

**UNIVERSITE MONTPELLIER II**  
- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC -

## **THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II**

DISCIPLINE : PALEOGENETIQUE ET EVOLUTION MOLECULAIRE  
ECOLE DOCTORALE : SYSTEMES INTEGRES EN BIOLOGIE, AGRONOMIE, GEOSCIENCES,  
HYDROSCIENCES, ENVIRONNEMENT (SIBAGHE)

### **ORGANISATION GENETIQUE DES POPULATIONS D'ESTURGEON EUROPEEN *ACIPENSER STURIO* : PASSE, PRESENT, FUTUR.**

PAR

**OLIVIER CHASSAING**

SOUS LA DIRECTION DE

**PATRICK BERREBI (ISEM) ET CATHERINE HÄNNI (IGFL)**

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 13 DECEMBRE 2010  
DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

- |  |                    |
|--|--------------------|
| ● M. Patrick BERREBI, Directeur de Recherche,<br>ISEM, Montpellier                 | Directeur de thèse |
| ● Mme Nathalie DESSE-BERSET, Ingénieur de Recherche,<br>CEPAM, Nice                | Examineur          |
| ● M. Emmanuel DOUZERY, Professeur,<br>ISEM, Montpellier                            | Examineur          |
| ● Mme Catherine HÄNNI, Directeur de Recherche,<br>IGFL, Lyon                       | Directeur de thèse |
| ● M. Hendrik POINAR, Professeur,<br>McMaster Ancient DNA Center, Hamilton (Canada) | Rapporteur         |
| ● M. Eric ROCHARD, Directeur de Recherche,<br>CEMAGREF, Cestas                     | Rapporteur         |



*A mon père,  
Gérard Chassaing,  
parti trop tôt*

*« Il faut se rendre compte que nous ne sommes qu'une espèce parmi des millions d'autres [...]. Au nom de quoi, nous, qui sommes apparus sur cette planète il y a juste une microseconde géologique, devrions-nous être responsables d'un monde vieux de 4 milliards et demi d'années, regorgeant d'espèces biologiques qui ont évolué et se sont diversifiées pendant au moins les trois quarts de cette immense durée ? La Nature n'existe pas pour nous, n'avait pas la moindre idée de notre venue, et se fiche complètement de nous ».*

Stephen Jay Gould, *Comme les Huit Doigts de la Main*, 1993.

# REMERCIEMENTS

Merci à Patrick Berrebi d'avoir été directeur de ma thèse, de m'avoir toujours fait confiance et de m'avoir soutenu et encouragé dans les moments difficiles. Adeptes de la bonne humeur, de l'ouverture d'esprit et de la diplomatie, il m'a fait découvrir les bons côtés de la recherche et de la collaboration.

Merci à Catherine Hänni d'avoir été co-directrice de ma thèse et de m'avoir permis de travailler dans des conditions matérielles idéales dans l'équipe Paléogénétique et Evolution Moléculaire de l'IGFL, ainsi que sur la plateforme Nationale Palgene du CNRS. Merci aussi de sa confiance et de son soutien, même si nous n'étions pas toujours sur la même longueur d'onde.

Je tiens à remercier Nathalie Desse-Berset pour son expertise archéozoologique et pour la fourniture des échantillons archéologiques des sites du Jardin d'Hiver, de Montmajour, de Troia, de St-Germain d'Esteuil, de Langon et de Ponthezières dont elle a la charge. Nathalie nous a aussi aidé à échantillonner certains spécimens de musée (avec l'aimable participation de Valentin Radu).

Merci également à Gaël Piquès pour son expertise archéozoologique et pour la mise à disposition des échantillons archéologiques des sites de Lattes et du Parc St-Georges.

Merci à Laurent Brosse pour l'aide qu'il a apporté à l'étude des esturgeons du Rhône, en particulier par ses travaux d'écologie et par l'échantillonnage qu'il a réalisé sur certains spécimens de musée. Le projet "esturgeons du Rhône" a été impulsé par Mario Lepage (Cemagref Bordeaux) et l'association MRM (Arles) : sans eux non plus je n'aurais pas travaillé sur les esturgeons.

Merci ensuite à tous les responsables des musées d'histoire naturelle dans lesquels nous avons échantillonné des esturgeons. Je sais que cela leur a parfois coûté de nous voir repartir avec un morceau de leur(s) esturgeon(s), mais j'espère qu'ils seront satisfaits des résultats et que cela les encouragera à continuer dans la voie de l'ouverture. Je tiens à remercier en particulier Patrice Pruvost, Romain Causse et Zora Gabsi du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris, Marie-Laure Guérin et Thierry Boisgard du Muséum de Nantes, Olivier Gerriet du muséum de Nice,

Armand Fayard et Philippe Candegabe du Muséum de Grenoble, Joël Clary et Jean-Louis Martelli du Musée des Confluences de Lyon, Adeline Rouilly du Muséum de Nîmes, Pierre Dalous et Brian Aiello du muséum de Toulouse, Nathalie Mémoire du muséum de Bordeaux et Stefano Vanni du Musée 'La Specola' de Florence pour leur accueil chaleureux et leur aide. Je remercie également Sonia Fisch-Muller du muséum de Genève, Sylvie Pichard du muséum de Marseille, Evelyne Crégut du musée Requier d'Avignon et Dumitru Murariu du muséum de Bucarest, responsables que je n'ai malheureusement pas rencontré personnellement.

Merci aussi à tous les scientifiques intéressés par les esturgeons avec qui j'ai pu discuter, que ce soit lors de visites ou en congrès. Eric Rochard du Cemagref de Bordeaux, qui m'a ouvert les portes de la station biologique de St-Seurin et avec qui le courant est tout de suite passé. Arne Ludwig de l'Institut zoologique de Berlin en Allemagne, qui s'est impliqué durant mon Master en nous fournissant des échantillons d'*A. oxyrinchus* ; son aide dans l'analyse des microsatellites fut également précieuse. Leonardo Congiu de l'Université de Padoue en Italie, qui nous a fourni des échantillons d'*A. naccarii*, et avec qui j'ai pu discuter 'philosophie de la recherche' dans un bar pékinois. Radu Suciuc de la Station biologique du Danube de Tulcea en Roumanie, pour son accueil bienveillant et sa passion communicative des esturgeons du Danube. Patrick Williot retraité du Cemagref de Bordeaux, qui nous a fourni des échantillons d'*A. sturio* de la station de St-Seurin. Samuel Toucanne de l'IFREMER de Plouzané, pour d'intéressantes discussions paléogéographiques.

Merci aux membres du CEFE et de l'ISEM qui ont appris à me connaître pendant mon Master et qui ont toléré mes passages éclairs à Montpellier pendant la thèse. Je remercie tout particulièrement les membres de l'équipe Métapopulation, Conservation et Coévolution de l'ISEM – partis ou encore présents – et en particulier Pierre-Alexandre Gagnaire, Sophie Dubois, Zhaojun Shao, Fabienne Justy et Christelle Tougard (remerciement spécial à toi Christelle, pour la relecture de l'intégralité de la thèse !!!). Merci également à Erick Desmarais et Frédérique Cerqueira, pour leur aide ainsi que pour les discussions partagées dans la salle du séquenceur.

Merci à tous les membres de l'ENS de Lyon que j'ai côtoyé au quotidien durant ma thèse, que ce soit dans mes activités de recherche ou d'enseignement, ils se reconnaîtront. Avec une dédicace spéciale à tous les membres de l'équipe Paléogénétique et Evolution Moléculaire, actifs ou exilés. Ils ont su supporter mon côté maniac sans prendre peur, ma science du timing sans perdre patience (j'ai toujours pensé qu'il y avait un trou noir à côté de la Plateforme, Ludo aussi je crois), et mon couple d'esturgeon en plastique chinois sans se moquer (enfin pas trop). Il s'agit bien sûr de Sandrine Hughes, toujours de bonne humeur sauf quand elle a la migraine... de Benjamin Gillet, rarement de bonne humeur sauf quand il va courir et qu'il encourage l'OL... de Ludovic Orlando, toujours partant pour la rigolade... de Marilynne Duffraisie, toujours disponible et coéquipière de choc aux mots fléch'... de Maud Pionnier, toujours souriante au stand des glaces (mais pas au stand des frites)... de Mohamed Mehreb, fort comme un turc et gentil comme un libanais... de Javier Oliver, à la persévérance proverbiale... de Bénédicte Bertrand, qui aimait les moutons roumains... de Marie Pagès, de qui j'ai hérité la meilleure paillasse, le meilleur bureau et les esturgeons du Rhône (merci pour tout)... de Sébastien Calvignac, coach de bad et de squash entre autres... de Muriel Gros-Balthazard, qui aime désormais les dattes... de Sophie Romero, de Yann Bourgeois et de Jérôme Gury. Remerciement spécial à Sandrine et Ludovic pour leur apport scientifique tout au long de la thèse, et à Sandrine et Benjamin pour leur relecture de parties de la thèse.

Merci enfin à tous mes amis et tous mes proches pour leur soutien indéfectible, même si certains ont pu croire que j'avais disparu pendant trois ans (mais en fait non). Merci en particulier à ma mère et à ma sœur.





# LISTES DE ABBREVIATIONS

**A** : adénine

**A. naccarii** : *Acipenser naccarii*, communément appelé esturgeon de l'Adriatique

**A. oxyrinchus** : *Acipenser oxyrinchus*, communément appelé esturgeon atlantique

**A. sturio** : *Acipenser sturio*, communément appelé esturgeon européen ou esturgeon commun

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADNmt** : ADN mitochondrial

**ADNnuc** : ADN nucléaire

**ADNa** : ADN ancien

**ap. J.-C.** : après Jésus-Christ

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNt** : ARN de transfert

**ARNr** : ARN ribosomal

**ARN 12S** : gène mitochondrial codant l'ARNr 12S

**ARN 16S** : gène mitochondrial codant l'ARNr 16S

**av. J.-C.** : avant Jésus-Christ

**BP** : before present (âge en prenant 1950 comme référence)

**C** : cytosine

**CITES** : Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction)

**CMH** : Complexe Majeur d'Histoincompatibilité

**COX (1, 2, 3)** : gènes mitochondriaux codant les sous-unités 1, 2 et 3 de la cytochrome oxidase

**Cyt b** : gène mitochondrial du cytochrome b

**Dlo5'** : fragment de 250 bp (209 sans les amorces) de la région de contrôle des esturgeons, amplifié avec les amorces Hétérol et Hétéroll.

**Dloop** : portion de la région de contrôle de l'ADNmt (par abus de langage dans le texte, Dloop est souvent utilisé comme synonyme de région de contrôle de l'ADNmt)

**G** : guanine

**IGB** : Institut für Gewässerökologie und Binnenfischei in Berlin (Institut d'Ecologie aquatique et des Pêches de Berlin)

**Indel** : insertion-délétion dans une séquence ADN

**IUCN** : International Union for Conservation of Nature (Union Internationale pour la Conservation de la Nature)

**kb** : milliers de paires de bases

**ka** : milliers d'années

**LGM** : Late Glacial Maximum (dernier maximum glaciaire, 30-25 ka BP)

**Ma** : millions d'années

**NADH (1 à 6)** : gènes mitochondriaux codant les sous-unités 1 à 6 de la NADH déshydrogénase

**Ne** : taille efficace d'une population (correspond au nombre de reproducteurs)

**pb** : paires de bases

**PCR** : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

qPCR : PCR quantitative ou en temps réel

**Py** : base pyrimidique

**T** : thymine

**Taq** ou **Taq polymérase** : ADN polymérase de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (plus ou moins modifiée), utilisée pour répliquer l'ADN lors des PCRs.

## TITRE

Organisation génétique des populations d'esturgeon européen *Acipenser sturio* : passé, présent, futur.

## RÉSUMÉ

L'esturgeon européen *Acipenser sturio* (Linnaeus, 1758) était un poisson commun de nos fleuves jusqu'au début du 20<sup>e</sup> siècle. Toutes ses populations sont maintenant éteintes sauf une qui survit dans le bassin Gironde-Garonne-Dordogne en France. Les données disponibles sur l'espèce restent très partielles car elles proviennent quasi exclusivement de cette population relictuelle. Au cours de cette thèse, plus d'une centaine d'échantillons anciens d'esturgeons – restes archéologiques ou spécimens naturalisés conservés dans les muséums d'histoire naturelle – ont été analysés grâce aux méthodes de la paléogénétique. Ces analyses génétiques ont été réalisées sur l'ADN mitochondrial (surtout la Dloop) ainsi que sur cinq loci microsatellites qu'il a été nécessaire d'adapter aux méthodes d'étude de l'ADN ancien. Les données paléogénétiques obtenues ont permis d'étudier : 1) les relations de l'esturgeon européen avec les autres espèces d'esturgeons vivant ou ayant vécu en Europe, en particulier l'esturgeon de l'Adriatique *A. naccarii* et l'esturgeon atlantique *A. oxyrinchus*. 2) la diversité génétique de l'esturgeon européen sur l'ensemble de son ancienne aire de répartition. 3) la diversité génétique d'une population d'esturgeon européen au cours du temps – la population du Rhône –, d'une période où elle était florissante jusqu'à son extinction. L'ensemble de ces données ont été discuté à la lumière de la conservation de l'espèce, qui est aujourd'hui en danger critique d'extinction.

## MOTS-CLEFS

Esturgeons, *Acipenser sturio*, *Acipenser naccarii*, *Acipenser oxyrinchus*, ADN ancien, Paléogénétique, Microsatellites, Génétique de la Conservation, Phylogénie, Etude Diachronique.

## TITLE

Genetics of the European sturgeon *Acipenser sturio*: past, present and future.

## ABSTRACT

The European sturgeon *Acipenser sturio* (Linnaeus, 1758) was a common fish of our rivers until the beginning of the 20<sup>th</sup> century. All populations are now extinct except one which survives in the Gironde-Garonne-Dordogne basin in France. Data available on this species are only partial because they only stem from this relictual population. During this thesis, more than one hundred ancient sturgeon samples – archaeological remains or naturalized museum specimens – were analysed by paleogenetics means. These genetics analyses were carried out on mitochondrial DNA (mainly the Dloop) and five microsatellites loci which were adapted to ancient DNA methodologies. Paleogenetics data that we obtained were used to study : 1) *A. sturio* interactions with other sturgeon species which live or lived in Europe, especially the Adriatic sturgeon *A. naccarii* and the atlantic sturgeon *A. oxyrinchus*. 2) the genetic diversity of *A. sturio* all over its former geographical range. 3) genetic diversity of a population of the European sturgeon through time – the Rhone River population – from a period it was flourishing until its extinction. All these data were considered in the light of the species conservation, since *A. sturio* is now critically endangered.

## DISCIPLINE

Paléogénétique et Evolution moléculaire

## KEYWORDS

Sturgeons, *Acipenser sturio*, *Acipenser naccarii*, *Acipenser oxyrinchus*, Ancient DNA, Paleogenetics, Microsatellites, Conservation Genetics, Phylogeny, Dichronic Study.

## INTITULE ET ADRESSE DES LABORATOIRES

Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier (I.S.E.M.) - Unité Mixte de Recherche UMII - CNRS (UMR 5554) - Université de Montpellier II - CC 065 – Place Eugène Bataillon 34095 Montpellier Cedex 05.

Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon - Université de Lyon / Université Lyon 1 / CNRS / INRA (UMR5242) - Ecole Normale Supérieure de Lyon - 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France.

# SOMMAIRE

AVANT PROPOS	1
<b><u>I- INTRODUCTION GENERALE : ESTURGEONS, BIOLOGIE DE LA CONSERVATION ET PALEOGENETIQUE</u></b>	<b>2</b>
<b><u>I-A PREAMBULE</u></b>	<b>4</b>
<i>I-A-1 BIAIS DE REPRESENTATIONS</i>	4
<i>I-A-2 CONSIDERATIONS SUR LES ESTURGEONS</i>	6
<b><u>I-B LES ESTURGEONS, OSTEICHTYENS SUR LE DECLIN</u></b>	<b>10</b>
<i>I-B-1 UNE VINGTAIN D'ESPECES, TOUTES MENACEES</i>	10
I-B-1-a Morphologie générale	
I-B-1-b Position systématique parmi les Vertébrés	
I-B-1-c Phylogénie des Acipenséridés	
I-B-1-d- Cycle de vie	
I-B-1-e- Distribution des espèces et histoire évolutive	
I-B-1-f- Caractéristiques génétiques et conséquences	
I-B-1-g- Menaces actuelles et conservation	
<i>I-B-2 L'ESTURGEON EUROPEEN ACIPENSER STURIO, UNE ESPECE AUTREFOIS ABONDANTE AUJOURD'HUI AU BORD DE L'EXTINCTION</i>	27
I-B-2-a Présentation de l'espèce	
I-B-2-b Une espèce originellement paneuropéenne	
I-B-2-c De l'abondance à l'extinction (ou presque)	
I-B-2-d Le sauvetage en cours de la population girondine	
I-B-2-e Statut actuel et perspectives de sauvegarde	
<b><u>I-C PALEOGENETIQUE ET BIOLOGIE DE LA CONSERVATION AU CHEVET DES ESTURGEONS</u></b>	<b>39</b>
<i>I-C-1 QU'EST-CE QUE LA PALEOGENETIQUE ?</i>	39
I-C-1-a L'étude de l'ADN ancien	
I-C-1-b Histoire abrégée	
I-C-1-c Utilisations des données paléogénétiques	

<i>I-C-2 BIOLOGIE DE LA CONSERVATION ET PALEOGENETIQUE</i>	52
<i>I-C-2-a La biologie de la conservation, discipline de crise</i>	
<i>I-C-2-b Apports de la génétique de la conservation</i>	
<i>I-C-2-c Plus-value apportée par la paléogénétique</i>	

<b><u>I-D PROBLEMATIQUES</u></b>	67
----------------------------------	----

<i>I-D-1 RELATIONS ENTRE ESPECES D'ESTURGEONS EN EUROPE</i>	67
<i>I-D-2 L'ESTURGEON EUROPEEN AVANT SON DECLIN</i>	67
<i>I-D-3 IMPLICATIONS POUR LA CONSERVATION DE L'ESTURGEON EUROPEEN</i>	68

<b><u>II- RELATIONS ENTRE LES ESPECES EUROPEENNES D'ESTURGEONS ACIPENSER STURIO, A. OXYRINCHUS ET A. NACCARII</u></b>	69
---	----

<b><u>II-A DISTRIBUTIONS</u></b>	71
----------------------------------	----

<i>II-A-1 AIRES DE REPARTITION ACTUELLES</i>	71
<i>II-A-2 AIRES DE REPARTITION HISTORIQUES</i>	73
<i>II-A-2-a Relevés de captures</i>	
<i>II-A-2-b Apports des études morphologiques et paléogénétiques</i>	
<i>II-A-2-c Questions en suspens</i>	

<b><u>II-B DETERMINATION DES ESPECES</u></b>	76
--	----

<i>II-B-1 DISCRIMINATION SUR LA BASE DE CRITERES MORPHOLOGIQUES</i>	76
<i>II-B-1-a Critères de reconnaissance</i>	
<i>II-B-1-b Limites de la morphologie</i>	
<i>II-B-2 DISCRIMINATION SUR LA BASE DE CRITERES GENETIQUES</i>	78
<i>II-B-2-a Les marqueurs mitochondriaux</i>	
<i>II-B-2-b Les marqueurs nucléaires</i>	

<b>ARTICLE N°1 : DISTINGUISHING SPECIES OF EUROPEAN STURGEONS USING MICROSATELLITE ALLELE SEQUENCES.</b>	89
--	----

<i>II-B-2-c Discussion des résultats obtenus</i>	
--	--

<b><u>II-C SYMPATRIES ET HYBRIDATIONS</u></b>	<b>119</b>
<i>II-C-1 LE CAS A. STURIO – A. NACCARII</i>	119
II-C-1-a Paradigme en place il y a 20 ans	
II-C-1-b <i>A. naccarii</i> en Méditerranée occidentale : une remise en cause... discutée	
II-C-1-c Apports des données de cette thèse	
II-C-1-d Bilan et perspectives	
<i>II-C-2 LE CAS A. STURIO – A. OXYRINCHUS</i>	134
II-C-2-a Paradigme en place il y a 20 ans	
II-C-2-b <i>A. oxyrinchus</i> en Mer Baltique : une remise en cause... rapidement acceptée	
II-C-2-c <i>A. oxyrinchus</i> en Europe hors de la Baltique	
II-C-2-d <i>A. oxyrinchus</i> en Europe hors de la Baltique : apport de cette thèse	
<b>ARTICLE N°2 : AN AMERICAN STURGEON IN FRANCE, PALEOGENETIC EVIDENCE.</b>	<b>147</b>
II-C-2-e Sur les limites de la distribution géographique d' <i>A. oxyrinchus</i> en Europe	
<i>II-C-3 CONCLUSIONS</i>	193

### **III- DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ L'ESTURGEON EUROPEEN** **ACIPENSER STURIO** **195**

<b><u>III-A COMMENT LA MESURER ?</u></b>	<b>197</b>
<i>III-A-1 LA MORPHOLOGIE</i>	197
<i>III-A-2 L'ADN MITOCHONDRIAL</i>	198
III-A-2-a La zone la plus variable : la région de contrôle	
III-A-2-b Caractéristiques de la région de contrôle de l'ADNmt des esturgeons	
III-A-2-c Utilisation de la région de contrôle comme marqueur de diversité intraspécifique chez <i>A. sturio</i>	
III-A-2-d Sur la qualité des séquences mitochondriales anciennes obtenues	
<i>III-A-3 L'ADN NUCLEAIRE : CHALLENGE DES MICROSATELLITES</i>	227
III-A-3-a Les microsatellites : généralités	
III-A-3-b Les microsatellites appliqués à l'ADN ancien : synthèse bibliographique	
III-A-3-c Les microsatellites appliqués à l'ADN ancien : sélection des locus	
III-A-3-d Les microsatellites appliqués à l'ADN ancien : protocole d'amplification	
III-A-3-e Les microsatellites appliqués à l'ADN ancien : génotypage	
III-A-3-f Les microsatellites appliqués à l'ADN ancien : séquençage	
III-A-3-g Résultats par locus	
III-A-3-h Sur la qualité des données microsatellites obtenues	
III-A-3-i Implications pour les analyses futures	

<b><u>III-B DIVERSITE DANS L'ESPACE : PHYLOGEOGRAPHIE DE L'ESPECE SUR SON AIRE DE REPARTITION HISTORIQUE</u></b>	<b>300</b>
<i>III-B-1 QU'EST-CE QUE LA PHYLOGEOGRAPHIE ?</i>	300
III-B-1-a Une discipline dérivée de la biogéographie	
III-B-1-b Origine des patrons phylogéographiques	
<i>III-B-2 L'UNITE PHYLOGEOGRAPHIQUE DE BASE : LA POPULATION</i>	301
III-B-2-a Qu'est ce qu'une population d'esturgeons européen ?	
III-B-2-b A la recherche des populations fonctionnelles historiques d' <i>A. sturio</i>	
<i>III-B-3 ETUDE PHYLOGEOGRAPHIQUE D'A. STURIO : MODUS OPERANDI</i>	305
III-B-3-a Sur la fragmentation des données : échelle spatiale	
III-B-3-b Sur la fragmentation des données : échelle temporelle	
<i>III-B-4 PHYLOGEOGRAPHIE MITOCHONDRIALE</i>	307
III-B-4-a Données disponibles	
III-B-4-b Structuration génétique	
<i>III-B-5 PHYLOGEOGRAPHIE NUCLEAIRE</i>	333
III-B-5-a Données disponibles	
III-B-5-b Disparités géographiques de la diversité génétique	
III-B-5-c Structuration populationnelle et tests d'assignation	
<i>III-B-6 DISCUSSION DES DONNEES PHYLOGEOGRAPHIQUES</i>	353
III-B-6-a Structuration géographique de la diversité génétique au niveau des grandes zones biogéographiques	
III-B-6-b Structuration géographique de la diversité génétique au niveau populationnel	
III-B-6-c Origine de la diversité génétique et facteurs ayant influencé sa répartition	
III-B-6-d Comparaison avec <i>A. oxyrinchus</i> en Amérique	
<b><u>III-C SUIVI DANS LE TEMPS DE LA POPULATION RHODANIENNE</u></b>	<b>368</b>
<i>III-C-1 DONNEES HISTORIQUES SUR LA POPULATION DU RHONE</i>	369
III-C-1-a Jadis une population florissante	
III-C-1-b Une extinction rapide	
<i>III-C-2 ECHANTILLONS BIOLOGIQUES DISPONIBLES SUR LE RHONE</i>	371
III-C-2-a Spécimens de muséum, naturalisés ou alcoolisés	
III-C-2-b Restes archéologiques	
<i>III-C-3 RESULTATS PALEOGENETIQUES ET DISCUSSION</i>	375
III-C-3-a Apports des données mitochondriales	
III-C-3-b Apports des données nucléaires	

<i>III-C-4 Discussion</i>	383
III-C-4-a La population ancienne du Rhône : une population d'esturgeon équilibrée	
III-C-4-b Suivi temporel de la population du Rhône	
III-C-4-c Comparaison avec la population de Gironde	
<b><u>IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u></b>	<b>388</b>
<b><u>IV-A BILAN</u></b>	389
<i>IV-A-1 APPORT MAJEUR DE LA PALEOGENETIQUE</i>	389
<i>IV-A-2 DES OUTILS POUR MIEUX CONNAITRE LA GENETIQUE DES ESTURGEONS</i>	390
IV-A-2-a Sur l'ADN mitochondrial	
IV-A-2-b Sur l'ADN nucléaire	
<i>IV-A-3 MIEUX CONNAITRE L'ESTURGEON EUROPEEN...</i>	391
IV-A-3-a Caractériser les populations anciennes	
IV-A-3-b Relativiser le statut de la dernière population survivante	
<i>IV-A-4 ...POUR MIEUX LE PROTEGER</i>	393
IV-A-4-a Sur le risque d'hybridation	
IV-B-4-b Sur la diversité génétique	
IV-B-4-c Sur la capacité de recolonisation spontanée	
IV-B-4-d Sur les réintroductions	
<b><u>IV-B PERSPECTIVES</u></b>	397
<i>IV-B-1 Phylogéographie</i>	397
IV-B-1-a Sur l'esturgeon européen	
IV-B-1-b Sur l'esturgeon atlantique	
IV-B-1-c Sur l'esturgeon adriatique	
<i>IV-B-2 Génomique</i>	398
IV-B-2-a Analyse fine de l'hybridation entre <i>A. sturio</i> et <i>A. oxyrinchus</i>	
IV-B-2-b Statut de la population de Gironde	
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	400
<b>ANNEXE 1</b>	435
<b>ANNEXE 2</b>	442



<b>ANNEXE 3</b>	447
<b>ANNEXE 4</b>	451
<b>ANNEXE 5</b>	455
<b>ANNEXE 6</b>	459

## **AVANT PROPOS**

Cette thèse compte quatre parties et comprend six annexes. Les références aux annexes dans le texte sont ponctuelles, limitant les allers-retours au minimum.

Chaque partie (sauf la partie IV de conclusion) est précédée d'un résumé en français et en anglais.

Cette thèse inclut trois articles rédigés (articles n°1 et n°2 dans le chapitre II, article n°6 dans l'annexe 6) dont un accepté dans *Journal of Fish Biology* (article n°1). Trois autres articles (articles n°3, n°4 et n°5 ; chapitre III) sont en préparation ; les brouillons ne sont pas présentés mais les résultats correspondants ont été inclus dans le manuscrit en français. Ces trois articles sont susceptibles d'être ultérieurement fusionnés en deux articles ou même en un seul.

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION GENERALE : ESTURGEONS, BIOLOGIE DE LA CONSERVATION ET PALEOGENETIQUE.

### **RESUME :**

Les esturgeons forment un groupe ancien de Vertébrés dont l'origine remonte au Jurassique, il y a plus de 150 Ma. Toutes les espèces d'esturgeons sont classées sur la liste rouge IUCN des espèces menacées. L'esturgeon européen *A. sturio* ne fait pas exception puisqu'il est au bord de l'extinction. Une seule population subsiste actuellement en Gironde, contre plusieurs dizaines auparavant à travers l'Europe.

La paléogénétique permet d'analyser l'ADN contenu dans les restes biologiques anciens. Une multitude d'applications de cette nouvelle discipline existent, incluant la génétique des populations disparues. Les informations apportées par la paléogénétique peuvent être utiles à la conservation des espèces ou populations actuelles, en mettant en lumière les événements passés.

L'objectif de cette thèse est d'appliquer la paléogénétique au cas de l'esturgeon européen, afin de documenter l'histoire évolutive de l'espèce et d'en tirer des informations utiles pour la conservation de la dernière population restante et plus généralement pour la conservation des esturgeons.

### **ABSTRACT:**

Sturgeons constitute a very old group of Vertebrates which originated in the Jurassic, more than 150 Mya. All sturgeon species are listed on the IUCN red list of endangered species. The European sturgeon *A. sturio* is no exception as it is on the edge of extinction. Only one population remains in the Gironde, where dozens formerly existed across Europe.

Paleogenetics opens the access to DNA preserved in ancient biological remains. Applications of this relatively new discipline are numerous, including genetics of extinct populations. Shedding light on past evolutionary and demographic events can help to the conservation of current species or populations.

The aim of this thesis is to apply paleogenetics methodologies to the case of the European sturgeon, in order to gather informations about the evolutionary history of the species which can be helpful for the conservation of the last remaining population and more generally for the conservation of sturgeons.

### I- INTRODUCTION GENERALE : ESTURGEONS, BIOLOGIE DE LA CONSERVATION ET PALEOGENETIQUE

#### I-A PREAMBULE

##### ***I-A-1 BIAIS DE REPRESENTATIONS***

Les Primates, dont l'Homme fait parti, sont des animaux visuels par excellence. Nous ignorons donc bien souvent ce qui ne se voit pas, et nous accordons souvent une importance disproportionnée aux choses qui nous sont familières ou qui nous impressionnent.

Ainsi parmi les êtres vivants, les microorganismes ne font l'objet de l'intérêt que des scientifiques, des industriels et de quelques amateurs éclairés, alors que les animaux se taillent la part du lion. Et en parlant de lion, c'est bien entendu les Mammifères qui sont au centre de notre intérêt puisqu'ils constituent la majorité des animaux qui nous sont « visibles ». Les premiers animaux qu'un enfant saura nommer seront ainsi souvent le chien, le chat, l'éléphant ou l'ours... rarement le hanneton ou la limace. Au jeu de la popularité, les animaux « non visibles », tels que ceux qui vivent sous la terre, sous l'eau ou bien la nuit, sont désavantagés. Il en est ainsi des Poissons (au sens large d'animaux aquatiques à nageoires et branchies), qu'on ne voit que rarement – dans les eaux claires, dans les aquariums ou dans le filet des pêcheurs. Un proverbe africain dit d'ailleurs avec raison que « *parce qu'il vit dans l'eau, lorsqu'il pleure on ne voit pas les larmes du poisson* ».

Ce biais de représentation - je le vois c'est important, je ne le vois pas ça n'existe pas - a de fâcheuses conséquences en ce qui concerne l'inventaire et la conservation de la biodiversité. A notre époque qualifiée de sixième extinction de masse (Leakey & Lewin 1995 ; Glavin 2007 ; Wake & Vredenburg 2008), l'extinction ou la menace d'extinction d'un Mammifère nous préoccupe beaucoup plus que dans

le cas d'un Amphibien, d'un Poisson ou d'un Insecte (sauf en cas d'espèce « utile » à l'Homme). Plusieurs dizaines d'espèces de Mollusques et plusieurs centaines d'espèces d'Insectes disparaissent sans doute chaque année (Dunn 2005 ; Regnier *et al.* 2009), mais ces disparitions passent presque inaperçues à côté de la menace qui pèse sur certaines des 5 487 espèces de Mammifères (Schipper *et al.* 2008), tels le guépard ou le rhinocéros. Les efforts de conservation sont donc très concentrés sur quelques taxons – utiles à l'homme ou agréables à regarder – et sont très dilués voire inexistantes pour tous les autres.

Concernant les Poissons, les espèces commerciales (consommation, ornementation...) sont étudiées intensivement, les autres sont au mieux marginalisées, au pire ignorées (hormis quelques exceptions comme les espèces modèles type Poisson-zèbre).

Ainsi sur les 16 000 espèces de Poissons marins, les 5% faisant l'objet d'un suivi scientifique sont essentiellement celles qui sont pêchées, telles les thons, morues, requins... (Reynolds *et al.* 2005). Les effectifs étant plus difficiles à estimer que pour les animaux terrestres, la sonnette d'alarme est souvent tirée très tard, alors que les stocks ont atteint un niveau dangereusement bas. Les pêcheries industrielles non régulées ont ainsi contribué à décimer les stocks de nombreuses espèces marines, qui ne s'en remettent pas avant plusieurs dizaines d'années (Hutchings 2000) ; et même quand des quotas stricts sont imposés, ils ne sont pas toujours respectés, par exemple pour le thon rouge (Figure I-1).

Des espèces autrefois abondantes dans les rivières de nos régions ont également quasiment disparues du milieu naturel, telles le saumon ou l'esturgeon (Birstein 1993 ; Parrish *et al.* 1998). Heureusement, une prise de conscience est en train de s'opérer, mais pour beaucoup d'espèces, n'est-il pas déjà trop tard ?



**Figure I-1 :** Dessin humoristique de Plantu paru dans le journal *Le Monde* daté du Mercredi 26 Novembre 2008, soit deux jours après la publication des quotas officiels de pêche au thon rouge pour 2009 par la Commission Internationale pour la Conservation des Thonidés de l'Atlantique (Cicta). Le dessin était accompagné du titre « L'excès de pêche au thon rouge met en péril la survie de l'espèce ». Les pêches effectives de 2008 ont dépassé le double des quotas officiels de la Cicta pour cette même année. (Téléchargé sur le site [www.lemonde.fr](http://www.lemonde.fr))

## **I-A-2 CONSIDERATIONS SUR LES ESTURGEONS**

La chair des esturgeons, d'une texture ferme proche de celle du veau et d'un goût fin, a été de tout temps particulièrement recherchée. La préparation des esturgeons permet également de fournir (i) de l'ichthyocolle (à partir de la vessie natatoire en particulier), très demandée avant l'invention des colles synthétiques (Holzkamm *et al.* 1988) ; à noter qu'un des anciens noms vernaculaire de l'espèce *Huso huso* est ainsi Ichthyocolle, et que Daubenton lui attribua le nom scientifique *Acipe ichthyocolle*, (ii) du cuir pouvant servir dans de multiples domaines tels que l'habillement ou la reliure de livres ; réalisé à partir de jeunes spécimens, le cuir d'esturgeon servait même d'après Cloquet (1819b) de carreaux de fenêtre dans la Russie du 18<sup>e</sup> siècle, (iii) de la graisse sous forme d'huiles et (iv) des œufs, mieux connus actuellement sous le nom de caviar, constitués d'œufs d'esturgeons tamisés (pour les séparer de la membrane ovarienne) et salés.

Toutes ces caractéristiques ont contribué à faire de la pêche à l'esturgeon une activité importante depuis des siècles. Par exemple en 1063, la charte d'Estiennette

comtesse de Provence, mentionne l'existence de bateaux sur le Rhône spécialement dédiés à la pêche de l'esturgeon (cité dans Cloquet 1819b).

La taille imposante d'un animal lui confère souvent un statut particulier, le rendant plus « visible » à nos yeux. L'esturgeon constitue bien souvent le plus gros animal présent dans les fleuves et rivières, pouvant atteindre plusieurs mètres suivant les espèces. Cette taille, couplée à la finesse de sa chair, ont fait de l'esturgeon un animal prestigieux depuis l'Antiquité.

Il était déjà considéré comme un met de luxe à la table des Grecs et des Romains sous le nom d'Acipenser ou d'Ellops (ce dernier terme étant discuté car il a aussi servi de terme générique pour décrire tous les poissons). Ovide le mentionne dans ses *Halieutiques* lorsqu'il liste de nombreux animaux aquatiques : «Viennent enfin [...] le goujon, si glissant et aux arrêtes inoffensives [...] ; l'aselle, peu digne d'un tel nom ; l'acipenser, fameux sur des bords étrangers » (Ovide vers 17 ap. J.-C.). Macrobe, écrivain de la fin de l'Antiquité romaine qui a repris les textes de multiples auteurs antiques, consacre à l'esturgeon le chapitre XII du livre 2 de ses *Saturnales* qu'il commence ainsi « L'esturgeon fut aussi compté, dans ce siècle, parmi les mets délicieux que la mer offre aux gourmands ». Il cite ensuite deux extraits d'autres auteurs romains qui appuient son propos ; le premier de Cicéron (103 - 46 av. J.-C.) issu du dialogue *Sur le destin* qui raconte que « Scipion était à sa bataille de Lavernium, avec Pontius, lorsqu'on lui apporta par hasard un esturgeon, poisson rare et très délicat » ; le second de Sammonicus Serenus (1<sup>er</sup> et 2<sup>e</sup> siècles de notre ère) qui s'exprime sur la noblesse de l'esturgeon dans une lettre adressée à l'empereur Septime Sévère en soulignant que « lorsque vous me faites l'honneur de me mettre au nombre de vos convives, je remarque que ce poisson [l'esturgeon] fait son entrée dans la salle à manger au son de la flûte, et escorté par vos gens couronnés de fleurs » (Macrobe vers 430 ap. J.-C.).

En Chine, l'esturgeon était réservé à l'empereur, et au Moyen-âge en Europe, il était le privilège des seigneurs et des rois d'après Cloquet (1819b). Ainsi sur le Rhône au court du Moyen-Âge, les seigneurs féodaux s'octroyaient de droit le premier esturgeon pêché de l'année (Vial 1904). Toujours aujourd'hui, il bénéficie de



cette image royale, et lorsqu'en 2004 un pêcheur britannique attrapa dans ses filets un esturgeon de plus de 2 mètres sur les côtes galloises, il fut dans l'obligation de l'offrir à la Reine (Figure I-2) ; elle permit au pêcheur d'en disposer, et après diverses péripéties le spécimen fut confié au muséum d'histoire naturelle de Londres, où il se trouve encore aujourd'hui (Anonyme 2004a, b).



**Figure I-2 :** L'esturgeon de « Sa Majesté » (Source : archives électroniques du Muséum d'Histoire Naturelle de Londres)

Si l'esturgeon est encore très recherché aujourd'hui, ce n'est plus tant parce que sa chair est particulièrement fameuse, mais surtout à cause de son caviar. Les ovaires d'esturgeons séchés et salés ont probablement été consommés depuis l'Antiquité, mais c'est plus récemment sur les bords de la Mer Noire et de la Mer Caspienne que la consommation des œufs d'esturgeons salés et séparés de leur protection ovarienne – caviar *stricto sensu* – s'est développée (Sternin & Doré 1998). En Russie, c'est après la conversion au Christianisme en 988 que la consommation de chair et d'œufs d'esturgeons a pris son essor, la consommation de viandes et de laitages étant interdite pendant les jeûnes. En France, il était déjà consommé au temps de Rabelais qui le mentionne en 1534 dans *La vie de Gargantua et de Pantagruel* (chapitre 60). Il fallut néanmoins attendre le début du 20<sup>e</sup> siècle pour que la consommation de caviar devienne vraiment importante. A certains endroits en

France au début du siècle dernier, les œufs d'esturgeons n'avait que peu de valeur et étaient parfois donnés à manger aux poules, comme quoi tout est question de mode.

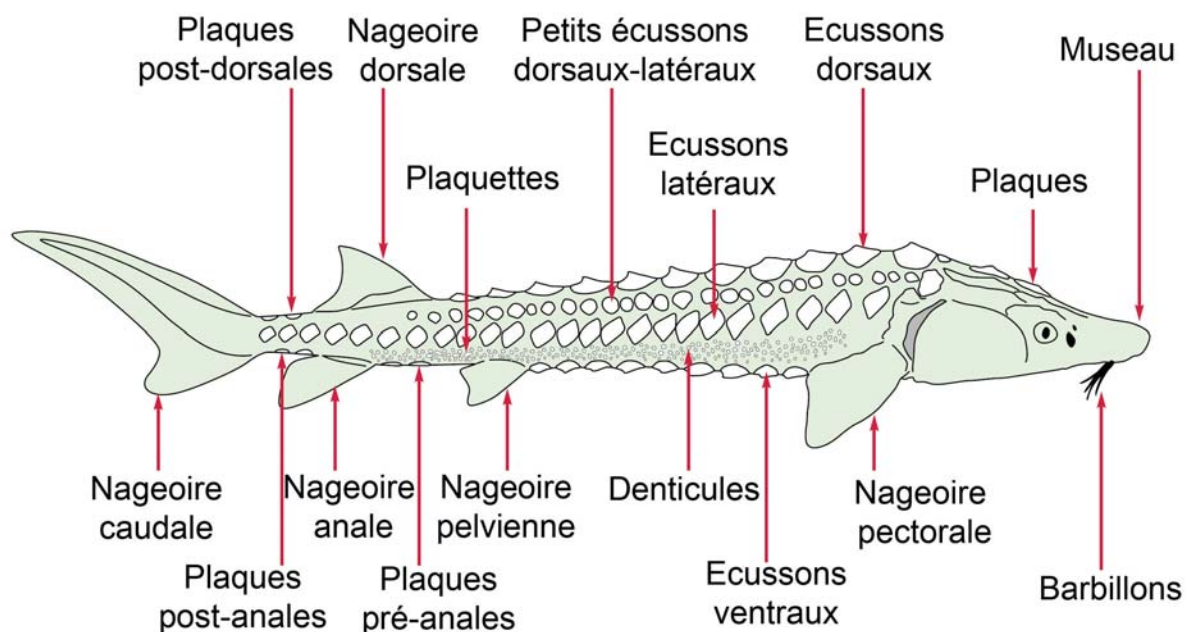
L'image de rareté et de luxe aujourd'hui associée à l'esturgeon pourrait bien causer sa perte, car la demande de caviar ne faiblit pas malgré la chute des effectifs naturels. Les prix du caviar s'envolent, atteignant plus de 5000 € le kilo pour le béluga, augmentant d'autant l'attractivité du braconnage. Heureusement, son image pourrait également sauver l'esturgeon, favorisant la prise de conscience de sa raréfaction par le grand public et les politiques, et alimentant les efforts de conservation le concernant.

**I-B LES ESTURGEONS, OSTEICHTYENS SUR LE DECLIN**

***I-B-1 UNE VINGTAIN D'ESPECES, TOUTES MENACEES***

I-B-1-a Morphologie générale

La figure I-3 présente les différents éléments morphologiques pouvant servir à distinguer les espèces d'esturgeons à partir d'un individu vivant (voir Vecsei 2001 pour une clef de détermination complète éditée par la convention sur le commerce international des espèces menacées d'extinction (CITES).



**Figure I-3 :** Critères morphologiques pouvant être utilisés pour distinguer les différentes espèces d'esturgeons (modifié d'après Vecsei 2001).

Les esturgeons sont principalement caractérisés au niveau morphologique par (i) la présence de cinq rangées longitudinales d'écussons osseux parcourant la totalité du tronc (deux rangées ventrales, deux latérales et une dorsale), (ii) un museau portant quatre barbillons (iii) le support de la nageoire pectorale par un aiguillon osseux. De nombreux autres critères morphologiques existent permettant de distinguer les esturgeons des autres Poissons, mais aussi les espèces

d'esturgeons entre elles (voir Findeis 1997 ; Artyukhin 2006 ; Grande & Hilton 2006 pour une liste exhaustive).

### I-B-1-b Position systématique parmi les Vertébrés

Règne : Animal

Embranchement : Chordé

Sous-embranchement : Vertébré

Super-classe : Ostéichtyen

Classe : Actinoptérygien

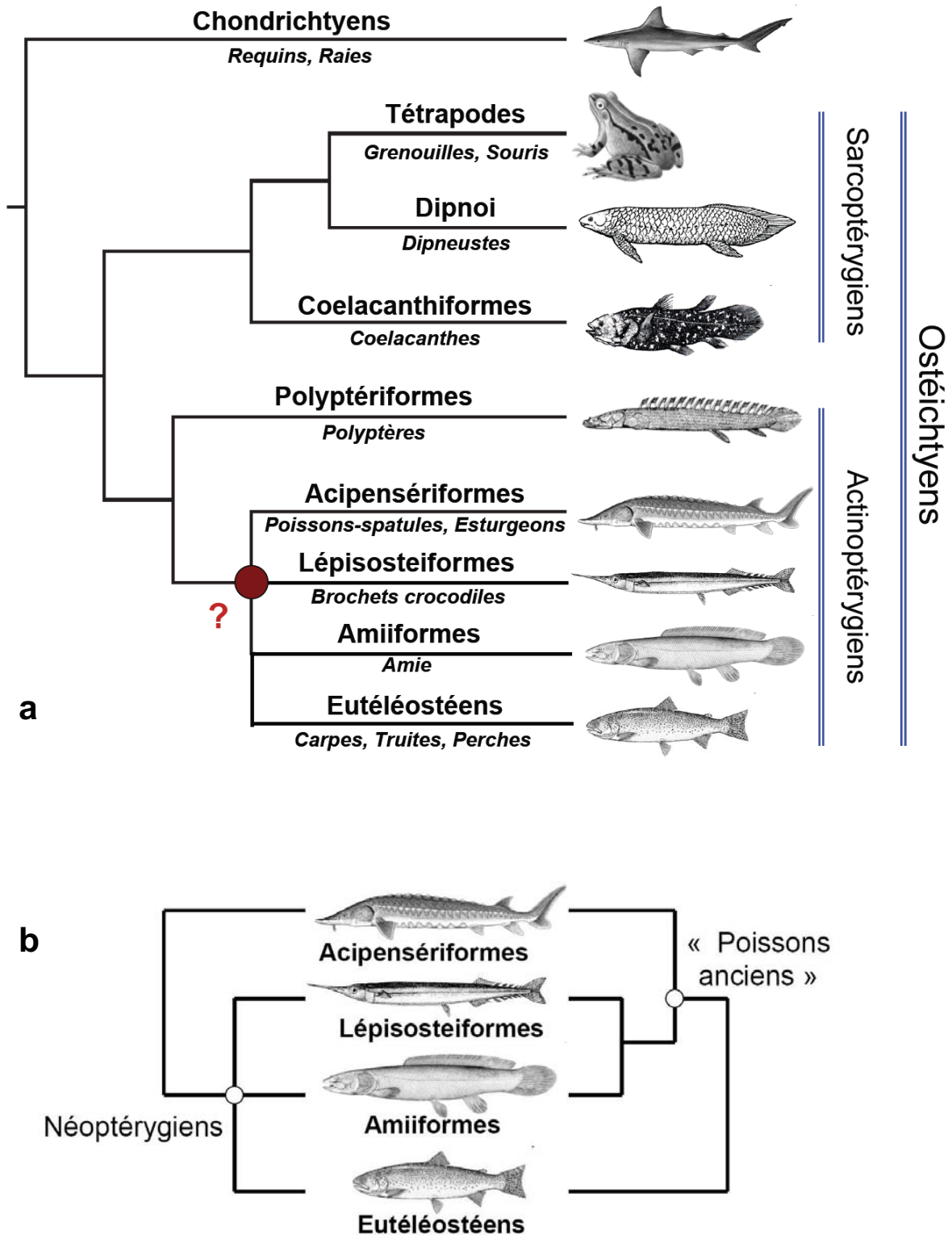
Sous-classe : Chondrostéen

Ordre : Acipensériforme

Famille : Acipenséridé

Les esturgeons appartiennent à la famille des Acipenséridés, dont l'étymologie viendrait d'après Oniga (1999) du latin *acus* signifiant aiguille et *pensum* signifiant botte de laine : Acipenser désignerait donc les poissons avec des barbes en aiguille de laine. Les Acipenséridés, avec la famille des Polyodontidés (les poissons spatules), constituent l'ordre des Acipensériformes, qui appartient au groupe des Vertébrés à nageoires rayonnées ou Actinoptérygiens, lui-même inclus dans le groupe des Vertébrés à squelette osseux ou Ostéichtyens (Figure I-4a). Au 18<sup>e</sup> siècle et jusqu'à la moitié du 19<sup>e</sup> siècle, les esturgeons étaient considérés de façon erronée comme proche des requins (appartenant au groupe des Chondrychiens, organismes à squelette cartilagineux), en raison de leur nageoire caudale hétérocerque (assymétrique) et de leur squelette en grande partie cartilagineux (voir par exemple Cloquet 1819a).

Parmi les Actinoptérygiens, le groupe le plus basal est constitué par les Polyptérimorphes ; les autres branchements sont discutés, Lépisostéiformes, Amiiiformes et Eutélostéens étant souvent regroupés pour former le groupe des Néoptérygiens (Nelson 1969 ; Lê *et al.* 1993 ; Bemis & Kynard 1997), mais certaines études plus récentes regroupent plutôt Lépisostéiformes, Amiiiformes et Acipensériformes pour former un clade de « Poissons anciens » (Venkatesh *et al.* 2001 ; Inoue *et al.* 2003) (Figure I-4b).



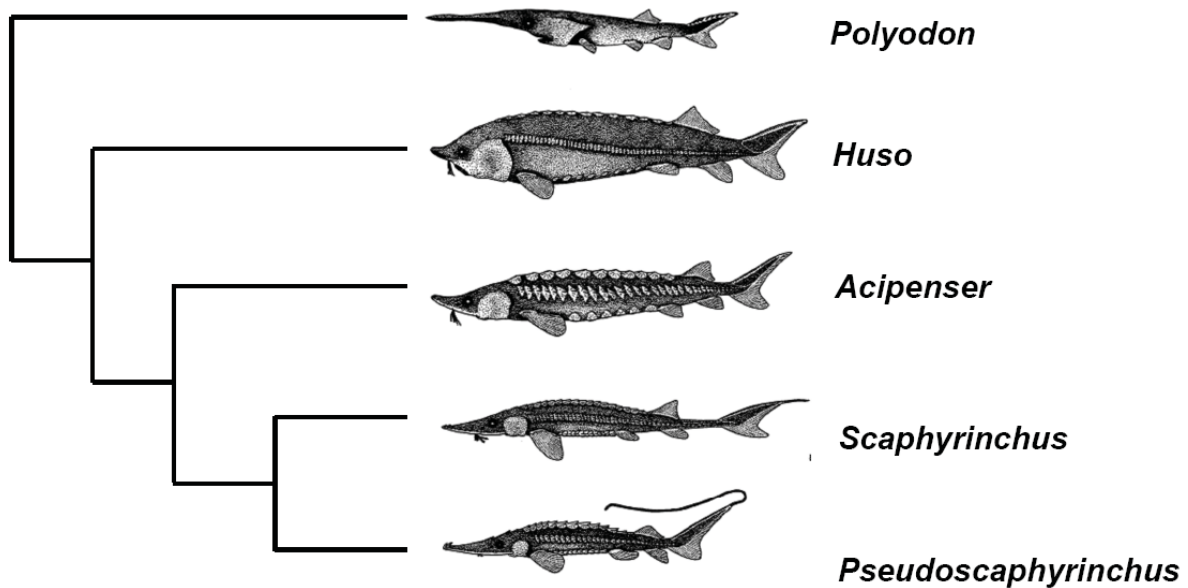
**Figure I-4 :** (a) Cladogramme indiquant la position des Acipensériformes dans la phylogénie des Vertébrés à mâchoires, d'après les données morphologiques de Nelson (1969) et Bemis *et al.* (1997) et les données moléculaires de Lê *et al.* (1993), Venkatesh *et al.* (2001), Artyukhin (2006), Inoue *et al.* (2003) et Hoegg *et al.* (2004). (b) Topologies alternatives pour la portion non résolue de la partie (a), modifiée d'après Hurley *et al.* (2007).

Les Acipensériformes sont représentés dans le registre fossile depuis le Jurassique Inférieur et existent donc depuis au moins 200 Ma (Gardiner 1984 ; Bemis & Kynard 1997), d'où le terme impropre de « fossiles vivants » qui leur est parfois attribué. Les plus anciens fossiles d'Acipensériformes appartiennent à des groupes aujourd'hui disparus tels les Chondrostéidés et les Peipiaostéidés, les plus anciens fossiles d'Acipenséridés identifiés remontant eux au Crétacé Supérieur entre -100 et -60 Ma (revue dans Grande & Hilton 2006).

### I-B-1-c Phylogénie des Acipenséridés

Si l'esturgeon au sens général du terme est bien connu du grand public (au moins par le caviar), les esturgeons dans leur diversité le sont moins. L'ordre des Acipensériformes compte en effet 27 espèces différentes comprenant deux espèces de poissons spatules (famille des Polyodontidés) et 25 espèces d'esturgeons (famille des Acipenséridés).

Les 25 espèces d'esturgeons se répartissent en quatre genres définis au cours du 19<sup>e</sup> siècle sur la base de critères morphologiques (Figure I-5) : le genre *Acipenser* (17 espèces) fut le premier décrit par Linné en 1758, puis vint le genre *Scaphirynchus* (3 espèces) par Heckel en 1836, le genre *Huso* (2 espèces) par Brandt en 1869 et enfin *Pseudoscaphirynchus* (3 espèces) par Nikolskii en 1900 (Bemis & Kynard 1997). La monophylie de ces genres est soutenue par les données morphologiques (Bemis & Kynard 1997 ; Findeis 1997 voir figure I-4), même si une analyse récente sur 28 caractères morphologiques place le genre *Huso* parmi les espèces du genre *Acipenser*, rendant ce dernier paraphylétique (Artyukhin 2006).

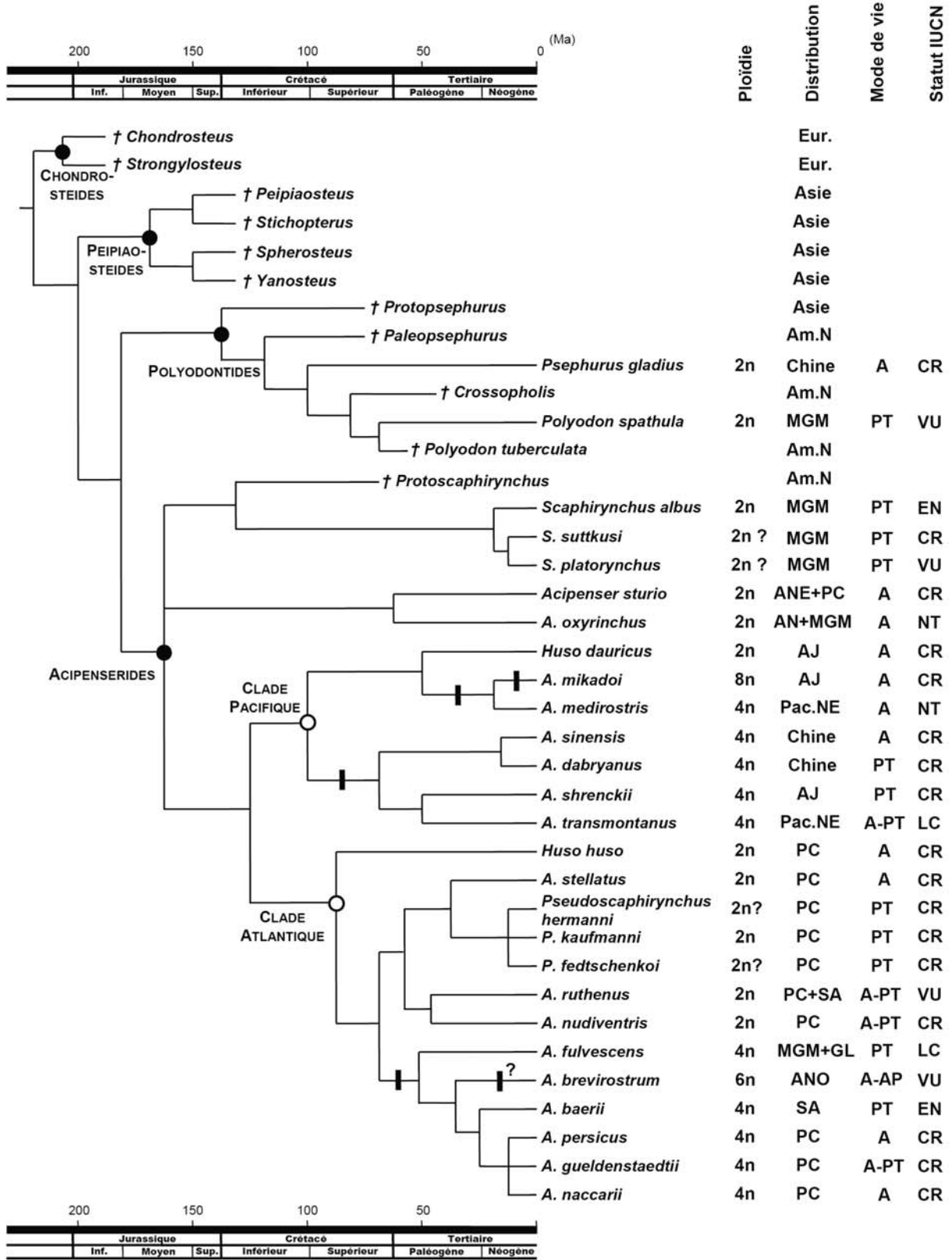


**Figure I-5 :** Cladogramme représentant les relations entre genre d'Acipensériformes basées sur 69 caractères morphologiques d'après Findeis (1997). Le genre *Polyodon* (famille de Polyodontidés) sert d'outgroup.

Les phylogénies moléculaires réalisées à partir de l'ADN mitochondrial (ADNmt) depuis la fin des années 1990 ont permis de préciser les relations entre les espèces d'Acipensériformes (Birstein *et al.* 1997a ; Birstein *et al.* 1999 ; Ludwig *et al.* 2001 ; Birstein *et al.* 2002 ; Peng *et al.* 2007 ; Krieger *et al.* 2008). Toutes les études moléculaires aboutissent au même schéma global, les différences majeures avec les phylogénies antérieures étant les suivantes : (i) le genre *Huso* est polyphylétique, les deux espèces se trouvant séparées parmi les Acipensériformes (ii) les genres *Scaphyrinchus* et *Pseudoscaphyrinchus* ne sont pas des taxons frères (les ressemblances morphologiques ne seraient pas des homologues mais des convergences évolutives) (iii) le genre *Acipenser* est paraphylétique, incluant les deux espèces du genre *Huso*, ainsi que les trois espèces du genre *Pseudoscaphyrinchus* (groupées avec *Acipenser stellatus*) et les trois espèces du genre *Scaphyrinchus* (qui divergent après le groupe formé par *A. sturio* et *A. oxyrinchus*).

Une synthèse des données paléontologiques (Grande *et al.* 2002 ; Hilton & Grande 2006), morphologiques (Bemis *et al.* 1997 ; Findeis 1997 ; Artyukhin 2006) et moléculaires (Ludwig *et al.* 2001 ; Birstein *et al.* 2002 ; Krieger *et al.* 2008) concernant la phylogénie des Acipensériformes est présentée à la figure I-6.

# INTRODUCTION GENERALE : LES ESTURGEONS





**Figure I-6 :** Phylogénie synthétique des Acipensériformes. Les groupes éteints (†) sont positionnés (ordre de branchement et âge) suivant les descriptions de Bemis *et al.* (1997). Les longueurs de branches pour les espèces actuelles reflètent dans la mesure du possible les temps de divergence estimés à partir des données moléculaires de Peng *et al.* (2007) obtenues à partir du gène du cytochrome *b* (Cyt *b*). La position des trois groupes au nœud basal des Acipenséridés n'a pas été résolue pour tenir compte de la divergence observée entre phylogénies morphologiques et moléculaires. La position des espèces au sein des clades Pacifique et Atlantique est une synthèse des phylogénies moléculaires les plus récentes, basées sur environ 1 kb du Cyt *b* (Peng *et al.* 2007) et sur environ 4 kb couvrant des portions du Cyt *b*, de la Dloop, des gènes des ARNr 12S et 16S, de la deuxième sous-unité de la cytochrome oxidase (COX2), de la cinquième sous-unité de la NADH déshydrogénase (NADH5) et des ARNts Asparagine et Phénylalanine (Krieger *et al.* 2008). Le niveau de ploïdie est indiqué tel que décrit par Zhang *et al.* (1999), Fontana *et al.* (2001), Ludwig *et al.* (2001) et Fontana *et al.* (2008) : 2n avec 120 chromosomes, 4n avec 200-250 chromosomes, 6n avec 360 chromosomes et 8n avec 500 chromosomes. Les barres noires le long des branches indiquent les événements de polyploïdisation putatifs. La distribution géographique est indiquée telle que décrite par Billard & Lecointre (2001), Vecsei (2001) et Bemis & Kynard (1997) : Eur. : Europe, Am.N. : Amérique du Nord, MGM : bassin du Mississippi et Golfe du Mexique, ANE : côte européenne Atlantique Nord-Est, ANO : côte américaine Atlantique Nord-Ouest, AN : Atlantique Nord, PC : région Ponto-Caspienne incluant les mers Méditerranée, Noire, Caspienne et d'Aral, AJ : fleuve Amur et mer du Japon, Pac.NE : côte américaine Pacifique Nord-Est, SA : Sibérie et océan Arctique, GL : région des Grands Lacs et baie d'Hudson. Le mode de vie (AP : amphidrome, PT : potamodrome, A : anadrome) et le statut dans la liste rouge de l'IUCN (LC : « least concern » préoccupation mineure, VU : vulnérable, NT : « near threatened » quasi menacé, EN : « endangered » en danger d'extinction, CR : « critically endangered » en danger critique d'extinction) sont tirés des fiches IUCN de chaque espèce, disponibles sur internet (IUCN 2010a ; [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)).

Les Acipenséridés se trouvent partagés en quatre groupes monophylétiques majeurs (ou clades) : (i) le clade des *Scaphirynchus*, (ii) le clade dit des « esturgeons marins » (Peng *et al.* 2007) constitué des esturgeons atlantiques et européens *A. oxyrinchus* et *A. sturio*, et qui dispute la place de groupe basal des Acipenséridés au clade des *Scaphirynchus*, (iii) le clade dit Pacifique (Peng *et al.* 2007), rassemblant *Huso dauricus* et les six *Acipenser* vivant sur les bords de l'océan Pacifique, (iv) le clade dit Atlantique (Peng *et al.* 2007), rassemblant *Huso huso*, les *Pseudoscaphirynchus* et les neuf *Acipenser* vivant sur les bords de l'océan Atlantique ou de l'ancienne Téthys ; à cet égard, ce clade devrait plutôt se nommer atlantico-téthysien que purement Atlantique.

### I-B-1-d- Cycle de vie

Les Acipenséridés sont des poissons à durée de vie relativement longue, dépassant 20 ans pour toutes les espèces, et pouvant atteindre plus de 100 ans pour certaines d'entre elles comme *Huso huso* (Billard & Lecointre 2001).

Les modes de vie diffèrent suivant les espèces, mais plusieurs caractéristiques reproductives sont communes à tous les Acipenséridés : (i) la reproduction se déroule en eaux douces et implique une migration amont, (ii) les reproducteurs montrent une fidélité importante à leur fleuve natal, (iii) la maturité sexuelle est atteinte tardivement, entre 3 et 20 ans suivant les espèces, que ce soit pour les mâles ou les femelles, (iv) les poissons une fois matures sexuellement ne se reproduisent généralement pas tous les ans mais tous les deux à cinq ans, effectuant à chaque fois une migration amont (Holcik 1989 ; Rochard *et al.* 1991 ; Billard & Lecointre 2001).

Suivant les patrons de migration et la salinité de l'eau dans laquelle les juvéniles et les adultes grandissent, trois modes de vie principaux sont distingués chez les esturgeons (schématisés sur la figure I-7) : l'anadromie (du grec *ana* « vers le haut » et *dromos* « route, course ») , la potamodromie (du grec *potamos* « rivière ») et l'amphidromie (du grec *amphi* « double») (Bemis & Kynard 1997). L'anadromie et l'amphidromie sont des variantes de la diadromie (du grec *dia* « entre »), caractérisée par des migrations entre eau salée et eau douce au cours du cycle de vie (Myers 1949 ; McDowall 1992). Le mode de vie qui caractérise chaque espèce d'esturgeons est indiqué en regard de la phylogénie sur la figure I-6.

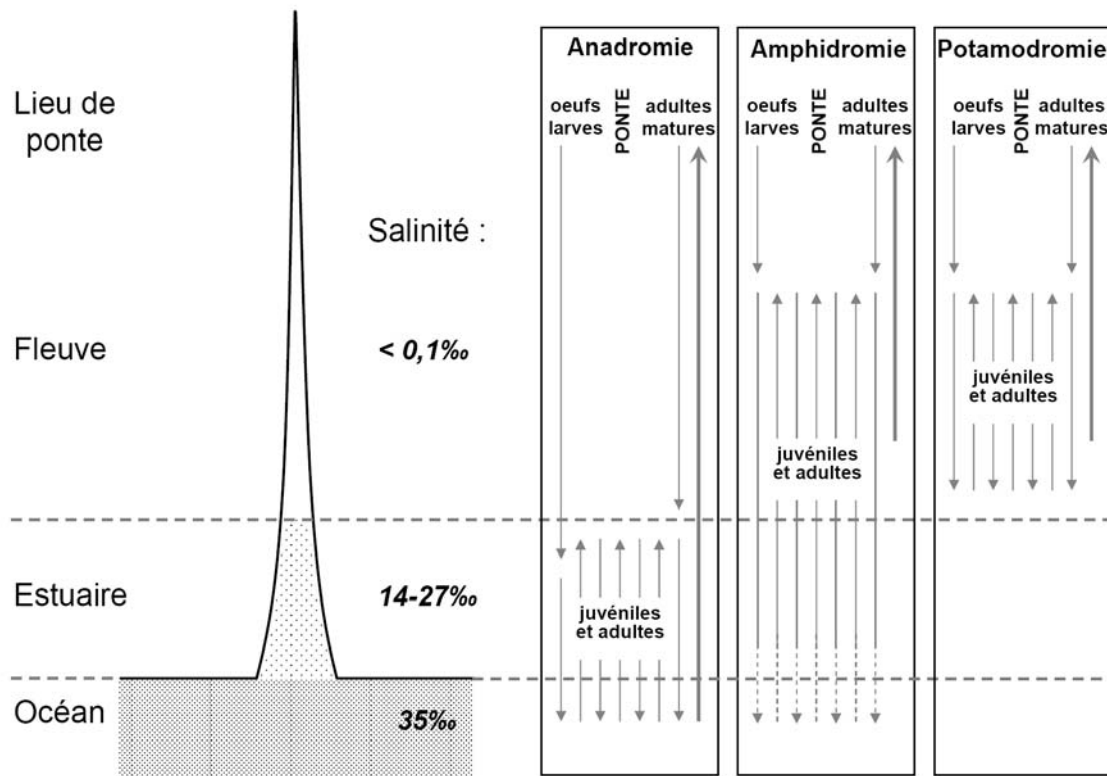
La plupart des espèces sont anadromes, en particulier l'esturgeon européen *A. sturio* et l'esturgeon atlantique *A. oxyrinchus* (Smith 1985 ; Williot *et al.* 1997). Les juvéniles migrent en aval de leur lieu de naissance (eau douce, salinité 0‰) jusqu'à l'estuaire (eau saumâtre, salinité 14-27 ‰), puis à la mer (eau salée, salinité 35 ‰) pour se nourrir. La croissance jusqu'à l'âge adulte se fait en mer dans la zone côtière (toujours sur le plateau continental à moins de 100 m de profondeur), avec des retours périodiques à l'estuaire. Les adultes une fois matures remontent jusqu'à la zone de ponte dans le fleuve pour se reproduire.

Certaines espèces sont potamodromes, par exemple l'esturgeon des lacs *A. fulvescens* (Peterson *et al.* 2007). Dans ce cas, tout le cycle et toutes les migrations pour la nutrition et la reproduction se déroulent en eau douce, la phase de croissance jusqu'à l'âge adulte se déroulant en rivière ou en lac.

Quelques espèces sont amphidromes, tel l'esturgeon à museau court *A. brevirostrum* (Bain 1997 ; Kynard 1997). Le cycle de vie est alors proche de celui des espèces anadromes, sauf que la croissance jusqu'à l'âge adulte se fait dans le fleuve ou dans l'estuaire, et pas en mer (où les poissons peuvent parfois néanmoins occasionnellement se trouver). Les déplacements entre eau douce et eau salée se font indépendamment de la reproduction.

A noter l'existence de populations potamodromes chez certaines espèces majoritairement anadromes (exemple de l'esturgeon russe *A. gueldenstaedtii* ; Kottelat *et al.* 2009a), et de populations anadromes chez certaines espèces majoritairement potamodromes (exemple du sterlet *A. ruthenus*, dont les populations anadromes ont malheureusement toutes disparu ; Kottelat *et al.* 2009b). Les esturgeons montrent donc une plasticité élevée vis-à-vis de la salinité, impliquant des capacités physiologiques spécifiques.

L'origine évolutive de la diadromie chez les Poissons est mal connue, mais elle est parfois considérée comme une étape de transition dans l'évolution de poissons marins devenant dulçaquicoles ou inversement (Gross 1987). McDowall (1993 ; 1997) considère qu'il est peu probable que les esturgeons dérivent d'un ancêtre purement marin, mais il est difficile de déterminer quel est l'état ancestral du groupe (anadrome ou potamodrome), au vu du peu de corrélation existant entre mode de vie et phylogénie (Figure I-6). En effet, potamodromie et anadromie coexistent chez les Acipenséridés comme chez les Polyodontidés.



**Figure I-7 :** Schématisation des différents cycles de vie rencontrés chez les esturgeons, inspiré de McDowall (1997) et Bemis et Kynard (1997). Les flèches indiquent les migrations, la flèche épaisse marquant la migration de reproduction.

#### I-B-1-e- Distribution des espèces et histoire évolutive

Les Acipensériformes sont uniquement présents dans l'hémisphère Nord, jamais en zone tropicale. Comme souligné par Choudhury & Dick (1998), les espèces fossiles autant que les espèces actuelles ont une distribution restreinte aux régions qui constituaient la Laurasie (Amérique du Nord et Eurasie), continent issu de la dislocation de la Pangée il y a près de 200 Ma. L'origine du groupe datant à peu près de cette époque d'après les données fossiles (voir figure I-6), il est raisonnable de penser que l'ancêtre commun à tous les Acipensériformes vivait en Laurasie il y a environ 200 Ma.

Au vu du mode de vie des esturgeons, Bemis & Kynard (1998) ont proposé le choix du bassin fluvial comme unité biogéographique intraspécifique de base. En effet, chaque espèce est divisée en différentes populations plus ou moins isolées, chacune se reproduisant dans un bassin fluvial différent. La somme des bassins fluviaux occupés par ces différentes populations constitue l'aire de répartition de l'espèce, à laquelle il faut rajouter pour les espèces anadromes les aires marines de nourrissage, qui peuvent être très étendues.

La distribution des espèces d'Acipenséridés au sein des grandes régions biogéographiques désignées par Bemis & Kynard (1997) est indiquée en regard de la phylogénie sur la figure I-6, et se trouve illustrée sur la mappemonde de la figure I-8. Les quatre grands clades d'Acipenséridés mentionnés dans la partie I-B-1-c ont une distribution géographique spécifique (i) le clade *Scaphirynchus* est restreint au bassin du Mississippi et au Golfe du Mexique en Amérique du Nord (région MGM sur la figure I-8), (ii) le clade des esturgeons marins couvre les côtes atlantiques américaines et européennes (régions ANO et ANE), (iii) le clade Pacifique couvre comme son nom l'indique les bords de l'océan Pacifique (régions Pac.NE, AJ et Chine) et (iv) le clade atlantico-téthysien couvre les bords des océans Atlantique et Arctique (régions ANO, ANE, SA), ainsi que les mers issues de la fermeture de l'océan Téthys c'est-à-dire les mers Méditerranée, Noire, Caspienne et d'Aral (région PC).

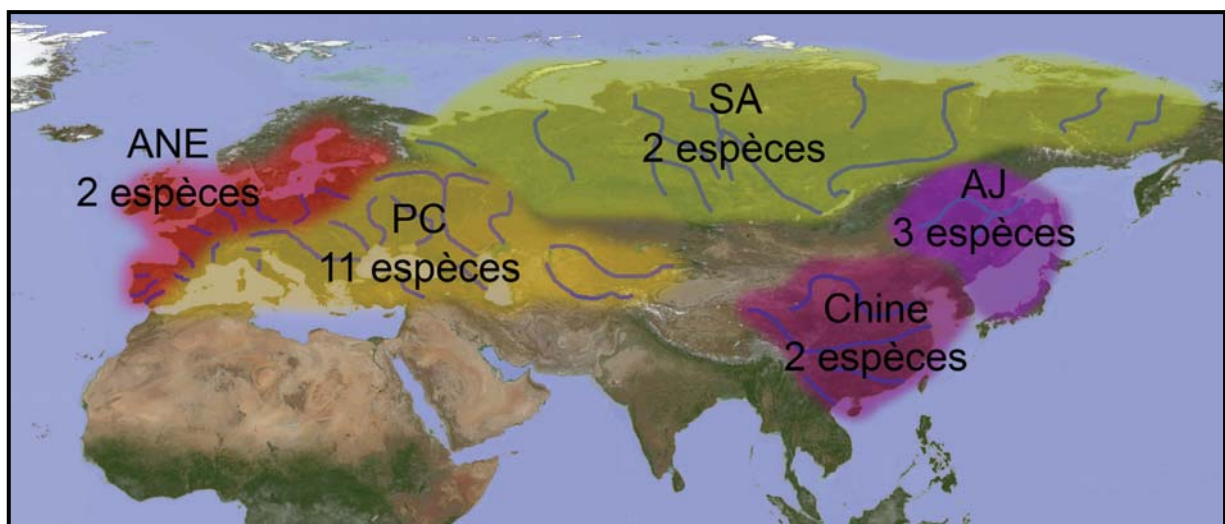
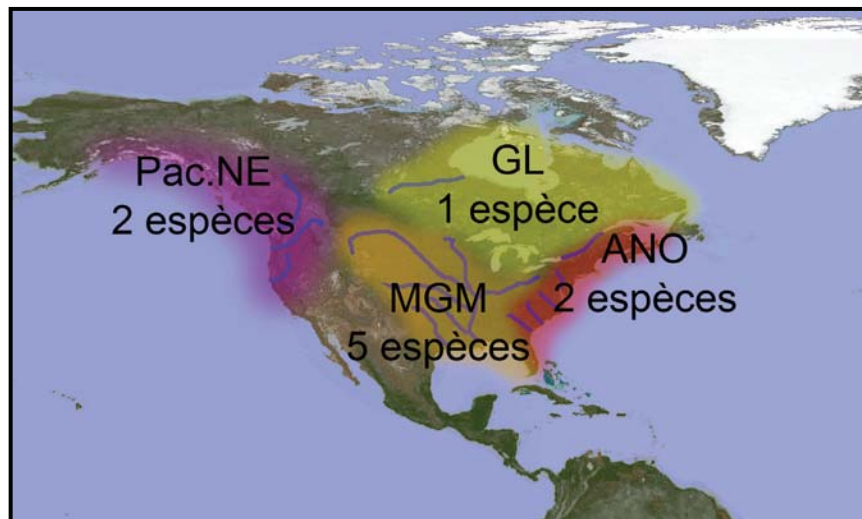
Les événements géologiques liés à la tectonique des plaques semblent avoir joué un rôle important dans la diversification des Acipensériformes (Bemis & Kynard 1997).

L'ouverture de l'océan Néo-Téthys – séparant la Pangée en Laurasie et Gondwana à partir de -200 Ma – a augmenté la surface du plateau continental, engendrant une extension des zones propices aux esturgeons. Cette multiplication des habitats marins favorables s'est sans doute accompagnée de nombreuses spéciations, peut-être à l'origine des différentes familles d'Acipensériformes dont seules subsistent aujourd'hui les Polyodontidés et les Acipenséridés (les Chondrostéidés et les Peipiaostéidés ayant disparus il y a plus de 100 Ma, voir figure I-6). Entre -200 et -180 Ma, la Téthys est ouverte de l'Amérique centrale actuelle à l'Ouest jusqu'à la Chine à l'Est.

L'ouverture de l'Atlantique Nord à partir de -180 Ma contribue ensuite à éloigner les masses continentales américaines et eurasiatiques, ainsi qu'à séparer l'Amérique du Nord et l'Amérique du Sud favorisant la diversification par vicariance au sein des familles existantes. C'est possiblement à ce moment là (entre -180 et -130 Ma) que les quatre clades actuels d'Acipenséridés se sont formés (figure I-6).

Enfin, la fermeture en deux temps de la Téthys par la remontée de la plaque indienne dans l'Eurasie (collision vers -50 Ma donnant l'Himalaya) et par la remontée de la plaque africaine dans l'Eurasie (collision vers -30 Ma donnant naissance aux chaînes de montagnes entre l'Himalaya et les Alpes) a conduit à la formation de plusieurs bassins plus ou moins isolés les uns des autres dans ce qui forme aujourd'hui la région ponto-caspienne (Mer d'Aral, Mer Caspienne, Mer Noire, Mer Méditerranée), conduisant à la diversification du clade atlantico-téthysien dans cette zone (qui concentre le plus grand nombre d'espèces d'Acipenséridés, voir figure I-8).

Le climat a également joué un rôle important, principalement par son impact sur le niveau eustatique. En effet, au cours du Jurassique et du Crétacé (entre -200 et -65 Ma), le climat global était plus chaud qu'actuellement, il n'y avait pas de glaciers permanents et le niveau marin était supérieur à ce qu'il est aujourd'hui – entre 50 et 200 m suivant les périodes (voir Scotese 1997 pour les reconstructions paléogéographiques, qui ont également servi de base à la discussion du paragraphe ci-dessus) – augmentant significativement l'étendue du plateau continental et donc les zones d'habitat propices aux esturgeons.



**Figure I-8 :** Distribution des espèces d'Acipensérédés par région (Pac.NE : côte américaine Pacifique Nord-Est, MGM : bassin du Mississippi et Golfe du Mexique, GL : région des Grands Lacs et baie d'Hudson, ANO : côte américaine Atlantique Nord-Ouest, ANE : côte européenne Atlantique Nord-Est, PC : région pontocaspienne incluant les mers Méditerranée, Noire, Caspienne et d'Aral, AJ : fleuve Amur et mer du Japon, SA : Sibérie et océan Arctique, Chine). Le découpage des régions est repris de Bemis et Kynard (1997), la répartition des espèces a été établi à partir de Vecsei (2001) et des comptes-rendus IUCN relatifs à chaque espèce (IUCN 2010a) et correspond à celle indiquée dans la figure I-6.

#### I-B-1-f- Caractéristiques génétiques et conséquences

Les premières données génétiques obtenues dans les années 1960 sur les esturgeons concernent le nombre de chromosomes (Ohno *et al.* 1969). Le génome des esturgeons est particulier dans le sens où il comprend des chromosomes

normaux mais aussi des microchromosomes, qu'il est parfois difficile de compter. L'amélioration des techniques a néanmoins permis de dénombrer les chromosomes chez presque toutes les espèces, ce qui a permis de distinguer deux groupes d'espèces, respectivement à environ 120 et 240 chromosomes (revue dans Fontana 2002). Deux espèces – l'esturgeon à museau court *A. brevirostrum* et l'esturgeon des Sakalines *A. mikadoi* – sont un peu à part car elles possèdent respectivement 360 et 500 chromosomes.

Le nombre important de chromosomes chez les Acipensériformes par rapport aux autres poissons – le nombre de chromosomes chez les Eutélostéens est en moyenne de 50, et le proto-génome diploïde des Vertébrés aurait compté 24 chromosomes (Jaillon *et al.* 2004 ; Volf 2005) – a conduit les premiers scientifiques à considérer que les espèces à 120 chromosomes étaient tétraploïdes (Dingerkus & Howell 1976), les espèces à 240 chromosomes étant alors octoploïdes. Ce paradigme est resté ancré dans les esprits pendant près de 20 ans (Birstein & Vasiliev 1987 ; Birstein *et al.* 1997a ; Flajshans & Vajcova 2000), mais des preuves de plus en plus nombreuses apportées par l'étude du nombre d'organiseurs nucléolaires (Fontana 1994), l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) de sondes correspondant aux ARNr nucléaires (Fontana *et al.* 1999 ; Fontana *et al.* 2003) ou l'héritabilité de marqueurs nucléaires polymorphes tels les microsatellites (Ludwig *et al.* 2001) ont conduit au consensus actuel : les espèces à 120 chromosomes sont des diploïdes fonctionnels et celles à 240 chromosomes sont des tétraploïdes fonctionnels. Dans ce contexte, *A. mikadoi* est une espèce octoploïde et *A. brevirostrum* est interprété comme une espèce hexaploïde (Fontana *et al.* 2008). La présence de nombreux chromosomes même chez les espèces diploïdes suggère néanmoins l'existence d'événements plus anciens de polyploïdisation, suivis ensuite d'un retour à la diploïdie fonctionnelle (Ohno 1970). La ploïdie de chaque espèce d'Acipensériformes est indiquée en regard de la phylogénie sur la figure I-6. Les espèces polyploïdes forment trois groupes monophylétiques et représentent environ la moitié des Acipenséridés.

Malgré cette hétérogénéité au niveau de la ploïdie, les esturgeons partagent une même caractéristique : un taux d'évolution lent. Krieger et Fuerst (2002) ont comparé 23 loci nucléaires ou mitochondriaux chez les Acipensériformes, les



Eutéléostéens et un groupe externe (Requins) : ils ont observé un taux moyen de substitution des acides aminés deux fois inférieur entre Requins-Acipensériformes qu'entre Requins-Eutéléostéens.

Ce faible taux d'évolution et les caractéristiques caryologiques hors normes des esturgeons expliquent sans doute la facilité avec laquelle les espèces peuvent s'hybrider, que ce soit en captivité ou dans le milieu naturel. Birstein *et al.* (1997a) ont effectué une revue des hybridations naturelles reportées dans la bibliographie depuis 1910, et indiquent que quasiment toutes les espèces peuvent s'hybrider les unes avec les autres, du moment que le lieu et le moment de la ponte coïncident. De façon étonnante, même les espèces ayant des niveaux de ploïdie différents peuvent s'hybrider. Cette faculté d'hybridation est d'ailleurs très utilisée en aquaculture (Jahnichen *et al.* 1999 ; Urbanyi *et al.* 2004), dans le but en particulier d'optimiser la vitesse de croissance et la production de caviar.

A noter une conséquence négative de l'existence d'espèces polyploïdes : aucune phylogénie nucléaire des Acipensériformes n'a encore été publiée, entreprise pourtant nécessaire pour valider la phylogénie mitochondriale (qui ne représente « que » l'évolution des lignées maternelles). En effet, l'existence de plusieurs copies dupliquées d'un même gène nucléaire (ou copies paralogues) rend difficile la construction d'une telle phylogénie.

### I-B-1-g- Menaces actuelles et conservation

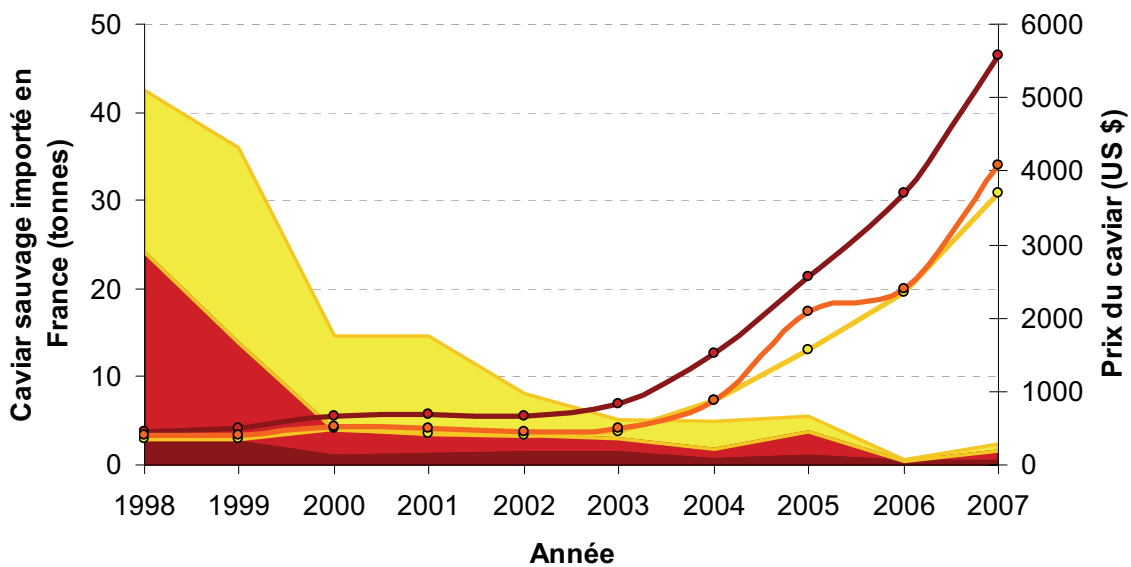
Les 27 espèces d'Acipensériformes sont inscrites sur la liste rouge des espèces menacées de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (IUCN 2010a). Le statut de chacune des espèces est indiqué en regard de la phylogénie sur la figure I-6. Parmi ces 27 espèces, 17 sont en danger critique d'extinction ce qui fait de ce groupe le plus menacé de toute la liste rouge. Certaines espèces sont d'ailleurs sans doute déjà éteintes dans la nature, comme le Poisson spatule chinois *Psephurus gladius*, ainsi que les espèces de *Pseudoscaphirynchus*, qui vivaient toutes trois dans les fleuves alimentant la Mer d'Aral.

Les causes de la raréfaction des esturgeons sont multiples (Rochard *et al.* 1990 ; Birstein *et al.* 1997b ; Billard & Lecointre 2001). Les plus importantes sont (i) la dégradation de l'habitat, en particulier l'extraction de graviers détruisant des zones de pontes, la construction de barrages empêchant les migrations de reproduction, la pollution et l'utilisation des fleuves pour l'irrigation (qui a par exemple entraîné l'assèchement de la Mer d'Aral où vivaient les *Pseudoscaphirhynchus*), (ii) la surpêche, la capture accidentelle (par les chalutiers par exemple) et le braconnage (qui concerne toutes les espèces et surtout celles produisant les meilleurs caviars), (iii) la gestion inexistante ou catastrophique des stocks naturels de certaines espèces, en particulier dans les pays bordant les mers Noire, Caspienne et d'Aral.

Le danger qui pèse sur ces espèces a conduit à la réglementation de tout commerce les concernant sous le contrôle de la CITES, et ce depuis le 1<sup>er</sup> Avril 1998 (CITES 1997). Divers progrès ont accompagné l'inscription à l'annexe II de la CITES : (i) un guide de reconnaissance morphologique par clefs a été mis à la disposition de toutes les polices douanières (Vecsei 2001) (ii) des outils moléculaires permettant de discriminer rapidement entre les espèces d'Acipensériformes ont été mis au point, afin de détecter les produits illégaux (DeSalle & Birstein 1996 ; Ludwig *et al.* 2002a ; Ludwig 2008). La réglementation a permis de réguler les pêches légales par l'émission de quotas d'exportation aux états producteurs, mais elle a aussi eu pour conséquence l'augmentation du commerce illégal, la demande en produit dérivés des esturgeons (en particulier le caviar) ne diminuant pas (Raymakers 2002, 2006). En effet, la rareté d'un produit recherché augmente sa valeur marchande et le rend plus attractif (Courchamp *et al.* 2006 ; Angulo & Courchamp 2009 ; Angulo *et al.* 2009). Les esturgeons et leur caviar étant de plus en plus rares, deviennent des mets encore plus prisés, dont le prix s'est envolé ces dernières années (Ludwig 2008). En attestent les quantités de caviar sauvage importées par la France qui se sont écroulées depuis 1998, pendant que les prix du caviar sur le marché international flambaient (Figure I-9).

Gault *et al.* (2008) ont ainsi réalisé une expérience de dégustation de caviar dans des soirées mondaines et dans des supermarchés parisiens, en demandant aux testeurs de comparer deux caviars, l'un étant présenté comme provenant d'une « espèce rare », l'autre d'une « espèce commune » ; en fait il s'agissait du même

caviar partagé en deux lots, mais 80% des testeurs (aussi bien dans les soirées mondaines que dans les supermarchés) ont préféré le caviar soi-disant issu de l'espèce rare. Cette attraction pour les denrées rares a sans doute entraîné les esturgeons dans un cercle vicieux duquel il sera difficile de les sortir : plus les esturgeons sont rares, plus leur caviar devient cher, et plus il est intéressant de les pêcher, donc plus ils deviennent rares... Les prises mondiales d'esturgeons ont d'ailleurs chutées de 90% en tonnage entre 1950 et 2000 (Pikitch *et al.* 2005 ; Ludwig 2008).



**Figure I-9 :** Evolution des importations de caviar sauvage en France (aires) et de son prix sur le marché international (courbes) entre 1998 et 2007. Les données sont indiquées pour les trois types de caviar les plus recherchés, le caviar beluga en rouge sombre (issu du beluga *Huso huso*), le caviar ossetra en rouge vif (issu de l'esturgeon russe *A. gueldenstaedtii*) et le caviar sevruga en jaune-orange (issu de l'esturgeon étoilé *A. stellatus*). Source pour les tonnages importés en France : CITES Trade Data <http://www.unep-wcmc.org/citestrade/> avec les paramètres suivants : pays importateur = France, pays exportateur = tous, espèces = l'une des trois, produits = œufs, source = sauvage. Source pour le prix du caviar : Ludwig (2008) et George Yousef (communication personnelle).

L'avenir des esturgeons est donc incertain, mais des mesures de conservation sont prises concernant quasiment toutes les espèces, incluant la mise en place de zones de ponte artificielles et de dispositifs permettant aux poissons de remonter en amont des barrages, le maintien de stocks *ex situ* pour la reproduction artificielle et le repeuplement, ainsi que l'information au grand public et aux pêcheurs. De plus, l'explosion du secteur de l'aquaculture – sous l'impulsion actuelle de la

Chine – devrait permettre de combler l'écart existant entre la demande et l'offre de caviar, ce qui permettra de faire diminuer son prix et limitera donc l'intérêt du braconnage. La production croissante d'esturgeons en aquaculture n'est pas néanmoins sans poser certains problèmes, en particulier l'évasion accidentelle d'espèces ou d'hybrides en dehors de leur zone d'origine (Arndt *et al.* 2000).

Nous venons de voir que toutes les espèces d'esturgeons sont menacées à des degrés divers, certaines ayant peut-être déjà disparu à l'état naturel. D'autres sont au bord de l'extinction, et nécessitent toute l'attention des scientifiques, du grand public et surtout des politiques. C'est le cas par exemple de l'esturgeon européen *Acipenser sturio*, espèce sur laquelle nous allons maintenant nous focaliser.

### ***I-B-2 L'ESTURGEON EUROPEEN ACIPENSER STURIO, UNE ESPECE AUTREFOIS ABONDANTE AUJOURD'HUI AU BORD DE L'EXTINCTION***

#### I-B-2-a Présentation de l'espèce

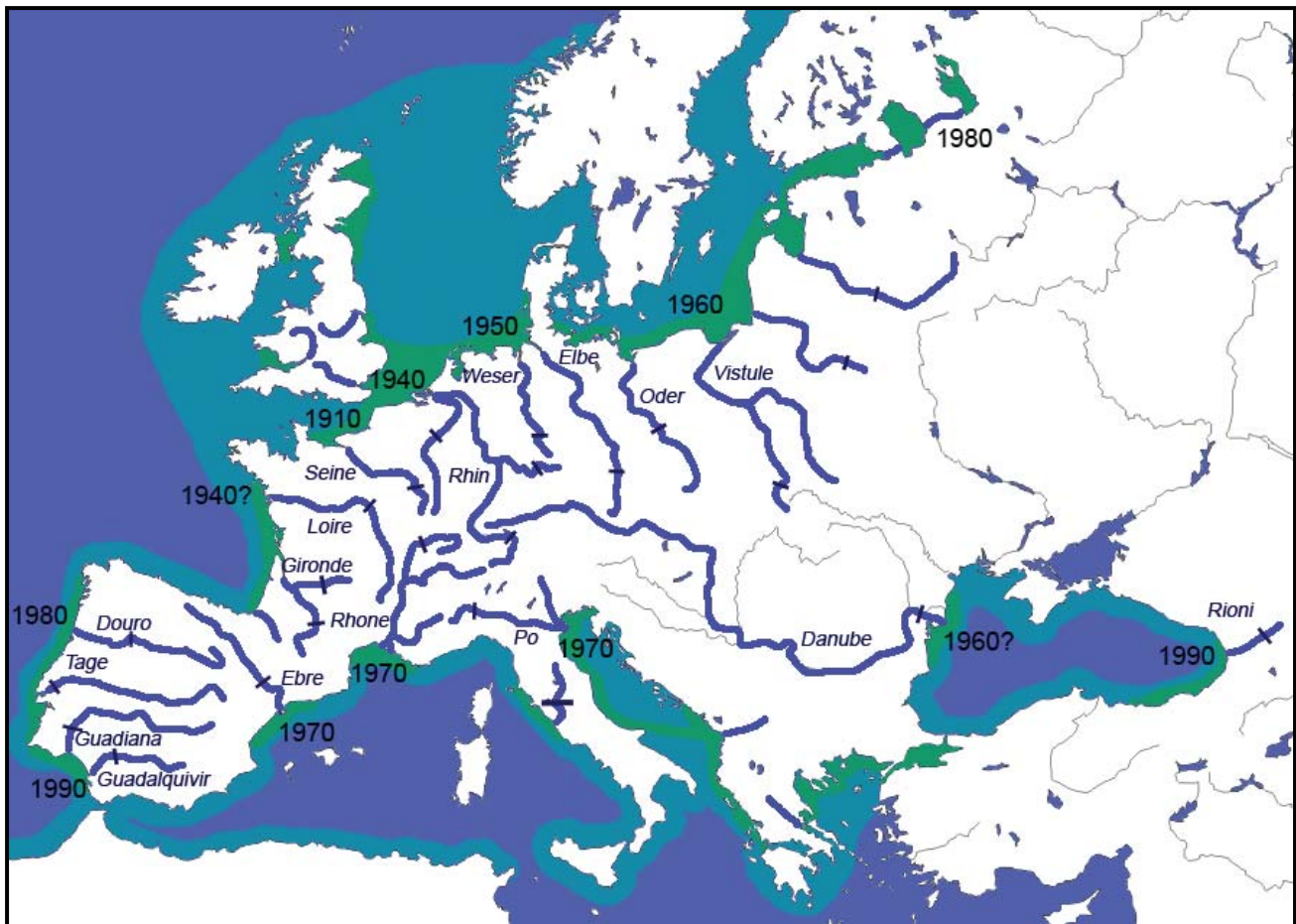
L'esturgeon européen *A. sturio* est l'espèce sœur de l'esturgeon atlantique *A. oxyrinchus*, avec lequel il forme le clade des « esturgeons de mer » à la base de la phylogénie des Acipenséridés (voir figure I-6 et partie I-B-1-c). C'est une espèce anadrome par excellence, mature sexuellement à partir de 8-12 ans pour les mâles et 13-16 ans pour les femelles, et pouvant vivre au moins jusqu'à 50 ans (et sans doute beaucoup plus). Elle peut atteindre une taille de plus de trois mètres et peser plus de 300 kg, ce qui en fait le poisson le plus imposant des fleuves français, hors espèces introduites (Holcik *et al.* 1989 ; Lepage & Rochard 1993 ; Williot *et al.* 1997).

Son caryotype se compose de  $116 \pm 4$  chromosomes (Fontana & Colombo 1974), et il appartient donc au groupe des espèces diploïdes. L'hybridation naturelle est reportée avec l'esturgeon russe *A. gueldenstaedtii* dans le Danube et la Mer Noire (Antipa 1909 ; Kozhin 1964 cités dans Holcik 1989), et plus récemment avec son espèce sœur *A. oxyrinchus* dans la Baltique (Ludwig *et al.* 2008) et en France (cette thèse, partie II-C-2).

### I-B-2-b Une espèce originellement paneuropéenne

L'esturgeon européen *A. sturio* est avec le sterlet *A. ruthenus* et le beluga *Huso huso* (*Acipenser huso* à l'époque) la première espèce d'esturgeon décrite par Linné dans sa classification de *Systema Naturae* à partir de l'édition de 1758. Linné écrit à son sujet qu'il habite « in Mari Europaeo », dans les mers d'Europe (Linné 1758). De multiples témoignages historiques indiquent également que l'esturgeon européen était une espèce commune dans toute l'Europe (Cloquet 1819a ; Gervais & Boulart 1876), et ce n'est pas un hasard s'il était aussi appelé esturgeon commun. D'après Magnin (1959 ; 1962), Holcik *et al.* (1989) et Lassalle *et al.* (2010), qui ont synthétisé toute la bibliographie historique, il se reproduisait dans tous les grands fleuves d'Europe, de la Mer Baltique à la Mer Noire, et il se trouvait en mer sur la façade atlantique européenne de la Norvège au Maroc, en Méditerranée et en Mer Noire. Il semble néanmoins n'avoir jamais été abondant en Mer Noire, en Mer Egée et dans les îles britanniques. Malheureusement, toutes ces populations ont disparu et il ne subsiste plus aujourd'hui qu'une seule population en Gironde. Les principaux fleuves abritant autrefois des esturgeons européens sont indiquées sur la figure I-10. A noter que la présence récente de l'esturgeon européen dans la Mer Baltique est remise en cause par les données de Ludwig *et al.* (2002b ; 2008), qui montrent que l'espèce dominante dans la région était en fait l'esturgeon atlantique *A. oxyrinchus*, au moins depuis le Moyen-Âge (voir partie II-C-2 pour plus de détails).

L'établissement avec certitude d'une liste de fleuves abritant des populations fonctionnelles d'esturgeons européens est toujours discutable, car les articles historiques mentionnent bien plus souvent les captures d'adultes de grande taille que de juvéniles. Or la présence de juvéniles venant de l'amont est la seule preuve irréfutable d'une reproduction effective et donc de la présence d'une population fonctionnelle d'esturgeons dans un fleuve donné. La présence ponctuelle d'individus de grande taille dans un fleuve marque les esprits et reste ancré dans la bibliographie, mais ne signifie pas pour autant la présence d'une population fonctionnelle.



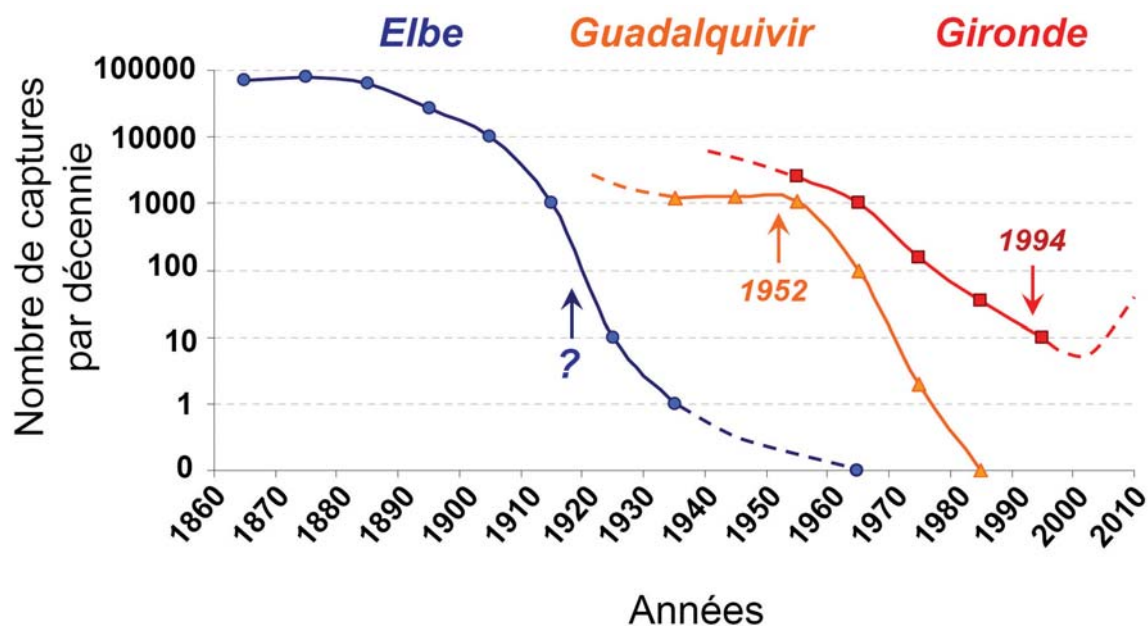
**Figure I-10 :** Distribution historique de l'esturgeon européen *A. sturio*, avec les fleuves majeurs où il se reproduisait (les tirets indiquent les extrêmes de migration amont reportés) et les zones marines où il était rencontré (les zones en cyan correspondent aux zones de capture reportées et en bleu-vert aux zones de captures les plus fréquentes). Les dates d'extinction présumées par fleuve sont également indiquées, et correspondent aux dernières captures et non aux dernières reproductions. Cette figure a été construite d'après les informations synthétisées par Magnin (1962), Holcik *et al.* (1989), Rochard *et al.* (2001), Williot *et al.* (2002) et Gonthier (2009).

#### I-B-2-c De l'abondance à l'extinction (ou presque)

L'esturgeon européen était donc présent partout en Europe il y a encore quelques siècles, mais la pollution, la modification du cours des fleuves et la surpêche ont conduit à sa raréfaction (voir Rochard *et al.* 1990 ; Williot *et al.* 1997 ; pour une liste exhaustive des facteurs impliqués voir aussi Gessner 2000). Roulé (1922) mentionne déjà à son époque que les esturgeons se font rares en France, avec une quasi disparition dans la Seine et la Loire et une relative abondance maintenue uniquement dans le bassin garonnais. Magnin (1962) souligne 40 ans

plus tard que l'espèce est en voie de disparition, et que les populations du Guadalquivir et surtout de Gironde constituent les derniers réservoirs importants de cette espèce.

Dans tous les bassins où les esturgeons européens étaient présents, les captures commerciales ou scientifiques se sont effondrées en quelques décennies (voir figure I-11 pour les exemples de l'Elbe, du Guadalquivir et de la Gironde).



**Figure I-11 :** Evolution du nombre de captures déclarées d'esturgeons européens par décennie entre 1860 et 2010 dans l'Elbe (Allemagne, population éteinte vers 1970), le Guadalquivir (Espagne, population éteinte vers 1990) et la Gironde (population relictuelle non éteinte). Les données sont tirées de Gessner (2000) pour l'Elbe, Fernandez-Pasquier (2000) pour le Guadalquivir et Rochard *et al.* (2001) et Gonthier (2009) pour la Gironde. Les flèches correspondent aux dernières reproductions observées. Les zones en tirets indiquent les tendances probables non confirmées par des données factuelles ; la remontée indiquée en Gironde dans les années 2000 intègre l'impact du lâcher de juvéniles issus de reproductions artificielles après 2007.

Malgré les mesures de conservation (principalement la limitation ou l'interdiction de la pêche), toutes les populations ont finalement disparu (voir la figure I-10 pour les dates d'extinction par population), sauf celle de Gironde-Garonne-Dordogne en France (appelée population de Gironde par la suite). La répartition actuelle de l'espèce correspond donc uniquement à celle de la population girondine,

avec une présence dans la Garonne jusqu'à Agen et dans la Dordogne jusqu'à Bergerac, et en mer sur la côte atlantique française et jusque dans les îles britanniques et en Mer Baltique (Figure I-12). Une autre population fonctionnelle était mentionnée sur le fleuve Rioni en Géorgie (Lepage & Rochard 1993 ; Williot *et al.* 1997 ; Bacalbasa-Dobrovici & Holcik 2000), mais peu de données étaient disponibles la concernant. J. Gessner indique sur la fiche de l'esturgeon européen dans la liste rouge IUCN (2010a) que plusieurs missions destinées à identifier l'esturgeon européen dans cette région se sont soldées par des échecs dans les années 2000 ; la population du Rioni s'est donc probablement éteinte dans les années 1990, et le bassin de la Garonne constitue le dernier bastion mondial de l'esturgeon européen.



**Figure I-12 :** Distribution actuelle de l'esturgeon européen *A. sturio*. La seule population restante est située en Gironde. Les poissons remontent la Dordogne et la Garonne jusqu'à Bergerac et Agen respectivement (barres sur les fleuves). Les captures en mer ont lieu du Pays Basque jusqu'en Mer du Nord (cyan), avec une fréquence maximum sur la façade atlantique française (bleu-vert). D'après les données obtenues entre 1980 et 1994 par Williot *et al.* (1997).

L'esturgeon européen a été classé comme « en danger d'extinction » (Endangered) sur la liste rouge de l'IUCN dès 1988, puis est devenu « en danger critique d'extinction » (Critically Endangered) à partir de 1996 (IUCN 2010a). En effet,



la population de Gironde est elle-même au bord de l'extinction, les effectifs étant tombés à des niveaux très bas (Lepage & Rochard 1993), et les dernières reproductions naturelles ayant probablement eu lieu en 1977, 1981 (estimées à partir de la répartition bimodale de la taille des juvéniles observée en 1985), 1988 (répartition unimodale observée en 1992) et 1994 (Williot *et al.* 1997 ; Rochard *et al.* 2001).

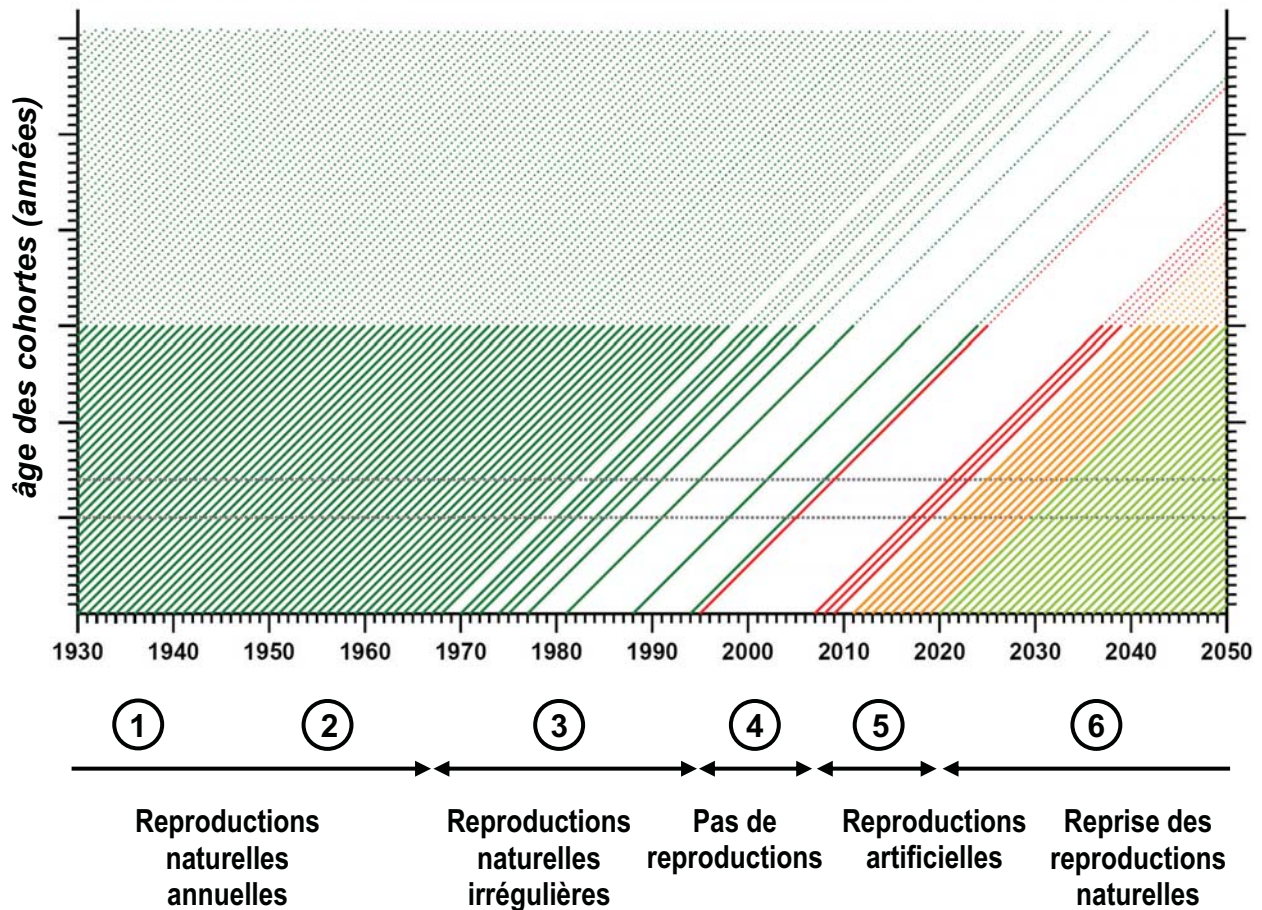
La transition de l'abondance à l'extinction a probablement suivi le même schéma pour toutes les populations. Un essai de représentation basé sur l'évolution des cohortes (ensemble d'individus issus de la même saison de reproduction dans un bassin donné), a été réalisé sur la figure I-13 à partir de l'exemple de la Gironde.

**(1)** La population est au départ abondante, les migrations de reproduction sont couronnées de succès chaque année (sauf circonstances exceptionnelles, par exemple un fort débit au moment de la ponte) donnant des cohortes annuelles.

**(2)** La surpêche et la dégradation de l'habitat entraînent une baisse des effectifs de géniteurs en quelques décennies, mais les géniteurs restent néanmoins assez nombreux pour permettre une reproduction annuelle.

**(3)** La chute des effectifs se poursuit, et lorsque le nombre de géniteurs passe sous un seuil critique (indéterminé), les rencontres entre mâles et femelles simultanément mûres deviennent aléatoires (effet Allee) entraînant l'absence de reproduction certaines années. La perte du caractère annuel de la reproduction entraîne des trous dans la « pyramide des âges » de la population (cohortes manquantes).

**(4)** Le nombre d'individus devient finalement tellement bas que les reproductions cessent, la population n'est alors plus fonctionnelle et est vouée à l'extinction (c'est probablement le stade actuel de la population de Gironde). L'extinction de la population peut être considérée comme fonctionnellement effective avec l'arrêt des reproductions, mais n'est définitive que lorsque tous les individus la constituant ont disparus, ce qui peut prendre des décennies. L'esturgeon ayant une durée de vie très longue, des captures ponctuelles d'adultes ont en effet souvent lieu pendant 20 à 50 ans après la dernière reproduction ; par exemple un esturgeon a été capturé près de l'embouchure du Guadalquivir en 1992, près de 40 ans après la dernière reproduction (Elvira & Almodovar 1993). Pour toutes les populations d'esturgeons européens l'histoire s'est arrêtée là (étape 4 de la figure I-13), sauf pour celle de Gironde qui a bénéficié des efforts de conservation du Cemagref de Bordeaux.



**Figure I-13 :** Scénario possible de l'évolution passée et future de la population de Gironde, schématisée sous la forme des cohortes matérialisées par un trait coloré, marquant leur naissance (ordonnée 0) puis leur vieillissement au cours du temps (pente 1), jusqu'à la maturité sexuelle mâle et femelle (aux alentours de 10 et 14 ans respectivement, barres grises horizontales en pointillés) puis la sénescence (marquée par le passage du trait coloré plein aux pointillés après 30 ans). Le code couleur des cohortes est le suivant : vert pour les cohortes issues d'une reproduction naturelle (foncé pour le passé, clair pour le futur), rouge-orange pour les cohortes issues d'une reproduction artificielle (rouge pour le passé, orange pour le futur). La première reproduction semi artificielle réalisée à partir d'individus issus du milieu naturel a eu lieu en 1995 (Williot *et al.* 2000 ; lâcher de moins de 20 000 juvéniles). La première reproduction artificielle à partir d'individus captifs du stock *ex situ* a été réalisée en 2007 (Gonthier 2009 ; lâcher d'environ 7 500 juvéniles). La schématisation ne prend pas en compte les effectifs des cohortes.

I-B-2-d Le sauvetage en cours de la population girondine

La population de Gironde a subit le même déclin que les autres populations d'esturgeons européens au cours du 20<sup>e</sup> siècle, malgré un frein mis à la pêche dès 1951 (interdiction de la pêche du 1er Juillet au 31 Décembre et taille limite de capture

passée à 1,45 m ; Letaconnoux 1961). L'espèce devient intégralement protégée en France en 1982 (arrêté du 25 janvier) car la situation devient préoccupante. Le Cemagref de Bordeaux entreprend alors de multiples efforts pour la conservation de la population girondine, incluant un programme d'information et de collaboration avec les pêcheurs ainsi que la constitution d'un stock de géniteurs sauvages captifs à la station de Saint-Seurin, dans le but de réaliser des reproductions en captivité et de soutenir les stocks sauvages (Williot *et al.* 1997).

Grâce aux efforts de conservation, l'histoire de la population girondine s'est poursuivie malgré la chute des effectifs et l'arrêt des reproductions naturelles ; reprenons donc la figure I-13 au stade 3.

**(3)** Dès le début des années 1980, le Cemagref a tenté de réaliser des reproductions semi artificielles à partir d'individus sauvages capturés lors de leur migration de reproduction, mais le nombre d'individus capturés était faible et il était rare de capturer à quelques jours d'intervalles un mâle et une femelle tous deux matures. Sur les quatre essais qui purent avoir lieu (1981, 1985 deux fois, et 1995), seul celui de 1995 fut couronné de succès (Williot *et al.* 2000), permettant l'obtention de 23 000 larves. Certains individus issus de cette reproduction ont été conservés pour renforcer le stock captif de géniteurs, les autres furent relâchés dans le milieu naturel permettant de soutenir la population sauvage (cohorte artificielle de 1995) et de réaliser des expériences de suivi télémétrique (Brosse 2003 ; Lepage *et al.* 2005).

**(4)** Après cette première reproduction semi artificielle, le nombre de captures d'adultes issus du milieu sauvage devint trop faible pour espérer récidiver. Des tests de reproduction entièrement artificielle ont donc été réalisés au Cemagref à partir du stock captif, sans succès pendant de longues années. Aucune reproduction naturelle ou artificielle ne vint soutenir la population en cours d'extinction entre 1995 et 2007, suggérant un nombre insuffisant d'adultes issus des dernières cohortes (1988, 1994 et 1995) pour réamorcer la reproduction naturelle. Ce déficit de reproduction a créé un trou dans la pyramide des âges de la population.

**(5)** En 2007, une reproduction totalement artificielle réussit pour la première fois, et une dizaine de milliers de larves furent obtenues conduisant au lâcher d'environ 7500 juvéniles dans la Garonne et la Dordogne (Gonthier 2009). La même réussite a également été obtenue en 2008, 2009 avec à chaque fois le lâcher en Dordogne et Garonne de dizaines de milliers de juvéniles (Eric Rochard, communication

personnelle). En espérant que le succès des reproductions artificielles perdure dans les prochaines années, il faudra néanmoins attendre les années 2020 pour que les individus issus des premières cohortes artificielles (2007-2009) atteignent la maturité sexuelle et permettent un éventuel réamorçage des reproductions naturelles.

**(6)** Lorsque les reproductions naturelles reprendront, les reproductions artificielles pourront être arrêtées (ou limitées). En 2020, la population sera majoritairement constituée des individus issus des cohortes artificielles 2007-2020, mais les quelques individus plus âgés restants (survivants des cohortes 1995, 1994 et antérieures) pourraient dans l'idéal eux aussi participer à la reproduction. Il faudra néanmoins attendre encore au moins jusqu'à 2030-2050 pour que le trou lié à l'absence de reproduction 1995-2007 s'efface et retrouver une population équilibrée.

A noter que ce scénario est plutôt optimiste dans la mesure où (i) la réussite des reproductions artificielles à venir n'est pas assurée ; en particulier, il n'y a pas eu de reproduction artificielle en cette année 2010 (Eric Rochard, communication personnelle) ; (ii) l'efficacité des lâchers de juvéniles nés en captivité est souvent limitée (voir Steffensen *et al.* 2010 pour des données sur *Scaphirynchus albus*) ; (iii) la population a subi un important goulot démographique qui pourrait avoir des conséquences néfastes sur sa viabilité à long terme (voir la partie I-C-2-b pour une discussion sur les effets de la consanguinité).

### I-B-2-e Statut actuel et perspectives de sauvegarde

L'espèce *A. sturio* est aujourd'hui composée :

- d'une population naturelle en Gironde, dont la reproduction en milieu naturel est à l'arrêt depuis 1994. L'effectif exact de cette population est inconnu mais était estimé en 1993 à quelques milliers d'individus (Lepage & Rochard 1993) ; nul doute qu'aujourd'hui les effectifs sont largement en dessous de ces chiffres.

- d'un stock *ex situ*, partagé entre le Cemagref de Bordeaux (>90% du stock) et l'IGB (Institut für Gewässerökologie und Binnenfischei) de Berlin (dont les individus proviennent du Cemagref de Bordeaux). Le stock français est composé d'environ 80 géniteurs matures de souche girondine issu des cohortes naturelles de 1988 et 1994 (environ 40 individus fortement consanguins) et de la cohorte semi-artificielle de

1995 (environ 40 individus frères et sœurs issus du croisement de deux individus) ; s'y rajoutent depuis 2007 des juvéniles issus de cohortes artificielles de 2007-2010 (plusieurs dizaines d'individus sont conservés par cohorte).

A noter que tous les individus de l'espèce sont consanguins, qu'ils soient issus du milieu naturel, en captivité, ou relâchés. En effet, la population naturelle restante est probablement le fruit de croisement entre apparentés (en liaison avec la raréfaction des reproductions naturelles), et le stock captif est constitué d'individus issus de cette population mais aussi et surtout de frères et sœurs nés de reproductions entre ces individus déjà consanguins.

A partir des variations d'effectif efficace (*i.e.* du nombre de reproducteurs réel), il est possible d'estimer la consanguinité d'une population (équation 11.5 de Frankham *et al.* 2002 ; pour la formule littérale, voir partie I-C ). Appliquons cette formule à la population résiduelle d'esturgeons de Gironde :

- considérons que la consanguinité était nulle au début du siècle dernier et que les effectifs totaux atteignaient alors 100 000 individus. Considérons que ce chiffre ait décliné linéairement pour finir divisé par 100 en 1980, flirtant ensuite avec des seuils très bas dans les années 1975 à 1990 (chiffres plausibles d'après les données de captures annuelles réalisées depuis 1950) ;

- considérons également que l'effectif efficace de la population (le nombre de reproducteur effectif) est 10 fois inférieur à l'effectif total, comme c'est le cas pour beaucoup de populations naturelles (Frankham 1995a) ; cette estimation est très conservative car la maturité sexuelle étant très tardive chez les esturgeons (10-15 ans), l'effectif efficace est sans doute encore beaucoup plus faible. Entre 1975 et 2005, le nombre de reproduction naturelle ayant été très faible, un nombre de reproducteurs proche de 10 par génération est plausible ; de même entre 2005 et 2020, puisque les seules reproductions ont été et seront artificielles, et sont réalisées à partir d'individus déjà consanguins ;

- considérons enfin que le temps de génération moyen est de 15 ans.

Au vu des hypothèses précédentes, l'évolution du coefficient de consanguinité  $F$  de la population girondine a suivi la tendance suivante :

Génération 0 (1900) :	$N_e = 10\ 000$	$F_0 = 0$
Génération 1 (1915) :	$N_e = 8\ 000$	$F_1 \approx 0$
Génération 2 (1930) :	$N_e = 6\ 000$	$F_2 \approx 0$
Génération 3 (1945) :	$N_e = 4\ 000$	$F_3 \approx 0$
Génération 4 (1960) :	$N_e = 2\ 000$	$F_4 \approx 0$
Génération 5 (1975) :	$N_e = 100$	$F_5 = 0,5\%$
Génération 6 (1990) :	$N_e = 10$	$F_6 = 5,5\%$
Génération 7 (2005) :	$N_e = 10$	$F_7 = 10,3\%$
Génération 8 (2020) :	$N_e = 10$	$F_8 = 14,7\%$

La population de Gironde a donc actuellement d'après ces estimations un coefficient de consanguinité proche de 10%. Le temps de génération important des esturgeons est un facteur freinant l'augmentation de la consanguinité, ce qui explique pourquoi l'espèce n'est pas encore extrêmement consanguine malgré plus de 30 ans à effectifs réduits. Néanmoins, cette estimation est probablement largement sous-évaluée, et ce pour deux raisons : (i) la population de 1900 n'avait sans doute pas un coefficient de consanguinité nul et (ii) le nombre de géniteurs par génération à partir de 1985 a sans doute été inférieur à 10, puisqu'un événement de reproduction annuel peut être le résultat du croisement d'un seul couple de géniteur. L'analyse génétique de la population girondine laisse d'ailleurs supposer une consanguinité bien plus importante que l'estimation ici faite (voir la partie III-B pour une analyse du polymorphisme génétique résiduel de la population de Gironde).

Malgré ce bémol, la réussite des reproductions en captivité entre 2007 et 2009 permet d'envisager avec espoir le devenir de la dernière population sauvage en Gironde, qui reste une priorité absolue de conservation. Avec l'amélioration des méthodes de reproduction artificielles et l'augmentation du nombre de juvéniles potentiellement produits, s'ouvre également la possibilité de réintroduire l'esturgeon européen dans des bassins d'où il a disparu.

Comme l'ensemble des espèces d'Acipensériformes, l'esturgeon européen *A. sturio* a connu un déclin très important au cours des derniers siècles. D'une espèce autrefois commune dans toute l'Europe ne subsiste qu'une seule population, très affaiblie et au bord de l'extinction. L'unique façon d'accéder à de nouvelles informations sur l'esturgeon européen est donc de se plonger dans le passé, afin d'étudier les populations qui ont disparu au cours des siècles. L'analyse de documents historiques, l'archéoichthyologie et surtout la paléogénétique ont donc ici une importance cruciale. La paléogénétique, en permettant la mise en lumière du passé évolutif des espèces, apporte par ailleurs des informations cruciales pour leur conservation.

### I-C PALEOGENETIQUE ET BIOLOGIE DE LA CONSERVATION AU CHEVET DES ESTURGEONS

#### **I-C-1 QU'EST-CE QUE LA PALEOGENETIQUE ?**

##### I-C-1-a L'étude de l'ADN ancien

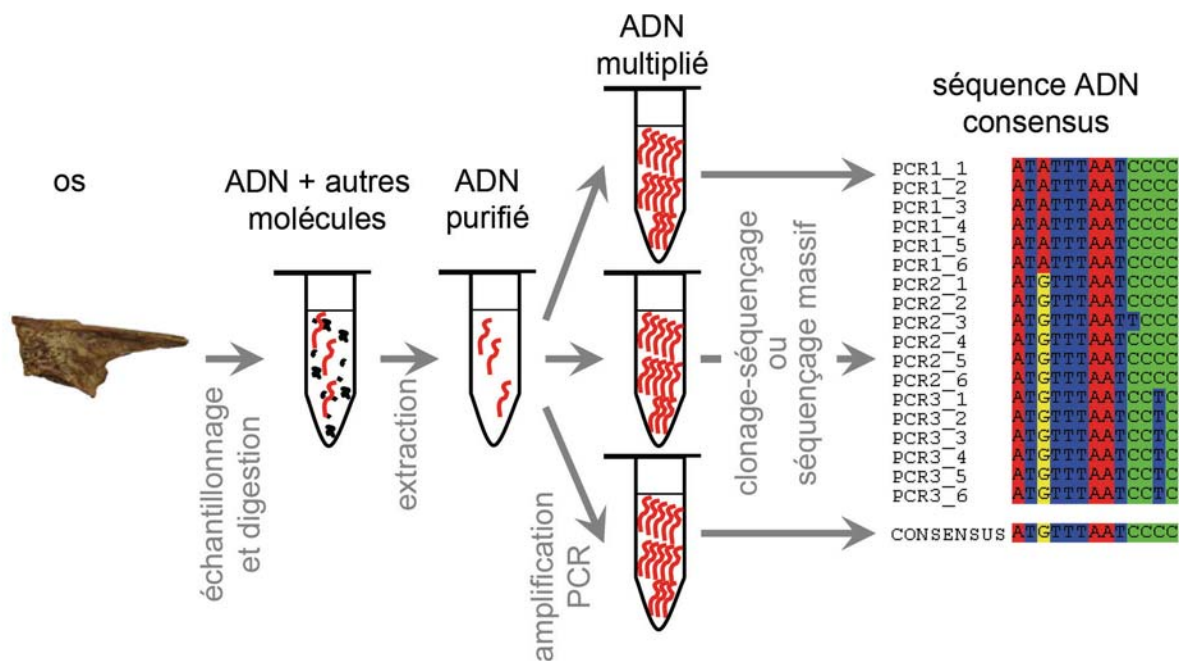
Les êtres vivants sont formés de cellules, unité structurale et fonctionnelle de la vie. Pour une espèce considérée, chaque cellule porte l'intégralité de l'information génétique, sous la forme d'acides nucléiques. Ces acides nucléiques – ribonucléique ou ARN et désoxyribonucléique ou ADN – sont composés d'une succession de nucléotides chacun formé d'un pentose, d'un groupement phosphate et d'une base azotée variable en fonction du type de nucléotide (voir plus loin, figure I-15). Quatre bases azotées différentes sont trouvées dans l'ADN : l'adénine (A), la guanine (G) (A et G sont les bases puriques), la thymine (T), et la cytosine (C) (T et C sont les bases pyrimidiques). Les mêmes bases sont trouvées dans l'ARN à l'exception de l'uracile (U) qui remplace la thymine. L'ordre des nucléotides le long des acides nucléiques – ou séquence – code les informations nécessaires à la vie des cellules, et varie suivant les êtres vivants. La comparaison des séquences de nucléotides permet de distinguer les espèces, et constitue la base de la phylogénie moléculaire.

Dès qu'une cellule meurt, les molécules qui la composent commencent à se dégrader, en particulier les acides nucléiques. Les nucléases endogènes dégradent la majorité des molécules d'ADN et d'ARN, rapidement suivies par les nucléases des bactéries et autres microorganismes détritvires (Eglinton & Logan 1991). Si les conditions environnementales inhibent rapidement l'activité des nucléases endogènes et limitent la digestion par les microorganismes, les acides nucléiques peuvent subsister un certain temps. Du fait de la réactivité du groupement alcool en C2 du pentose, les ARNs se dégradent rapidement, après quelques semaines voire quelques jours seulement (Inoue *et al.* 2002) ; les ADNs sont eux plus stables dans le temps et peuvent subsister pendant plusieurs centaines voire milliers d'années après la mort (Paabo & Wilson 1991 ; Lindahl 1993). La paléogénétique vise à

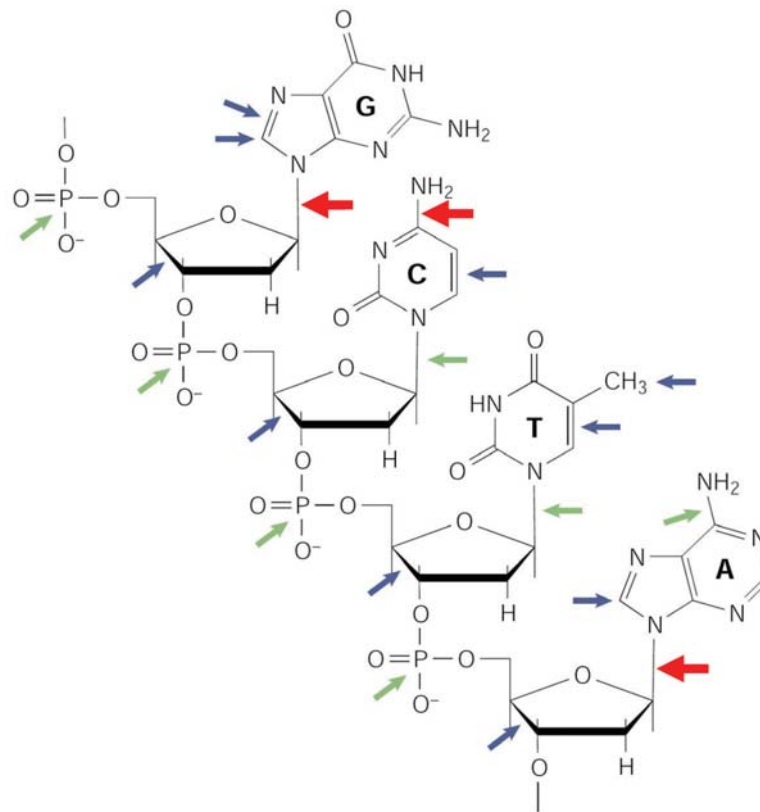


extraire et à étudier cet ADN résiduel post mortem (ou ADN ancien ou ADNa), conservé dans les restes organiques provenant d'organismes ou de cellules mortes tels que (i) les ossements, momies, tissus naturalisés ou séchés (Paabo 1985a ; Hagelberg *et al.* 1989 ; Hanni *et al.* 1990) (ii) les fèces et coprolithes (Hoss *et al.* 1992 ; Poinar *et al.* 2001 ; Poinar *et al.* 2003) (iii) les préparations culinaires et parfums (Teletchea *et al.* 2005 ; Hansson & Foley 2008 ; Schnell *et al.* 2010) (iv) les sédiments et les glaces (Willerslev *et al.* 1999 ; Willerslev *et al.* 2004 ; Willerslev *et al.* 2007).

La procédure expérimentale employée pour obtenir les séquences d'ADN ancien est illustrée dans ses grandes lignes à la figure I-14.



**Figure I-14 :** Schématisation de la procédure expérimentale suivie pour obtenir une séquence d'ADN ancien à partir d'un ossement.



**Figure I-15 :** Principales réactions de dégradations affectant l'ADN ancien. Les réactions d'hydrolyse sont marquées par des flèches vertes ou rouges pour les plus fréquentes (dépurination et désamination de cytosine). Les réactions d'oxydation sont marquées par des flèches bleues. Modifié d'après Lindahl (1993) et Hofreiter *et al.* (2001a).

Les réactions chimiques qui conduisent à la dégradation de l'ADN après la mort sont principalement des réactions d'hydrolyse et d'oxydation (Figure I-15). Les réactions d'hydrolyse affectent les liaisons N-glycosidiques reliant pentoses et bases azotées et concernent surtout les bases puriques – le taux de dépurination est en effet 20 fois supérieur au taux de dépyrimidination (Lindahl & Nyberg 1972). Les sites abasiques fragilisent la structure de l'ADN en favorisant les réactions d'hydrolyse sur la liaison phosphodiester qui relie deux nucléotides successifs : très rapidement, cette liaison est rompue, conduisant à la fragmentation de l'ADN (Lindahl & Andersson 1972). D'autres réactions d'hydrolyse interviennent, en particulier les réactions de désamination des cytosines en uraciles et plus minoritairement des adénines en hypoxanthines. La demi-vie d'une cytosine dans une molécule d'ADN double brin est ainsi estimée à 30 000 ans (Lindahl 1993). Ces désaminations sont à l'origine de mutations artéfactuelles lors de l'amplification de l'ADN par PCR : l'uracile s'hybride en effet avec l'adénine (alors que la cytosine initiale s'hybridait avec la guanine) et l'hypoxanthine avec la cytosine (alors que l'adénine s'hybridait avec la thymine),

donnant respectivement des mutations C-G → T-A et A-T → G-C. De multiples études ont montré que les désaminations de cytosines expliquent la grande majorité des mutations artéfactuelles observées dans les études d'ADNa (Hofreiter *et al.* 2001b ; Gilbert *et al.* 2003 ; Binladen *et al.* 2006 ; Stiller *et al.* 2006 ; Briggs *et al.* 2007 ; Gilbert *et al.* 2007). Des réactions d'oxydation interviennent également, modifiant la structure hélicoïdale de l'ADN ou la structure des bases (Lindahl 1993) ; les modifications induites constituent souvent des points d'arrêt infranchissables par la *Taq* polymérase (enzyme utilisée pour l'amplification de l'ADN lors de la PCR), interdisant toute amplification par PCR. Enfin, d'autres types de réactions peuvent intervenir, telle que la dimérisation des thymines favorisée par le rayonnement UV (Douki *et al.* 2003) ou des réactions de Maillard (Lee & Cerami 1987), réactions qui ont globalement les mêmes conséquences néfastes que les réactions d'oxydations sur l'amplification par PCR.

Après un certain temps, les effets combinés sur l'ADN de toutes les dégradations chimiques sont tellement importants qu'aucune molécule utile au biologiste moléculaire ne subsiste ; dans des conditions standard (pH neutre, température de 15°C, salinité physiologique), l'ADN est théoriquement totalement détruit après environ 100 000 ans (Paabo & Wilson 1991 ; Lindahl 1993).

Toutes les réactions chimiques dégradant la quantité et la qualité de l'ADN post mortem sont favorisées par un milieu aqueux (hydrolyses), oxygéné (oxydations) et par des températures élevées (accélération de la cinétique des réactions) (Lindahl 1993). L'ADN a donc de meilleures chances d'être conservé dans un milieu sec, anoxique et à basse température sans succession gel-dégel (Hoss *et al.* 1996 ; Poinar *et al.* 1996 ; Poinar 1998 ; Smith *et al.* 2001 ; Smith *et al.* 2003). Très peu d'études ont d'ailleurs rapporté des résultats positifs sur des substrats provenant de régions tropicales ou désertiques, et dans ces cas l'ADN était très dégradé (Marota & Rollo 2002 ; Orlando *et al.* 2008). Des conditions environnementales particulières sont donc indispensables à la préservation de l'ADN post mortem, qui dans la majorité des cas est totalement dégradé bien avant les 100 000 ans théoriques. Néanmoins, dans des conditions de gel permanent comme dans le permafrost ou les glaces continentales (mimant un congélateur géant), de l'ADN vieux de plus de 400 000 ans a pu être récupéré et analysé (Willerslev *et al.* 2003 ; Willerslev *et al.* 2004).

L'ADN étant fragmenté et chimiquement modifié au cours du temps, deux écueils doivent être évités afin d'authentifier des séquences anciennes :

1) la contamination. L'ADN moderne est un bien meilleur substrat pour la *Taq* polymérase, comparé à l'ADNa. En cas de contamination de l'ADNa par de l'ADN moderne, ce dernier sera donc amplifié de façon privilégiée et non spécifique, conduisant à des résultats erronés. Ce problème de contaminations est particulièrement important pour les analyses d'ADNa humain (puisque dans ce cas nous sommes nous-mêmes les contaminants) ;

2) les mutations artéfactuelles. Les modifications de base liées à l'altération chimique de l'ADNa brouillent l'information originale portée par cet ADN. Par exemple les substitutions C-G → T-A induites par les désaminations de cytosines, si elles ne sont pas détectées comme artéfactuelles, peuvent conduire à des résultats biaisés.

Afin d'éviter les erreurs lors des analyses d'ADNa, des critères d'authentification ont été établis (voir par exemple Cooper & Poinar 2000 ; Hofreiter *et al.* 2001a ; Poinar 2003 ; Paabo *et al.* 2004 ; Gilbert *et al.* 2005). La figure I-16 présente succinctement ces principaux critères, que nous avons appliqués au cours de cette thèse (voir l'annexe 1 pour une description détaillée des méthodes utilisées).

### **1- Zones de travail spécifiques (obligatoire)**

- séparation des zones de travail ADN ancien / ADN moderne
- zone de travail ADN ancien assimilée salle blanche (surpression, filtres, stérilisation)
- préparation des PCRs dans des salles indépendantes des salles d'extraction de l'ADN

### **2- Test de préservation d'autres biomolécules et d'autres restes (recommandé)**

- racémisation des acides aminés compatible avec la préservation de l'ADN
- préservation de l'ADN comparable dans les restes issus d'un même site

### **3- Contrôles d'extraction et d'amplification PCR (obligatoire)**

- blancs d'extraction négatifs
- blancs de PCR négatifs
- tests de contamination croisée et d'effet carrier PCR négatifs

### **4- Quantification (fortement recommandé)**

- détermination du nombre de molécules d'ADN par PCR quantitative
- quantité d'ADN inversement proportionnelle à la taille des fragments visés

### **5- Validation des séquences (obligatoire)**

- séquençage d'au moins deux produits de PCR indépendants pour détecter les mutations artéfactuelles liées aux dégradations de l'ADN ancien
- séquençage de fragments chevauchants pour éliminer les Numts

### **6- Reproductibilité des résultats (obligatoire pour les échantillons précieux)**

- résultats identiques à partir de deux extractions indépendantes
- résultats identiques dans deux groupes de recherche indépendants

**Figure I-16 :** critères d'authenticité pour les études d'ADN ancien.

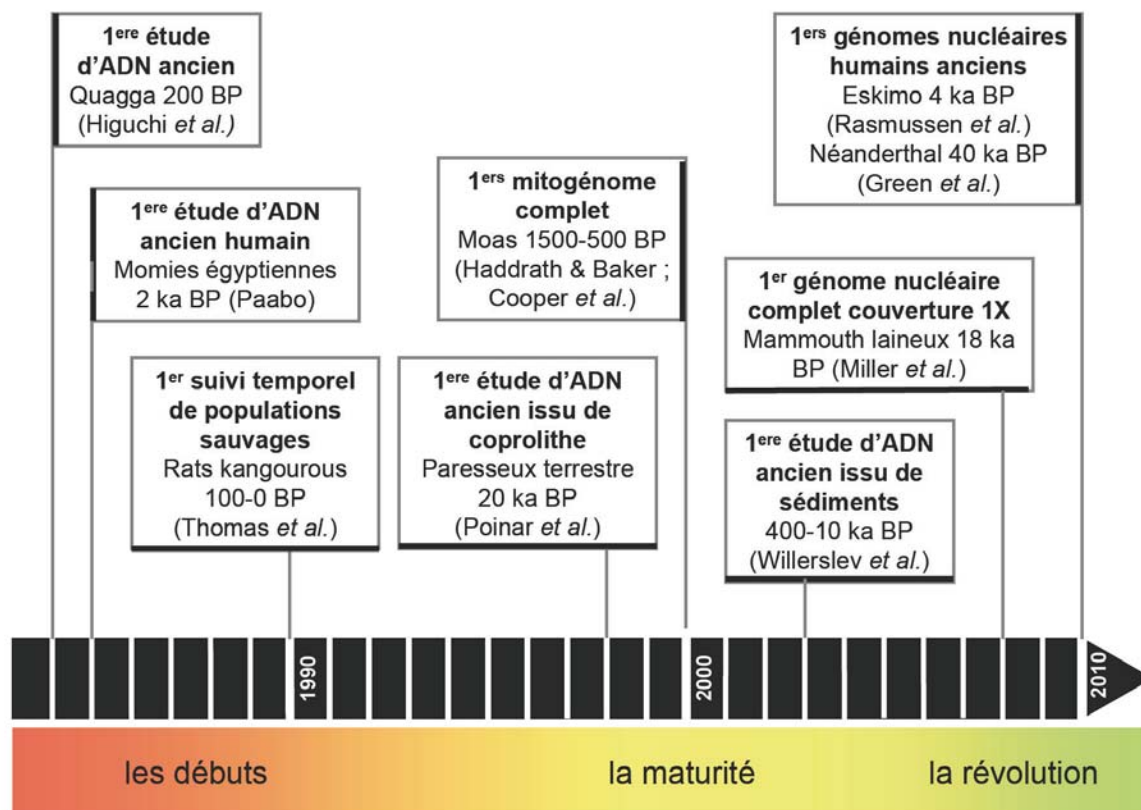
### I-C-1-b Histoire abrégée (figure I-17)

La paléogénétique est une discipline relativement récente, puisque ses sources remontent aux années 1980, quand Higuchi *et al.* (1984) séquencèrent pour la première fois une portion d'ADNmt issue d'un fragment de muscle séché d'un quagga (espèce de zèbre aujourd'hui disparue) mort au milieu du 19<sup>e</sup> siècle.

S'en suivit une période un peu folle où l'ADNa fut traqué dans toute une gamme de restes biologiques (Paabo 1985b ; Hagelberg *et al.* 1989 ; Paabo 1989 ; Hanni *et al.* 1990 ; Hoss *et al.* 1992) grâce à l'utilisation de la PCR nouvellement inventée (Saiki *et al.* 1985). La recherche du scoop conduisit à la découverte d'ADNa dans des fossiles vieux de plusieurs millions d'années, comme des feuilles de Magnoliacées du Miocène (Golenberg *et al.* 1990), des os de Dinosaures du Crétacé Supérieur (Woodward *et al.* 1994) ou encore des Insectes conservés dans l'ambre du Crétacé Inférieur (Cano *et al.* 1993). Le mirage d'une fenêtre ouverte sur la génétique d'espèces disparues depuis le Crétacé s'estompa bien vite lorsque la communauté scientifique s'aperçut que ces résultats n'étaient pas reproductibles, et correspondaient probablement à des contaminations (Sidow *et al.* 1991 ; Zischler *et al.* 1995 ; Gutierrez & Marin 1998).

Ces débuts mitigés eurent deux conséquences : (i) la discipline fut plongée dans le doute et sujette à la suspicion ; (ii) elle dut apporter une réponse à ces questionnements par l'établissement de critères stricts nécessaires à l'authentification des résultats paléogénétiques (voir figure I-16). Avec ces critères d'authenticité imposés comme une référence, la discipline atteignit l'âge de la maturité à la fin des années 1990 et gagna en crédibilité.

Enfin, depuis 2005 et l'apparition des méthodes de séquençage d'ADN à haut débit (454, Solid, GenomeAnalyser...), le domaine de la paléogénétique vit une révolution, comme d'ailleurs toute la génétique moléculaire. Les précautions nécessaires pour éviter les contaminations sont toujours indispensables, mais l'énorme quantité de séquences analysables grâce au haut débit permet de mieux caractériser les mutations artéfactuelles (Stiller *et al.* 2006 ; Briggs *et al.* 2007 ; Gilbert *et al.* 2007) et de d'obtenir des jeux de données conséquents en peu de temps (Gilbert *et al.* 2008a ; Stiller *et al.* 2009).

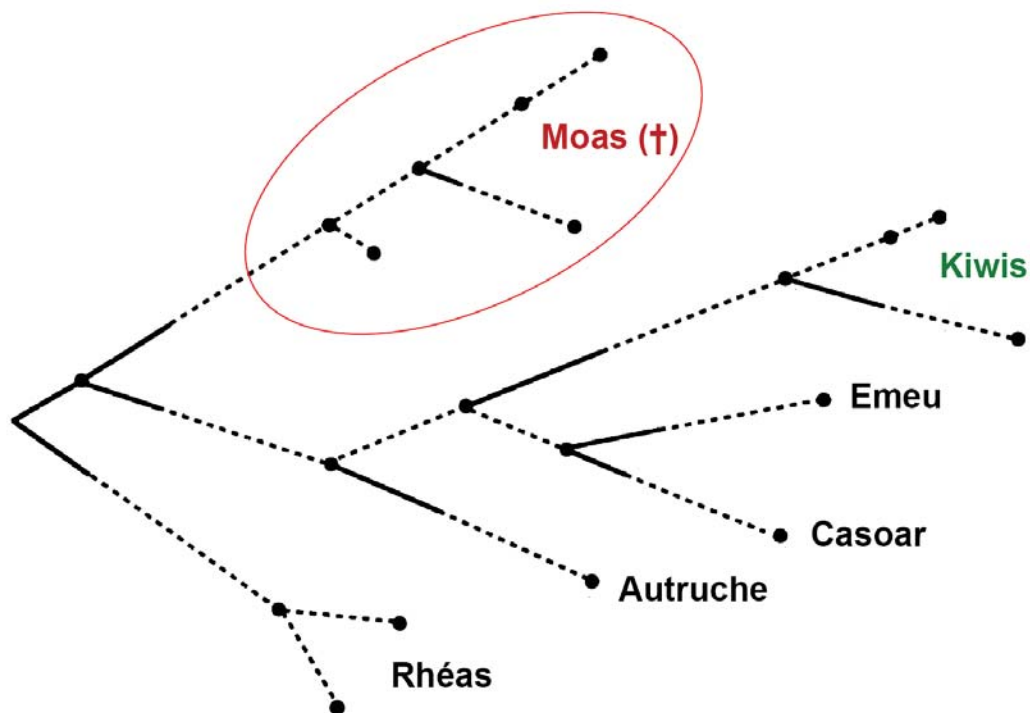


**Figure I-17 :** Principaux faits marquants de la paléogénétique depuis ses débuts.

### I-C-1-c Utilisations des données paléogénétiques

#### ■ Phylogénie.

Une application évidente des recherches paléogénétiques est la possibilité de placer les espèces éteintes au sein des phylogénies d'espèces actuelles. Cet aspect a été particulièrement développé aux débuts de la discipline, avec les exemples du quagga (parmi les Equidés) (Higuchi *et al.* 1984), des moas néo-zélandais (parmi les Struthioniformes ; Figure I-18) (Cooper *et al.* 1992), du loup de Tasmanie (parmi les Marsupiaux) (Krajewski *et al.* 1992), de l'ours des cavernes (parmi les Ursidés) (Hanni *et al.* 1994) ou encore du mammouth (parmi les Eléphantidés) (Hagelberg *et al.* 1994 ; Hoss *et al.* 1994). Ces études se sont essentiellement basées sur l'ADNmt, plus facile à étudier sur les restes anciens car présent en un plus grand nombre de copies par cellule.



**Figure I-18 :** Placement des Moas (oiseaux éteints de Nouvelle-Zélande) dans la phylogénie des Struthioniformes (oiseaux piéteurs), réalisée à partir de 390 pb de l'ARN mitochondrial 12S. Les Kiwis (oiseaux de Nouvelle-Zélande encore vivants) ne sont pas regroupés avec les Moas, indiquant deux colonisations indépendantes de la Nouvelle-Zélande par les Struthioniformes, à l'origine des Moas et des Kiwis (modifié d'après Cooper *et al.* 1992).

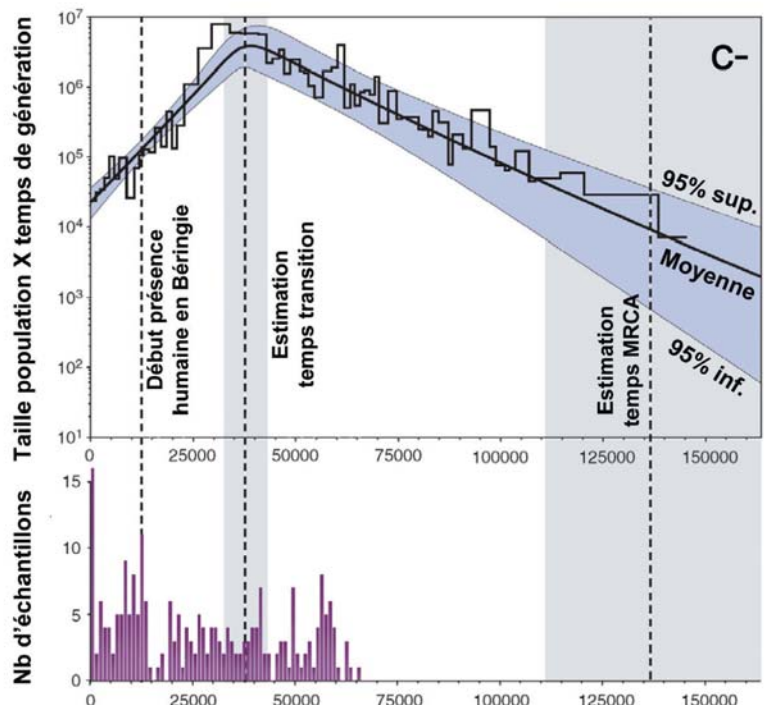
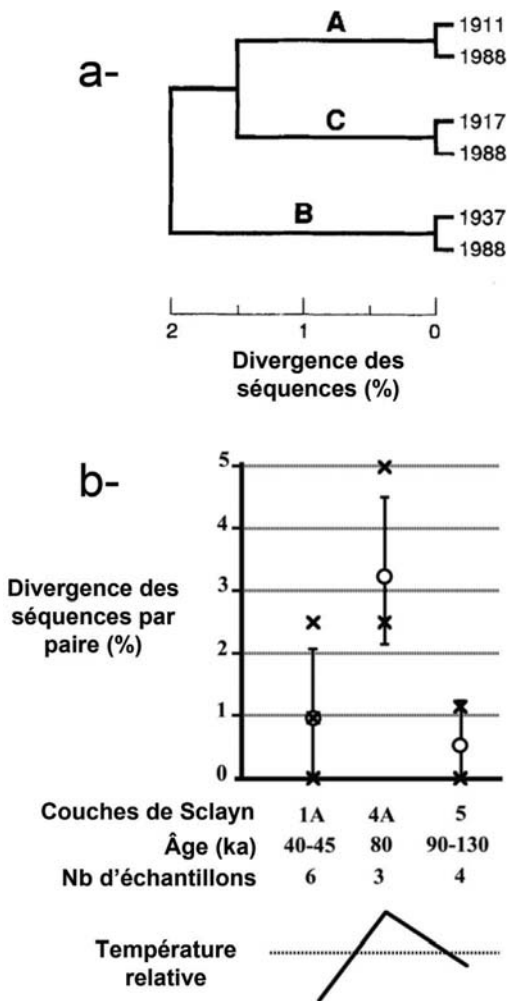
La paléogénétique permet même parfois de redécouvrir des taxons qui étaient considérés comme éteints. Steeves *et al.* (2010) ont par exemple étudié l'ADN de fossiles d'oiseaux de l'Holocène attribués à l'espèce *Sula tasmani* – considérée comme éteinte – et l'ont comparé à celui d'espèces d'oiseaux actuelles vivant dans la même région. Ils se sont aperçus que l'ADN du taxon éteint était identique à celui de l'espèce actuelle *S. dactylatra fullagari*, indiquant que *S. tasmani* n'avait pas disparu mais était en fait *S. dactylatra fullagari*.

#### ■ Histoire des populations.

Lorsqu'un nombre important d'échantillons anciens est étudié, il est possible d'appliquer les méthodes de la génétique des populations. Une comparaison entre la situation présente et la situation passée à un point donné dans le temps est le plus souvent effectuée lorsque le sujet d'étude est une espèce encore vivante. Dans certains cas où les échantillons anciens sont échelonnés sur une plus grande

période de temps, de multiples points dans le passé peuvent être comparés entre eux et éventuellement avec le présent. Une revue récente portant sur 29 articles traitant de ce sujet a été réalisé par Ramakrishnan & Hadly (2009).

Citons les exemples du Rat Kangourou de Californie (stabilité génétique de trois populations entre le début et la fin du 20e siècle ; Thomas *et al.* 1990 ; Figure I-19a), des Géomyidés (stabilité génétique d'une population pendant les 3000 dernières années ; Hadly *et al.* 1998), de l'ours brun (suivi de la population béringienne sur 60 ka, avec de multiples variations, extinctions d'haplotypes, réinvasions... ; Leonard *et al.* 2000 ; Barnes *et al.* 2002), ou encore de l'ours des cavernes (variations génétiques sur la grotte de Sclayn entre -130 ka et -40 ka ; Orlando *et al.* 2002 ; Figure I-19b). Chez les Poissons, des analyses génétiques de populations au cours du temps ont été réalisées par exemple sur la morue (Hutchinson *et al.* 2003) ou le thon rouge (Riccioni *et al.* 2010).



**Figure I-19 :** Exemples de suivi temporel de populations ou espèces : a- 3 populations californiennes de rats kangourous (A, B et C) (Thomas *et al.* 1990) b- Ours des cavernes de Sclayn (Belgique), avec relation au climat (Orlando *et al.* 2002) c- Bisons béringiens, avec modèle démographique (Shapiro *et al.* 2004).



De nouveaux outils d'analyse des données génétiques, en particulier les modélisations bayésiennes basées sur la théorie de la coalescence, permettent désormais de mieux estimer les paramètres évolutifs et démographiques tels que les dates de divergence (en prenant en compte l'âge des séquences anciennes) ou la taille efficace des populations disparues.

Ce type d'étude nécessite un jeu de données informatif (nombre d'individus et nombre de sites polymorphes importants), ce qui a par exemple été réalisé sur le bison (Shapiro *et al.* 2004 ; Figure I-19c), le mammoth (Debruyne *et al.* 2008) ou le bœuf musqué (Campos *et al.* 2010).

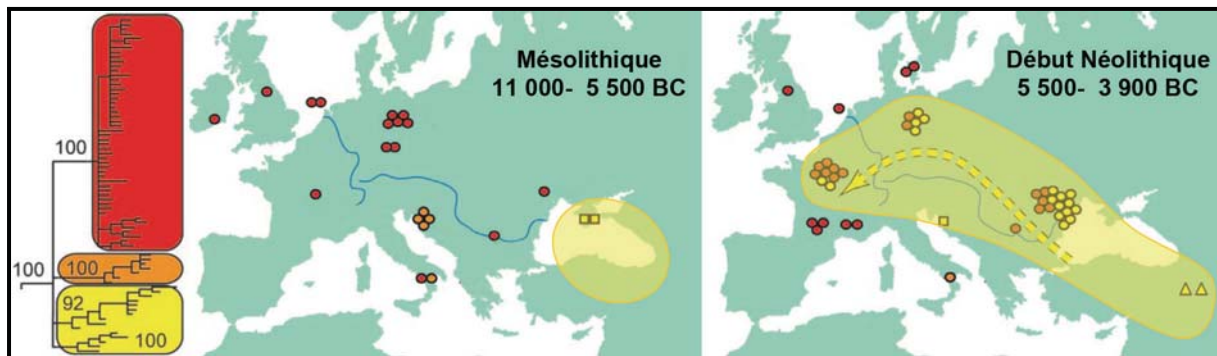
### ■ Phylogéographie.

Pour les espèces vivantes dont l'aire de répartition a été drastiquement réduite ou pour les espèces éteintes, analyser la diversité génétique sur l'ensemble de la distribution permet d'accéder à des informations sur l'histoire évolutive de l'espèce et sur sa biologie. L'ours brun est sans doute l'un des modèles qui a été le plus étudié, puisqu'aux données sur les populations actuelles sont venues se rajouter celles de populations disparues nord-américaines (Miller *et al.* 2006), européennes (Valdiosera *et al.* 2007) et nord-africaines (Calvignac *et al.* 2008 ; Calvignac *et al.* 2009). Le cas des lions (Barnett *et al.* 2006a, b ; Barnett *et al.* 2009) et des loups (Vila *et al.* 1999 ; Koblmüller *et al.* 2009 ; Muñoz-Fuentes *et al.* 2009 ; Slater *et al.* 2009) ont également été bien décrits.

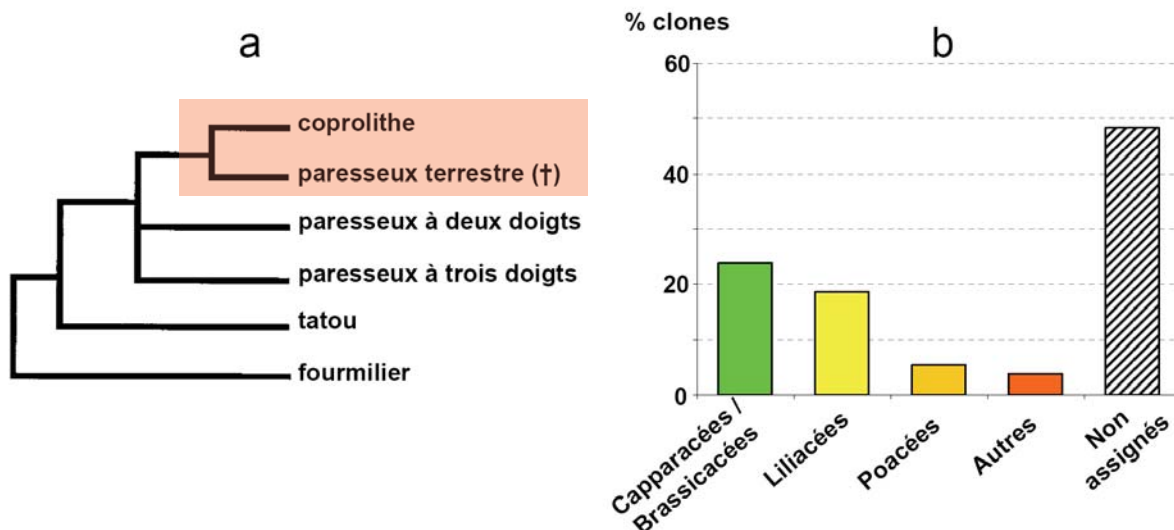
L'analyse de la diversité génétique dans l'espace et le temps sur les espèces commensales ou domestiquées par l'Homme permet également d'identifier ou de confirmer certaines voies de migration humaines. Les exemples des chèvres (Fernandez *et al.* 2006) ou des porcs en Europe (Larson *et al.* 2007) sont pertinents à cet égard (Figure I-20).

### ■ Régime alimentaire.

L'analyse génétique des fèces fournit des informations (i) sur l'individu source qui les a produites, puisqu'elles contiennent des cellules mortes issues de son tractus digestif (Figure I-21a), mais aussi (ii) sur la nourriture qu'il a consommé, puisqu'elles contiennent des résidus non digérés qui en sont issus, ce qui permet de mieux connaître ses habitudes alimentaires mais aussi l'environnement dans lequel il vit ou vivait (Figure I-21b).



**Figure I-20 :** Diversité génétique des porcs et migration humaine. Trois groupes génétiques distincts de porcs ont été identifiés en Europe et au Proche-Orient (rouge, orange et jaune). Le groupe jaune aurait été ramené en Europe occidentale lors de la Néolithisation par les hommes, suivant la voie danubienne. Modifié d'après Larson *et al.* (2007).



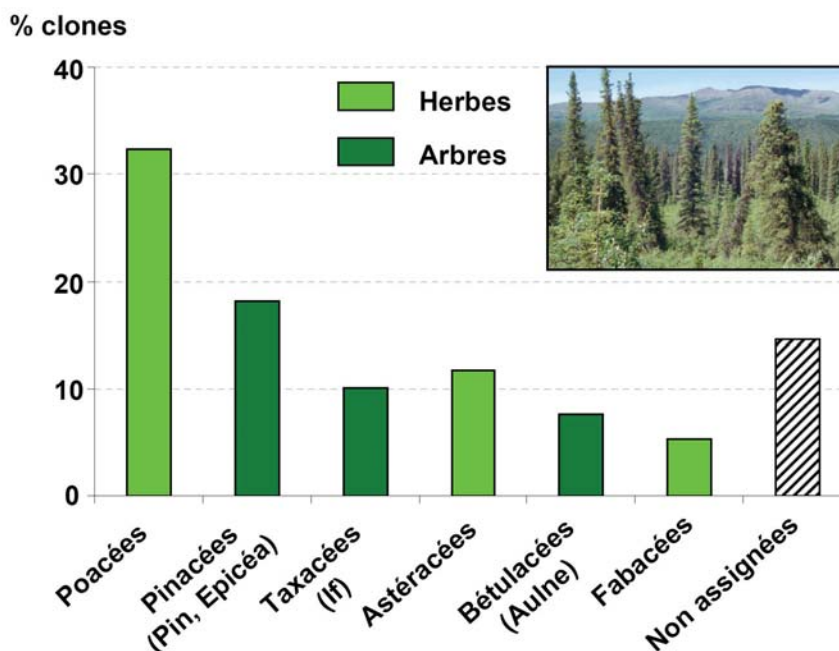
**Figure I-21 :** Analyse génétique d'un coprolithe datant d'environ 20 ka BP.

a- L'analyse d'un marqueur mitochondrial à large spectre (ARN 12S) identifie l'espèce source comme étant proche du paresseux terrestre, disparu il y a 11 ka (la séquence de référence du paresseux terrestre a été obtenu à partir d'un os) ;  
 b- L'analyse de marqueurs chloroplastiques à large spectre (*rbcL*) permet de détecter les différents végétaux présents dans la déjection, indiqués en % des clones séquencés (n=188). Près de la moitié des clones n'ont pu être assignés à aucune famille végétale car les banques de données ne contenaient pas de séquences proches. D'après Poinar *et al.* (1998).

L'analyse des fèces fraîches ou fossilisées (nommées alors coprolithes) est applicable aux herbivores (Poinar *et al.* 1998 ; Hofreiter *et al.* 2000 ; Poinar *et al.* 2003 ; van Geel *et al.* 2008) comme aux omnivores (dont l'Homme) et aux carnivores (Hoss *et al.* 1992 ; Poinar *et al.* 2001 ; Deagle *et al.* 2005 ; Gilbert *et al.* 2008b).

■ Paléoenvironnements

La démonstration de la présence d'ADNa amplifiable conservé dans les glaces continentales (Willerslev *et al.* 1999 ; Willerslev *et al.* 2007) ainsi que dans les sédiments du permafrost (Willerslev *et al.* 2004 ; Lydolph *et al.* 2005), des grottes (Willerslev *et al.* 2003 ; Haile *et al.* 2007) ou des lacs (Matisoo-Smith *et al.* 2008) constitua une avancée supplémentaire. L'amplification de marqueurs génétiques mitochondriaux et chloroplastiques à large spectre permet en effet d'identifier la faune et la flore présentes dans ces environnements. Willerslev *et al.* (2007) ont ainsi pu montrer l'existence d'une forêt boréal au Groenland il y a plus de 100 000 ans (Figure I-22).

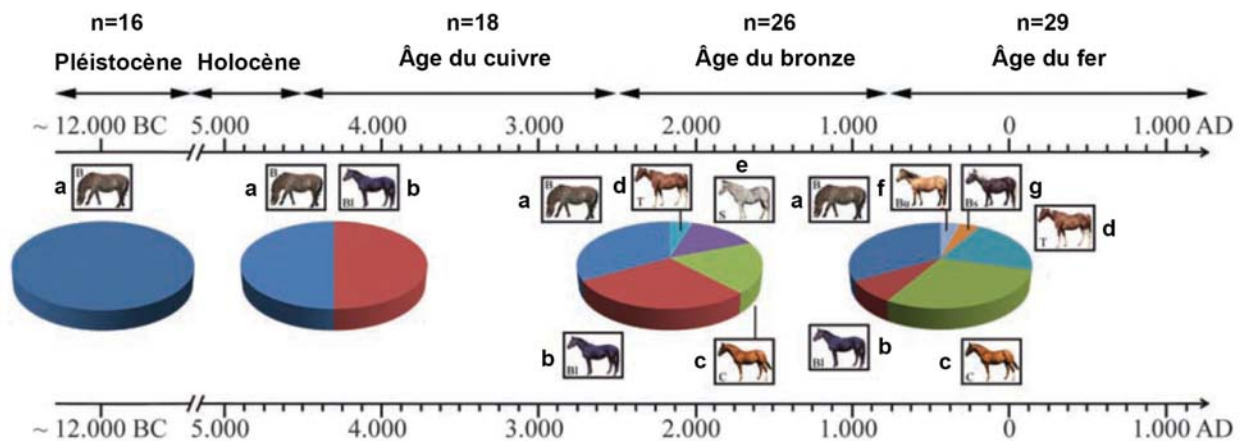


**Figure I-22 :** Analyse génétique de glaces du Groenland (carotte Dye3) datant de 800-450 ka BP. L'utilisation de marqueurs chloroplastiques à large spectre (*rbcL* et *trnL*) indique la présence d'herbacées et d'arbres typiques d'une forêt boréal. Sur l'ensemble des clones séquencés (n=549), 45% ont été éliminés car ils ne passaient pas les filtres d'authentification et d'identification ; seules les séquences ayant passées ces filtres sont présentés ici. D'après Willerslev *et al.* (2007).

■ Traits phénotypiques

La grande majorité des analyses paléogénétiques portant sur les Eucaryotes s'est focalisée sur l'ADNmt. Mais avec l'amélioration des méthodes, de plus en plus d'études se sont orientées vers l'ADN nucléaire (ADNnuc) qui contient les gènes

codant pour la plupart des traits phénotypiques (Hunter 2006). De nombreuses études se sont ainsi intéressées aux traits phénotypiques d'espèces disparues, comme la couleur du pelage (Rompler *et al.* 2006) ou l'adaptation au froid (Campbell *et al.* 2010) chez le Mammouth. D'autres ont analysé les origines phylogénétique de traits phénotypiques d'espèces encore vivantes comme la robe des chevaux (Ludwig *et al.* 2009a ; Figure I-23) ou le pelage des loups (Anderson *et al.* 2009 ; Barsh *et al.* 2009). Et bien sûr, l'origine des caractéristiques différenciant l'Homme des autres Primates a été recherchée, par exemple l'étude du langage à partir de données génétiques tirées de l'Homme de Néandertal (Krause *et al.* 2007).



**Figure I-23 :** Evolution du polymorphisme de coloration de la robe chez les chevaux entre le Pléistocène et l'Âge du fer. Huit polymorphismes nucléotidiques (SNPs) impliqués dans la coloration ont été génotypés sur 89 ossements anciens. a : Bai, b : Noir, c : Alezan, d : Pie tobiano, e : Pie sabino, f : Isabelle, g : Noir argenté. D'après (Ludwig *et al.* 2009a).

Par ailleurs, avec les méthodes de séquençage à haut débit, l'accès à des génomes anciens nucléaires complets est maintenant possible, ouvrant la voie à la recherche systématique de traces de sélection (les traces de sélection positive étant les plus recherchées) permettant d'identifier les traits qui ont récemment évolué dans telle ou telle lignée. La publication récente du génome nucléaire complet de l'Homme de Néandertal est bien sûr au centre de toutes les attentions (Green *et al.* 2010), puisque par comparaison avec les génomes des Hommes modernes et des autres Primates (surtout le chimpanzé), il permettra de déterminer ce qui fait notre spécificité (Lambert & Millar 2006).

### **■ Analyses de parenté**

Clarifier les généalogies du passé intéresse surtout les historiens et les anthropologues. La paléogénétique a permis par exemple d'identifier les restes du Tsar Nicolas II et de ses proches – exécutés après la Révolution russe en 1918 – (Ivanov *et al.* 1996 ; Coble *et al.* 2009) ou de clarifier les relations de parentés entre les momies égyptiennes de la famille de Toutankhamon (Hawass *et al.* 2010) – pharaon de la XVIIIe dynastie. Attention toutefois, les résultats paléogénétiques obtenus à partir de restes humains ne sont pas toujours fiables.

La paléogénétique permet d'arracher de l'oubli les séquences d'ADN conservées dans les restes biologiques anciens. L'analyse des informations portées par ces séquences permet de répondre à toute une gamme de questions fondamentales auxquelles les chercheurs ne pensaient pas pouvoir répondre un jour, et induit également toute une gamme d'applications en biologie de la conservation.

## ***I-C-2 BIOLOGIE DE LA CONSERVATION ET PALEOGENETIQUE***

### **I-C-2-a La biologie de la conservation, discipline de crise**

Les activités humaines depuis plusieurs milliers d'années en général (chasse, déforestation, agriculture, élevage), et depuis le début de l'ère industrielle en particulier (urbanisation, agriculture intensive, pollution, exploitation intensive des ressources naturelles et sans doute réchauffement climatique) ont contribué et contribuent à la disparition ou à la raréfaction de nombreuses espèces (Pimm & Raven 2000 ; Halpern *et al.* 2008 ; Schipper *et al.* 2008). La biologie de la conservation est née dans ce contexte de crise, avec pour objectif la description et la préservation de la biodiversité dans sa globalité. Le cœur de la discipline est la compréhension des facteurs et des processus conduisant à l'extinction des espèces, et bien sûr la prévention de ces extinctions. C'est une discipline mixte ayant des fondations biologiques (écologie, systématique, génétique) mais englobant également les apports des sciences humaines et sociales et l'expérience des gestionnaires de terrain (Meine *et al.* 2006). Le premier congrès sur la biologie de la conservation eu lieu en 1978 à San Diego et peut être considéré comme l'acte

fondateur de la discipline, même si ses racines peuvent être retracées jusqu'au 19<sup>e</sup> siècle (Wallace 1863 p.234 ; Marsch 1864 p.57-127). Les comptes-rendus de ce congrès furent publiés en 1980 sous le titre *Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective* (Soulé & Wilcox 1980).

Au départ, les biologistes de la conservation s'intéressaient principalement (i) à la génétique, à la démographie et à la viabilité des petites populations ; (ii) à la fragmentation, à la dégradation et à la conservation des habitats ; (iii) à la gestion des aires naturelles et au suivi des espèces en danger (Meine *et al.* 2006). Avec l'intégration des nouvelles connaissances, de nouvelles questions se sont ajoutées telles que (i) les interactions entre espèces au sein des écosystèmes, (ii) l'impact du climat et en particulier du réchauffement climatique sur la biodiversité et (iii) l'attribution d'une valeur à la biodiversité et la définition de priorités de conservation.

La biologie de la conservation a intégré les innovations méthodologiques d'autres champs disciplinaires pour s'enrichir. C'est ainsi que la modélisation informatique, les systèmes d'informations géographiques (SIG) ou encore la génétique ont pris une place centrale dans la discipline. La génétique, par la pertinence et la précision des informations qu'elle fournit, constitue un outil majeur de prise de décision en biologie de la conservation.

### I-C-2-b Apports de la génétique de la conservation

#### ■ Que conserver ? Définition des unités de conservation et clarification des relations taxonomiques.

La répartition des efforts de conservation est conditionnée par l'identification des entités menacées, qu'il est donc impératif de caractériser le plus précisément possible. Ces entités sont généralement identifiées à deux niveaux : celui de l'espèce et celui de la population (ou du groupe de populations). Au sens biologique, une espèce est un groupe d'individus interfertiles engendrant une descendance fertile (Mayr 1963). Chaque espèce ayant ses caractéristiques morphologiques et génétiques propres, constitue une entité à préserver. Par ailleurs au sein d'une même espèce, des variations peuvent exister, ce qui a conduit les biologistes à créer

de multiples catégorisations au niveau intraspécifique incluant les sous-espèces, les populations, les stocks,...

Afin de répondre à un besoin de clarification et d'unification au niveau intraspécifique, la notion d'ESU pour « Evolutionarily Significant Unit » ou « Unité Evolutivement Significative » a été introduite (Ryder 1986). Une ESU peut se définir comme un groupe d'individus reproductivement isolé ayant une identité génétique propre, représentant une composante évolutive importante de l'espèce (King & Burke 1999 ; voir aussi Fraser & Bernatchez 2001 pour une revue sur la multitude de définitions du terme ESU). Chaque ESU est génétiquement différenciée des autres et dispose donc théoriquement d'un potentiel adaptif distinct, ce qui justifie des efforts de conservation séparés (Moritz 1994). L'ESU constitue l'unité de base de la conservation.

La bonne définition des unités de conservation est critique afin d'éviter (i) l'extinction d'espèces (ou d'ESUs) non identifiées, (ii) les mélanges par hybridation d'espèces (ou d'ESUs) non identifiées, (iii) de consacrer du temps et de l'argent à des espèces (ou ESUs) communes ou des populations hybrides n'ayant pas un statut d'espèce (ou d'ESU) (Frankham *et al.* 2002).

Les caractéristiques morphologiques des organismes ont servi de base à la définition de ces unités de conservation, mais depuis l'avènement des marqueurs moléculaires à la fin des années 1960, les critères génétiques sont majoritairement utilisés (Moritz 1994). Ils offrent une résolution phylogénétique bien meilleure (dans le sens où les espèces et les populations peuvent être distinguées sur la base de nombreux marqueurs génétiques diagnostiques) et permettent de résoudre bon nombre d'incertitudes taxonomiques, insolubles ou mêmes insoupçonnées auparavant. L'exemple des complexes d'espèces jumelles ou cryptiques est parlant : lorsque plusieurs espèces sont très semblables morphologiquement, elles sont très difficiles voir impossibles à identifier ; l'existence de ces groupements d'espèces est connue depuis plus de 300 ans, mais il a fallu attendre l'invention de la PCR et l'utilisation systématique de la génétique pour que le nombre d'espèces cryptiques décrites augmente de façon exponentielle (Bickford *et al.* 2007). Hebert *et al.* (2004) ont par exemple identifié 10 espèces différentes de papillons à partir de l'espèce morphologique *Astraptes fulgerator*.

### ■ Contrôle du commerce

En fournissant des outils de reconnaissance rapide des espèces, la génétique permet de détecter le commerce illégal. L'utilisation des marqueurs moléculaires s'est donc rapidement répandu pour le contrôle du commerce des produits issus d'espèces protégées, comme le caviar des esturgeons (DeSalle & Birstein 1996 ; Ludwig *et al.* 2002a ; Ludwig 2008 ; Rehbein *et al.* 2008 ; Waldman *et al.* 2008), la viande des baleines (Baker *et al.* 2006 ; Baker *et al.* 2007), l'ivoire des éléphants et des rhinocéros (Wasser *et al.* 2004) ou encore le bois tropical (Finkeldey *et al.* 2010).

### ■ Caractérisation de l'hybridation et de l'introggression

L'hybridation correspond à un croisement entre différentes espèces, conduisant à une descendance viable. L'hybridation naturelle produit souvent des hybrides non fertiles, mais dans certains cas les hybrides de première génération sont capables de se croiser entre eux ou avec les espèces parentes, conduisant à des flux de gènes d'une espèce à l'autre : cette situation est nommée introgression (Rhymer & Simberloff 1996). La détection des hybrides est restée basée sur des caractéristiques morphologiques jusque dans les années 1960, partant du postulat que les individus hybrides ont un phénotype intermédiaire entre les deux espèces parentales (Smith 1992). Mais ce n'est pas toujours le cas, et la morphologie ne permet généralement pas non plus de distinguer les différents états d'hybridation (génération F1, F2 ou après de multiples croisements). L'utilisation des marqueurs génétiques a beaucoup simplifié la détection des hybrides, permettant parfois d'initier des mesures de conservation.

L'hybridation avec des espèces communes représente en effet une menace importante pour certaines espèces rares car l'introggression conduit à l'érosion de leur identité génétique et à terme à leur disparition pure et simple (Rhymer & Simberloff 1996 ; Allendorf *et al.* 2001). Ce problème se pose pour de nombreuses espèces, notamment de Plantes, de Poissons ou d'Oiseaux (Grant & Grant 1992 ; Ellstrand *et al.* 1999 ; Perry *et al.* 2002). Chez les Mammifères, les exemples sont plus rares mais il a été démontré grâce à la génétique que le loup éthiopien *Canis simiensis* – espèce menacée d'extinction – s'hybridait avec les chiens domestiques (Gottelli *et al.* 1994).



Par ailleurs, certains taxons décrits comme des espèces à part entière se sont révélées être le fruit d'une hybridation. Dans ce cas, le statut de la population hybride dépend de la nature de l'hybridation. Si l'hybridation est naturelle, alors la population hybride représente une entité évolutive qu'il est nécessaire de conserver ; c'est le cas par exemple du loup rouge américain *Canis rufus*, qui fut identifié grâce à la génétique comme un hybride de loup gris *Canis lupus* et de coyote *Canis latrans* (Wayne & Jenks 1991). Si l'hybridation est artificielle, résultant de l'introduction d'une espèce exotique dans l'aire de répartition d'une espèce autochtone ou bien directement de croisements artificiels réalisés en captivité, alors la population hybride n'a pas lieu d'être conservée ; c'est le cas par exemple des populations canadiennes hybrides de truite fardée *Oncorhynchus clarki lewisi* (espèce native) et de truite arc-en-ciel *O. mykiss* (espèce introduite) (Rubidge & Taylor 2004).

### ■ Statut et viabilité des populations

Les marqueurs moléculaires permettent d'estimer la variabilité génétique des populations et donc leur viabilité à long terme, partant du principe que plus une population est variable génétiquement, plus elle dispose d'un potentiel adaptatif important qui lui permettra de survivre à d'éventuelles variations environnementales (infection par un pathogène, nouvelles espèces compétitrices, changements climatiques...) (Barrett & Schluter 2008).

La diversité génétique est générée par mutation au cours des générations, et se perd par les effets de la sélection (un variant génétique étant favorisé ou défavorisé) et/ou de la dérive génétique (le hasard conduisant à la conservation de tel variant et à l'élimination de tel autre). Les effets de la sélection et de la dérive génétique sont dépendants du locus considéré et de la taille de la population ; en particulier l'effet de la dérive génétique est d'autant plus important et celui de la sélection d'autant plus faible que la population a un effectif limité. Les espèces menacées ayant par définition souvent des petites populations, elles sont moins sujettes à la sélection (ce qui limite par exemple l'élimination des variants génétiques défavorables) et plus sensibles à la dérive (ce qui les expose à une perte accrue de diversité) (Frankham *et al.* 2002).

Les faibles effectifs conduisent également à la consanguinité par des croisements entre apparentés, ce qui accentue la perte de diversité génétique et expose à l'expression des variations génétiques délétères rares ou tares génétiques (Keller & Waller 2002). La consanguinité rend ainsi les populations naturelles plus sujettes à l'extinction (Frankham & Ralls 1998 ; O'Grady *et al.* 2006), en induisant une baisse du taux de survie et de reproduction des individus. Ralls *et al.* (1988) ont en effet étudié 40 populations de Mammifères et ont mis en évidence un taux de mortalité plus élevé chez les individus consanguins pour 36 d'entre elles. Chez le poisson mexicain *Poeciliopsis monacha*, la comparaison de populations « normale » et « consanguine » a permis de corrélérer la consanguinité à la présence de déformations corporelles – dont une courbure anormale de la colonne vertébrale – et à une plus faible résistance à l'hypoxie (Vrijenhoek *et al.* 1992 ; Vrijenhoek 1994).

Le coefficient de consanguinité d'un individu peut être calculé si son pedigree est connu, comme par exemple dans les zoos (Boakes *et al.* 2007 ; Wolc *et al.* 2008). L'histoire des croisements dans une population sauvage est en général inconnue, mais il est possible d'estimer le coefficient de consanguinité à l'instant  $t$  par la perte d'hétérozygotie observée entre l'instant  $t_0$  et l'instant  $t$ , ou bien à partir des variations de la taille efficace  $N_e$  :

$$F_t = 1 - (H_t / H_0) \quad (\text{Frankham } et al. 2002 ; \text{équation (11.5), p. 266})$$

$$F_t = 1 - \prod_{i=1}^t [1 - 1 / (2N_{e_i})] \quad (\text{Frankham } et al. 2002 ; \text{équation (11.5), p. 266})$$

Les marqueurs moléculaires permettent nous l'avons vu de détecter les échanges génétiques entre espèces (hybridation), mais aussi entre populations d'une même espèce lorsque celles-ci sont génétiquement différenciées. L'identification des patrons de migration peut être réalisée grâce à la génétique de façon complémentaire avec les données de terrain, ce qui permet d'estimer la résistance de l'espèce à la fragmentation de son habitat, problème souvent majeur pour les espèces menacées (Lowe & Allendorf 2010). Si les populations fragmentées n'échangent plus de gènes, leur diversité génétique tendra à décroître et leur consanguinité à s'accroître (Couvét 2002).

### ■ Gestion des populations sauvages

Les populations sauvages menacées peuvent faire l'objet de diverses mesures de conservation comme : (i) l'augmentation du nombre d'individus afin d'éviter les problèmes liés aux faibles effectifs ; le choix de la population source des individus néo-introduits se fait sur des critères génétiques quand cela est possible, afin de maximiser les bénéfices tout en conservant l'identité de la population supplémentée ; (ii) l'échange d'individus entre populations fragmentées ou bien la création de corridors d'habitat favorable entre elles, afin de maintenir les flux génétiques entre les isolats ; (iii) le déplacement des individus dans un nouvel habitat favorable et préservé.

### ■ Gestion des populations captives

Pour certaines espèces, le maintien de populations captives dans les zoos, aquariums et autres réserves, constitue le dernier rempart avant l'extinction pure et simple : c'est le cas par exemple pour le cerf du père David (Zhigang & Harris 2008), l'oryx algazelle (IUCN 2008), ou la corneille d'Hawaï (IUCN 2010b). Ces populations captives peuvent également servir au repeuplement des populations naturelles, comme pour l'esturgeon d'Europe (Gonthier 2009) ou le tamarin lion doré (Kierulff *et al.* 2008).

Les populations maintenues en captivité sont généralement fondées à partir d'un nombre limité d'individus et peuvent donc subir une détérioration de leurs caractéristiques génétiques en liaison avec la consanguinité – perte de diversité génétique, accumulation de mutations délétères en particulier. Un programme de reproduction artificielle doit être établi sur la base des relations de parenté connues ou de la proximité génétique des individus (mesurée à l'aide des marqueurs moléculaires), afin de limiter la consanguinité et de maximiser la rétention de la diversité génétique présente. L'objectif est alors de maximiser le nombre de géniteurs et d'équilibrer leur descendance (un géniteur ne devant pas fournir les  $\frac{3}{4}$  des descendants constituant la génération suivante).

Parfois – comme pour l'esturgeon européen – le choix des géniteurs est néanmoins limité par les contraintes de maturation sexuelle et les croisements ne peuvent être contrôlés à volonté.

Les populations captives sont également caractérisées par une adaptation génétique aux conditions d'élevage, ce qui réduit souvent leur capacité à réintégrer le milieu naturel (Frankham 2008). Ce point est pour l'instant relativement délaissé, mais constitue la principale menace pour les espèces produisant un grand nombre de descendants – par exemple les poissons comme les esturgeons – car les effets de la sélection sont d'autant plus importants que le nombre d'individus sur lesquels elle s'exerce est grand (Allendorf & Luikart 2006).

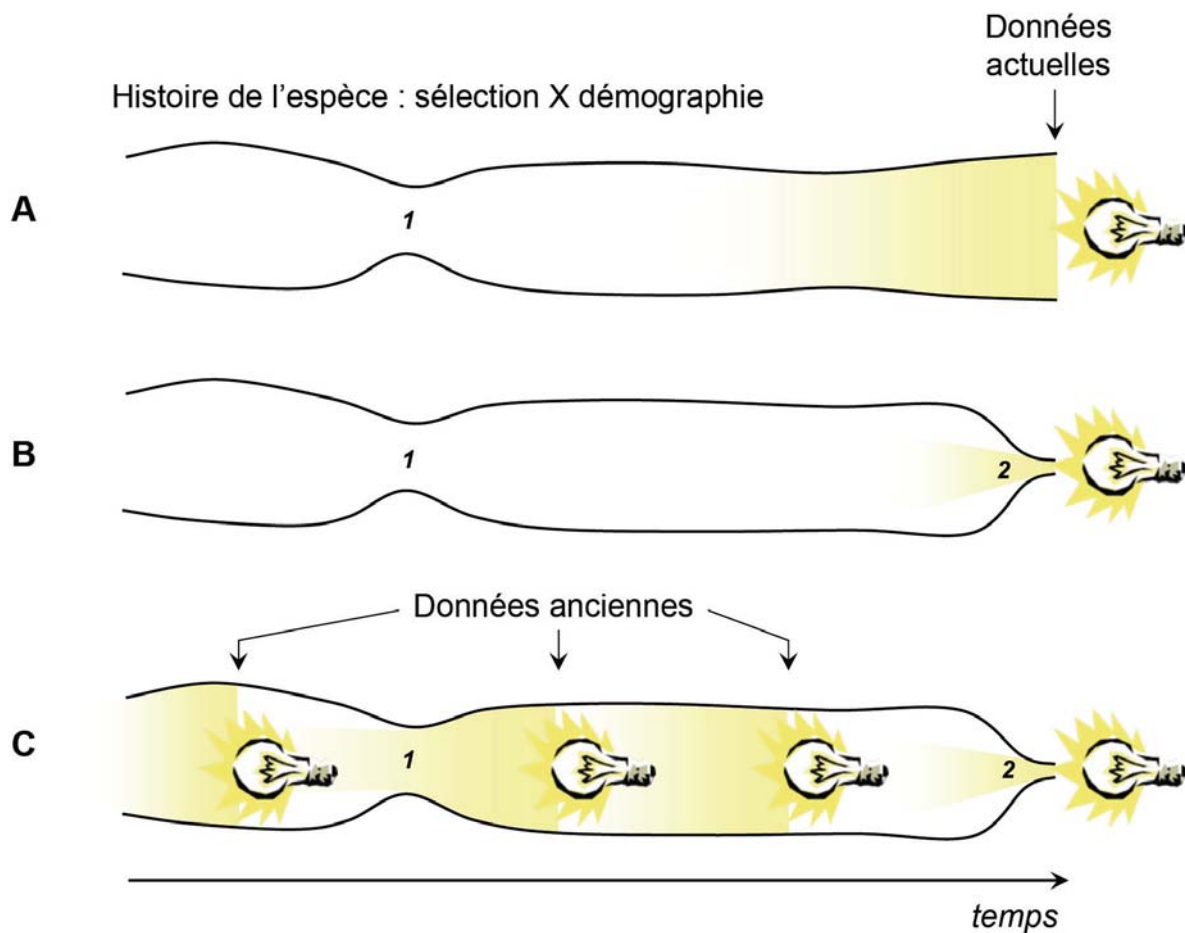
Le nombre d'œufs pondus par une seule femelle saumon ou esturgeon pouvant atteindre plusieurs milliers, la sélection des œufs les plus adaptés aux conditions artificielles est d'autant plus forte. Plusieurs études ont d'ailleurs montré que le taux de survie et de reproduction de Salmonidés nés et élevés en captivité étaient de l'ordre de 0 à 15% par rapport à des poissons sauvages (Leider *et al.* 1990 ; Fleming *et al.* 2000 ; McGinnity *et al.* 2003).

Pour réduire ce phénomène, Frankham (2008) recommande de minimiser le nombre de générations de captivité, de fragmenter les populations captives (ne pas mettre tous ses œufs dans le même panier) et d'apporter régulièrement si possible de nouveaux individus sauvages dans la population captive.

### I-C-2-c Plus-value apportée par la paléogénétique

#### ■ De la profondeur dans la dimension temporelle

L'analyse génétique des populations naturelles ayant débuté il y a seulement quelques décennies – et ne s'étant intensifiée qu'à partir des années 1990 – les biologistes de la conservation disposent souvent d'un recul très limité dans la dimension temporelle. Les seules informations disponibles sont celles qu'ils peuvent inférer à partir de l'analyse des données actuelles. Les événements évolutifs (sélection) et démographiques (réduction, expansion) laissent en effet une empreinte détectable au niveau génétique, dont l'intensité est généralement corrélée à l'intensité et au type d'événement (Figure I-24A).



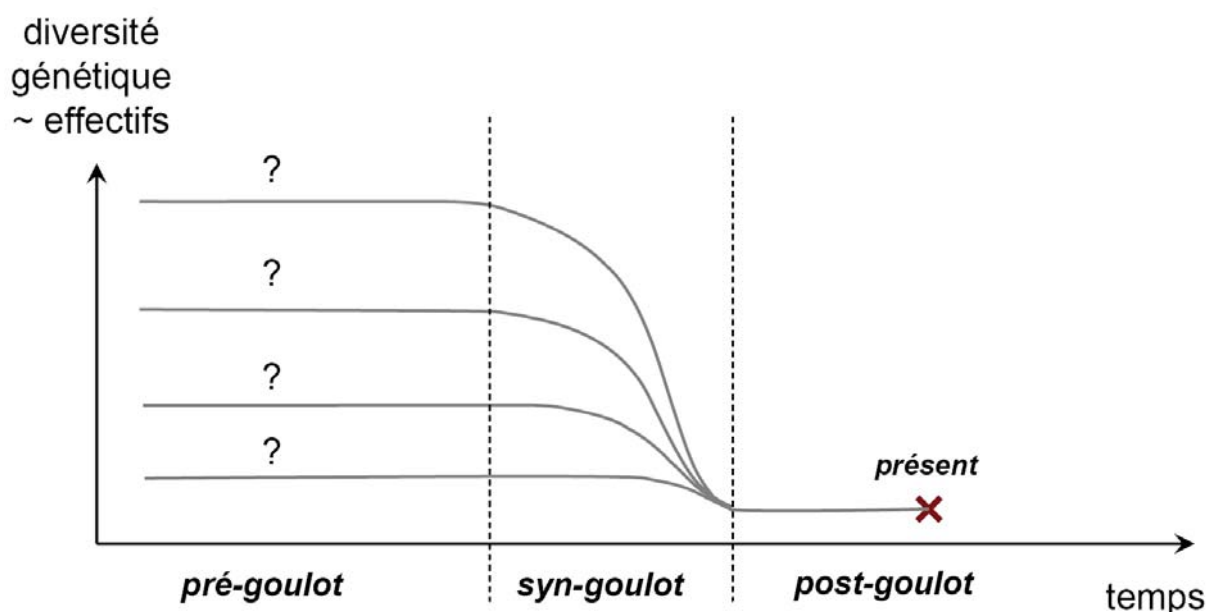
**Figure I-24 :** Quand la paléogénétique apporte la lumière sur l'histoire évolutive et démographique des espèces. A : L'analyse seule des données génétiques actuelles permet d'accéder à l'histoire récente de l'espèce, mais pas à des événements anciens comme le goulot 1. B : Dans le cas où l'espèce est menacée et subit un goulot démographique 2, les données génétiques résiduelles sont partielles et ne permettent d'accéder qu'à une partie fragmentaire de l'histoire de l'espèce. C : La paléogénétique éclaire directement l'histoire passée de l'espèce, et permet de détecter des événements anciens comme le goulot 1.

Néanmoins, les espèces menacées ont par définition subi des réductions drastiques de leurs effectifs – ou goulots démographiques – qui comptent parmi les événements affectant le plus les caractéristiques génétiques. Ces goulots s'accompagnent en effet d'une érosion de la diversité génétique et d'un déséquilibre des fréquences alléliques pour les locus diploïdes, traces facilement détectables par l'analyse des marqueurs moléculaires (Nei *et al.* 1975 ; Cornuet & Luikart 1996 ; Luikart *et al.* 1998). Les conséquences génétiques des goulots démographiques sont souvent tellement marquantes qu'elles masquent tout ou partie des traces laissées par les événements antérieurs, qui ne sont ainsi plus accessibles aux scientifiques (Figure I-24B).

La paléogénétique ouvrant l'accès à la diversité génétique ancienne, elle permet de mettre en lumière directement les événements évolutifs ou démographiques du passé (Figure I-24C), et de discuter leurs causes et leurs conséquences. Ces renseignements sont d'une importance cruciale pour la conservation car ils fournissent un moyen de calibration empirique des modèles prédictifs de viabilité des populations ou d'impact du climat. Ils permettent également de contextualiser les niveaux de diversité génétique actuelle et de mieux les interpréter.

### ■ Meilleure caractérisation des goulots démographiques

Lorsque la diversité génétique actuelle d'une espèce menacée est très faible, il est souvent difficile de déterminer la perte de diversité génétique qui résulte du goulot démographique et de trancher entre (1) une diversité importante avant le goulot (la diversité actuelle n'en étant alors qu'un reliquat) ou (2) une diversité déjà faible avant le goulot (Figure I-25).



**Figure I-25 :** L'intensité d'un goulot d'étranglement est difficile à estimer précisément uniquement à partir des données génétiques actuelles.

Les données génétiques anciennes permettent de mieux caractériser ces goulots d'étranglement, que ce soit de façon empirique ou avec l'appui des méthodes bayésiennes basées sur la théorie de la coalescence (Ramakrishnan *et al.*

2005). Les exemples sont multiples, incluant le tétra de prairie *Tympanuchus cupido* (Bouzat *et al.* 1998), l'éléphant de mer *Mirounga angustirostris* (Weber *et al.* 2000), le putois à pieds noirs *Mustela nigripes* (Wisely *et al.* 2002), le rongeur argentin *Ctenomys sociabilis* (Chan *et al.* 2006) ou le faucon crécerelle des Seychelles *Falco araea* (Groombridge *et al.* 2009).

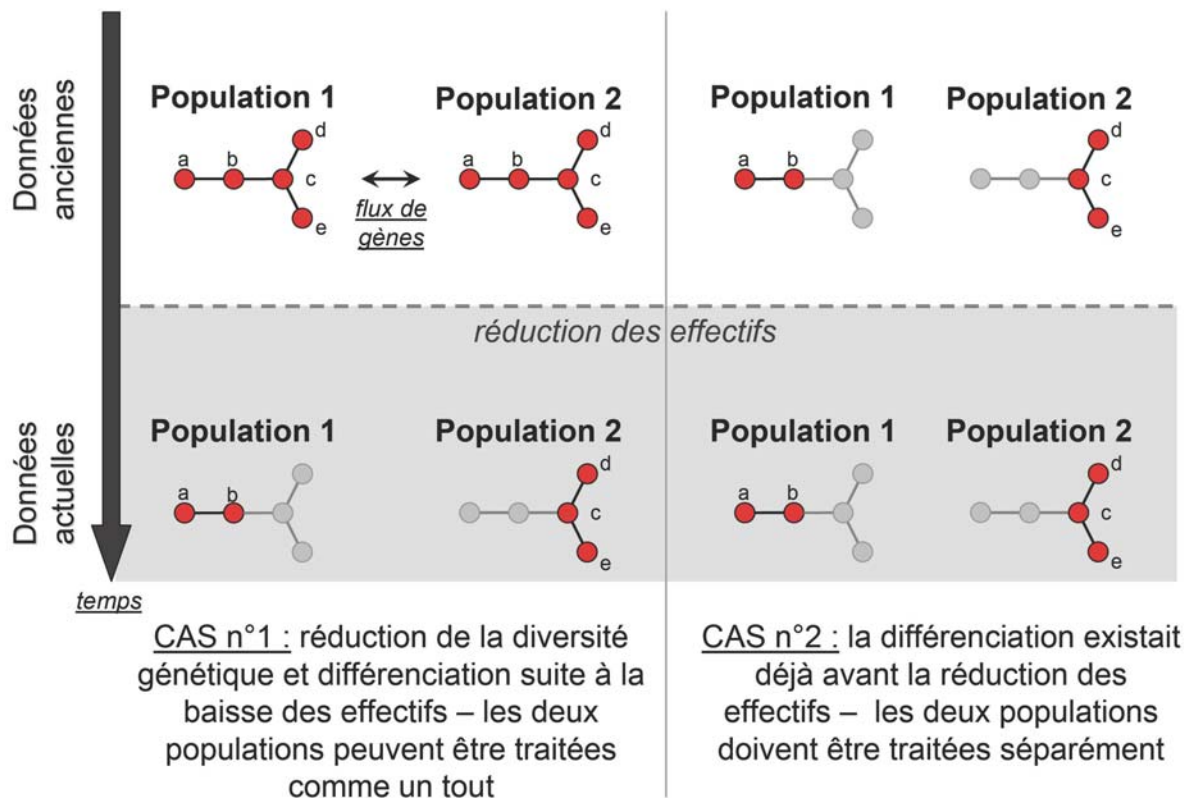
Dans certains cas, la diversité génétique n'est pas différente pré- et post-goulot démographique, indiquant l'influence d'autres facteurs agissant en sens contraire. Par exemple chez l'otarie à fourrure, la diversité génétique mesurée à partir de restes archéologiques vieux de plus de 1 000 ans est similaire à celle observée après la récente et importante diminution de l'aire de répartition (Pinsky *et al.* 2010), sans doute en liaison avec les importants flux migratoires qui caractérisent cette espèce. L'effet diversifiant des flux géniques peut en effet neutraliser et même outrepasser l'effet uniformisant de la dérive génétique.

### ■ Meilleure définition des ESUs

La définition des ESUs repose en partie sur la différenciation génétique des populations. Néanmoins, la réduction de la taille des populations accélère la dérive génétique et peut conduire à une différenciation génétique là où il n'y en avait pas auparavant (Frankham *et al.* 2002 ; Biebach & Keller 2009 ; Lozier & Cameron 2009) ; cette différenciation ne matérialise pas un potentiel adaptatif mais un artefact démographique, elle ne justifie donc pas la distinction d'ESUs. Dans le cas où une différenciation est observée entre des populations ayant subi une récente chute de leurs effectifs, la paléogénétique permet de trancher entre (1) une différenciation récente liée à la dérive post goulot démographique et (2) une différenciation plus ancienne présente avant le goulot (Figure I-26). La politique de conservation sera différente dans l'un et l'autre cas.

La cicindèle du Nord-Est américain *Cicindela dorsalis dorsalis* fournit un exemple du cas n°1 : la paléogénétique a en effet montré qu'un haplotype présent uniquement dans le Massachusetts actuellement, était en fait répandu dans d'autres populations voisines il y a quelques décennies, encourageant ainsi l'introduction d'individus issus des populations voisines pour renforcer la population en danger du Massachusetts (Goldstein & Desalle 2003).

Les renards de la Sierra Nevada fournissent un exemple du cas n°2 : la paléogénétique a en effet montré que la différenciation de la sous-espèce native de Californie par rapport au renard commun existait bien avant qu'elle devienne menacée d'extinction (Perrine *et al.* 2007).



**Figure I-26 :** La paléogénétique comme aide à la délimitation des ESUs. Les cercles rouges matérialisent les haplotypes présents dans chaque population.

■ **Aide à la décision pour les opérations de réintroduction**

Une réintroduction vise à établir une espèce dans une zone appartenant à son aire de répartition historique mais d'où elle a disparue ; un renforcement vise à soutenir une population existante par l'introduction d'individus conspécifiques (IUCN 1998). Dans les deux cas, les individus relâchés peuvent provenir de populations captives ou de populations naturelles. Dans ce dernier cas, il s'agit d'une translocation (Griffith *et al.* 1989).

Dans l'idéal, une réintroduction doit s'effectuer dans une zone de l'aire de répartition historique, à partir d'individus les plus proches possibles au niveau génétique de la population disparue qui y était installée (IUCN 1998). L'identification

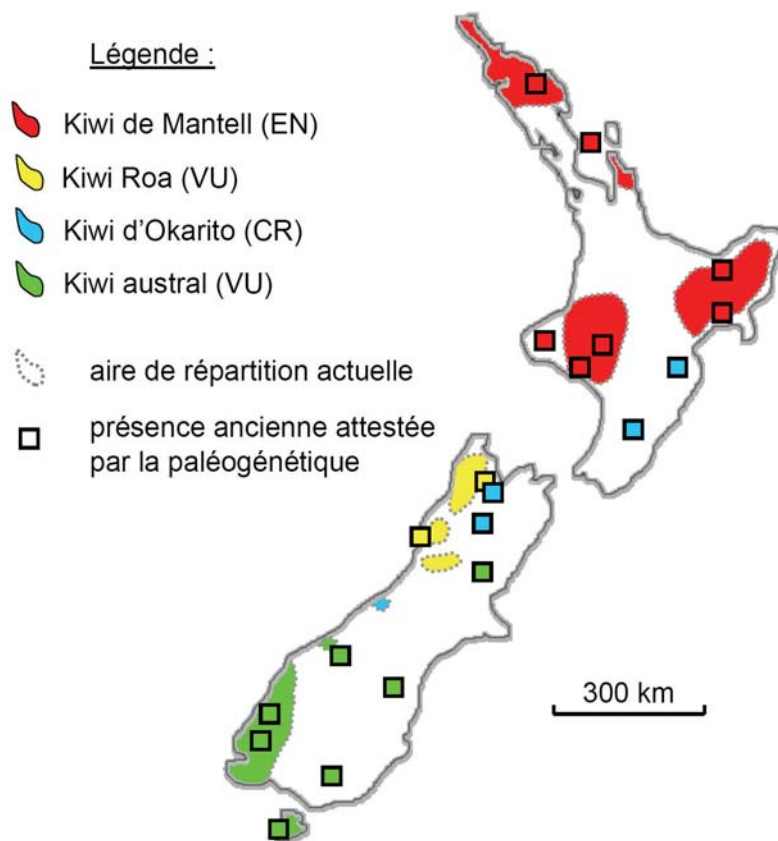


de l'aire de répartition historique d'une espèce n'est pas toujours évidente, surtout lorsque la majorité des populations sont éteintes, et plus encore si elle fait partie d'un groupe d'espèces cryptiques. L'identification des individus à utiliser pour la réintroduction n'est pas non plus chose aisée, puisque par définition la population dont ils doivent être proches a disparu. La paléogénétique est utile à la résolution de ces problèmes, et peut donc servir au choix (i) des sites de réintroduction et (ii) de l'origine des individus à réintroduire.

Prenons l'exemple des kiwis de Nouvelle-Zélande (oiseaux de l'ordre des Struthioniformes). Cinq espèces différentes ont été décrites : le kiwi d'Owen, le kiwi de Mantell, le kiwi Roa, le kiwi d'Okarito et le kiwi austral (Baker *et al.* 1995). Toutes ces espèces sont menacées à des degrés divers et ont vu leur aire de répartition fondre comme peau de chagrin au cours des derniers siècles, comme en témoigne l'abondance de fossiles dans des régions d'où elles sont aujourd'hui absentes (Shepherd & Lambert 2008). Seuls les ossements du kiwi d'Owen sont identifiables par rapport aux autres – car de plus petite taille – les quatre autres espèces étant indistinguables (Worthy & Holdaway 2002, cité dans Shepherd & Lambert 2008).

L'analyse paléogénétique de nombreux restes couvrant l'ensemble du territoire néo-zélandais a permis d'estimer les aires de répartition anciennes de ces quatre espèces, ainsi que leur structuration populationnelle (Shepherd & Lambert 2008). Les efforts de conservation sont pour l'instant focalisés sur la préservation des populations restantes, mais des réintroductions sont envisagées (Birdlife International 2008a, b, c). Les aires géographiques anciennement occupées révélées par la paléogénétique sont autant d'options possibles (Figure I-27), dans la mesure bien entendu où elles offrent toujours un habitat favorable aux kiwis. De plus, la détermination de la structuration génétique historique des populations de chaque espèce – données actuelles et données anciennes incluses – peut permettre aux gestionnaires de choisir les individus à déplacer afin qu'ils soient les plus proches possibles des populations disparues (ceci dans le but de maximiser leur survie).

Le même type de raisonnement peut être utilisé pour d'autres taxons très menacés, comme les esturgeons dans notre cas (voir les chapitres II et III).



**Figure I-27 :** Aire de répartition actuelle et ancienne de quatre espèces de kiwi en Nouvelle-Zélande. La présence ancienne est attestée par analyse paléogénétique. Modifié d'après Shepherd & Lambert (2008).

### ■ Des leçons du passé, pour anticiper le futur

Un des apports majeurs de la paléogénétique est de pouvoir suivre l'évolution des populations et des espèces sur des milliers d'années, apportant un recul nouveau sur les temps (quand ?) et vitesses (combien de temps ?) des phénomènes évolutifs et démographiques.

Il est en particulier possible grâce à la paléogénétique d'observer les effets des variations environnementales sur les populations naturelles pendant des durées bien supérieures à notre espérance de vie (Hadly 1996 ; Hadly *et al.* 2004 ; Hofreiter & Stewart 2009 ; Campos *et al.* 2010). Les archives génétiques stockées dans les fossiles sont ainsi autant de repères pour prévoir la réponse des espèces au réchauffement climatique d'origine anthropique qui se dessine à l'horizon. Ces prédictions revêtent une importance toute particulière pour les espèces les plus sensibles comme celles qui sont déjà menacées d'extinction ou qui vivent dans les zones polaires (Prost *et al.* 2010).

Il est également possible de suivre l'évolution des espèces et des populations avant leur extinction, comme pour l'ours des cavernes (Stiller *et al.* 2010) ou certaines populations de loups (Leonard *et al.* 2007) ou d'ours bruns (Leonard *et al.* 2000 ; Barnes *et al.* 2002 ; Calvignac *et al.* 2008). Ces informations, complémentaires de celles qui sont recueillies sur les populations actuelles, illustrent la diversité des situations qui précèdent l'extinction.

La paléogénétique permet aussi de constater la labilité temporelle des structurations génétiques dans les populations, la diversité locale pouvant varier brutalement en quelques centaines voire quelques dizaines d'années (Hofreiter *et al.* 2007). Dans ce contexte, un schéma de pensée statique où l'objectif serait de conserver la biodiversité telle qu'elle nous apparaît à l'instant t semble obsolète.

### ■ L'apport de la paléogénétique a ses limites

L'analyse des données paléogénétiques, si elle est informative en elle-même, ne doit cependant pas être découplée des autres informations disponibles concernant en particulier la biologie et la démographie des espèces, sous peine de commettre de grosses erreurs. En effet, le signal génétique est parfois incohérent avec les observations de terrain, comme pour le passereau hawaïen *Loxops coccineus coccineus* qui a connu un important déclin démographique au cours du dernier siècle, mais dont la diversité génétique n'a pas été affecté et a même conservé la trace d'une expansion démographique antérieure (Reding *et al.* 2010). En se fiant uniquement aux données génétiques, la menace qui pèse sur cette espèce n'aurait pas été détectée.

Hofreiter (2009) fait également judicieusement remarquer que la (paléo)génétique des espèces menacées est souvent très utile, mais qu'elle peut aussi parfois être trompeuse. La démographie des mammouths est par exemple restée stable pendant une grande partie du Pléistocène (Debruyne *et al.* 2008), alors que dans le même temps les bisons subissaient un déclin démographique progressif sur 20 000 ans (Shapiro *et al.* 2004 ; Drummond *et al.* 2005). Néanmoins, ce sont les mammouths qui se sont éteints à la fin du Pléistocène, alors que les bisons courent toujours dans les plaines américaines (mais pour combien de temps il est vrai).

### I-D PROBLEMATIQUES

#### ***I-D-1 RELATIONS ENTRE ESPECES D'ESTURGEONS EN EUROPE***

Plusieurs espèces d'esturgeons se sont côtoyées en Europe jusqu'à récemment, mais en raison de la disparition de la quasi-totalité des populations sauvages d'esturgeons, la distribution des différentes espèces et leurs relations restent mal définies. Le premier objectif de cette thèse est donc d'apporter des informations génétiques susceptibles de préciser la distribution passée de l'esturgeon européen, ainsi que ses relations avec les différentes espèces d'esturgeons en Europe, *i.e.* les zones de sympatrie, les éventuelles hybridations.

#### ***I-D-2 L'ESTURGEON EUROPEEN AVANT SON DECLIN***

Nous avons vu que l'esturgeon européen a subi un très fort déclin depuis deux siècles, avec la disparition de toutes les populations existantes sauf une (celle de Gironde).

Le second objectif de cette thèse est de rassembler des informations paléogénétiques sur les populations d'esturgeons européens disparues couvrant l'ensemble de l'ancienne aire de répartition. La sélection des outils moléculaires adaptés pour analyser la diversité génétique de l'espèce (sur l'ADN mitochondrial et l'ADN nucléaire) est un prérequis obligatoire. Les informations rassemblées permettront de mettre en lumière l'histoire évolutive de l'esturgeon européen (récents évènements fondateurs, échanges entre populations...) et d'émettre des hypothèses quant aux impacts anthropiques et climatiques.

Le troisième objectif de cette thèse est d'effectuer le suivi génétique de la population d'esturgeons européens qui vivait dans le Rhône, depuis la Préhistoire jusqu'à son extinction dans les années 1970. Il y a plus de 2000 ans, les esturgeons étaient sans doute déjà pêchés mais la population rhodanienne était florissante. La transition de cette période d'abondance jusqu'à l'extinction est intéressante à documenter pour la conservation de la dernière population d'esturgeons européens, mais aussi pour les populations menacées des autres espèces d'Acipensériformes.

### ***I-D-3 IMPLICATIONS POUR LA CONSERVATION DE L'ESTURGEON EUROPEEN***

L'ensemble des données génétiques rassemblées dans cette thèse servira de base à des discussions concernant la conservation de l'esturgeon européen. Le statut de la dernière population vivant en Gironde sera discuté à la lumière de la diversité ancienne de l'espèce, et par comparaison avec la population rhodanienne disparue. Les interactions avec les autres espèces d'esturgeons (*A. oxyrinchus* et *A. naccarii* en particulier) et leurs conséquences potentielles pour le futur de l'esturgeon européen seront également prises en considérations. Il s'agit essentiellement de la question de l'éventuelle réintroduction de l'espèce dans des bassins fluviaux qu'elle occupait anciennement.

## CHAPITRE II

### RELATIONS ENTRE LES ESPECES EUROPEENNES D'ESTURGEONS *ACIPENSER STURIO*, *A. OXYRINCHUS* ET *A. NACCARII*

#### Publications associées

##### Article n°1 :

Chassaing O., Hänni C., Berrebi P. Distinguishing species of European sturgeons using microsatellite allele sequences.

*Accepté par Journal of Fish Biology.*

##### Article n°2 :

Chassaing O., Desse-Berset N., Duffraisse M., Hughes S., Berrebi P., Hänni C. An American sturgeon in France: paleogenetic evidence.

*En préparation.*

### **RESUME :**

L'esturgeon européen *A. sturio*, l'esturgeon adriatique *A. naccarii* et l'esturgeon atlantique *A. oxyrinchus* ont cohabité en Europe de l'ouest. L'utilité des portions flanquantes des locus microsatellites pour distinguer ces trois espèces a été établie. Associés à des analyses mitochondriales, ces marqueurs nucléaires permettent l'identification des hybrides.

*A. sturio* et *A. naccarii* ont vécu en sympatrie en mer Adriatique. La présence de populations fonctionnelles d'*A. naccarii* hors de la mer Adriatique est exclue, même si certains individus vagabonds ont pu occasionnellement être capturés en Méditerranée occidentale. Aucune hybridation entre les deux espèces n'a été décelée.

*A. sturio* et *A. oxyrinchus* ont vécu en sympatrie en Europe du Nord et dans les fleuves français Loire et Seine jusqu'au 20<sup>e</sup> siècle. L'arrivée d'*A. oxyrinchus* en Europe (en provenance d'Amérique du Nord) se serait produit après la dernière glaciation, antérieurement à la colonisation de la mer Baltique qui aurait eu lieu au Moyen-Âge. L'hybridation a été reportée entre les deux espèces en mer Baltique et en France, à un taux faible à moyen.

### **ABSTRACT :**

The European sturgeon *A. sturio*, the Adriatic sturgeon *A. naccarii* and the Atlantic sturgeon *A. oxyrinchus* have coexisted in Western Europe. Usefulness of microsatellites flanking regions to distinguish between these three species has been established. Coupled with mitochondrial analyses, these nuclear markers allow hybrids to be identified.

*A. sturio* and *A. naccarii* lived in sympatry in the Adriatic Sea. Presence of functional populations of *A. naccarii* outside the Adriatic Sea is excluded, even if some stray individuals have been caught occasionally in Western Mediterranean. No hybridization has been detected between both species.

*A. sturio* and *A. oxyrinchus* lived in sympatry in northern Europe and in French rivers Seine and Loire until the 20<sup>th</sup> century. *A. oxyrinchus* arrival in Europe (from northern America) could have occurred after the last glaciation, before the Baltic Sea colonization which probably occurred during the Middle-Ages. Weak to medium levels of hybridization have been detected between both species in the Baltic region and in France.

## II- RELATIONS ENTRE LES ESPECES EUROPEENNES D'ESTURGEONS ACIPENSER STURIO, A. OXYRINCHUS ET A. NACCARI

### II-A DISTRIBUTIONS

#### **II-A-1 AIRES DE REPARTITION ACTUELLES**



**Figure II-1 :** Statut actuel des esturgeons en Europe. Les cercles matérialisent les populations établies (cercles pleins) ou en cours d'établissement (cercles hachurés). Les zones en pointillés correspondent aux aires marines dans lesquelles les esturgeons peuvent être rencontrés. Les flèches noires indiquent les populations soutenues par des lâchers d'individus nés et élevés en captivité.

A l'heure actuelle, trois espèces d'esturgeons survivent en Europe occidentale, à l'Ouest d'une ligne reliant la Pologne à la Grèce (Figure II-1) :

1) l'esturgeon européen *A. sturio*, dont la dernière population mondiale (bassin Gironde-Garonne-Dordogne) est très menacée, comme nous l'avons vu dans la partie I-B-2. Cette population n'est plus fonctionnelle depuis 1994, l'espèce est donc au bord de l'extinction et est classée comme en danger critique d'extinction sur la



liste rouge IUCN (Kottelat *et al.* 2009c). Les mesures de conservation orchestrées par le Cemagref de Bordeaux visent à renforcer la population girondine en priorité. En coopération avec le Cemagref de Bordeaux, l'IGB de Berlin a par ailleurs réalisé des lâchers expérimentaux de juvéniles nés en captivité dans le fleuve Elbe (en Allemagne) depuis 2008.

**2)** l'esturgeon de l'Adriatique *A. naccarii*, dont les deux dernières populations sont installées dans les bassins des fleuves Pô-Adige en Italie, et Buna en Albanie. Le statut de ces populations reste relativement flou, mais il semble qu'elle ne soient plus fonctionnelles (absence de reproduction dans le milieu naturel depuis près de 30 ans). La persistance de la population albanaise est compromise car la dernière capture mentionnée remonte à 1997 (Ludwig *et al.* 2003). Des captures régulières sont relevées en Italie, mais la population serait devenue complètement artificielle suite aux lâchers massifs d'individus nés et élevés en captivité depuis la première reproduction artificielle réalisée en 1988 (Arlati *et al.* 1988). L'espèce est donc classée comme en danger critique d'extinction (possiblement éteinte) sur la liste rouge IUCN (Bronzi *et al.* 2009).

**3)** l'esturgeon atlantique *A. oxyrinchus*, qui a été réintroduit récemment dans le fleuve Oder à la frontière germano-polonaise. Les individus lâchés dans l'Oder proviennent de populations nord-américaines en bonne santé. Les effectifs d'esturgeon atlantique sont d'ailleurs globalement en croissance outre-Atlantique grâce à la bonne gestion qui y est réalisée, et l'espèce n'est maintenant « que » presque menacée sur la liste rouge IUCN (St. Pierre & Parauka 2009). La réintroduction en Europe est en cours depuis 2006 et il faudra encore attendre de nombreuses années avant de pouvoir conclure quant à son succès ou non (Gessner *et al.* 2006). Les raisons qui ont guidé cette réintroduction sont explicitées dans la partie suivante.

D'autres espèces, toutes aussi menacées, vivent dans la Mer Noire. Il s'agit de l'esturgeon étoilé *A. stellatus*, de l'esturgeon russe *A. gueldenstaedtii*, du sterlet *A. ruthenus* et du beluga *H. huso*.

**II-A-2 AIRES DE REPARTITION HISTORIQUES**

II-A-2-a Relevés de captures

Nous l'avons vu avec l'exemple de l'esturgeon européen dans la partie I-B-2, la situation était bien différente il y a encore deux siècles. Les esturgeons étaient en effet communs dans toute l'Europe, se reproduisant dans tous les grands fleuves de la Mer Baltique à la Mer Noire. Les récits, comptes rendus de pêches, et autres articles naturalistes (voir Holcik 1989 qui dresse une liste complète des références historiques donnant des indications sur la distribution des esturgeons) permettent d'avoir une image globale de la distribution historique des esturgeons en Europe (Figure II-2).



**Figure II-2 :** Distribution historique possible des esturgeons en Europe il y a environ 200 ans, basée sur les mentions de captures référencées dans Holcik (1989). Les cercles pleins et les pointillés ont la même signification que dans la figure II-1.

La distribution de l'espèce *A. sturio* était alors beaucoup plus étendue, et les populations étaient également bien plus importantes qu'aujourd'hui en terme d'effectifs. Par ailleurs la présence du beluga *Huso huso* est mentionnée en Mer Adriatique ; des populations fonctionnelles de *H. huso* auraient existé dans les bassins du Pô ou de l'Adige et auraient disparu dans les années 1970 (Kottelat *et al.* 2009d). La présence d'*Acipenser stellatus* a aussi été mentionné en Mer Egée et Mer Adriatique, mais sporadiquement ; il est peu probable que des populations fonctionnelles d'esturgeons étoilés aient existé dans ces zones, les captures occasionnelles recensées pouvant correspondre à des individus vagabonds issus des populations de Mer Noire.

Au final, la distribution historique des esturgeons en Europe nous apprend que les espèces *A. sturio* et *A. naccarii* – dont les aires de répartition sont actuellement disjointes – vivaient en sympatrie en Mer Adriatique, et peut-être également avec le beluga *H. huso*.

### II-A-2-b Apports des études morphologiques et paléogénétiques

Cette vision basée sur les données historiques est restée admise par la communauté scientifique jusque dans les années 1990. La paléogénétique couplée à l'analyse morphologique des restes archéologiques et des spécimens naturalisés, a permis d'actualiser la distribution historique des esturgeons en Europe (Figure II-3).

Les populations d'esturgeons de la Baltique se sont révélées être des populations d'esturgeon atlantique *A. oxyrinchus* et non d'esturgeon européen *A. sturio* (Ludwig *et al.* 2002b). Ces populations baltiques d'esturgeon atlantique auraient été fondées par quelques individus issus des populations nord-américaines, qui auraient traversé l'Atlantique au Moyen-Âge (Ludwig *et al.* 2008). L'aire de répartition historique d'*A. oxyrinchus* en Europe pourrait également s'étendre en dehors de la Baltique (Desse-Berset 2009a ; Ludwig *et al.* 2009b). La présence historique de l'esturgeon atlantique dans la Baltique est le facteur qui a permis d'initier sa réintroduction dans la région après 2006.



**Figure II-3 :** Distribution historique possible des esturgeons en Europe il y a 200 ans, actualisée grâce aux études récentes de paléogénétique et de morphologie.

Par ailleurs, une polémique a éclaté entre scientifiques espagnols (rejoints plus tard par leurs collègues européens) quant à la présence historique ou non de populations fonctionnelles de l'esturgeon adriatique *A. naccarii* dans la péninsule ibérique, en particulier dans le fleuve Guadalquivir (GarridoRamos *et al.* 1997 ; Doukakis *et al.* 2000 ; Rincon 2000a). De multiples preuves contredisent la présence d'*A. naccarii* dans cette région (Ludwig *et al.* 2009c ; Pages *et al.* 2009 ; cette thèse), mais les auteurs espagnols à l'origine de cette polémique maintiennent leur hypothèse (Garrido-Ramos *et al.* 2009).

#### II-A-2-c Questions en suspens

1) La sympatrie entre *A. sturio* et *A. naccarii* était-elle restreinte à l'Adriatique OU s'étendait-elle à toute la Méditerranée occidentale comme le pensent Garrido-Ramos *et al.* (2009).

2) Quand précisément *A. oxyrinchus* est-il arrivé en Europe (au Moyen-Âge OU avant) ? Et quelles zones a-t-il colonisé (seulement la Baltique OU toute la façade atlantique européenne) ?

3) Lors de son installation en Europe, *A. oxyrinchus* a-t-il remplacé *A. sturio* OU a-t-il vécu en sympatrie avec *A. sturio* OU s'est-il installé dans des habitats non occupés par *A. sturio* ?

4) Les espèces ayant vécu en sympatrie en Europe (*A. sturio* – *A. naccarii* et *A. sturio* – *A. oxyrinchus*) ont-elles échangé des gènes en s'hybridant OU non ? Si oui, de quelle ampleur a été ce flux de gènes et quelles en sont les marques aujourd'hui ?

Pour répondre à ces questions, il est impératif de disposer de plusieurs moyens fiables et complémentaires pour distinguer les différentes espèces d'esturgeons qui vivaient en Europe, sujet de la partie II-B et de l'article n°1.

### II-B DETERMINATION DES ESPECES

#### **II-B-1 DISCRIMINATION SUR LA BASE DE CRITERES MORPHOLOGIQUES**

##### II-B-1-a Critères de reconnaissance

Les esturgeons ont tous une morphologie semblable, mais il est néanmoins possible de distinguer les espèces sur la base de certains critères diagnostiques (voir Vecsei 2001 pour une clef de détermination morphologique complète).

##### ■ Distinction *A. sturio* - *A. oxyrinchus* :

La distinction entre les espèces sœurs *A. sturio* et *A. oxyrinchus* est délicate, car malgré une divergence d'environ 60 Ma (voir figure I-6 et Peng *et al.* 2007) seuls quelques critères distinctifs simples ont été identifiés (Magnin 1964 ; Ludwig & Gessner 2007 ; Desse-Berset 2009a) :

- l'aspect des écailles dermiques osseuses est alvéolaire chez *A. oxyrinchus* (petits trous), alors qu'il est tuberculé chez *A. sturio* (petites protubérances) (voir Desse-Berset 2009a pour des photographies couleurs, ou la figure S1 de l'article n°2)

- le nombre d'écailles dermiques osseuses des lignes dorsales, latérales et ventrales est inférieur chez *A. oxyrinchus* (respectivement 10/29/10 en moyenne, d'après Magnin 1964) par rapport à *A. sturio* (respectivement 12,5/35/11 en moyenne, d'après Magnin 1964)

D'autres critères sont listés dans Magnin (1964), en particulier des mesures corporelles et crâniennes.

### ■ Distinction *A. naccarii* - *A. sturio* / *A. oxyrinchus* :

La distinction entre *A. naccarii* et le couple *A. sturio* / *A. oxyrinchus* est plus aisée, même si *A. naccarii* a parfois été confondu avec *A. sturio* (Holcik 1989 ; Birstein *et al.* 1998) :

- la forme de la tête est arrondie chez *A. naccarii*, alors qu'elle est pointue chez *A. sturio* et *A. oxyrinchus* (Vecsei 2001)

- sur les côtés à la base de la nageoire anale, des plaques osseuses sont présentes chez *A. sturio* et *A. oxyrinchus*, mais pas chez *A. naccarii* (Vecsei 2001)

- la morphologie des écailles dermiques est différente entre *A. naccarii* et *A. sturio* / *A. oxyrinchus* (N. Desse-Berset, communication personnelle).

D'autres critères ont été utilisés par Elvira & Almodovar (2000a), en particulier des mesures corporelles et crâniennes encore une fois.

## II-B-1-b Limites de la morphologie

### ■ Préservation des restes biologiques :

Ces critères de reconnaissance spécifiques peuvent être utilisés avec efficacité sur des individus vivants ou fraîchement morts, mais ils deviennent moins pertinents sur les restes anciens, aussi bien les spécimens naturalisés que les restes archéologiques. En effet, les traitements nécessaires à la naturalisation et à la conservation des poissons dans les musées peuvent conduire à une déformation des spécimens et à l'altération des informations morphologiques (Shields & Carlson 1996 ; Sagnes 1997). Les restes archéologiques eux, sont fragmentaires (il est rare de retrouver une momie d'esturgeon !!) et en fonction de leur état de préservation, seuls

certaines critères morphologiques diagnostiques sont accessibles au scientifique, sinon aucun.

Pour effectuer une détermination spécifique de restes anciens, l'utilisation de critères morphologiques seuls est donc bien souvent insuffisante, et l'idéal est d'avoir recours à des critères génétiques, beaucoup plus fiables si la préservation de l'ADN est bonne.

### **■ Non détection des hybrides :**

Nous avons vu dans la partie I-B-1 que les hybridations entre espèces d'esturgeons étaient fréquentes, il est donc important de pouvoir identifier d'éventuels hybrides. La morphologie ne permettant pas de reconnaître les hybrides (sauf dans certains cas), il est indispensable de se tourner vers la génétique pour éclaircir ce point.

## ***II-B-2 DISCRIMINATION SUR LA BASE DE CRITERES GENETIQUES***

### **II-B-2-a Les marqueurs mitochondriaux**

#### **■ Rappels sur la mitochondrie et l'ADN mitochondrial:**

Les mitochondries, organites impliqués dans le métabolisme énergétique cellulaire, sont présentes chez la grande majorité des Eucaryotes, et en particulier chez tous les animaux (Wolstenholme 1992). Chaque mitochondrie contient un génome autonome sous la forme d'une ou plusieurs molécules d'ADN circulaire (identiques entre elles) faisant chacune entre 13 et 20 kb (suivant les espèces). Le génome mitochondrial est indépendant du génome nucléaire, présent lui dans le noyau des cellules. L'ADNmt code chez les animaux pour deux ARNr, 13 protéines et 22 ARNt (Boore 1999). Les ARNr et ARNt sont impliqués dans la traduction des gènes codant les protéines mitochondriales, alors que les protéines participent au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

L'ADNmt se distingue de l'ADNnuc car (i) il ne recombine pas (sauf exceptions) (ii) il est continu et circulaire (et non pas discontinu et linéaire comme

dans les chromosomes) (iii) il est haploïde (iv) il est maternellement hérité et (v) il évolue plus vite (Ballard & Whitlock 2004).

### ■ Le génome mitochondrial des esturgeons :

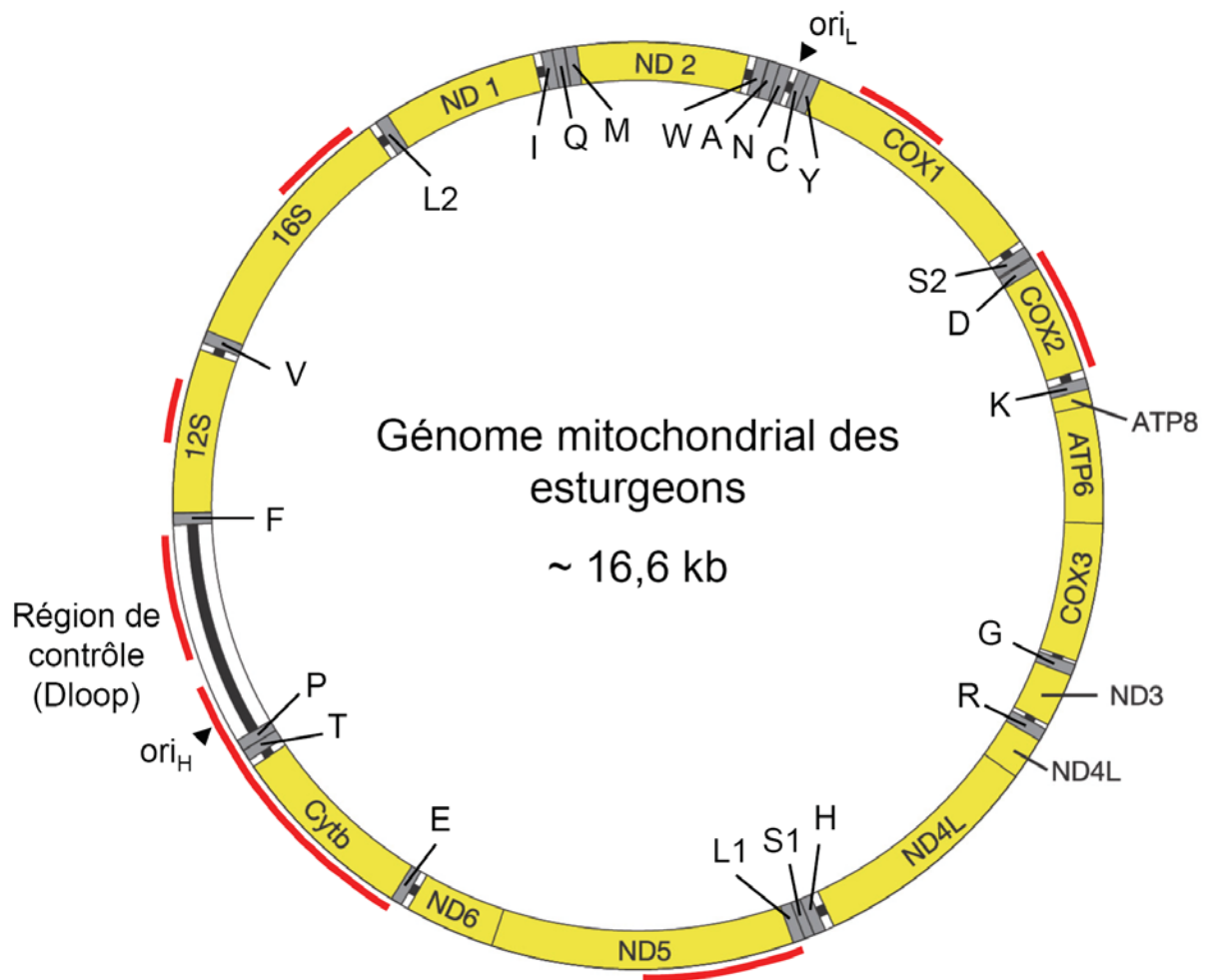
Le génome mitochondrial des Acipensériformes est semblable à celui de la majorité des Vertébrés de part sa taille et l'ordre dans lequel se succèdent les gènes (Figure II-4).

Les génomes mitochondriaux complets de neuf espèces sont disponibles dans les banques de données : *Polyodon spathula* (numéro d'accèsion AY510086, AY442349 et AP004353), *Psephurus gladius* (AY571339), *Scaphirynchus albus* (AP004354), *A. gueldenstaedtii* (FJ392605), *A. stellatus* (AJ585050), *A. transmontanus* (AB042837), *A. dabryanus* (AY510085), *A. sinensis* (EU719645) et *H. huso* (AY442351).

Au cours de cette thèse, nous avons également obtenu la séquence complète des génomes mitochondriaux d'*A. sturio* et *A. oxyrinchus*, respectivement à partir de trois individus actuels de Gironde et de deux individus actuels d'Amérique du Nord provenant des fleuves Saint-John (Canada) et Shark (USA) (voir la partie III-A-1 pour une description plus avancée de ces deux génomes). L'amplification PCR a été réalisée par fragments chevauchants de 1,5 kb à l'aide d'amorces dessinées à partir du consensus des génomes mitochondriaux déjà disponibles dans les banques. Les fragments amplifiés ont ensuite été clonés et séquencés par leurs deux extrémités.

Concernant *A. naccarii*, seules les séquences correspondant à certaines zones sont disponibles dans les banques de données : il s'agit du Cyt *b* entier et de portions des ARN12S, ARN16S, COX1, COX2, NADH5, de la région de contrôle et de certains ARNt (portions indiquées en rouge sur la figure II-4). Seules ces zones peuvent donc être comparées entre *A. sturio*, *A. oxyrinchus* et *A. naccarii*.





**Figure II-4 :** Carte synthétique du génome mitochondrial des esturgeons. Les portions jaunes correspondent aux protéines et ARNr, les portions grises aux ARNt et les portions blanches barrées d'un trait noir aux régions non codantes. En regard des différentes portions sont inscrit les codes standard des protéines et des ARNr (extérieur du cercle) ainsi que ceux des ARNt (intérieur du cercle). Les origines de réplication du brin léger ( $ori_L$ ) et du brin lourd ( $ori_H$ ) sont indiquées par une pointe de flèche. Les portions disponibles dans Genbank à la fois pour *A. sturio*, *A. oxyrinchus* et *A. naccarii* sont matérialisées par un trait rouge. Modifié à partir de Krause *et al.* (2006).

■ Un outil diagnostique de choix :

La comparaison des séquences d'ADNmt permet aisément de distinguer les espèces d'esturgeons. Wirgin *et al.* (1997) ont ainsi pointé l'intérêt d'utiliser les séquences de la région de contrôle pour discriminer *A. sturio* et *A. oxyrinchus*, pendant que Ludwig & Kirschbaum (1998) montraient que l'ARN12S permet de distinguer *A. sturio* et *A. naccarii*. Hormis les séquences correspondant aux ARNt (qui sont très conservées), toutes les séquences mitochondriales permettent en fait

## RELATIONS INTERSPECIFIQUES : DETERMINATION DES ESPECES

la discrimination entre *A. sturio*, *A. oxyrinchus* et *A. naccarii* (et plus généralement entre toutes les espèces d'Acipensériformes). La figure II-5 liste par exemple les 138 sites variable entre *A. sturio*, *A. oxyrinchus* et *A. naccarii* sur les 1143 pb du Cyt *b* : 47 permettent la discrimination entre *A. sturio* / *A. oxyrinchus*, 112 entre *A. sturio* / *A. naccarii* et 122 entre *A. oxyrinchus* / *A. naccarii*.

Position	15	27	42	54	96	136	162	171	195	198	216	264	273	276	280	294	300	303	312	315	333	342	345	348	351	357	363	387	390
A. nac	G	A	T	T	T	C	C	T	T	T	C	C	T	C	T	A	A	T	T	T	A	T	T	A	A	C	T	G	A
A. stu	A	A	T	C	C	T	T	C	C	C	T	T	C	T	T	A	A	C	C	C	A	C	C	G	G	T	C	G	G
A. oxy	A	G	C	C	C	T	T	C	C	C	T	C	C	T	C	G	G	C	C	C	G	C	T	G	G	T	T	A	A
Position	396	397	399	411	435	438	441	459	462	477	483	498	510	525	534	543	553	562	567	573	576	582	585	594	630	631	633	648	651
A. nac	A	C	G	G	C	C	C	T	G	A	A	T	A	T	T	C	C	A	C	A	T	A	T	A	A	T	A	T	G
A. stu	A	T	A	A	A	T	T	C	A	A	G	C	G	C	C	T	T	G	C	G	C	A	C	G	A	C	A	C	A
A. oxy	T	C	A	A	A	T	T	C	A	G	G	C	G	C	C	T	T	G	T	G	C	G	C	A	G	T	G	C	A
Position	666	669	675	678	685	688	690	693	697	705	706	709	718	723	726	735	747	748	750	768	771	774	792	807	819	822	828	840	849
A. nac	G	C	A	C	C	T	G	G	A	G	C	G	A	C	A	C	C	C	G	C	A	C	T	G	C	T	C	T	C
A. stu	A	T	T	T	T	T	C	T	A	A	C	A	G	T	G	C	T	T	A	T	G	T	A	A	C	T	T	C	T
A. oxy	A	T	T	T	T	C	C	T	G	G	T	A	A	C	A	T	T	T	A	T	G	T	A	A	T	C	T	C	T
Position	852	855	858	868	873	876	891	894	907	909	916	918	930	939	945	948	951	954	957	960	963	967	969	975	984	993	997	1014	1023
A. nac	C	A	T	T	T	A	T	C	T	A	A	A	T	A	C	G	C	A	C	T	T	A	T	C	G	C	C	T	A
A. stu	T	G	C	C	A	G	C	C	T	G	G	C	C	G	T	A	T	G	C	C	A	C	T	A	T	T	T	T	G
A. oxy	T	G	C	C	A	G	T	T	C	G	G	C	C	A	T	A	T	G	T	C	C	G	C	T	A	C	C	C	G
Position	1029	1035	1038	1050	1056	1059	1071	1077	1078	1083	1086	1087	1090	1092	1102	1104	1105	1107	1112	1116	1126	1129							
A. nac	T	C	G	T	G	A	T	T	G	A	C	C	A	C	C	G	A	T	T	A	G	T							
A. stu	C	T	A	T	A	G	C	C	A	G	T	T	G	C	A	A	A	G	G	G	A	C							
A. oxy	C	C	A	C	A	G	C	C	A	G	T	T	G	T	G	A	T	T	G	G	G	C							

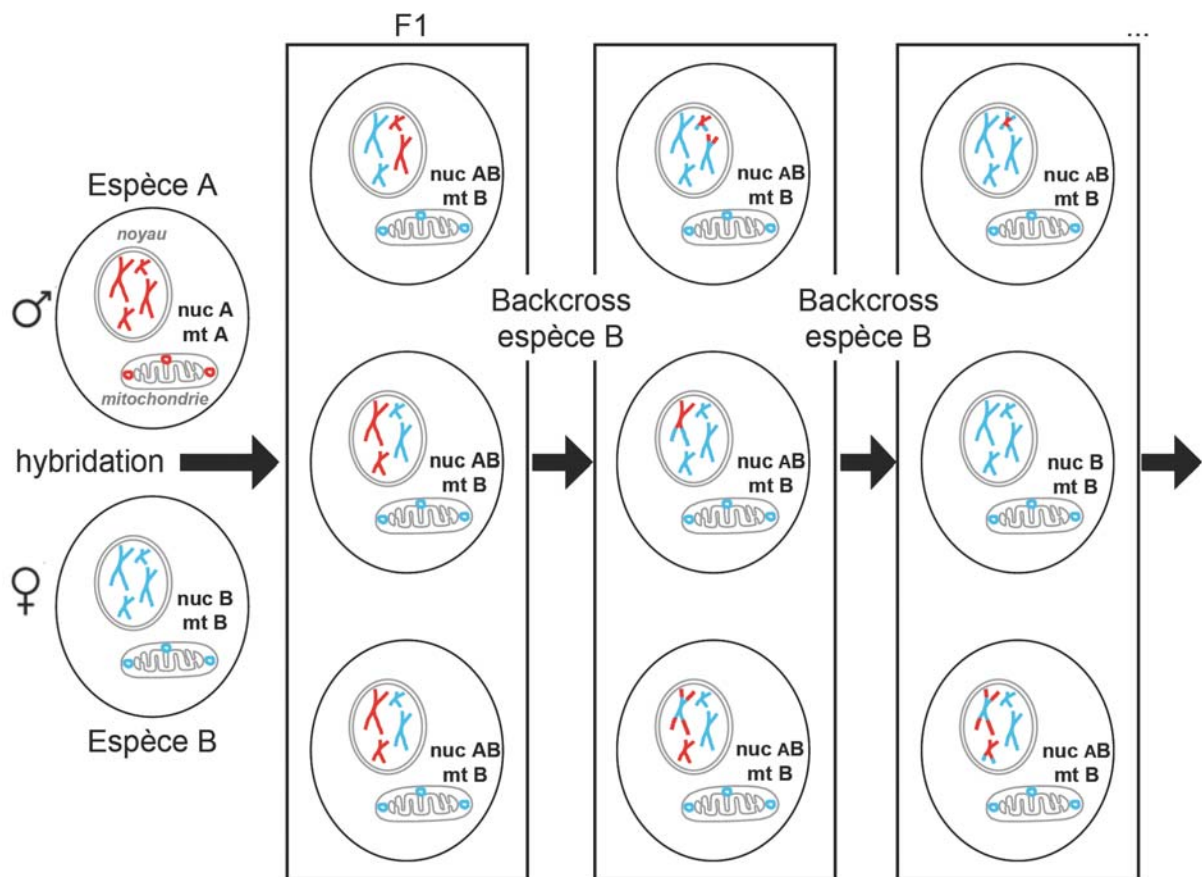
**Figure II-5 :** sites polymorphes du cytochrome *b* permettant la discrimination entre *A. sturio* (AJ245839), *A. oxyrinchus* (AJ245838) et *A. naccarii* (AJ245834). Les chiffres indiquent la position nucléotidique le long du gène.

### II-B-2-b Les marqueurs nucléaires

#### ■ Intérêt :

L'ADNmt est un outil diagnostique extrêmement efficace, mais il est hérité maternellement (Dawid & Blackler 1972 ; Hutchison *et al.* 1974). Comme il ne retrace que l'histoire des lignées maternelles, il ne permet pas de détecter d'éventuelles hybridations. Les hybrides possédant le génome mitochondrial d'une des espèces

parentales, et un mélange des génomes nucléaires des deux espèces parentales, l'analyse de marqueurs nucléaires diagnostiques permet en revanche de les identifier. Dans le cas d'hybridation exposé à la figure II-6 (où un mâle de l'espèce A se croise avec une femelle de l'espèce B et où les hybrides se croisent ensuite avec l'espèce parentale B) l'analyse de l'ADNmt seule conduirait à la fausse conclusion que les individus hybrides appartiennent à l'espèce B. L'utilisation de marqueurs nucléaires en complément permet d'identifier avec certitude les hybrides F1 et potentiellement les hybrides plus introgressés.



**Figure II-6 :** Cas théorique d'hybridation entre deux espèces A et B. Les génomes mitochondriaux et nucléaires sont colorés par espèce, respectivement en rouge pour l'espèce A et en bleu pour l'espèce B. A la méiose, les génomes nucléaires des deux espèces peuvent éventuellement recombiner à partir de la génération F1.

Les hybridations étant fréquentes entre espèces d'esturgeons, la détection des hybrides naturels ou artificiels est une question importante aussi bien pour la conservation des Acipensériformes que pour le contrôle de leur commerce.

### ■ Une carence en marqueurs nucléaires chez les esturgeons :

Peu de marqueurs nucléaires diagnostiques ont été identifiés chez les Acipensériformes, et ce pour plusieurs raisons :

**1)** l'existence de plusieurs niveaux de ploïdie chez les esturgeons rend difficile l'étude comparée des gènes nucléaires (Ludwig *et al.* 2001). En effet si deux allèles d'un même gène sont présents chez une espèce diploïde, ils seront quatre chez une espèce tétraploïde et huit chez une espèce octoploïde.

**2)** la vitesse d'évolution du génome nucléaire des esturgeons est très lent (voir par exemple Brown *et al.* 1996 ; Birstein *et al.* 1997a ; Peng *et al.* 2007). D'abord parce que comme chez tous les animaux la vitesse d'évolution de l'ADNnuc est globalement inférieure à celle de l'ADNmt – par exemple, Moriyama & Powell (1997) ont montré que le taux de substitutions synonymes est entre 1,7 et 9 fois plus élevé sur l'ADNmt que sur l'ADNnuc chez la drosophile. Ensuite parce que du fait de leur faible métabolisme et de leur longue durée de vie, les esturgeons évoluent lentement en comparaison des autres animaux (Krieger & Fuerst 2002). Un même gène nucléaire a donc plus de chances d'être resté inchangé (et donc inutile d'un point de vu phylogénétique) entre deux espèces d'esturgeons qu'entre deux espèces de Mammifères.

**3)** les génomes nucléaires des esturgeons ont été très peu étudiés jusqu'à maintenant. Il n'existe par exemple aucune carte génétique disponible, et aucun projet de séquençage n'a été amorcé.

Au final, les marqueurs nucléaires développés chez les Acipenséridés sont peu nombreux en comparaison de ce qui existe pour d'autres taxons tels les Salmonidés ou les Cyprinidés. Ces marqueurs appartiennent globalement à deux catégories : (i) les marqueurs nucléaires multicopies, qui sont présents en plusieurs copies paralogues plus ou moins divergentes sur le génome et (ii) les marqueurs microsatellites.

### ■ Intérêt limité des marqueurs nucléaires multicopies

Tiedemann *et al.* (2007) se sont basés sur l'intron 2a de la chaîne B du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) identifié par Venkatesh *et al.* (1999) pour distinguer *A. sturio*, *A. oxyrinchus* et leurs hybrides dans la Mer Baltique. Les auteurs ont trouvé un allèle majoritaire chez *A. sturio* (population relictuelle de Gironde), un allèle majoritaire distinct chez *A. oxyrinchus* (population nord-américaine de recolonisation glaciaire) et un mélange de ces allèles ainsi que d'allèles intermédiaires dans la population baltique. De plus les individus de la Baltique présentaient souvent deux allèles (interprétés par les auteurs comme de l'hétérozygotie) alors que les autres présentaient généralement un seul allèle (interprété comme de l'homozygotie). Ces découvertes ont conduit les auteurs à affirmer que la population d'esturgeons de la Baltique était une population hybride entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus*.

Cette affirmation est un peu hâtive car le CMH n'a pas été le sujet d'études poussées chez les esturgeons, et l'étendue de la diversité allélique chez *A. sturio* et *A. oxyrinchus* n'est que très partiellement entrevue à partir de l'étude des deux populations (qui plus est très peu diverses génétiquement) utilisées par Tiedemann *et al.* (2007). Par ailleurs, les auteurs ont considéré ce locus comme diploïde, alors que le CMH est connu pour être une zone complexe fortement dupliquée (Babik 2010), comme cela a par exemple été montré chez les épinoches (Reusch *et al.* 2004 ; Reusch & Langefors 2005). La quantification par qPCR effectuée au cours de la présente thèse sur ce même locus chez *A. sturio* révèle ainsi entre 5 et 20 fois plus de copies CMH que du locus microsatellite diploïde LS19 (voir partie III-A-1 pour des détails sur le principe de la quantification par qPCR). Ainsi, l'hétérozygotie supposée par Tiedemann *et al.* (2007) résulte probablement de l'amplification de plusieurs copies paralogues.

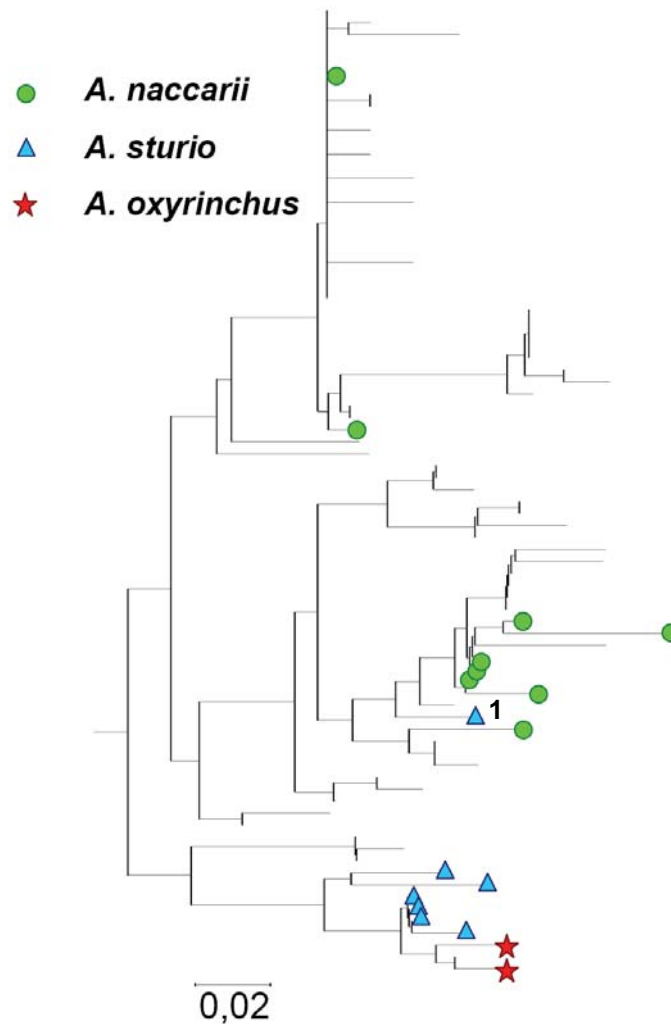
Au final, l'utilisation du CMH comme marqueur nucléaire diagnostique des espèces d'esturgeon n'est à l'heure actuelle par très pertinente. Une clarification de l'organisation du CMH chez les esturgeons est indispensable.

Garrido-Ramos *et al.* (1997) se sont eux basés sur la présence / absence d'une famille d'ADN satellite *HindIII* pour discriminer *A. sturio* et *A. naccarii*. Cet ADN satellite nucléaire semble en effet être présent chez *A. naccarii* mais pas chez

*A. sturio* ni *A. oxyrinchus*. Ces résultats ont été très controversés (Elvira & Almodovar 1999 ; Doukakis *et al.* 2000) et aucune autre équipe que celle qui l'a mise au point n'utilise ce marqueur. Par ailleurs peu de séquences ont été obtenues sur cette famille alors qu'elle a été identifiée par hybridation de sondes fluorescentes en de multiples zones chromosomiques (Lanfredi *et al.* 2001) ; par exemple 50 zones chromosomiques ont été identifiées chez *A. naccarii* (mais seulement 11 séquences dans GenBank), 80 zones chez *A. gueldenstaedtii* (mais 11 séquences) ou encore 38 zones chez *A. baerii* (mais 8 séquences). Ainsi l'ensemble de la diversité allélique de cette famille n'a pas été identifié à l'heure actuelle (et il sera sans doute difficile de séquencer de façon exhaustive les multiples zones chromosomiques). De plus, les séquences disponibles ne permettent pas forcément de discriminer les espèces, certains clones séquencés pour *A. naccarii* se retrouvant à l'identique chez *A. gueldenstaedtii* ou *A. baerii*. Le manque de connaissance sur la diversité allélique de ce marqueur ainsi que son faible pouvoir de discrimination n'en font pas un outil de choix pour la détermination des espèces d'esturgeons.

D'autres séquences nucléaires multicopies ont été utilisées, telles que la famille d'ADN satellite *PstI* (Robles *et al.* 2004), l'ARNr 5S (Robles *et al.* 2005) ou l'ARNr 18S (Krieger *et al.* 2006). La discrimination spécifique est possible à l'aide de tous ces marqueurs multicopies, mais le nombre important de séquences obtenues pour chaque individu complique l'analyse. De plus, les allèles présents chez une même espèce ne forment pas forcément un groupe monophylétique sur un arbre (voir la figure II-7 avec l'exemple du jeu de données de Robles *et al.* (2005) sur l'ARNr 5S), les différentes copies paralogues évoluant plus ou moins indépendamment les unes des autres. Dans la mesure où seuls quelques individus par espèce ont été analysés, il est possible que certaines copies paralogues n'aient pas été identifiées (par exemple à cause d'une mutation dans la zone d'hybridation d'une des amorces utilisées lors de la PCR). Il est donc tout à fait envisageable que lors de l'analyse d'un spécimen ancien dont l'espèce est inconnue, de nouveaux allèles appartenant à une copie paralogue différente de celle précédemment identifiée soient séquencés ; si ces allèles sont plus proches de ceux d'une autre espèce que des allèles de l'espèce à laquelle appartient réellement le spécimen, une erreur de détermination peut se produire. Par exemple prenons la figure II-7. Imaginons que l'allèle 1 de l'esturgeon européen n'ait pas été identifié lors de l'étude

de Robles *et al.* (2005), et que lors de l'analyse d'un reste archéologique très dégradé ce soit le seul allèle amplifié. Cet allèle étant plus proche des allèles identifiés chez *A. naccarii* que de ceux identifiés chez *A. sturio* ou *A. oxyrinchus*, nous concluions à tort que le reste archéologique appartient à l'espèce *A. naccarii*, alors qu'en réalité il appartient à l'espèce *A. sturio*.



**Figure II-7 :** Arbre phylogénétique construit à partir du jeu de données de Robles *et al.* (2005) sur l'ARNr 5S. Les allèles identifiés chez *A. sturio*, *A. naccarii* et *A. oxyrinchus* sont indiqués par des sigles distinctifs. Les autres allèles appartiennent à d'autres espèces d'esturgeons

Pour toutes ces raisons, l'utilisation de marqueurs nucléaires multicopies n'est pas idéale pour la discrimination des espèces d'esturgeons.

### ■ Les microsatellites, un potentiel inexploité :

Les microsatellites sont de courtes séquences d'ADN caractérisées par la répétition en tandem d'un motif de une à six paires de bases. La réplication de ce motif répété lors des divisions cellulaires est particulièrement sujette aux erreurs, consistant en l'ajout ou le retrait d'un ou plusieurs motifs (Schlotterer & Tautz 1992). Chez l'Homme, le taux de mutation des locus microsatellites est ainsi estimé à  $4.10^{-4}$  par génération, contre  $2.10^{-8}$  par nucléotide en moyenne sur le génome (Whittaker *et al.* 2003). Pour un même locus, plusieurs dizaines d'allèles peuvent parfois exister, différant les uns des autres par le nombre de répétitions du motif central.

Cet important polymorphisme, couplé au fait que les microsatellites sont fréquents et répartis de façon homogène dans les génomes eucaryotes (Tautz & Renz 1984), explique qu'ils soient les marqueurs moléculaires les plus couramment utilisés à l'heure actuelle (Schlotterer 2004). Ils sont particulièrement utilisés pour étudier la diversité génétique à l'intérieur des espèces ; l'analyse combinée de plusieurs locus informatifs permet en effet une discrimination au niveau individuel (*e.g.* Rudnick *et al.* 2005).

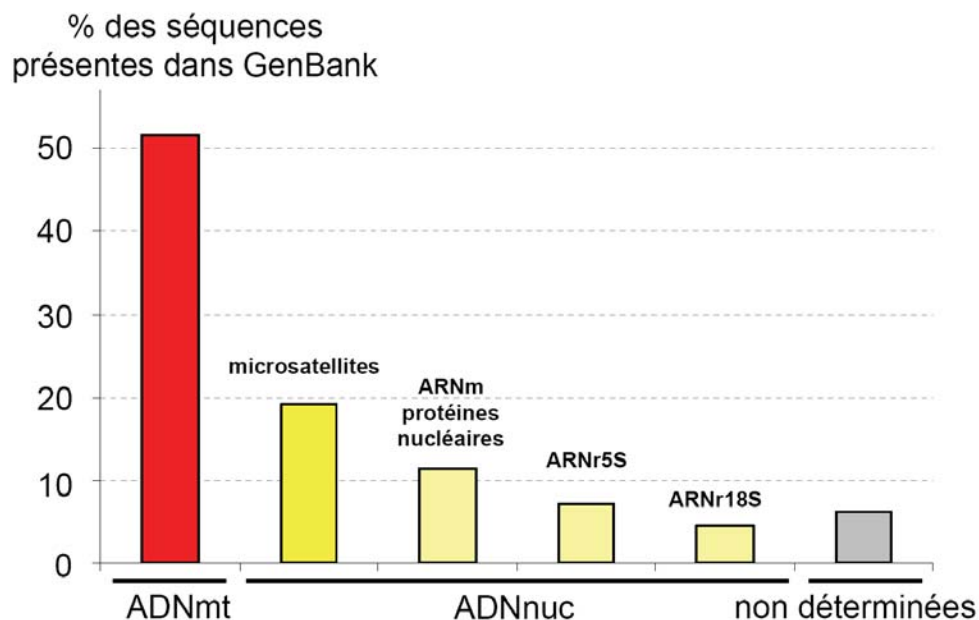
Les microsatellites peuvent être utilisés pour la discrimination des espèces sans séquençage, lorsque les tailles d'allèles sont disjointes ou en comparant les fréquences alléliques des différentes espèces (*e.g.* Pampoulie & Danielsdottir 2008). La discrimination basée sur les fréquences alléliques requiert un nombre important d'individus et de marqueurs pour être efficace, ce qui n'est pas toujours possible.

Le séquençage des locus microsatellites n'est que rarement entrepris en dehors de la phase d'identification de nouveaux locus, mais les séquences encadrants la zone répétée (appelées aussi séquences flanquantes) sont souvent polymorphes et peuvent aussi servir à discriminer les espèces ; cette propriété a par exemple été exploitée pour distinguer des espèces de cerfs (Poetsch *et al.* 2001), de vignes (Sefc *et al.* 1999) ou de poissons de la famille des Cichlidés (Zardoya *et al.* 1996).

Les microsatellites constituent la majorité des marqueurs nucléaires identifiés chez les esturgeons (Figure II-8). Servant principalement à l'étude de la diversité intraspécifique (voir par exemple Henderson-Arzapalo & King 2002 pour



*A. oxyrinchus* ; McQuown *et al.* 2003 pour *A. fluvescens* ; Zhu *et al.* 2006 pour *A. sinensis*), leur potentiel de discrimination interspécifique est sous-exploité. Dans le but d'employer ce potentiel pour discriminer *A. sturio*, *A. oxyrinchus* et *A. naccarii* au niveau nucléaire, 18 locus microsatellites préalablement identifiés chez diverses espèces d'esturgeon (May *et al.* 1997 ; McQuown *et al.* 2000 ; King *et al.* 2001 ; Henderson-Arzapalo & King 2002 ; Zane *et al.* 2002 ; Forlani *et al.* 2008) ont été analysé ici. Lors de la présente étude, le génotypage de plus de 30 individus a été réalisé par espèce pour chacun de ces locus, ce qui m'a permis de sélectionner les cinq locus les plus informatifs et les plus faciles à analyser : LS19, LS54, LS68, Aox23 et AoxD161. A noter que la sélection de ces locus a aussi pris en compte leur adéquation à être utilisé sur substrat ancien, critère important puisqu'ils sont destinés à servir aussi à l'analyse de spécimens de musée et de restes archéologiques (voir la partie III-A-2 pour une discussion approfondie sur les critères de sélection pour l'ADN ancien). Dix individus par espèce, représentatifs de l'ensemble de la diversité allélique identifiée lors du génotypage, ont été choisis pour le séquençage allélique sur les cinq locus sélectionnés, dans le but d'identifier de nouveaux sites diagnostiques nucléaire fiables pour la distinction des espèces *A. sturio*, *A. oxyrinchus* et *A. naccarii*.



**Figure II-8 :** Répartition par type des 2759 séquences d'esturgeons présentes dans la base de données GenBank (le 10 Août 2010). Les microsatellites constituent la majorité des séquences nucléaires présentes (20% du total et 40% des séquences nucléaires).

**ARTICLE 1 : DISTINGUISHING SPECIES OF EUROPEAN STURGEONS  
USING MICROSATELLITE ALLELE SEQUENCES.**

Olivier CHASSAING, Catherine HÄNNI, Patrick BERREBI

*Journal of Fish Biology, accepté.*

# **Distinguishing species of European sturgeons using microsatellite allele sequences**

**O. Chassaing . C. Hänni . P. Berrebi**

O. Chassaing, P. Berrebi (Corresponding author)

Institut des Sciences de l'Evolution, UMR 5554 CNRS/UM2/IRD, Université Montpellier  
2, cc065, place Bataillon, 34095 Montpellier cedex 05, France.

Email: [patrick.berrebi@univ-montp2.fr](mailto:patrick.berrebi@univ-montp2.fr)

Tel.: (33) 467143732

Fax: (33) 467143622

O. Chassaing, C. Hänni

Paléogénétique et Evolution Moléculaire, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon,  
Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, INRA, Ecole Normale Supérieure de Lyon,  
46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

Running headline: Nuclear discrimination of European sturgeons

**Abstract** Five microsatellite markers were analysed and their alleles were sequenced for the three species that lived in Western Europe – the European sturgeon *Acipenser sturio* L., the Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus* (Mitchill) and the Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Bonaparte). A total of 94 different allele sequences were obtained. Fixed mutations in flanking regions or in the core repeat of microsatellites allow the clear distinction between the different species. Allele sequences comparison gave also some insights into microsatellites and sturgeons evolution. These nuclear markers can be used to solve species determination problems, and combined with mitochondrial markers, will be useful to identify introgression and hybridization between the three species. Moreover, because they are short and with a limited allele size range, they are particularly suited for analysis of museum specimens or archaeological remains.

**Keywords** Microsatellites . Species determination . Hybridization . Sturgeons . *Acipenser*

## Introduction

Most of the twenty five extant sturgeon species are considered threatened or endangered (IUCN 2010) due to human activities, particularly overfishing and habitat destruction (Billard, Lecointre 2001). Three species lived and used to be common in Western Europe: the European sturgeon *A. sturio*, the Atlantic sturgeon *A. oxyrinchus* and the Adriatic sturgeon *A. naccarii*. At the beginning of the last century, sturgeons were spawning in each major river from the Black Sea to the Baltic Sea. Nowadays, only relict populations remain in the Garonne basin in France and in the Po basin in Italy, being respectively the last natural population of *A. sturio* and *A. naccarii*. *A. oxyrinchus* is now extinct in Europe, but numerous breeding populations still exist on the Atlantic coast of the USA and Canada.

Because almost all European natural populations are now extinct, biogeography of species and relations between them are poorly understood. Traditionally, only *A. sturio* and *A. naccarii* were considered to have lived in Western Europe and the now extinct Baltic sturgeon population had for example been classified as belonging to *A. sturio* (Artyukhin, Vecsei 1999; Birstein, Doukakis 2000). However recent studies based on museum specimens and archaeological remains indicated that it was *A. oxyrinchus*, sister species of *A. sturio*, which inhabited the Baltic Sea at least since the Middle ages (Ludwig et al. 2002; Ludwig et al. 2008). It was a surprise, as *A. oxyrinchus* was considered to be a purely American species before this discovery. In the same way, past repartition of *A. naccarii* is controversial, some scientists claiming it was not endemic to the Adriatic Sea, but that it was also present in the Western Mediterranean, perhaps in sympatry with *A. sturio* (GarridoRamos et al. 1997; De la Herran et al. 2004). Nevertheless, recent evidences based on archaeological artefacts indicated that if the punctual presence of *A. naccarii* cannot be excluded, it is unlikely that any functional population of this species existed apart from the Adriatic Sea, and particularly in the Western Mediterranean (Ludwig et al. 2009a; Pages et al. 2009). These examples demonstrate the usefulness of studying ancient remains – by archaeozoological and paleogenetics means – to get information from the past.

Hybridization between different sturgeon species is a common natural phenomenon (review in Birstein et al. 1997) and has been reported in many cases in the wild (Tranah et al. 2004; Ludwig et al. 2009b). In Western Europe, natural sympatry is

known with *A. sturio* and *A. oxyrinchus* in the Baltic Sea (these species diverged 60 Mya, according to Peng et al. 2007), or with *A. sturio* and *A. naccarii* in the Adriatic Sea (they diverged 170 Mya), so that hybridization between these species could have occurred in the past. The question should be addressed extensively before considering reintroducing sturgeons in European rivers, because as only one natural population remains for each *A. sturio* and *A. naccarii*, these species are particularly sensitive to extinction by hybridization (Rhymer, Simberloff 1996; Allendorf et al. 2001). However, hybridization is very difficult to detect in past populations, because maternal and paternal genetic contributions have to be analysed.

To identify sturgeon species, molecular biology studies have relied mainly on mitochondrial markers (DeSalle, Birstein 1996; Pages et al. 2009) particularly the cytochrome *b* gene and the Control Region sequences. But mitochondrial DNA being maternally inherited (Dawid, Blackler 1972), these markers only tell us the story of maternal lineages. To address the question of hybridization, several nuclear markers allowing distinguishing between sturgeons species have to be analysed.

The number of nuclear markers available for sturgeons is relatively low when compared with other taxa such as mammals. The majority of them are microsatellites markers, which are mainly used to detect population structure within species (Wirgin et al. 2002; McQuown et al. 2003). Cross amplification of a same microsatellite is common in related species (Primmer et al. 1996; Peakall et al. 1998), and it is particularly the case for sturgeons (May et al. 1997; King 2001), probably because of their slow evolutionary rate (Robles et al. 2004). It is sometimes possible to distinguish between species based on the allele lengths or frequencies (Jennekens et al. 2001) or because of the presence of diagnostic substitutions in the flanking regions of the repeated motifs (Presa, Guyomard 1996; Zardoya et al. 1996; Ludwig et al. 2002). However to establish such differences, the sequencing of microsatellite alleles from several populations of the different species to distinguish is necessary in order to get a view of the allelic diversity. Due to the lack of extensive studies in this field, only few microsatellites can be used as species specific markers.

In this study, we described species-specific nuclear markers helpful for species determination and hybrid detection between the three species of sturgeons which lived in Western Europe. To achieve this goal, several microsatellite loci have been screened

and their alleles have been sequenced to identify diagnostic substitutions or indels in the flanking regions or in the core repeat.

## **Material and Methods:**

### Fish samples

Samples from wild and broodstock *A. sturio* individuals of the Gironde estuary were provided by the CEMAGREF of Bordeaux (n = 52). They consist of 16 wild individuals caught in 1994 and 36 individuals stemming from the cross of one male and one female in 1995 (Williot *et al.* 1997). The two parents are part of the 16 wild individuals analysed here.

For *A. oxyrinchus*, we used DNA stored in ethanol and previously extracted (Ludwig *et al.* 2002). Individuals coming from three North American river basins were studied: St-John River (n = 30) in Canada, Shark River (n = 14) and Delaware River (n = 13) in the USA.

Samples from broodstock *A. naccarii* individuals (n = 30) were coming from Giovannini farm (Italy). These fish are descending from several wild individuals from the Po basin (Arlati, Poliakova 2009).

### DNA extraction, locus selection and PCR conditions

For *A. sturio* and *A. naccarii*, DNA was extracted from fins in ethanol following Chelex protocol (Walsh *et al.* 1991). For *A. oxyrinchus*, ethanol was evaporated, and DNA pellets were resuspended in TE buffer.

Eighteen microsatellite loci, previously isolated from different sturgeon species (May *et al.* 1997; McQuown *et al.* 2000; King 2001; Henderson-Arzapalo, King 2002; Zane *et al.* 2002; Forlani *et al.* 2008), were tested for amplification on these three species. Primers and loci characteristics are indicated in Table I. We selected five loci for our study, on the basis of amplification efficiency, polymorphism, and trimeric or tetrameric motifs which facilitates sequencing: LS19, LS54, LS68, Aox23 and AoxD61. LS19, LS54, LS68 were initially isolated in *A. fluvescens* (May *et al.* 1997), whereas Aox23

and AoxD161 were isolated in *A. oxyrinchus* (King 2001; Henderson-Arzapalo, King 2002). A new forward primer (F2) was designed for locus Aox23 on *A. sturio* and *A. oxyrinchus* (see Table I) because a 59 bp sequence is repeated in the 5' flanking region of the microsatellite for these species (the second repetition is truncated at the 3' end for *A. oxyrinchus*), and primer F can anneal on both of these repetitions. No amplification was obtained for *A. naccarii* with F2 primer except for two individuals, but good amplification efficiency have been obtained with F primer. Aox23 has been previously used to distinguish between *A. sturio* and *A. oxyrinchus* (Ludwig et al. 2002), but only the 5' flanking region has been extensively sequenced in this publication, and only one sequence per species is available in GenBank (accession numbers AJ431640 and AJ431641 respectively).

PCR were performed under the following conditions: preheating at 94°C for 5 min, then denaturing at 94°C for 1 min, annealing at 52-57°C (see Table I) for 30 s, elongation at 72°C for 30 s for 35 cycles, and a final polymerization for 5 min at 72°C. Amplifications were carried out in a total reaction volume of 20 µL containing MgCl<sub>2</sub> 1,5-2,5 mM, DNA polymerase buffer 1X, 100 µM dNTP, 0.5 µM of each primer, 1 U Taq DNA polymerase and 2 µL of DNA extract.

## Genotyping

For each microsatellite locus, one primer was labelled with a fluorochrome, allowing accurate size determination by capillary electrophoresis. Genotypes were determined on an ABI PRISM 3130XL sequencer (ABI™), using ROX400HD as size marker. Genotype analyses were done using GENEMAPPER software (ABI™). Some individuals were genotyped based on two independent PCR to check the reliability of size assignation. Allele, genotype number and observed heterozygosity were calculated for each locus using GENETIX software (Belkhir et al. 1998). *A. sturio* and *A. oxyrinchus* are sister species and are known to be diploid while *A. naccarii* is considered to be tetraploid (Ludwig *et al.* 2001), so that up to four alleles were amplified for each locus for this last species. No quantification has been made to determine the genuine genotype; indeed when three alleles were observed for a tetrasomic locus, in *A. naccarii* only, it was often impossible to establish which allele was present in two copies. As heterozygosity has no sense in



this case, we calculated band sharing parameter for *A. naccarii*, which is another way to estimate population variability (Lynch 1990; Forlani et al. 2008).

### Sequencing

Once all samples have been genotyped, ten to twelve individuals per species were selected so that they represent most allelic variability of the three species (full-sibs were not included for *A. sturio*). PCR amplification products corresponding to these samples were cloned using Topo TA cloning kit according to the manufacturer instructions (Invitrogen). Four to sixteen clones per product were sequenced on an ABI PRISM 3130XL sequencer (ABI™). Sequences were assembled and analysed using Geneious software v3.6 (Drummond et al. 2009). Sequences were then aligned by eye.

The DNA polymerase can slip on microsatellite motifs, creating artefact fragments called shadow or stutter bands (Schlotterer, Tautz 1992; Litt et al. 1993). Genuine sequences were distinguished from stutter sequences according to their frequency among sequenced clones and to their length, previously determined by genotyping.

Some alleles share the same length but have different sequences, particularly when the repeated region consists of several different repeated motifs (homoplasmy). In this case, genotyping doesn't allow distinguishing between them, contrary to sequencing. Allele and genotype number were therefore also calculated for each locus based on sequences.

## Results:

### Genotyping

All loci gave tetrasomic patterns for *A. naccarii* except LS19 which seemed to be disomic. For *A. sturio* and *A. oxyrinchus* only disomic patterns were observed. These results are consistent with reported ploidy of these species (Ludwig et al. 2001; Fontana 2002).

We tested the inheritance of the five microsatellites in *A. sturio*, broodstock individuals being full sibs, descendant from two wild individuals. Genotypes of the parents and their progeny are compatible with a disomic inheritance.

All loci were polymorphic for the three species analysed. Based on their length, two to four alleles per locus were identified for *A. sturio*, three to nine alleles for *A. oxyrinchus*, and two to seven for *A. naccarii* (Table II). Allele's lengths are not overlapping for loci LS54 and Aox23 between *A. naccarii* and the two other species, alleles being longer for *A. naccarii* (Fig. 1). For locus AoxD161, allele's lengths are not overlapping between *A. sturio* and the two other species, alleles being longer for *A. sturio* (Fig. 1). These length criteria could be used for species determination, when allele sequencing is not possible.

### Sequencing

All alleles detected by genotyping have been sequenced with success (Fig. 2, accession numbers XXXXXX to XXXXXX). The only exception was one long allele of locus Aox23 in *A. naccarii*. It was also not possible for few *A. naccarii* individuals to sequence all alleles at a given locus, especially when four of them were present.

In *A. sturio* and *A. oxyrinchus* the same number of alleles was detected by sequencing and genotyping (Table II), except for locus Aox23 which is a compound microsatellite, and for which length homoplasmy has been detected in *A. oxyrinchus* (see the three 127 bp alleles in Fig. 2).

In *A. naccarii*, more alleles were detected by sequencing than by genotyping (Table II), because two allele families were identified per locus, distinguished by mutations in the microsatellite flanking regions (all loci) and by mutations in the microsatellite core repeat (LS54 and Aox23). These two families are identified by dashed lines in Fig. 2. Some alleles of both families have close or identical length so that it was impossible to identify them by genotyping only. Regarding to locus LS19, an indel of one base pair (bp) in the 5' flanking region distinguishes alleles of 125 and 126 bp (see Fig. 2), which were considered as only one allele before sequencing because of genotype assignation sensibility unable to detect a difference of one bp. The highest divergence between allele families in *A. naccarii* was detected for locus Aox23 (see Fig. 2), for which at least one allele family seems to be imbedded in a minisatellite region visible when amplified with F2 forward primer. In these conditions, the two shortest alleles were amplified as a 275 bp fragment in two *A. naccarii* individuals, containing three identical tandem repeats of 53 bp each, located upstream to the microsatellite

region (see accession numbers XXXXXX and XXXXXX). The first half of these repetitions are identical to the 5' flanking region of the microsatellite and the second half is of low complexity and share TAC and TAA motifs with the microsatellite core. The microsatellite locus certainly originated by slippage on the low complexity portion of one of the minisatellite region. The detection of two families for each microsatellite locus of the tetraploid *A. naccarii* could correspond to the presence of two diverged paralogous loci inherited from the polyploidization event which lead to the tetraploid state of this species.

### Species distinction

Allele sequences proved to be useful to distinguish between the three sturgeon species analysed. Distinction between *A. naccarii* and the two other species can be made on the basis of the allele sequence of the five loci studied (Fig. 2). Substitutions in flanking regions of LS19, LS68 and AoxD161 (positions 41 and 112 – 10 and 13 – 10 and 126 respectively) and in the repeated motif of LS54 and Aox23 distinguish all *A. naccarii* alleles from all *A. sturio* and *A. oxyrinchus* alleles. Indels in the 5' flanking region of Aox23 can be used as a supplementary diagnostic criterion.

Distinction between *A. sturio* and *A. oxyrinchus* can be made on the basis of the allele sequence of three out of the five loci. For Aox23, *A. sturio* alleles are characterized by two substitutions (positions 1 and 2) and an indel of 12 bp in the 5' flanking region when compared with those of *A. oxyrinchus* (Fig. 2), differences previously observed by Ludwig et al. (2002). For AoxD161, *A. sturio* alleles shared two repeat imperfections in the 3' portion of the repeated region, which distinguish them from *A. oxyrinchus* alleles. They consist in an A/G and a C/G substitution, transforming the CTAT motif into CTGT and GTAT motifs respectively (Fig. 2). For LS68, a G/A transition in the 5' flanking region (position 33) coupled with allele length can be used as a diagnostic difference between *A. sturio* and *A. oxyrinchus*. Indeed, *A. oxyrinchus* alleles all have an adenine at this particular site except one allele which has a guanine, as *A. sturio* alleles. But *A. sturio* alleles have not the same number of repeated motifs as this particular *A. oxyrinchus* allele, so that a distinction can be made between the species (Fig. 2).

## Discussion

### Available species specific nuclear markers in sturgeons

Several nuclear markers have been previously used to discriminate between *A. sturio*, *A. oxyrinchus* and *A. naccarii*. Tiedemann et al. (2007) studied the MHC II B-chain intron 2a previously described by Venkatesh et al. (1999) and found four substitutions separating *A. sturio* from *A. oxyrinchus*. They also identified intermediate alleles and high levels of heterozygosity in ancient samples from the Baltic Sea that they interpreted as the result of hybridization. Several limits to the use of this marker must be pointed out. Firstly, MHC has not been extensively characterized in Acipenseriformes, and due to its double duplication which occurred at the beginning of vertebrate evolution (Abi-Rached et al. 2002), it is likely that those paralogous genes, carrying each a fixed allele, are amplified together and be misinterpreted as heterozygosity. Secondly, intermediate alleles described could correspond to ancient natural variations occurring in *A. sturio* MHC regions, that are now absent from the Gironde population impoverished gene pool.

Garrido-Ramos et al. (1997) used the presence/absence of a *HindIII* satellite-DNA family to discriminate between *A. sturio* and *A. naccarii*. This satellite DNA seems indeed to be present in most sturgeon species including *A. naccarii* but not in both *A. sturio* and *A. oxyrinchus*. They applied this method on museum specimens from the Guadalquivir River to demonstrate the presence of *A. naccarii* in Spain. But these results and the method utilized were questioned by other teams (Elvira and Almodovar 1999; Doukakis et al. 2000). Furthermore the absence of the marker could result either from the degradation of DNA or from its absence in the original substrate, so that it is not recommended to use this marker, at least for ancient samples, for which DNA is degraded.

Other multiple copies sequences of nuclear DNA were also studied, such as the satellite-DNA family *PstI* (Robles et al. 2004), 5S rRNA (Robles et al. 2005) and 18S rRNA (Krieger et al. 2006), but their use as species specific marker is questionable as (i) sequences from different chromosomal locations cannot be distinguished and (ii) the intraspecific variability is high and has not been so far fully described. More reliable markers should be used whenever possible.

In a way to identify new reliable nuclear markers that are able to distinguish between *A. sturio*, *A. oxyrinchus* and *A. naccarii*, we tested 18 microsatellite loci from the bibliography and retained five of them that we analysed extensively: LS19, LS54, LS68, Aox23 and AoxD161.

#### Microsatellites as species specific nuclear markers

Ludwig et al. (2002) used the 5' flanking region of microsatellite Aox23 to discriminate between *A. sturio* and *A. oxyrinchus* in the Baltic area, because three substitutions and a deletion separate both species. Here, we sequenced twelve *A. oxyrinchus* alleles and two *A. sturio* alleles of this locus, and the same interspecific differences were observed (Fig. 2), confirming the reliability of this marker. We also identified microsatellite loci AoxD161 and LS68 as able to distinguish between *A. sturio* and *A. oxyrinchus*, based on allele lengths and sequences. Sequencing is required to use Aox23 and LS68 as species specific marker. However, AoxD161 is diagnostic simply by genotyping, because two substitutions in the microsatellite core repeat of *A. sturio* lead to longer alleles in *A. sturio* (161-173 bp) than in *A. oxyrinchus* (125-149 bp) (Fig. 1). With three species specific nuclear markers, hybridization and introgression detection between *A. sturio* and *A. oxyrinchus* becomes more accurate.

Concerning the detection of hybrids between *A. naccarii* and *A. sturio* or *A. oxyrinchus*, the five microsatellite loci analysed in this study can distinguish each kind of crossing, based on allele sequences. Such differences in microsatellite flanking or core repeat regions are frequently found between related species (Zardoya et al. 1996; Peakall et al. 1998). For loci LS54 and Aox23, allele lengths are not overlapping between *A. naccarii* and *A. sturio* / *A. oxyrinchus*, so that the distinction can be made by genotyping only (Fig. 1). It is not surprising that all the five microsatellites distinguish *A. naccarii* whereas only three of them distinguish *A. sturio* from *A. oxyrinchus*. This result is congruent with the fact that *A. naccarii* lineage diverged around 170 Mya from *A. sturio* / *A. oxyrinchus* lineage, but that *A. sturio* and *A. oxyrinchus* diverged more recently around 60 Mya (Peng et al. 2007).

#### Particularities of the tetraploid species *A. naccarii*

In *A. naccarii* two allele families were detected for each of the five analysed loci. Alleles of a same family are sharing mutations that distinguish them from those of the other family.

For loci LS68 and AoxD161, each allele family behave like a disomic marker, each individual having always two alleles of each family (sometimes as homozygotes). *A. naccarii* is a tetraploid species (Fontana 1994; Fontana et al. 2001), so that it is likely that these families represent paralogous loci that have diverged after the polyploidization event, which is thought to have occurred between 50 and 75 Mya (Peng et al. 2007). This pattern can be an illustration of functional diploidisation (Ohno, 1970)..

For loci LS19, LS54 and Aox23, allele give no evidence of disomy, some individuals carrying alleles from one family only. Locus LS54 is biased because weak PCR amplification of long alleles (when together with shorter ones) prevents their sequencing for half of the individuals. For Aox23, the most plausible explanation is the existence of null alleles, a problem caused by polymorphism in annealing flanking sequences, and frequently reported when microsatellite are cross-amplified between species (Sefc *et al.* 1999). Indeed, this microsatellite locus is embedded in a minisatellite region and such regions are known to be highly polymorphic (Robles *et al.* 2004). Furthermore, allele families for this locus are very divergent. Concerning LS19, null alleles are unlikely, because the use of another set of primers on some individuals gave identical results (data not shown). For this locus, allele families perhaps represent an ancestral polymorphism (inherited from a previous polyploidization event for example) conserved in both paralogous copies after *A. naccarii* lineage polyploidization event. These allele families could also have diverged initially on each paralogous copy, like for LS68 and AoxD161, and have been homogenised thereafter by recombination, mixing alleles of both families on both paralogous loci.

### Sampling bias

Finally we would like to point out the critical importance of sampling when developing species specific nuclear marker. It is indeed essential to analyse an important number of individuals from all known populations of a species, or at least several representative populations, in order to record the maximum of the intraspecific variability and to identify sequences possibly shared with other species. We did so with *A. oxyrinchus*, for

which three populations were analysed, but it was impossible to do so for *A. sturio* and *A. naccarii*, because only relict populations still exist. In the case of *A. sturio*, this limitation is particularly problematic because only one depleted population remains in the Gironde estuary, while more than a dozen existed until the 20<sup>th</sup> century in areas as diverse as the North Sea, the Mediterranean Sea and the Black Sea. The genepool of the present-day Gironde population is no more representative of the past intraspecific diversity of the species, and museum/archaeological samples coming from different extinct populations have to be added whenever possible to complete the dataset we established here. The addition of allele sequences from other sturgeon species is also important, as it will enhance the discrimination power of these microsatellites markers.

**Acknowledgments** We thank Arne Ludwig (Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, Germany), Leonardo Congiu (University of Padova, Italy) and Cemagref of Bordeaux (France) for providing sturgeon tissue samples. We are grateful to Arne Ludwig and Leonardo Congiu for providing aliquots of microsatellites primers for preliminary testing of cross amplification. Data used in this work were partly produced through molecular genetic analysis technical facilities of the IFR119 Montpellier Environnement Biodiversité. We thank Sandrine Hughes and Javier Oliver at the IGFL, for their helpful comments on the manuscript.

## References

- Abi-Rached, L., Gilles, A., Shiina, T., Pontarotti, P. & Inoko, H. (2002). Evidence of en bloc duplication in vertebrate genomes. *Nature Genetics* **31**, 100-105.
- Allendorf, F. W., Leary, R. F., Spruell, P. & Wenburg, J. K. (2001). The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 613-622.
- Arlati, G. & Poliakova, L. (2009). Restoration of Adriatic Sturgeon (*Acipenser naccarii*) in Italy: Situation and Perspectives. In *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons* (Carmona, R., Domezain, A., GarciaGallego, M., Hernando, J. A., Rodriguez, F. & RuizRejon, M., eds.), pp. 237-245.
- Artyukhin, E. & Vecsei, P. (1999). On the status of Atlantic sturgeon: conspecificity of European *Acipenser sturio* and North American *Acipenser oxyrinchus*. *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie* **15**, 35-37C.
- Belkhir, K., Borsa, P., Goudet, J., Chikhi, L. & Bonhomme, F. (1998). Genetix, logiciel sous Windows<sup>TM</sup> pour la génétique des populations, Laboratoire Génome et populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

- Billard, R. & Lecointre, G. (2001). Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **10**, 355-392.
- Birstein, V. J., Hanner, R. & DeSalle, R. (1997). Phylogeny of the Acipenseriformes: Cytogenetic and molecular approaches. *Environmental Biology of Fishes* **48**, 127-156.
- Birstein, V. & Doukakis, P. (2000). Molecular analysis of *Acipenser sturio* L., 1758 and *Acipenser oxyrinchus* Mitchill, 1815: A review. *Boletín Instituto Español De Oceanografía* **16**, 61-73.
- Dawid, I. B. & Blackler, A. W. (1972). Maternal and Cytoplasmic Inheritance of Mitochondrial-DNA in *Xenopus*. *Developmental Biology* **29**, 152-&.
- De la Herran, R., Robles, F., Martínez-Espin, E., Lorente, J. A., Rejon, C. R., Garrido-Ramos, M. A. & Rejon, M. R. (2004). Genetic identification of western Mediterranean sturgeons and its implication for conservation. *Conservation Genetics* **5**, 545-551.
- DeSalle, R. & Birstein, V. J. (1996). PCR identification of black caviar. *Nature* **381**, 197-198.
- Doukakis, P., Birstein, V. J., DeSalle, R., Ludwig, A. N., Ludwig, A., Machordom, A., Almodovar, A. & Elvira, B. (2000). Failure to confirm previous identification of two putative museum specimens of the Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio*, as the Adriatic sturgeon, *A. naccarii*. *Marine Biology* **136**, 373-377.
- Drummond, A. J., Ashton, B., Cheung, M., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S., Thierer, T. & Wilson, A. (2009). Geneious v4.8, Available from <http://www.geneious.com/>.
- Elvira, B. & Almodovar, A. (1999). A morphological study of native sturgeon *Acipenser sturio* in Spain, and recent records of exotic siberian sturgeon. *Journal of Applied Ichthyology* **15**, 278-279.
- Fontana, F. (1994). Chromosomal nucleolar organizer regions in 4 sturgeon species as markers of karyotype evolution in acipenseriformes (Pisces) *Genome* **37**, 888-892.
- Fontana, F., Tagliavini, J. & Congiu, L. (2001). Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancements and perspectives. *Genetica* **111**, 359-373.
- Fontana, F. (2002). A cytogenetic approach to the study of taxonomy and evolution in sturgeons. *Journal of Applied Ichthyology* **18**, 226-233.
- Forlani, A., Fontana, F. & Congiu, L. (2008). Isolation of microsatellite loci from the endemic and endangered Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Conservation Genetics* **9**, 461-463.
- GarridoRamos, M. A., Soriguer, M. C., de la Herran, R., Jamilena, M., Rejon, C. R., Domezain, A., Hernando, J. A. & Rejon, M. R. (1997). Morphometric and genetic analysis as proof of the existence of two sturgeon species in the Guadalquivir river. *Marine Biology* **129**, 33-39.
- Henderson-Arzapalo, A. & King, T. L. (2002). Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) population delineation and broodstock management. *Molecular Ecology Notes* **2**, 437-439.
- IUCN (2010). International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species. Version 2010.1. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Jennekens, I., Meyer, J. N., Horstgen-Schwark, G., May, B., Debus, L., Wedekind, H. & Ludwig, A. (2001). A fixed allele at microsatellite locus LS-39 exhibiting species-specificity for the black caviar producer *Acipenser stellatus*. *Journal of Applied Ichthyology* **17**, 39-42.



- King, T. L., B. A., Lubinski, et al. (2001). Microsatellite DNA variation in Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) and cross-species amplification in the Acipenseridae. *Conservation Genetics* **2**, 103–119.
- Krieger, J., Hett, A. K., Fuerst, P. A., Birstein, V. J. & Ludwig, A. (2006). Unusual intraindividual variation of the nuclear 18S rRNA gene is widespread within the acipenseridae. *Journal of Heredity* **97**, 218-225.
- Litt, M., Hauge, X. & Sharma, V. (1993). Shadow Bands Seen When Typing Polymorphic Dinucleotide Repeats - Some Causes and Cures. *Biotechniques* **15**, 280-284.
- Ludwig, A., Belfiore, N. M., Pitra, C., Svirsky, V. & Jenneckens, I. (2001). Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics* **158**, 1203-1215.
- Ludwig, A., Debus, L., Lieckfeldt, D., Wirgin, I., Benecke, N., Jenneckens, I., Williot, P., Waldman, J. R. & Pitra, C. (2002). When the American sea sturgeon swam east - A colder Baltic Sea greeted this fish from across the Atlantic Ocean in the Middle Ages. *Nature* **419**, 447-448.
- Ludwig, A., Arndt, U., Lippold, S., Benecke, N., Debus, L., King, T. L. & Matsumura, S. (2008). Tracing the first steps of American sturgeon pioneers in Europe. *BMC Evolutionary Biology* **8**.
- Ludwig, A., Arndt, U., Debus, L., Rosello, E. & Morales, A. (2009a). Ancient mitochondrial DNA analyses of Iberian sturgeons. *Journal of Applied Ichthyology* **25**, 5-9.
- Ludwig, A., Lippold, S., Debus, L. & Reinartz, R. (2009b). First evidence of hybridization between endangered sterlets (*Acipenser ruthenus*) and exotic Siberian sturgeons (*Acipenser baerii*) in the Danube River. *Biological Invasions* **11**, 753-760.
- Lynch, M. (1990). The Similarity Index and DNA Fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution* **7**, 478-484.
- May, B., Krueger, C. C. & Kincaid, H. L. (1997). Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**, 1542-1547.
- McQuown, E. C., Sloss, B. L., Sheehan, R. J., Rodzen, J., Tranah, G. J. & May, B. (2000). Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon: New primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser*. *Transactions of the American Fisheries Society* **129**, 1380-1388.
- McQuown, E., Krueger, C. C., Kincaid, H. L., Gall, G. A. E. & May, B. (2003). Genetic comparison of lake sturgeon populations: Differentiation based on allelic frequencies at seven microsatellite loci. *Journal of Great Lakes Research* **29**, 3-13.
- Ohno, S. (1970). *Evolution by gene duplication*. New York: Springer.
- Pages, M., Desse-Berset, N., Tougaard, C., Brosse, L., Hanni, C. & Berrebi, P. (2009). Historical presence of the sturgeon *Acipenser sturio* in the Rhone basin determined by the analysis of ancient DNA cytochrome b sequences. *Conservation Genetics* **10**, 217-224.
- Peakall, R., Gilmore, S., Keys, W., Morgante, M. & Rafalski, A. (1998). Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 1275-1287.

- Peng, Z. G., Ludwig, A., Wang, D. Q., Diogo, R., Wei, Q. W. & He, S. P. (2007). Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces : Acipenseriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **42**, 854-862.
- Presa, P. & Guyomard, R. (1996). Conservation of microsatellites in three species of salmonids. *Journal of Fish Biology* **49**, 1326-1329.
- Primmer, C. R., Moller, A. P. & Ellegren, H. (1996). A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* **5**, 365-378.
- Rhymer, J. M. & Simberloff, D. (1996). Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 83-109.
- Robles, F., de la Herran, R., Ludwig, A., Rejon, C. R., Rejon, M. R. & Garrido-Ramos, M. A. (2004). Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes. *Gene* **338**, 133-142.
- Robles, F., de la Herran, R., Ludwig, A., Rejon, C. R., Rejon, M. R. & Garrido-Ramos, M. A. (2005). Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in the ancient fish sturgeon. *Genome* **48**, 18-28.
- Schlotterer, C. & Tautz, D. (1992). Slippage Synthesis Of Simple Sequence Dna. *Nucleic Acids Research* **20**, 211-215.
- Sefc, K. M., Regner, F., Turetschek, E., Glossl, J. & Steinkellner, H. (1999). Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* **42**, 367-373.
- Tiedemann, R., Moll, K., Paulus, K. B., Scheer, M., Williot, P., Bartel, R., Gessner, J. & Kirschbaum, F. (2007). Atlantic sturgeons (*Acipenser sturio*, *Acipenser oxyrinchus*): American females successful in Europe. *Naturwissenschaften* **94**, 213-217.
- Tranah, G., Campton, D. E. & May, B. (2004). Genetic evidence for hybridization of pallid and shovelnose sturgeon. *Journal of Heredity* **95**, 474-480.
- Venkatesh, B., Ning, Y. & Brenner, S. (1999). Late changes in spliceosomal introns define clades in vertebrate evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 10267-10271.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. & Higuchi, R. (1991). Chelex-100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for Pcr-Based Typing from Forensic Material. *Biotechniques* **10**, 506-513.
- 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.
- Wirgin, I., Waldman, J., Stabile, J., Lubinski, B. & King, T. (2002). Comparison of mitochondrial DNA control region sequence and microsatellite DNA analyses in estimating population structure and gene flow rates in Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus*. *Journal of Applied Ichthyology* **18**, 313-319.
- Zane, L., Patarnello, T., Ludwig, A., Fontana, F. & Congiu, L. (2002). Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Molecular Ecology Notes* **2**, 586-588.
- Zardoya, R., Vollmer, D. M., Craddock, C., Streelman, J. T., Karl, S. & Meyer, A. (1996). Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **263**, 1589-1598.

## Figures captions

**Fig. 1:** allele size range for LS19, LS54, LS68, Aox23 and AoxD161 microsatellite loci, defined for *A. naccarii* (green), *A. oxyrinchus* (red) and *A. sturio* (blue). Size is given including primers. Boxes indicate non overlapping size range. For Aox23 locus, size refers to amplification with the F primer for each species (and not F2 primer, see Table I).

**Fig. 2:** sequences of alleles identified for locus LS19, LS54, LS68, Aox23 and AoxD161 for *A. oxyrinchus* (A.oxy), *A. sturio* (A.stu), and *A. naccarii* (A.nac). Primer sequences are not shown. Reference corresponds to the sequence of *A. fulvescens* for LS19, LS54 and LS68 (accession numbers AFU72730, AFU72735 and AFU72739 respectively), and of *A. oxyrinchus* for Aox23 and AoxD161 (accession numbers AJ431641 and AF067811 for Aox23, AY093639 for AoxD161). Position relative to this reference is indicated up to the alignment. Allele name indicates the species, the number of sequenced individuals carrying it and the size in bp (including the primers). Dashes are deletions and dots indicate identical positions in the flanking regions. Empty box indicates the repeat region. Shaded boxes indicate species diagnostic sites. Dashed lines at the left identify the two allele families for *A. naccarii*. The repeated motif consisted in TTG (coded as M) or TCG (coded as P) for LS19. It consists in GATA (coded as M), GACA (coded as P), GGCA (coded as B), GAGA (coded as D), ---C (coded as F), GTTA (coded as J), GACC (coded as Q) and AGTA (coded as H) for LS54. It consists in GATA (coded as M), AATA (coded as P), TATA (coded as B), GATC (coded as D), GATG (coded as E), GAAA (coded as F) and GACA (coded as H) for LS68. It consists in TAC (coded as M), TAA (coded as P), AAA (coded as H) or CAA (coded as B) for Aox23. It consists in CTAT (coded as M), CTGT (coded as P) or GTAT (coded as B) for AoxD161. Note that the last GATA motif and the three base pairs from the 3' flanking region of LS68 are part of the reverse primer. A 26 bp sequence shared between *A. oxyrinchus* and *A. sturio* (TGATGCAGTGTGCTAGCTTCTCAATA) has been replaced by // at the beginning of the sequences of Aox23; this portion has not been amplified for *A. naccarii* because of the use of the F forward primer for this species (instead of F2 for the other).

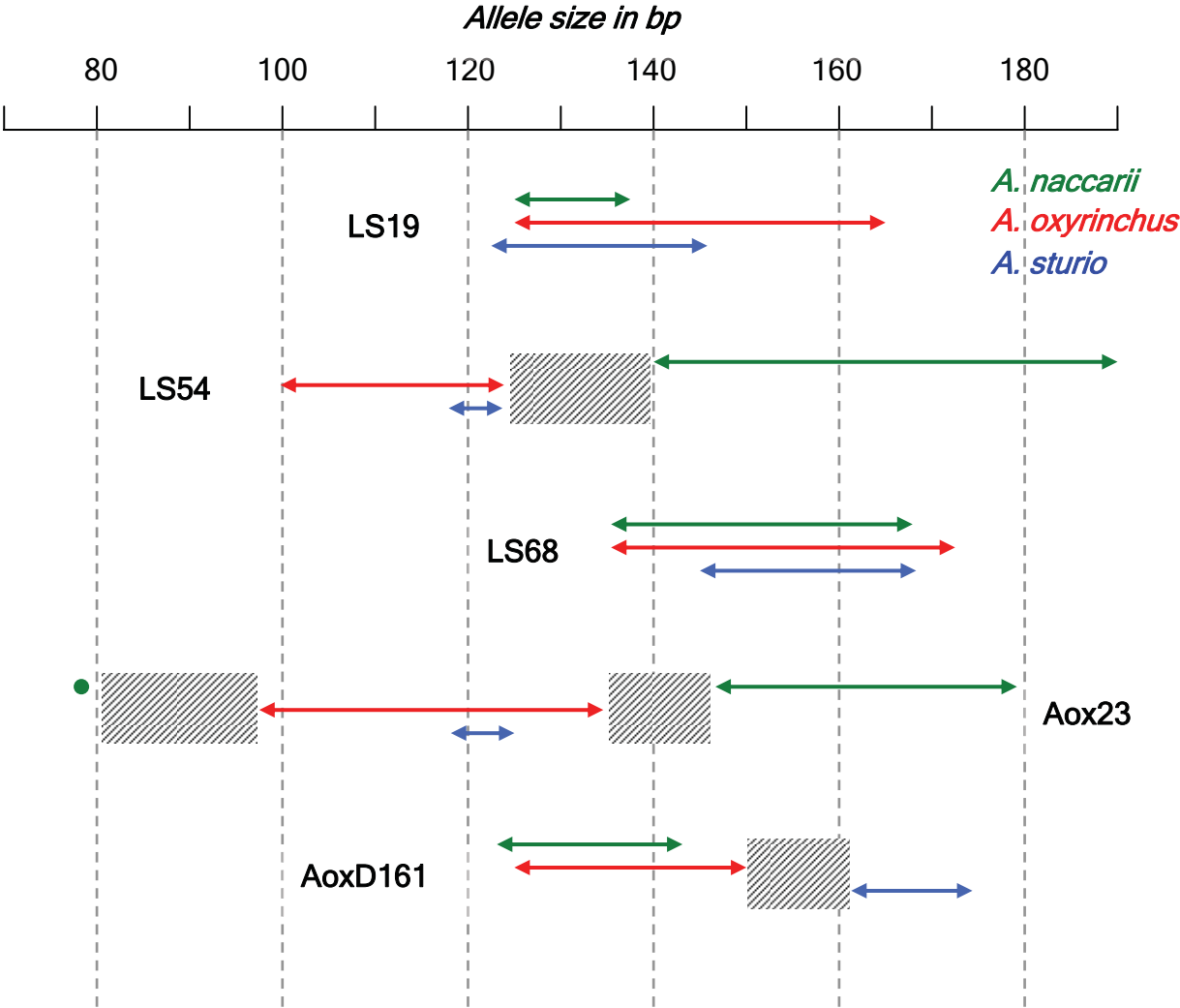


Figure 1

**LS19**

	1	31	41	112	124
AFU72730	AAATAAATCACACAGAAAACCCCATAGTC-TAAATCGTATA			TTTATCCCTTAAAATTACTATATAATT	
:A.nac6-137	.....	-	.....	.....	.....
:A.nac5-125	.....	-	.....	.....	.....
:A.nac10-126	.....	A	.....	.....	.....
A.stu3-146	.....	-	.....	.....	.....
A.stu10-122	.....	-	.....	.....	.....
A.oxy3-164	.....	-	.....	.....	.....
A.oxy7-146	.....	-	.....	.....	.....
A.oxy10-131	.....	-	.....	.....	.....
A.oxy2-125	.....	-	.....	.....	.....

**LS54**

	1	21	75
AFU72735	CAAACCTGAATTATGCAAAACC		GA
:A.nac4-139	.....	.....	.....
:A.nac4-151	.....	.....	.....
:A.nac1-151	.....	.....	.....
:A.nac1-159	.....	.....	.....
:A.nac4-191	T.....	A	.....
:A.nac1-191	T.....	A	.....
:A.nac4-171	T.....	A	.....
:A.nac1-167	T.....	A	.....
:A.nac1-171	T.....	A	.....
:A.nac1-167	T.....	A	.....
:A.nac1-171	T...TA.....	A	.....
:A.nac1-156	T...TA.....	A	.....
A.stu8-123	T.....	.....	.....
A.stu10-119	T.....	.....	.....
A.oxy3-123	T.....	.....	.....
A.oxy12-119	T.....	.....	.....
A.oxy2-99	T.....	.....	.....

**LS68**

AFU72739	1	10	13	21	33	137
A.nac1-160	AAAGAAATAT-----	GCAAAAGCAACAAGCAATTAA				TTG
A.nac1-152	...	C...GCAACTCA...	T			...
A.nac3-148	...	C...GCAACTCA...	T			...
A.nac1-156	...	C...GCAACTCA...	T			...
A.nac1-136	...	C...GCAACTCA...	T			...
A.nac1-152	...	C...GCAACTCA...	T			...
A.nac6-152	...	C...GCAACTCA...	T			...
A.nac1-148	...	C...GCAACTCA...	T			...
A.nac3-168	...	C...GCAACTCA...	T			...
A.nac2-160	...	C...GCAACTCA...	T			...
A.nac2-156	...	C...GCAACTCA...	T			...
A.nac1-156	...	C...GCAACTCA...	T			...
A.nac6-136	...	C...GCAACTCA...	T			...
A.stu8-168	...	A	CAGCTCA...	T	G	...
A.stu10-144	...	A	CAGCTCA...	T	G	...
A.oxy2-156	...	A	CAGCTCA...	T	G	...
A.oxy1-172	...	A	CAGCTCA...	T		...
A.oxy1-164	...	A	CAGCTCA...	T		...
A.oxy3-160	...	A	CAGCTCA...	T		...
A.oxy1-156	...	A	CAGCTCA...	T		...
A.oxy5-152	...	A	CAGCTCA...	T		...
A.oxy5-148	...	A	CAGCTCA...	T		...
A.oxy2-144	...	A	CAGCTCA...	T		...
A.oxy1-140	...	A	CAGCTCA...	T		...
A.oxy1-136	...	A	CAGCTCA...	T		...

**Aox23**

	1	35	186
AJ431641	AT //	TATTAT	MMMMMMMMMM--PPPPPP--
AF067811	//		MMMMMMMMMM--PPPPPP--
A.oxy1-164	//		MMMMMMMMMMMMMMMMMMMM--PPPPPP--
A.oxy1-156	//		MMMMMMMMMMMMMMMMMMMM--PPPPPP--
A.oxy1-151	//		MMMMMMMMMMMMMMMMMMMM--PPPPPP--
A.oxy3-148	//		MMMMMMMMMMMMMMMMMMMM--PPPPPP--
A.oxy1-135	//		MMMMMMMMMMMMMMMM--PPPPPP--
A.oxy1-145	//		MMMMMMMMMMMMMMMM--PPPPPPPPPP--
A.oxy1-133	//		MMMMMMMMMMMMMMMM--PPPPPP--
A.oxy1-134	//		MMMMMMMMMMMMMMMM--PPPPPP--
A.oxy3-127	//		MMMMMMMMMMMM--PPPPPP--
A.oxy2-131	//		MMMMMMMMMMMM--PPPPPP--
A.oxy7-127	//		MMMMMMMMMMMM--PPPPPP--
A.oxy1-127	//		MMMMMMMMMMMM--PPPPPP--
AJ431640	GA //	TATTAATATTAT	MMMMMM--PPPPPPPPPPPPPP--
A.stu10-154	GA //	TATTAATATTAT	MMMMMM--PPPPPPPPPPPPPP--
A.stu2-148	GA //	TATTAATATTAT	MMMMMM--PPPPPPPPPPPPPP--
A.nac1-156		---TAAATATTAT	MMMMMMMMMMMMMMMMMM--PHPPPPPPPPPP--
A.nac1-150		---TAAATATTAT	MMMMMMMMMMMMMMMMMM--PHPPPPPPPPPP--
A.nac5-147		---TAAATATTAT	MMMMMMMMMMMMMMMMMM--PHPPPPPPPPPP--
A.nac1-174		---TAAATAATAT	MMMMMMMMMMMMMMMMMM--PHPPPPPPPPPPPPPPPPPP--
A.nac3-171		---TAAATAATAT	MMMMMMMMMMMMMMMMMM--PHPPPPPPPPPPPPPPPPPP--
A.nac6-79		---TAT	M-----PPPPBBP--
A.nac3-79		---TAT	M-----PPPPBBP--

**AoxD161**

AY093639	1	GGGTACTTTCCT	10	-----	126	ACACTATCTGTGTATTA	139
A. oxy4-149	A	.....	.....	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	.....	.....
A. oxy1-145	A	.....	.....	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	.....	.....
A. oxy1-141	A	.....	.....	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	.....	.....
A. oxy2-137	A	.....	.....	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	.....	.....
A. oxy5-133	A	.....	.....	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	.....	.....
A. oxy4-129	A	.....	.....	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	.....	.....
A. oxy1-125	A	.....	.....	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	.....	.....
A. stu3-173	A	.....	.....	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	.....	.....
A. stu5-169	A	.....	.....	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	.....	.....
A. stu4-165	A	.....	.....	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	.....	.....
A. stu7-161	A	.....	.....	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	.....	.....
A. nac6-141	A	.....	A	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	G	.....
A. nac3-137	A	.....	A	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	G	.....
A. nac2-133	A	.....	A	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	G	.....
A. nac1-129	A	.....	A	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	G	.....
A. nac1-120	A	---	-	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	G	C
A. nac1-121	A	.....	A	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	G	.....
A. nac1-137	A	.....	A	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	G	A
A. nac5-133	A	.....	A	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	G	A
A. nac5-129	A	.....	A	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	G	A
A. nac5-125	A	.....	A	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	G	A
A. nac1-124	A	---	-	MMMMMMMMMMMMMMMM	.....	G	A

**Figure 2**



Table I. Microsatellites loci used in this study

Locus	Reference publication	GenBank accession number	Size	Primer sequences (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)
Aox-23	King et al., 2001	AF067811	79-174	F: *CAGTGTGCTAGCTTCTCAATA ‡ F2: *AATATTAYTACTACTACAAGC R: GTTAGCTTAACCATGAATTGTG	53
Aox-D161	Henderson-Arzapalo & King, 2002	AY093639	120-173	F: *GTTTCAAATGATTGAGAAAATGC R: TGAGACAGACACTCTAGTTAAACAGC	57
LS-19	May et al., 1997	U72730	125-164	F: *CATCTTAGCCGTCTGTGGTAC R: CAGGTCCTAATACAATGGC	57
LS-54	May et al., 1997	U72735	99-191	‡ F: *TCTKTCAAGGTATACTTTAG ‡ R: GCAGACAAAATAGCATTGAG	52
LS-68	May et al., 1997	U72739	136-172	F: *TTATTGCATGGTGTAGCTAAAC R: AGCCCAACACAGACAATATC	57
AnacB11	Forlani et al., 2008	EF576947	132-162	F: *GCAGCAGAATTCAGAATCATG R: TGATGGAACACAAGACAGTG	54
AnacB3	Forlani et al., 2008	EF576944	204-377	F: *CTCGATCTTCTGATGGTCC R: GATGCCAAGTTTATATACCC	56
AnacC11	Forlani et al., 2008	EF576948	115-193	F: *AAATTTCCATTGGGGTGT R: CTCGTTTTGAGAACCCG	49
AnacG8	Forlani et al., 2008	EF576951	130-140	F: *GGTAGCAATAAGTGGAGTG R: CTAGTTTCCCTTGATCAAGG	52
AnacE4	Forlani et al., 2008	EF576950	326-354	F: *TCAGCTACAGGGTTCTGGG R: GTTGTTACTCATTGGAAGTC	54
AnacA1	Forlani et al., 2008	EF576942	137-149	F: *GAACGTTTCATGAAGTCAGG R: CCTAAGATATGACCCACG	52
AnacD3	Forlani et al., 2008	EF576949	135-203	F: *CAGTCTGATACAGCCTAG R: ATGTGCGAAGACAGACAG	50
An16	Zane et al., 2002	AY144617	173-217	F: *TTAACCCTGGACCACACAGCA R: TCCCACCATGCACCACACTAGA	62
Spl120	McQuown et al., 2000	AF276189	263-303	F: *ATTCCATGAGCAACACCACA R: TGATGGTCTGATGAGATCGG	55
AoxD234	Henderson-Arzapalo & King, 2002	AY093645	195-322	F: *AACTGGCTTTGTGATTGATCC R: TGAAGCAAAGGGTATTATTGAG	56
AoxD241	Henderson-Arzapalo & King, 2002	AY093646	144-272	F: *TGTTCAATATAGTCTTCCAGGTC R: CACAACAAATCAAAACAGAAGC	56
Aox-12	King et al., 2001	AF067810	149-209	F: *CAGAGTCTTCCCTGCAGCACTT R: TGCAGAGAGAGAGTGTGTGTGTC	56

‡ primer designed for this study  
\* fluorochrome position

Table II. Informations obtained by genotyping and sequencing on the five microsatellite loci and on the three sturgeon species

Locus	Genotyping									Sequencing					
	A. sturio (n=52)			A. oxyrinchus (n=57)			A. naccarii (n=30)			A. sturio (n=10)		A. oxyrinchus (n=12)		A. naccarii (n=10)	
	No all.	No gen.	Ho	No all.	No gen.	Ho	No all.	No gen.	Bs	No all.	No gen.	No all.	No gen.	No all.	No gen.
LS19	2	2	0,47	4	7	0,5	2	3	0,78	2	2	4	6	3	4
LS54	2	2	0,6	3	5	0,2	6	11	0,45	2	2	3	3	12	8
LS68	2	2	0,23	9	14	0,69	7	16	0,42	2	2	9	10	13	10
Aox23	2	2	0,04	9	16	0,73	6	12	0,44	2	2	12	10	7	8
AoxD161	4	7	0,81	7	10	0,47	6	8	0,53	4	5	7	7	11	8

No all.: number of alleles, No gen.: number of genotypes, Ho: observed heterozygosity, Bs: band sharing (average probability an allele to be shared by two individuals)

### II-B-2-c Discussion des résultats obtenus

#### ■ Discrimination *A. sturio* / *A. oxyrinchus* (voir figure 2 de l'article n°1)

Trois des cinq locus microsatellites analysés permettent de différencier l'esturgeon européen et l'esturgeon atlantique. Les allèles des deux espèces se distinguent par :

(1) deux substitutions et un indel de 12 pb dans la région flanquante 5' du locus Aox23. Cet élément diagnostique avait été utilisé à plusieurs reprises (Ludwig *et al.* 2002b ; Ludwig *et al.* 2008). Le séquençage de tous les allèles identifiés pour chacune des deux espèces – 12 chez *A. oxyrinchus*, 2 chez *A. sturio* – valide cette différence diagnostique. Par ailleurs, ce microsatellite est caractérisé par un motif répété mixte (TAC)<sub>x</sub>(TAA)<sub>y</sub> et les deux espèces se distinguent également par le nombre de motif de chaque type : le nombre de répétition (TAC) est plus élevé chez *A. oxyrinchus* et le nombre de répétition (TAA) est plus élevé chez *A. sturio* (la gamme des possibles étant (TAC)<sub>9-22</sub>(TAA)<sub>5-9</sub> et (TAC)<sub>5-6</sub>(TAA)<sub>13-15</sub> respectivement pour *A. oxyrinchus* et *A. sturio*) ;

(2) deux substitutions dans la région répétée du locus AoxD161, transformant localement le motif de base (CTAT) en (CTGT) et (GTAT) chez *A. sturio*. Ces deux substitutions ont fixé la portion 3' de la région répétée chez *A. sturio*, conduisant à des allèles plus longs chez ce dernier (> 160 pb) par rapport à *A. oxyrinchus* (< 150 pb) ; les deux espèces peuvent donc également être distinguées sur ce locus sur la base des tailles d'allèles ;

(3) une substitution dans la région flanquante 5' du locus LS68. Imparfaitement diagnostique si elle est considérée seule, cette substitution permet néanmoins de distinguer les deux espèces si la longueur des allèles est prise en compte. En effet, les allèles d'*A. sturio* portent un G à la position 33, alors que les allèles d'*A. oxyrinchus* portent tous un A, sauf un qui porte un G. Cet allèle d'*A. oxyrinchus* se distingue pourtant des allèles d'*A. sturio* par un nombre différent de répétitions du motif répété.

#### ■ Discrimination *A. naccarii* / *A. oxyrinchus* – *A. sturio*

Les cinq locus analysés permettent de différencier l'esturgeon adriatique des « esturgeons de mer » sur la base de substitutions dans les régions flanquantes

(LS19, LS68 et AoxD161) ou dans la région répétée (LS54 et Aox23). Il n'est pas surprenant que les cinq locus soient diagnostiques, vu que les lignées évolutives menant respectivement à *A. naccarii* et au couple *A. sturio* / *A. oxyrinchus* ont divergé il y a environ 170 Ma (Peng *et al.* 2007). Par comparaison, seulement trois locus permettent de différencier *A. sturio* et *A. oxyrinchus*, espèces sœurs ayant divergé il y a environ 60 Ma (Peng *et al.* 2007).

### ■ Sur la possibilité de détecter les hybrides

Un seul marqueur diagnostique est suffisant pour distinguer les individus d'espèce pure et les hybrides F1, mais Boecklen & Howard (1997) soulignent que quatre ou cinq marqueurs sont nécessaires au minimum pour identifier le stade d'hybridation (F1, premiers backcrosses de deux types, hybrides introgressés à des taux divers, F2, F3...). A l'exception des espèces pures et des F1, plus on aura de marqueurs diagnostiques, plus précise sera la détermination.

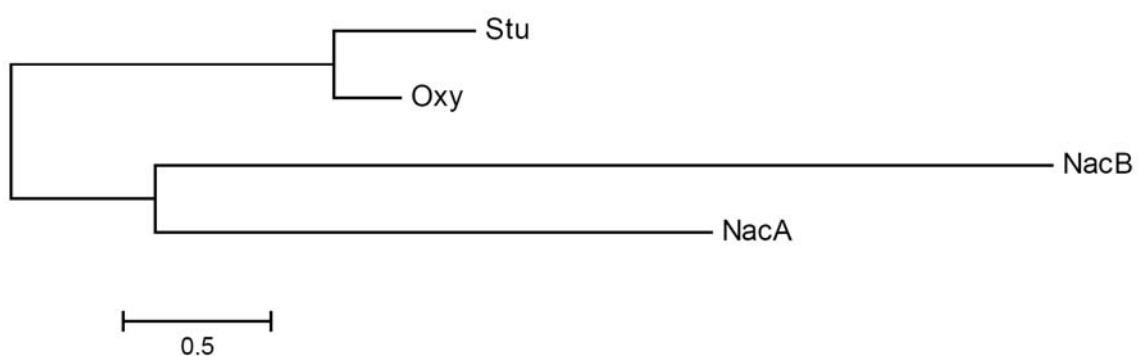
Le jeu de marqueurs nucléaires diagnostiques établi ici fournit un outil fiable pour la détection des hybridations entre *A. sturio* et *A. naccarii* ou entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus*. A l'heure actuelle, les aires de répartition des trois espèces sont disjointes et les effectifs sont tellement faibles qu'il n'y a plus nulle part de reproduction naturelle en Europe. Néanmoins, avec le renforcement artificiel des populations existantes et les réintroductions, les distributions pourraient à nouveau se chevaucher à l'avenir, et le suivi des interactions entre espèces (dont l'hybridation) sera alors crucial. De plus, les marqueurs nucléaires développés ici ont été choisis pour être adaptables sur substrat ancien, permettant de tester l'existence ou non d'hybridations naturelles par le passé par l'analyse d'échantillons anciens (voir la partie II-C pour des applications pratiques).

### ■ Sur la tétraploïdie d'*A. naccarii*

Le séquençage des allèles microsatellites a permis d'observer pour chacun des cinq locus analysés l'existence de deux familles d'allèles chez *A. naccarii*, se distinguant par des substitutions ou des indels dans les régions flanquantes. Les séquences de ces deux familles d'allèles se groupent ensemble quand elles sont comparées aux allèles d'*A. sturio* et *A. oxyrinchus*, mais elles sont néanmoins relativement éloignées l'une de l'autre – plus que ne le sont les allèles d'*A. sturio* et

*A. oxyrinchus* (Figure II-9). L'existence de deux familles d'allèles chez *A. naccarii* est sans doute liée à l'état tétraploïde de l'espèce ; en effet, une polyploïdisation génomique aurait eu lieu dans la lignée menant à *A. naccarii* il y a environ 50-70 Ma (Peng *et al.* 2007). La duplication a conduit au relâchement des contraintes sélectives (Ohno 1970), ce qui pourrait expliquer la divergence importante des deux familles d'allèles. Ces familles correspondent sans doute aux locus paralogues issus de la duplication génomique, mais seules les familles des locus LS68 et AoxD161 se comportent de façon disomique (chaque individu portant deux allèles de chaque famille, parfois à l'état homozygote). Les autres locus ne se comportent pas systématiquement de façon disomique (un individu ne portant parfois des allèles que d'une seule famille), sans doute en raison de biais de séquençage pour LS54 et Aox23 (amplification préférentielle des allèles courts, allèles nuls...), et peut-être du fait de recombinaisons entre locus paralogues pour LS19.

A noter qu'il serait très intéressant de séquencer les allèles des espèces d'esturgeons appartenant à la même lignée évolutive que l'esturgeon adriatique – *A. fluvescens*, *A. baerii* et *A. gueldenstaedtii* en particulier – qui ont connu le même événement de polyploïdisation. Selon toute probabilité, deux familles d'allèles devraient également exister chez ces espèces tétraploïdes, avec une divergence équivalente aux deux familles d'*A. naccarii* (si l'hypothèse d'une polyploïdisation ancestrale à cette lignée est valide).



**Figure II-9 :** Arbre phylogénétique présentant les relations entre les quatre familles d'allèles distinguées dans cette étude (NacA et NacB : *A. naccarii*, Stu : *A. sturio* et Oxy : *A. oxyrinchus*). L'arbre est construit à partir des distances intergroupes par paires (échelle en % au bas de l'arbre, gaps pris en compte) moyennées sur les cinq locus microsatellites et calculées grâce au logiciel MEGA4 (Tamura *et al.* 2007). La matrice des distances intergroupes a ensuite servi de base pour la construction de l'arbre par Neighbour-Joining grâce au logiciel PHYLIP (Felsenstein 1989).

### ■ Sur les limites de cette étude

Plusieurs aspects de cette analyse pourraient être améliorés. (i) Tout d'abord les allèles les plus longs du locus LS54 n'ont pas tous pu être séquencés chez *A. naccarii*, en raison de la méthode de clonage utilisée. Au lieu de réaliser un clonage à partir du produit de PCR brut (dans lequel tous les allèles sont présents en mélange, suivant des proportions variables souvent en défaveur des allèles les plus longs), les différents allèles présents dans un même produit auraient pu être séparés par électrophorèse sur gel, découpés, purifiés, puis clonés individuellement (le clonage permettant d'acquérir des séquences à partir d'une faible quantité d'ADN). (ii) Ensuite certains allèles du locus Aox23 n'ont probablement pas été amplifiés chez *A. naccarii* – principalement dans la famille d'allèles courts – sans doute en raison d'un important polymorphisme de séquence dans les zones d'hybridation des amorces utilisées lors de la PCR. La mise au point d'amorces dans des portions plus conservées des régions flanquantes permettrait de mieux évaluer la diversité allélique de l'esturgeon adriatique pour ce locus, et permettrait également d'identifier de nouveaux sites polymorphes entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus* (le locus Aox23 étant situé dans une zone minisatellite, type de séquences connu pour leur variabilité (le locus Aox23 étant situé dans une zone minisatellite, type de séquences connu pour leur variabilité ; Robles *et al.* 2004). (iii) Enfin, le nombre de locus séquencés aurait pu être augmenté, ce qui aurait sans doute permis d'identifier de nouveaux marqueurs diagnostiques nucléaires, en particulier pour discriminer *A. sturio* et *A. oxyrinchus* et augmenter la précision de la description des hybrides complexes..

Cette étude souffre également d'autres biais inhérents au statut actuel des espèces d'esturgeons analysées. Par exemple, la mise au point de marqueurs diagnostiques nécessite théoriquement la prise en compte de l'ensemble de la diversité intraspécifique existante (ou du moins le maximum). Pour cela, il est nécessaire d'échantillonner plusieurs populations de chaque espèce, ce qui fut possible pour *A. oxyrinchus* (nous en avons étudié trois parmi la bonne douzaine subsistant en Amérique du Nord) mais pas pour *A. sturio* et *A. naccarii*, une unique population subsistant pour chacune d'elle (respectivement Gironde et Pô). De plus, les individus de ces deux espèces que nous avons analysés ont été prélevés dans le milieu naturel alors que les populations étaient déjà très réduites, et ne représentent

sans doute qu'une partie de la diversité génétique qui existait auparavant. La résolution de ce biais passe par l'analyse d'échantillons anciens provenant d'autres populations d'*A. sturio* et *A. naccarii* (voir la partie XX pour une discussion sur le sujet concernant *A. sturio*).

Nous venons de voir que les espèces d'esturgeons peuvent être distinguées de façon rapide et fiable sur la base de critères génétiques mitochondriaux et nucléaires. L'analyse couplée de ces deux types de marqueurs permet également d'identifier d'éventuels hybrides. Les esturgeons ayant presque disparu d'Europe, la détermination des zones historiques de sympatrie et d'hybridation ne peut se faire qu'en analysant des échantillons anciens, ce que nous allons développer dans la prochaine partie.

## II-C SYMPATRIES ET HYBRIDATIONS

### **II-C-1 LE CAS *A. STURIO* – *A. NACCARII***

#### II-C-1-a Paradigme en place il y a 20 ans

##### ■ Sympatrie dans les fleuves adriatiques

Il y a 20 ans, l'esturgeon de l'Adriatique *A. naccarii* était considéré comme ayant toujours été endémique de l'Adriatique (Tortonese 1989), et l'esturgeon européen *A. sturio* comme ayant été commun dans toute l'Europe (Holcik *et al.* 1989).

Les deux espèces étaient donc sympatriques dans les fleuves majeurs de l'Adriatique au cours du siècle dernier (voir Figure II-3, partie II-A-1), certainement dans le Pô (et ses affluents) et les fleuves de Vénétie en Italie (Adige, Bachiglione, Brenta...), et peut-être également dans certains fleuves des côtes yougoslaves et albanaises (Cetina, Buna). Cette sympatrie aurait perduré jusqu'à l'extinction d'*A. sturio* dans la région, probablement dans les années 1970.

##### ■ Hybridation incertaine

L'importance relative des deux espèces là où elles se trouvaient en sympatrie n'est quasiment pas documentée, de même que d'éventuelles hybridations. Les deux espèces ayant des ploïdies différentes (*A. sturio* diploïde et *A. naccarii* tétraploïde ; Ludwig *et al.* 2001), leur hybridation est peu probable.

Néanmoins, Birstein *et al.* (1997a) mentionne l'hybridation naturelle entre *A. sturio* et *A. gueldenstaedtii* en Mer Noire (citant Antipa 1909 ; Antoniu-Murgoci 1946 ; Berg 1948 ; Banarescu 1964). Or *A. naccarii* est très proche d'*A. gueldenstaedtii* et d'*A. persicus* comme le montre la phylogénie de la figure I-6 ; sur la région de contrôle de l'ADNmt certains *A. naccarii* du Pô se sont aussi révélés être plus proches d'*A. gueldenstaedtii* que d'autres *A. naccarii* venant de la Buna (Ludwig *et al.* 2003). L'identité spécifique d'*A. naccarii*, *A. gueldenstaedtii* et *A. persicus* est donc questionnable, et ces trois espèces pourraient en réalité n'en former qu'une, *A. naccarii* étant une sous-espèce endémique de l'Adriatique et



*A. persicus* une sous-espèce endémique de la Caspienne (Birstein *et al.* 2000). En résumé, si *A. sturio* et *A. gueldenstaedtii* se sont hybridés dans les bassins fluviaux de la Mer Noire, il est tout à fait possible qu'*A. sturio* et *A. naccarii* se soient hybridés dans les bassins fluviaux de la Mer Adriatique.

II-C-1-b *A. naccarii* en Méditerranée occidentale : une remise en cause... discutée

■ L'étude qui déclencha la polémique :

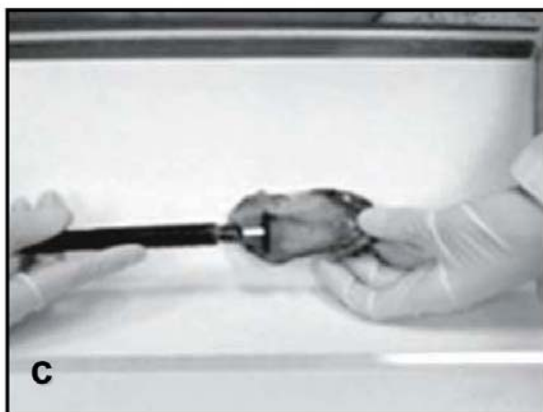
En 1997, des chercheurs des universités de Séville et Grenade ainsi que le directeur d'une pisciculture installée elle aussi à Grenade ont affirmé sur la base de critères morphologiques et génétiques que l'esturgeon *A. naccarii* n'était pas endémique de la Mer Adriatique, mais qu'il avait aussi été autochtone en péninsule ibérique jusque dans les années 1970 (Garrido-Ramos *et al.* 1997). En effet, quatre spécimens de musée datant du 20<sup>e</sup> siècle et pêchés dans le Guadalquivir (EBD-8173 et EBD-8174 de la station biologique de Doñana à Séville), le Tage (MUC1 de l'Université de Coimbra) et le Mondego (MUC46B également de l'Université de Coimbra) se groupaient avec *A. naccarii* d'après les analyses morphométriques réalisées par les auteurs. De plus, en utilisant la famille satellite *HindIII* comme critère génétique diagnostique (cette famille est présente chez *A. naccarii* et absente chez *A. sturio*) les auteurs montraient que les spécimens EBD-8173 et EBD-8174 appartenaient à l'espèce *A. naccarii*. Garrido-Ramos *et al.* (1997) se sont servi de ces résultats pour recommander l'introduction de l'esturgeon adriatique dans les fleuves de la péninsule ibérique, en particulier le Guadalquivir.

■ Des résultats remis en question par la communauté scientifique :

Les résultats obtenus par Garrido-Ramos *et al.* (1997) furent rapidement réfutés, que ce soit au niveau morphologique ou génétique :

- Elvira & Almodovar examinèrent lors de trois études successives (1999 ; 2000a ; 2000b) un nombre important d'esturgeons ibériques (respectivement 26, 31 et 42) conservés dans les musées espagnols et portugais. Parmi ces spécimens se trouvaient les quatre « *naccarii* » de Garrido-Ramos *et al.* (1997) (EBD-8173, EBD-8174, MUC1 et MUC46B). Ils analysèrent ces individus sur la base de 39 critères morphométriques et 12 critères méristiques et les comparèrent à des esturgeons *A. sturio* de Gironde, de Mer Adriatique et de Mer du Nord ainsi qu'à des *A. naccarii*

de l'Adriatique : les spécimens de musée provenant de la péninsule ibérique ont tous été identifiés comme appartenant à l'espèce *A. sturio*. A noter que les auteurs excluent certains spécimens de l'analyse globale du fait de leur très mauvais état de conservation ; EBD-8173 et EBD-8174 font partie de ces spécimens dégradés, mais furent néanmoins assignés à l'espèce *A. sturio* sur la base de l'analyse de la peau et des écailles. Les photographies récemment publiées de ces deux spécimens ainsi que d'un troisième (EBD-8401) confirment leur déplorable état de conservation (Figure II-10 ; à comparer avec le bon état des spécimens que nous avons utilisé, voir par exemple les photographies des spécimens du Rhône dans Brosse *et al.* 2009b).



**Figure II-10 :** Photographies des spécimens EBD-8173 (a), EBD-8174 (b) et EBD-8401 (c).

Source : Martinez-Espin *et al.* (2009)

- Rincon réanalysa le jeu de données morphométriques utilisé par Garrido-Ramos *et al.* (1997) dans deux études (Rincon 2000a ; Rincon 2000b), et observa qu'il n'y avait pas de soutien à l'existence de deux groupes distincts d'esturgeons en Ibérie (ces deux groupes avaient été interprétés comme correspondant à *A. sturio* et *A. naccarii* par (ces deux groupes avaient été interprétés comme correspondant à *A. sturio* et

*A. naccarii* par Garrido-Ramos *et al.* 1997)). Il remarqua également que les deux variables composites utilisées par Garrido-Ramos *et al.* (1997) (C-A et F-B, où C est la distance entre la base des barbillons et l'arc cartilagineux de la bouche, A est la distance du bout du museau à la base des barbillons, F est la distance du bout du museau à l'arc cartilagineux de la bouche et B la largeur du museau à la hauteur des barbillons) sont affectées par l'allométrie ontogénétique (en d'autres termes varient en fonction de l'âge des spécimens), discriminant donc les petits *A. sturio* des gros *A. sturio* et pas forcément les espèces *A. sturio* et *A. naccarii*.

- Doukakis *et al.* (2000) tentèrent d'amplifier de courtes séquences d'ADNmt sur trois spécimens de musée ibériques : EBD-8173 et EBD-8174, plus EBD-8401 du même musée et provenant lui aussi du Guadalquivir. Ces essais furent réalisés par trois équipes différentes : une première au Muséum Américain d'Histoire Naturelle (P. Doukakis, V. Birstein et R. DeSalle), une autre à Berlin (A. Ludwig et A.N. Ludwig) et la dernière à Madrid (B. Elvira, A. Almodovar, M. Machordom). Malgré toutes leurs tentatives, ils n'arrivèrent pas à obtenir de résultats reproductibles ni sur le Cyt *b*, ni sur l'ARN12S, ni sur la NADH5, obtenant essentiellement des séquences issues de contamination. Les auteurs en conclurent que l'ADN était peu préservé dans ces spécimens, et qu'il était peu probable que Garrido-Ramos *et al.* (1997) aient pu amplifier de l'ADN nucléaire endogène à partir de tels substrats.

- Almodovar *et al.* (2000) échouèrent dans l'amplification d'un fragment de 402 pb du Cyt *b* pour le spécimen EBD-8174, mais réussirent finalement à amplifier un fragment de 155 pb qui correspondait à l'esturgeon européen *A. sturio* et non à *A. naccarii*. A noter que ces analyses sont postérieures de quelques mois seulement à celles de Doukakis *et al.* (2000).

Les analyses génétiques réalisées par Garrido-Ramos *et al.* (1997) sont aussi discutables sur d'autres points :

- les conditions d'expérimentation sur l'ADN ancien ne sont pas explicitées ; il est juste indiqué que l'ADN des spécimens de musée a été extrait suivant la méthode décrite par Pääbo (1989). Il n'est pas fait mention de l'utilisation de locaux dédiés pour l'étude des échantillons anciens. Aucun contrôle lors de l'extraction d'ADN (blanc, contamination croisée) ne semble avoir été réalisé. Les auteurs ayant

manipulé beaucoup d'ADN issu de tissus frais, la possibilité d'une contamination récurrente doit être envisagée.

- le marqueur génétique employé – la famille nucléaire multicopie d'ADN satellite *HindIII* – n'est pas adapté à l'objectif de discrimination spécifique comme nous l'avons vu au II-B-2.

- au vu des études de Doukakis *et al.* (2000) et Almodovar *et al.* (2000), l'ADN ne semble pas très bien préservé dans les spécimens EBD-8173 et EBD-8174 puisque l'amplification d'ADNmt a été très difficile (voir impossible dans certains laboratoires). Pourtant Garrido-Ramos *et al.* (1997) ont réussi à identifier la présence d'une famille d'ADN satellite nucléaire par digestion enzymatique et clonage sans même réaliser une amplification préalable par PCR, performance impossible si la quantité d'ADN est faible.

■ Les auteurs de l'étude initiale persistent et signent :

Malgré cette levée de boucliers, les mêmes auteurs continuent à clamer que l'esturgeon adriatique vivait en sympatrie avec l'esturgeon européen dans la péninsule ibérique.

De la Herran *et al.* (2004) ont ainsi réanalysé génétiquement EBD-8173 et EBD-8174, en rajoutant aussi quelques autres spécimens de musée capturés en dans les fleuves ibériques (dont EBD-8401) ou en Méditerranée. Les trois marqueurs nucléaires multicopies *HindIII*, *PstI* et ARN5S qu'ils ont utilisés groupent les spécimens EBD-8173, EBD-8174, EBD-8401 et MZUF5714 (du musée de Florence et originaire de Salerne sur la côte ouest de l'Italie) avec *A. naccarii*, alors que ces individus étaient étiquetés comme appartenant à l'espèce *A. sturio*. Ils ont également analysé EBD-8173, EBD-8174 et EBD-8401 sur deux marqueurs mitochondriaux – 212 pb du Cyt *b* et 139 pb de l'ARN12S – obtenant des séquences d'*A. naccarii* pour EBD-8173 et EBD-8401 mais pas pour EBD-8174 ; pour ce dernier, ils ont identifié la même séquence d'*A. sturio* qu'Almodovar *et al.* (2000), interprétant ce résultat comme un signe de fiabilité de leur analyse et comme un état hybride pour le spécimen. Malheureusement, ces résultats ne sont sans doute pas plus fiables que ceux de Garrido-Ramos *et al.* (1997) puisqu'ils ont été réalisés dans le même laboratoire, par les mêmes personnes et dans les mêmes conditions. Il est troublant

que ces auteurs arrivent à analyser cinq marqueurs génétiques dont trois nucléaires sur EBD-8173, EBD-8174 et EBD-8401, pour des spécimens qui n'ont donné que des contaminations (ou au mieux un peu d'ADNmt pour EBD-8174) dans trois laboratoires indépendants de renommée internationale (Doukakis *et al.* 2000). L'hypothèse d'une contamination récurrente est la plus plausible.

Sur la base de ces analyses génétiques critiquables et de la méthode d'analyse morphométrique qui avait été mise en doute par Rincon (2000a), Garrido-Ramos *et al.* (2009) – dans un chapitre du livre « Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons » qu'ils ont eux-mêmes édités – prétendent que de nombreux esturgeons de musées en Europe ont été mal identifiés et ne sont en fait pas des *A. sturio* mais des *A. naccarii*. Toujours dans ce chapitre, les auteurs affirment que « la distribution historique [*A. naccarii*] s'étend au moins de la Gironde à l'Adriatique, sans discontinuité géographique », continuant d'aller à contre-courant par rapport à leurs collègues, et sans donnée tangible pour soutenir cette extension importante de l'aire de répartition. Considérant comme un fait la présence d'*A. naccarii* en Ibérie, les auteurs préconisent son introduction dans les fleuves espagnols et en particulier dans le Guadalquivir. Coïncidence ou non, la ferme aquacole d'A. Domezain – l'un des auteurs – est installée sur les bords du Guadalquivir et élève des esturgeons... de l'Adriatique. Elle serait bien sûr prête à fournir les poissons pour une introduction dans le milieu naturel.

### ■ L'apport de deux études paléogénétiques récentes :

La première étude menée par Pagès *et al.* (2009) sert de tremplin à cette thèse, dans le sens où elle s'intéressa à des restes archéologiques provenant du Rhône, sur lesquels nous nous sommes penchés et dont nous avons poursuivi l'analyse par la suite (voir le chapitre III, en particulier la partie III-C). Ces échantillons datant du 2<sup>e</sup> au 6<sup>e</sup> siècle av. J.-C., ont été exhumés du site du Jardin d'Hiver situé sur les bords du Rhône, près de la ville d'Arles, dans le sud de la France. Une étude archéozoologique antérieure n'a relevé la présence d'aucune autre espèce que l'esturgeon européen *A. sturio* sur ce site, où plus de 2500 restes osseux ont été trouvés (Desse-Berset 1994). En analysant une portion de Cyt *b* sur quatre échantillons de ce site – correspondant à quatre individus différents – Pagès *et al.* (2009) identifièrent à chaque fois la séquence correspondant à celle d'*A. sturio*, qui

était donc sans aucun doute l'espèce majoritaire présente dans le Rhône il y a plus de 2000 ans.

La seconde étude menée par Ludwig *et al.* (2009c) se trouva être encore plus pertinente car elle s'intéressa à 12 restes archéologiques provenant de six sites ibériques (sud du Portugal et sud-ouest de l'Espagne) et datant du Magdalénien (autour de 11 ka BP) au 15<sup>e</sup> siècle de notre ère. La morphologie des écailles a été identifiée comme semblable à celle d'*A. sturio* pour tous les échantillons, et cinq restes ont pu être analysés sur 209 pb de la D-loop (fragment Dlo-5', voir description dans le chapitre III) et donnant tous des séquences d'*A. sturio* ; ces cinq échantillons positifs viennent des sites archéologiques de Castro Marim au sud du Portugal (1,9-2,5 ka BP, embouchure du fleuve Guadiana) pour deux d'entre eux, et de La Cartuja près de Séville en Espagne (0,4-0,5 ka BP, bord du Guadalquivir) pour les trois autres. Ces résultats excluent la présence fréquente d'*A. naccarii* dans la péninsule ibérique au moins jusqu'au 15<sup>e</sup> siècle.

### II-C-1-c Apports des données de cette thèse

#### ■ Apports des données de cette thèse : restes archéologiques

Au cours de cette thèse, nous avons analysé au niveau génétique 56 restes archéologiques – correspondant à 56 esturgeons différents – provenant de quatre sites archéologiques localisés sur les bords du Rhône, et âgés de 250 à 2500 ans (voir l'annexe 2 pour des informations sur les échantillons, et l'annexe 3 pour visualiser le jeu de données correspondant). La description des quatre sites archéologiques – Jardin d'Hiver, Montmajour, Lattes et Parc Saint-Georges – sera réalisée dans la partie III-C. Les 56 échantillons ont donné des résultats sur le fragment Dlo-5' de l'ADNmt, et 36 ont pu être analysés avec succès sur une partie ou la totalité des cinq marqueurs microsatellites diagnostiques établis dans l'article n°1. Toutes les séquences obtenues, que ce soit au niveau mitochondrial ou nucléaire, ont été identifiées comme appartenant à *A. sturio* (voir le tableau de la figure II-11), ce qui permet d'exclure avec une confiance de 95% la présence d'*A. naccarii* dans le Rhône à une fréquence supérieure à 5,2%, ainsi que la présence d'hybrides à une fréquence supérieure à 8% ; avec une confiance de 99%, les fréquences d'exclusion sont respectivement de 7,9 et 12%. Le détail du raisonnement et des calculs est présenté à la figure II-11.

Ces analyses comprennent 14 fois plus d'échantillons que celles de Pagès *et al.* (2009) et incluent en plus une détermination spécifique au niveau nucléaire permettant l'identification d'éventuels hybrides. Elles confirment de façon définitive et avec un soutien statistique fort que seul l'esturgeon européen vivait dans le Rhône au cours des trois derniers millénaires et démontrent qu'aucune hybridation significative avec *A. naccarii* n'y a eu lieu. Le Rhône étant un des fleuves majeurs de Méditerranée occidentale, ces résultats vont à l'encontre des théories de Garrido-Ramos *et al.* (2009).

		Succès ADNmt			Succès ADNnuc		
		Total	dont stu	dont nac	Total	dont stu	dont nac
Sites étudiés	Arles	42	42	0	25	25	0
	Montmajour	8	8	0	8	8	0
	Lattes	5	5	0	2	2	0
	St-Georges	1	1	0	1	1	0
Total		56	56	0	36	36	0

Soit X la variable aléatoire représentant le nombre d'*A. naccarii* identifiés.

Cette variable suit une loi binomiale de paramètres n (nombre d'échantillons analysés) et f (fréquence d'*A. naccarii* parmi les échantillons)

La probabilité que X soit nulle (et donc qu'aucun *A. naccarii* n'ait été identifié parmi les échantillons) vaut :

$$p(X=0) = \overset{\text{vaut 1}}{C_n^0} \cdot \overset{\text{vaut 1}}{f^0} \cdot (1-f)^{n-0} = (1-f)^n$$

Pour que  $p(X=0)$  soit inférieure à 5%, il faut que :  $(1-f)^n < 0,05$        $1-f < \sqrt[n]{0,05}$        $f > 1 - \sqrt[n]{0,05}$   
 Ce qui donne pour  $n=56$  :  $f > 0,052$

Pour que l'évènement "identifier au moins un *A. naccarii* parmi 56 échantillons" ne se réalise pas dans 95% des cas, il faut donc que f soit inférieur à 5,2%. Il est donc exclu que la fréquence relative d'*A. naccarii* dans le Rhône dépasse ce seuil, puisque toutes les séquences identifiées appartiennent à *A. sturio*.

Le même raisonnement conduit à partir des données nucléaires ( $n = 36$ ) permet d'exclure la présence d'hybrides à une fréquence supérieure à 8% avec une confiance de 95%.

En prenant une confiance de 99%, les fréquences d'exclusion d'*A. naccarii* et des hybrides passent respectivement à 7,9 et 12%.

**Figure II-11 :** Nombre de restes archéologiques provenant du Rhône étudiés avec succès au niveau mitochondrial et nucléaire. Distinction est faite entre les différents sites archéologiques. Le raisonnement permettant de déterminer les fréquences d'exclusion dans le Rhône concernant *A. naccarii* et les hybrides *A. naccarii* - *A. sturio* est exposé.

Par ailleurs, nous avons analysé un échantillon archéologique datant du 5<sup>e</sup> siècle de notre ère et provenant de l'estuaire du Sado au Portugal (code labo

CH1188 dans l'annexe 2). Les séquences mitochondriales et nucléaires obtenues à partir de cet échantillon indiquent qu'il s'agit d'un *A. sturio*. Ces résultats sont cohérents avec ceux décrits par Ludwig *et al.* (2009c) et contredisant l'hypothèse d'une sympatrie *A. sturio* – *A. naccarii* dans la péninsule ibérique.

Au final l'ensemble des données obtenues à partir des restes archéologiques va dans le sens d'une absence d'*A. naccarii* en Méditerranée occidentale (voir la synthèse à la figure II-12).



**Figure II-12 :** *A. naccarii* en dehors de la mer Adriatique : synthèse des données obtenues à partir des restes archéologiques. Le fleuve, l'âge et les références traitant de ces échantillons sont indiqués. Pour chaque fleuve sont également inscrits : le nombre d'*A. naccarii* identifié / le nombre d'échantillons déterminé génétiquement / le nombre d'échantillon déterminé morphologiquement.

■ Apports des données de cette thèse : spécimens de musées capturés en Mer Méditerranée occidentale

Au cours de cette thèse, nous avons également analysé au niveau génétique 29 spécimens de muséums datant des 19<sup>e</sup>-20<sup>e</sup> siècles et capturés en Méditerranée occidentale ou au Portugal (voir l'annexe 2 pour des informations sur les échantillons, et l'annexe 3 pour visualiser le jeu de données correspondant). Tous étaient étiquetés comme étant des *A. sturio*, sauf un spécimen pêché au large de



## RELATIONS INTERSPECIFIQUES : *A. STURIO* – *A. NACCARII*

Nice étiqueté *A. naccarii* (code labo CH544). Parmi ces spécimens, ceux pêchés en fleuve peuvent être rattachés à la population ayant vécu dans ledit fleuve, mais la population d'origine des individus capturés en mer reste difficile à déterminer. En effet comme nous l'avons vu dans la partie I-B-1-d, les esturgeons anadromes (comme *A. sturio*, *A. oxyrinchus* et *A. naccarii*) peuvent s'aventurer très loin de leur fleuve natal lors de la phase de vie marine ; ainsi, un esturgeon pêché en mer appartient probablement à la population du fleuve le plus proche, mais il n'est pas exclu qu'il vienne d'un fleuve plus éloigné.

Sur les 29 esturgeons de musée analysés, 25 d'entre eux ont donné des résultats sur l'ADNmt et 18 sur l'ADNnuc (Tableau II-1).

		Testés	Succès ADNmt					Succès ADNnuc				
			Total	dont stu	dont nac	dont oxy	dont ruth	Total	dont stu	dont nac	dont oxy	dont ruth
Captures	en Mer	16	14	11	2	0	1	11	8	2	0	1
	en Fleuve	13	11	9	0	2	0	7	5	0	2	0
Total		29	25	20	2	2	1	18	13	2	2	1

**Tableau II-1 :** Nombre de spécimens de musée provenant de Méditerranée occidentale étudiés avec succès au niveau mitochondrial et nucléaire. Distinction est faite entre les spécimens capturés en mer et ceux capturés dans un fleuve. Stu = *A. sturio*, Nac = *A. naccarii*, Oxy = *A. oxyrinchus*, ruth = *A. ruthenus*.

Parmi les esturgeons pêchés en fleuve, tous ont été identifiés comme *A. sturio*, sauf un esturgeon pêché dans l'Ebre identifié comme un *A. oxyrinchus* (au niveau mitochondrial et nucléaire ; code labo CH1234) et un autre esturgeon pêché dans le Rhône identifié comme un hybride introgressé d'*A. oxyrinchus* et *A. sturio* (il porte un haplotype mitochondrial d'*A. oxyrinchus* et des allèles microsatellites d'*A. oxyrinchus* et d'*A. sturio* ; code labo CH554). Nous discuterons de ces deux spécimens dans la partie II-C-2.

Parmi les esturgeons pêchés en mer, tous ont été identifiés comme *A. sturio*, sauf trois esturgeons capturés en mer entre Nice et Livourne : deux d'entre eux sont des *A. naccarii* (au niveau mitochondrial et nucléaire ; codes labo CH544 et CH1175) et le dernier est un *A. ruthenus* (au niveau mitochondrial et nucléaire ; code labo CH547).

L'origine méditerranéenne de l'*A. ruthenus* est très peu probable car cette espèce n'a jamais été reportée en dehors des mers Noire et Caspienne ; les discussions avec les responsables des collections du musée des Confluences à Lyon (d'où provient le spécimen) amènent à penser qu'il pourrait s'agir d'une erreur d'étiquetage car d'autres poissons en provenance de Mer Noire sont entrés au musée la même année.

L'identification de deux *A. naccarii* semble indiquer la présence d'*A. naccarii* hors de la Mer Adriatique. Cependant, aucun *A. naccarii* n'ayant été identifié ni sur les sites archéologiques installés au bord du Rhône, ni parmi les spécimens de musée capturés dans les fleuves de Méditerranée occidentale, l'existence d'une ou plusieurs populations fonctionnelles de cette espèce dans la région est hautement improbable. Plusieurs hypothèses alternatives peuvent être envisagées pour expliquer ces observations :

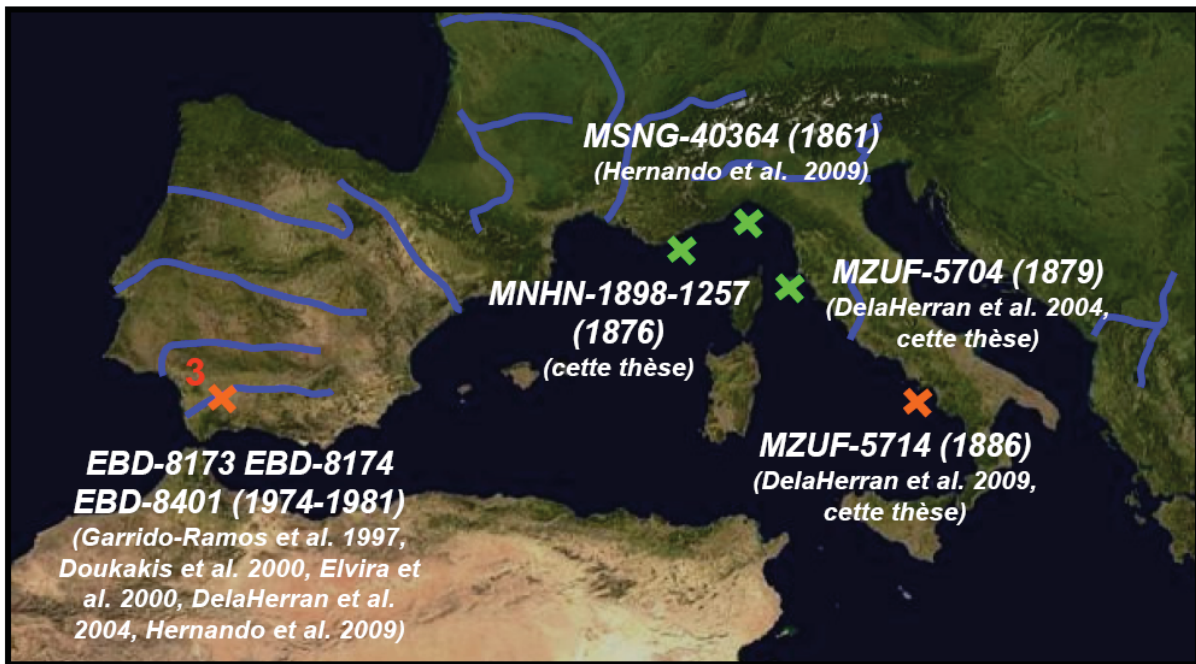
**1)** une erreur d'étiquetage est possible, même si ces deux poissons viennent de deux musées différents (MNHN de Paris et MZUF de Florence) ; il est également possible que ces poissons aient été achetés par le musée comme venant de Méditerranée alors que ce n'était pas le cas. Le spécimen MZUF a en particulier été acheté sur le marché de Florence.

**2)** il est tout fait envisageable que ces deux esturgeons soient issus des populations d'*A. naccarii* de la Mer Adriatique et qu'ils aient été capturés en Mer Méditerranée lors de leur phase de vie marine. Les esturgeons anadromes peuvent en effet se déplacer sur de longues distances en mer ; des esturgeons européens de la population de Gironde ont ainsi été capturés jusqu'au Danemark, en Irlande et même en Islande (Williot *et al.* 1997) ; autre exemple, D'Ancona (1924) mentionnait la présence de quelques spécimens d'*A. stellatus* en Mer Adriatique et même en Méditerranée occidentale au début du 20<sup>e</sup> siècle, alors que les populations fonctionnelles les plus proches pour cette espèce étaient situées en Mer Noire. Il est ainsi possible que certains *A. naccarii* sortent de la Mer Adriatique lors de leur phase de vie marine : en suivant la côte Est de la Mer Adriatique, les esturgeons se retrouvent en Grèce – où des captures d'*A. naccarii* ont été reporté (Economidis 1973) – et en suivant la côte Ouest les esturgeons se retrouvent en Méditerranée. Ludwig *et al.* (2003) évoquent une limitation possible des déplacements en mer d'*A. naccarii* du fait d'une sensibilité aux salinités supérieures à 11‰ (la salinité moyenne en Mer Adriatique et en Méditerranée est d'environ 34‰) ; les études qui

ont porté sur le sujet se sont focalisées sur des jeunes de l'année qui n'ont peut-être pas les mêmes caractéristiques physiologiques que les subadultes et les adultes (McKenzie *et al.* 1999 ; McKenzie *et al.* 2001) ; d'autres analyses seraient nécessaires pour éclaircir ce point, étant donné que ce sont souvent les adultes qui réalisent de longs déplacements en mer pour se nourrir. La décharge d'eau douce du Pô et de l'Adige engendrant un courant d'eau moins salée qui longe la côte italienne de l'Adriatique jusqu'en Sicile (Orlic *et al.* 1992 ; Zonneveld 1996), elle pourrait également permettre aux esturgeons *A. naccarii* de sortir de la Mer Adriatique vers la Méditerranée occidentale sans être exposés à de trop fortes salinités.

A noter de façon intéressante que parmi les esturgeons de Méditerranée analysé pendant cette thèse se trouve le spécimen MZUF-5714 (code labo CH1147) qui a été pêché en Mer Méditerranée au large de Salerne. De la Herran *et al.* (2004) avait déterminé génétiquement ce spécimen comme appartenant à l'espèce *A. naccarii* sur la base du marqueur nucléaire *HindIII*, alors qu'il est étiqueté *A. sturio* au musée de Florence. Les résultats de nos analyses sont en contradiction avec ceux obtenus par De la Herran *et al.* (2004), car l'haplotype de Dloop et les allèles de deux des cinq marqueurs microsatellites diagnostiques (les trois autres marqueurs n'ont pas donné de résultat du fait de la faible quantité d'ADN) ont tous identifiés *A. sturio*. De plus les quantifications d'ADN que nous avons effectuées sur ce spécimen indiquent une conservation moyenne à faible de l'ADN, incompatible avec une hybridation significative de fragments de la taille du motif répété du marqueur *HindIII* (qui fait 171 pb).

Nos analyses ont été réalisées en respectant les standards les plus élevés de la paléogénétique (voir annexe 1), nous considérons donc que nos résultats sont fiables. Les données obtenues à partir des spécimens de musée suggèrent la présence ponctuelle d'*A. naccarii* en Méditerranée occidentale (à proximité de la Mer Adriatique), mais en aucune façon la présence de populations fonctionnelles car les captures sont très peu nombreuses et toujours effectuées en mer (voir la synthèse à la figure II-13).



**Figure II-13 :** *A. naccarii* en dehors de la mer Adriatique : synthèse des données disponibles sur les spécimens de musée. Chaque croix correspond à un seul spécimen (sauf pour le Guadalquivir). Le code musée, la date de capture et les références sont indiquées pour chaque individu. Tous les individus ont été analysés au niveau génétique et morphologique (sauf MSNG-40364 pour qui il n'y a pas de donnée génétique). Croix verte : pas de conflit entre les données (*A. naccarii* probable), croix orange : discordance dans les données (*A. sturio* probable).

■ Apports des données de cette thèse : spécimens de musées capturés en Mer Adriatique

En plus de ces 32 spécimens de Méditerranée occidentale et du Portugal, nous avons également analysé 20 spécimens de la Mer Adriatique, dont quatre étiquetés *H. huso*, un *A. naccarii* et un *A. stellatus* (Tableau II-2).

Les quatre *H. huso* ne donnèrent aucun résultat génétique, peut-être à cause d'un passage prolongé dans le formol. Le spécimen étiqueté *A. stellatus* a été identifié comme un *A. sturio*, au niveau nucléaire et mitochondrial (code labo CH1173). Le spécimen étiqueté *A. naccarii* appartient bien à cette espèce, comme attendu (code labo CH1177).

Les 14 autres spécimens sont tous des *A. sturio*, et sur les huit validés à la fois au niveau mitochondrial et nucléaire, aucune trace d'hybridation avec *A. naccarii* n'a été observée. Ces résultats sont congruents avec ceux de Ludwig *et al.* (2003) qui ont analysé 65 *A. naccarii* originaires du Pô (n=48) et de la Buna (n=17) à l'aide

## RELATIONS INTERSPECIFIQUES : *A. STURIO* – *A. NACCARII*

d'un marqueur mitochondrial (Dloop) et de huit marqueurs nucléaires (microsatellites) et qui n'ont pas détectés de signe d'hybridation (attention toutefois, les allèles microsatellites n'ont pas été séquencés et n'ont pas de valeur diagnostique individuellement ; l'analyse globale du jeu de données microsatellite par ACP ne montre néanmoins pas d'individu aberrant se distinguant du groupe principal, indiquant l'absence d'hybrides avec *A. sturio*).

La Mer Adriatique étant la zone de sympatrie reconnue entre *A. sturio* et *A. naccarii*, la non détection d'hybrides dans cette région tend à montrer que l'hybridation entre ces espèces est un phénomène rare sinon inexistant. Seule une mention d'hybridation a été faite par De la Herran *et al.* (2004) au sujet du spécimen EBD-8174, pour expliquer l'obtention de résultats non congruents entre ADNmt et ADNnuc. Les résultats concernant ce spécimen ne pouvant pas être considéré comme fiables – en particulier ceux obtenus sur l'ADN nucléaire – il est raisonnable de penser ce spécimen n'est en réalité pas un hybride.

	Testés	Succès ADNmt					Succès ADNnuc				
		Total	dont stu	dont nac	dont huso	dont stell	Total	dont stu	dont nac	dont huso	dont stell
Total	20	16	15	1	0	0	9	8	1	0	0

**Tableau II-2 :** Nombre de spécimens de musée provenant de la mer Adriatique étudiés avec succès au niveau mitochondrial et nucléaire.

### II-C-1-d Bilan et perspectives

Au vu des données présentées ci-dessus, il n'y a pas d'arguments déterminants permettant d'établir la présence de populations fonctionnelles d'*A. naccarii* en dehors de la Mer Adriatique :

- aucun juvénile n'a été identifié en dehors de la Mer Adriatique
- aucun individu n'a été capturé en train de remonter dans un fleuve pour se reproduire en dehors de la Mer Adriatique (hormis EBD-8173, EBD8174 et EBD-8401 dont la détermination spécifique est controversée et qui sont probablement en fait des *A. sturio*)

- aucun reste archéologique n'atteste la présence de cette espèce en dehors de la région adriatique, que ce soit en Méditerranée occidentale ou sur la façade atlantique de la péninsule ibérique

Des individus isolés de l'espèce *A. naccarii* ont néanmoins été capturés occasionnellement sur les côtes européennes de la Méditerranée occidentale, mais toujours en mer. Ces spécimens sont probablement originaires de la Mer Adriatique et se sont déplacés sur plusieurs centaines de kilomètres jusqu'en Méditerranée pour se nourrir ; nous l'avons vu, de telles migrations ne sont pas rares chez les esturgeons.

Concernant l'hybridation entre les deux espèces, aucune trace tangible n'a été détectée, que ce soit à partir des restes archéologiques ou des spécimens de musées. En particulier aucun hybride n'a été identifié au sein des esturgeons de musée capturés en Mer Adriatique (*A. sturio* et *A. naccarii*), seule région où la sympatrie des deux espèces est avérée.

Afin de mieux caractériser les relations entre *A. sturio* et *A. naccarii*, il serait pertinent de s'intéresser à des restes archéologiques provenant d'Italie du Nord ou d'autres régions bordant la Mer Adriatique. L'analyse paléogénétique de tels restes permettrait d'estimer le ratio des deux espèces dans les fleuves où elles vivaient en sympatrie, et donc d'évaluer indirectement la compétition qui pouvait exister entre elles. Cette information pourrait s'avérer utile dans le cadre de la conservation des deux espèces.

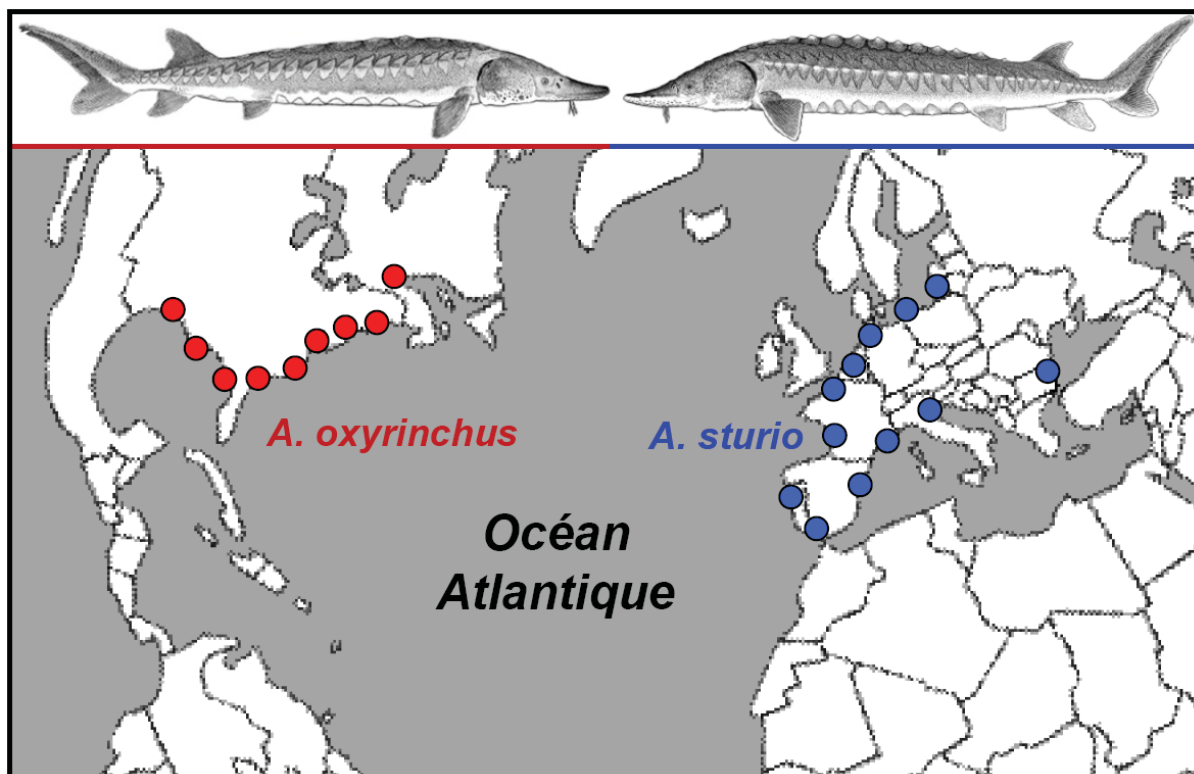
## II-C-2 LE CAS *A. STURIO* – *A. OXYRINCHUS*

### II-C-2-a Paradigme en place il y a 20 ans

#### ■ Des distributions géographiques disjointes

Il y a 20 ans, l'esturgeon atlantique *A. oxyrinchus* était considéré comme une espèce purement américaine, les populations de cette espèce étant installées dans tous les fleuves importants de la façade atlantique américaine – du Canada à la Floride – ainsi que dans le Golfe du Mexique. Les populations de l'océan Atlantique et celles du Golfe du Mexique forment deux sous-espèces nommées respectivement *A. o. oxyrinchus* et *A. o. deostoi* (Vladykov 1955 ; Ong *et al.* 1996).

*A. sturio* sur la façade atlantique européenne, *A. oxyrinchus* sur la façade atlantique américaine, la situation paraissait simple (Figure II-14). De plus, les distributions étant disjointes, la question d'une éventuelle hybridation ne se posait même pas.



**Figure II-14 :** Répartitions historiques d'*A. sturio* et *A. oxyrinchus* sur les façades européennes et américaines, telles qu'elles étaient perçues jusqu'à la fin du siècle dernier.

### ■ Un statut taxonomique discuté

Malgré cette distribution géographique tranchée, la situation taxonomique du couple n'a pas toujours été très claire, principalement en raison de la forte ressemblance morphologique qui les caractérise (voir partie II-B-1).

L'esturgeon européen *A. sturio* fut le premier décrit (Linné 1758), suivi un demi-siècle plus tard par l'espèce américaine *A. oxyrinchus* (Mitchill 1815). A la fin du 19<sup>e</sup> et au début du 20<sup>e</sup> siècle, les deux formes étaient néanmoins souvent considérées comme des sous-espèces d'*A. sturio* en raison de leur ressemblance, nommées *A. sturio sturio* pour la version européenne et *A. sturio oxyrinchus* pour la version américaine (Smith 1891 ; Tilhii 1929 ; Berg 1948).

Plus tard, d'autres auteurs en particulier Magnin (1959 ; 1962) se remirent à considérer les deux formes comme deux espèces à part, même si la confusion est toujours présente, Magnin (1959) parlant d'*A. sturio* dans le fleuve Delaware et dans le Golfe du Maine aux Etats-Unis (faisant référence à des travaux antérieurs qui ne faisaient sans doute pas la distinction entre les deux formes). Sur la base de critères morphologiques, Magnin & Beaulieu (1963) rétablissent le statut d'espèces à part entière pour *A. sturio* (Linnaeus 1758) et *A. oxyrinchus* (Mitchill 1815), ce qui sera confirmé ensuite par les premières phylogénies moléculaires (Birstein *et al.* 1997a ; Birstein & DeSalle 1998). Malgré ces arguments morphologiques et génétiques, le statut taxonomique des deux espèces est resté discuté, certains auteurs continuant à douter que les deux taxa méritent chacun le statut d'espèce (Artyukhin & Vecsei 1999 ; Debus 1999).

### ■ Des indices mal interprétés à cause du paradigme en place

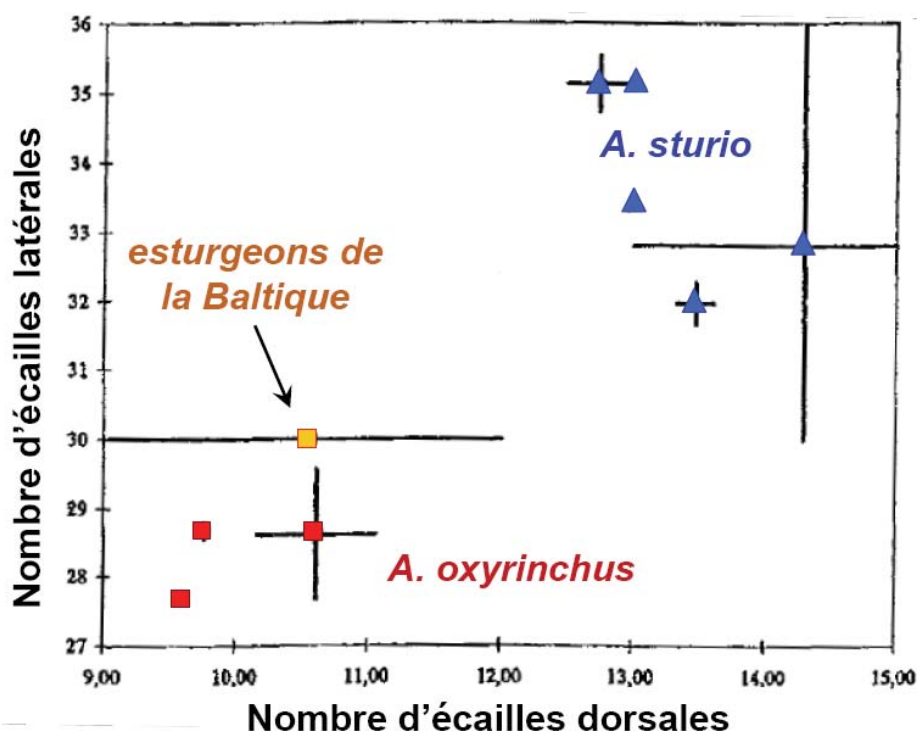
Artyukhin & Vecsei (1999) ont remis en question la validité de la différenciation des espèces *A. sturio* et *A. oxyrinchus* sur un seul argument : les esturgeons de la Mer Baltique – qui ont disparu dans les années 1980, voir figure I-10 – sont morphologiquement plus proches d'*A. oxyrinchus* que d'*A. sturio* (Tableau II-3). Dans l'esprit des auteurs les esturgeons de Baltique sont obligatoirement des *A. sturio*, donc s'ils sont plus proches des *A. oxyrinchus* que des autres *A. sturio*, c'est simplement parce que les deux espèces *A. sturio* et *A. oxyrinchus* n'en forment qu'une.



Table 1  
Morphological characters of different sturgeon populations

	<i>A. oxyrinchus</i> Saint Lawrence River	<i>A. sturio</i> Gironde estuary	<i>A. sturio</i> Eastern Baltic Region
Membranous Fontanelle	present	Absent	Present
Scute surface	alveolar-radial	tubercular- radial	alveolar-radial
Viscera color	pale	grayish	pale
SD number	9.76	12.74	10.25 (9-12)
SL number	28.67	35.13	27.38 (26-33)
Gill rakers	21.54	20.19	20.17 (18-22)

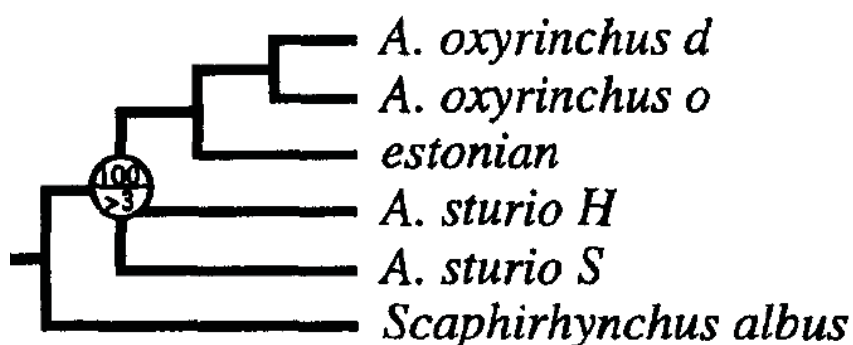
**Tableau II-3 :** Tableau 1 de l'article de Artyukhin & Vecsei (1999) présentant les caractéristiques morphologiques des populations d'*A. oxyrinchus* du St-Laurent, d'*A. sturio* de la Gironde et des esturgeons de la Baltique que les auteurs considèrent être des *A. sturio*. Notez la similitude des caractères entre *A. oxyrinchus* et les esturgeons de la Baltique.



**Figure II-15 :** Figure 10 de l'article de Debus (1999) présentant le nombre d'écaillies dermiques dorsales et latérales pour différentes populations d'*A. sturio* et d'*A. oxyrinchus*, ainsi que pour les esturgeons de la Baltique. La figure a été modifiée dans un souci de lisibilité mais sans altérer son contenu.

Dans le même numéro de la même revue, Debus (1999) mettait également clairement en évidence la singularité des esturgeons de la Baltique, qui se trouvaient être plus proches des *A. oxyrinchus* que des autres populations d'*A. sturio* (Figure II-15). Malgré cela, il n'envisageait pas que ces esturgeons puissent être des *A. oxyrinchus*, mais plutôt qu'il pouvait s'agir d'*A. sturio* ayant gardé des caractères ancestraux proches des *A. oxyrinchus*, ce qui justifiait la remise en question du statut spécifique des deux espèces.

Des études génétiques (*Cytb*) ont même été réalisées sur un échantillon de tissu d'un esturgeon capturé en Estonie en 1996 (la dernière prise recensée en Baltique, voir Paaver 1996), montrant également au niveau génétique la proximité des esturgeons de la Baltique avec *A. oxyrinchus* (Birstein *et al.* 1998 ; figure II-16). Là encore, l'interprétation fut que la population Baltique était une population d'*A. sturio* particulière, sans doute reproductivement isolées des autres populations d'*A. sturio* de la façade atlantique.



**Figure II-16 :** Extrait de la figure 2 de l'article de Birstein *et al.* (1998), présentant une portion de l'arbre construit à partir de 300 pb du *Cyt b* et incluant deux séquences d'*A. sturio* (H : mer du Nord, S : Gironde), deux séquences d'*A. oxyrinchus* (o : *A. o. oxyrinchus*, d : *A. o. desotoi*) et la séquence d'un esturgeon estonien capturé dans la Baltique.

### II-C-2-b *A. oxyrinchus* en Mer Baltique : une remise en cause... rapidement acceptée

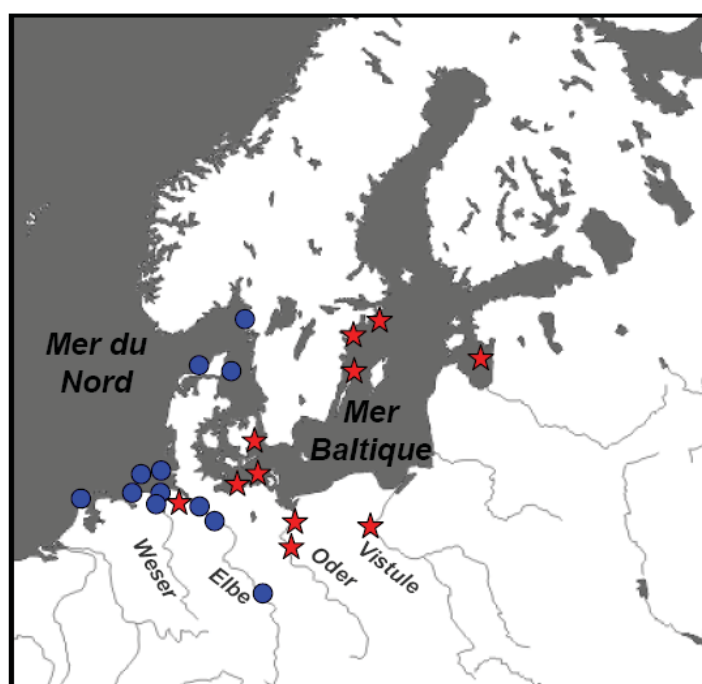
#### ■ La publication qui fit la lumière sur les esturgeons de Baltique

Malgré les indices à la fois morphologiques et génétiques indiquant la divergence des esturgeons de la Baltique par rapport aux autres esturgeons

européens, il fallut attendre Ludwig *et al.* (2002b) pour que l’hypothèse d’une présence d’*A. oxyrinchus* dans la Mer Baltique soit proposée.

Ludwig *et al.* (2002b) s’intéressèrent d’abord à 64 spécimens naturalisés provenant essentiellement de la Mer Baltique et de la Mer du Nord – dont 43 furent testés au niveau génétique pour un marqueur mitochondrial (Dloop) et un marqueur nucléaire (région flanquante 5’ du microsatellite Aox23) diagnostiques –, comparés à 67 esturgeons *A. sturio* modernes de la Gironde (issus du stock captif du Cemagref) et à 361 *A. oxyrinchus* modernes provenant de neuf populations américaines. Parmi les 25 spécimens de musées qui donnèrent des résultats mitochondriaux, 14 présentaient un haplotype spécifique d’*A. sturio* (Mer du Nord et Méditerranée), mais 10 spécimens de la Baltique et un spécimen de la Mer du Nord présentaient un haplotype spécifique d’*A. oxyrinchus* (Figure II-17). La présence d’*A. oxyrinchus* en Baltique était démontrée grâce à la paléogénétique et permettait d’expliquer de façon cohérente toutes les observations précédentes relatant la singularité des esturgeons de la Baltique par rapport aux autres esturgeons présents en Europe (Birstein *et al.* 1998 ; Artyukhin & Vecsei 1999 ; Debus 1999).

	Cités	Testés	ADNmt +	ADNnuc +	<i>A. oxyrinchus</i>	<i>A. sturio</i>
Baltique	33	16	10	9	10	0
Mer du Nord	29	25	13	10	1	12
Méditerranée	2	2	2	2	0	2



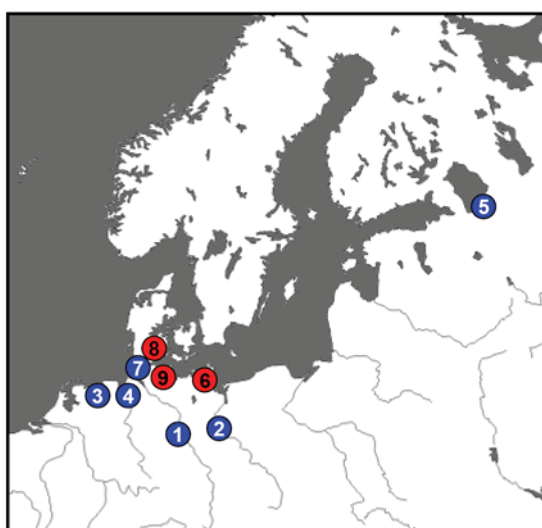
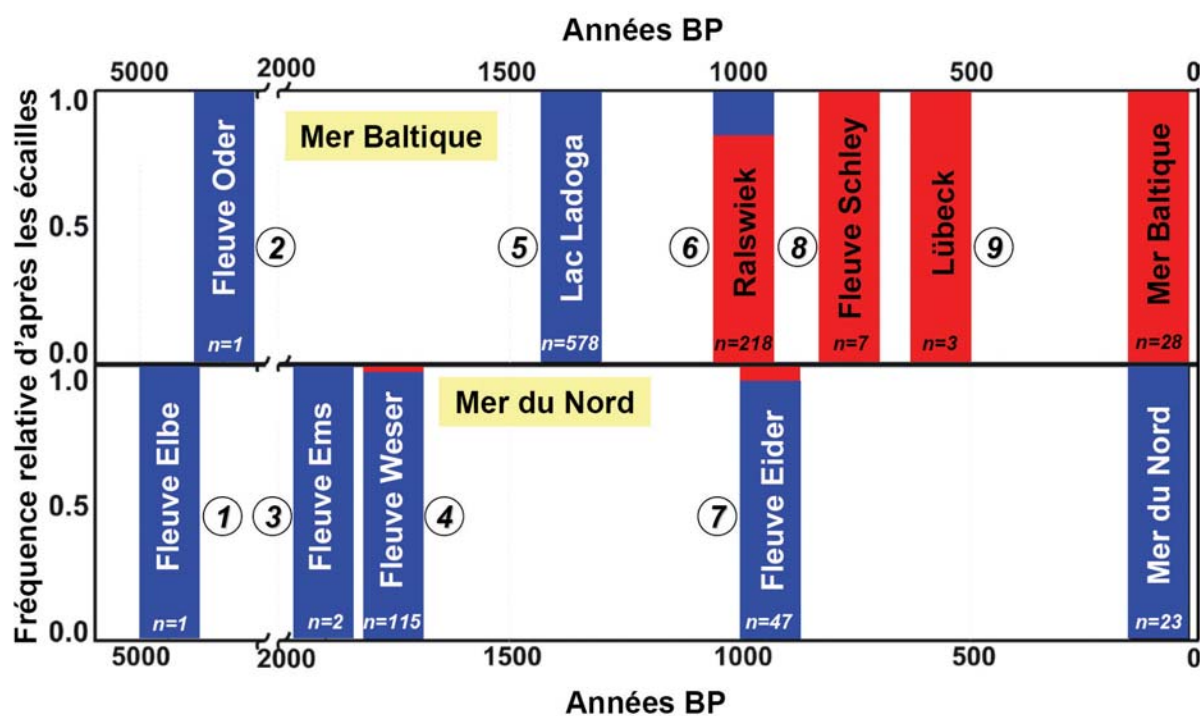
**Figure II-17 :** Résultats obtenus par Ludwig *et al.* (2002b) sur les spécimens de musée capturés en mers du Nord et Baltique au cours des 19<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> siècles (ci-dessus). Les spécimens étudiés avec succès au niveau génétique sont localisés sur la carte ci-contre ; *A. sturio* en rond bleu et *A. oxyrinchus* en étoile rouge.

Le seul haplotype mitochondrial d'*A. oxyrinchus* identifié en Baltique correspond à l'haplotype A, qui avait été précédemment identifié en Amérique et qui se trouve être fixé dans les populations d'*A. oxyrinchus* vivant le plus au nord de la distribution américaine. Ludwig *et al.* (2002b) en conclurent donc que les *A. oxyrinchus* de la Baltique provenaient sans doute des populations américaines les plus septentrionales (entre le fleuve St-Laurent au Canada et le fleuve Hudson aux USA) par migration à travers l'Atlantique.

Par ailleurs, les résultats obtenus au niveau nucléaire sur les spécimens de musées de Baltique et de Mer du Nord furent tous congruents avec les résultats mitochondriaux, ne donnant aucun signe d'hybridation entre les deux espèces.

Une fois la présence d'*A. oxyrinchus* démontrée en Baltique grâce aux spécimens de musée, Ludwig *et al.* (2002b) tentèrent de déterminer la période à laquelle la colonisation de la Mer Baltique par cette espèce avait eu lieu. Pour cela, ils réanalysèrent la morphologie de 972 écailles dermiques – attention, ces écailles n'appartiennent pas forcément à 972 individus différents – provenant principalement de 9 sites archéologiques (Figure II-18), et conclurent à la colonisation de la Mer Baltique d'abord par *A. sturio* à la fin du Pléistocène (avant 3 ka BP), puis par *A. oxyrinchus* il y a environ 1,2 ka BP. Les auteurs proposèrent un modèle impliquant un remplacement d'*A. sturio* par *A. oxyrinchus* dans la Baltique entre 1,2 et 0,8 ka BP lors du petit âge glaciaire, permettant d'expliquer le déclin d'*A. sturio* dans la région après l'arrivée d'*A. oxyrinchus*. L'hypothèse d'une plus grande tolérance aux conditions froides chez *A. oxyrinchus* par rapport à *A. sturio* – le premier pouvant frayer lorsque la température de l'eau est entre 13 et 18°C, le second ayant besoin d'une eau à plus de 20°C – fut avancée par les auteurs.

L'identification de plusieurs centaines de restes d'*A. oxyrinchus* en Mer Baltique permet de conclure à l'existence de populations fonctionnelles de cette espèce dans la région, sans doute depuis le Moyen-Âge et jusqu'à l'extinction de la population dans les années 1990.



**Figure II-18 :** Nombre et proportion relative d'écaillés osseuses présentant les caractéristiques morphologiques d'*A. sturio* (en bleu) et d'*A. oxyrinchus* (en rouge) en mer du Nord et en mer Baltique au cours des 5000 dernières années (ci-dessus), sur neuf sites archéologiques (1 à 9) et sur les spécimens de musée des 19<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> siècles (barres tout à fait à droite). Les sites sont indiqués sur la carte ci-contre par leur numéro, la couleur de fond indiquant l'espèce dominante suivant le même code que ci-dessus. Modifié d'après Ludwig *et al.* (2002b).

■ Une découverte rapidement suivi d'applications pratiques

L'identification des esturgeons de la Baltique comme appartenant à l'espèce *A. oxyrinchus* fut très rapidement acceptée par la communauté scientifique, sûrement parce qu'elle apportait une réponse à la singularité de la population d'esturgeons baltiques qui avait été notée depuis quelques années.

Un projet de réintroduction d'*A. oxyrinchus* en Mer Baltique fut lancé, impliquant des analyses préliminaires (Arndt *et al.* 2006 ; Gessner & Arndt 2006) et l'importation d'individus des populations canadiennes par avion (Gessner *et al.* 2009)

permettant la mise en place d'un stock captif en Allemagne. Des esturgeons *A. oxyrinchus* sont relâchés dans le fleuve Oder à la frontière germano-polonaise depuis 2006, ainsi que dans la Vistule en Pologne.

### ■ Aux origines de la population baltique

Tiedemann *et al.* (2007) affirmèrent sur la base d'une analyse du CMH que la population d'esturgeons de la Mer Baltique n'était pas composée d'*A. oxyrinchus* comme démontré par Ludwig *et al.* (2002b), mais d'hybrides entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus*. Reposant sur un marqueur multicopies mal caractérisé chez les esturgeons (voir partie II-B-2-b), cette étude ne peut pas être considérée comme une révision fiable du statut de la population de la Mer Baltique. De plus, aucune trace d'hybrides n'avait été détectée par Ludwig *et al.* (2002b).

Afin de mieux caractériser la colonisation de la Mer Baltique par *A. oxyrinchus*, Ludwig *et al.* (2008) analysèrent au niveau génétique 586 écailles dermiques d'esturgeons baltiques datant de l'époque médiévale (8<sup>e</sup>-13<sup>e</sup> siècles de notre ère) et provenant de deux sites archéologiques (la majorité des échantillons venant du site de Ralswiek, voir figure II-18). Parmi ces écailles, 227 donnèrent des résultats positifs sur l'ADNmt (fragment Dlo-5'), 220 portant des haplotypes spécifiques d'*A. oxyrinchus* (218 haplotypes A mais aussi deux haplotypes, BS1 et BS2, jamais identifiés auparavant, et différant de l'haplotype A chacun par une) et sept portant un haplotype spécifique d'*A. sturio* (haplotype As2).

La préservation de 210 écailles – sur les 227 ayant donné des résultats génétiques – était assez bonne pour établir une distinction sur la base de critères morphologiques (aspect tuberculé ou alvéolaire). Ludwig *et al.* (2008) ont donc comparé les résultats génétiques et morphologiques : ils ne concordent pas dans près de 60% des cas lorsque l'ADNmt porte une signature *A. sturio*, contre environ 10% des cas lorsqu'il porte une signature *A. oxyrinchus* (Tableau II-4). Ces discordances peuvent s'expliquer par une mauvaise conservation de certains restes archéologiques, altérant la fiabilité de reconnaissance sur la base de critères morphologiques. Ces discordances pourraient surtout être la manifestation d'un état introgressé ; en effet si l'aspect des écailles est codé par un nombre de gènes nucléaires limité comme c'est le cas chez d'autres poissons (Harris *et al.* 2008 ; Sire *et al.* 2009), il est envisageable que chez des individus hybrides ou introgressés

## RELATIONS INTERSPECIFIQUES : *A. STURIO* – *A. OXYRINCHUS*

l'identité spécifique soit « espèce 1 » au niveau mitochondrial et « espèce 2 » au niveau des gènes codant l'aspect des écailles ; dans ce cas l'ADNmt et l'aspect des écailles seront discordants.

ADNmt positif		Aspect des écailles		Désaccord ADN/morpho	
7	<i>A. sturio</i>	dont	3	<i>A. sturio</i>	57,1%
		dont	4	<i>A. oxyrinchus</i>	
220	<i>A. oxyrinchus</i>	dont	180	<i>A. oxyrinchus</i>	11,3%
		dont	23	<i>A. sturio</i>	

ADNnuc positif		ADNmt		Hybridation introgression	
0	<i>A. sturio</i>	dont	0	<i>A. sturio</i>	9,1%
		dont	0	<i>A. oxyrinchus</i>	
44	<i>A. oxyrinchus</i>	dont	40	<i>A. oxyrinchus</i>	d'introgression oxy→stu
		dont	4	<i>A. sturio</i>	
3	mélange <i>stu / oxy</i>	dont	?	<i>A. oxyrinchus</i>	6,8%
		dont	?	<i>A. sturio</i>	

**Tableau II-4 :** Comparaison des résultats basés sur l'ADNmt, l'ADNnuc et l'aspect des écailles obtenus par Ludwig *et al.* (2008), permettant de mettre en évidence les désaccords entre génétique et morphologie ainsi que les indices d'hybridation et d'introgression.

Ludwig *et al.* (2008) ont également amplifié sept locus microsatellites nucléaires sur 50 des 227 écailles ayant donné des résultats au niveau mitochondrial.

Parmi les microsatellites, le marqueur diagnostique Aox23 a pu être amplifié sur 47 écailles permettant l'identification de trois individus hybrides (ADN nucléaire des deux espèces) et quatre individus introgressés (possédant la signature mitochondriale d'*A. sturio* et la signature nucléaire d'*A. oxyrinchus*) (Tableau II-4). Ces observations indiquent que l'hybridation est possible entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus* et que leurs hybrides sont fertiles et peuvent se croiser avec les espèces parentales. Le taux d'introgression détecté – de l'ordre de 15% – est néanmoins incompatible avec l'existence d'une population purement hybride telle que décrite par Tiedemann *et al.* (2007) à partir de données du CMH.

Les sept locus microsatellites ont été obtenus sur 18 à 30 écailles baltiques (suivant les locus) parmi les 50 testées. Les génotypes multilocus obtenus ont été comparés à ceux de 178 *A. oxyrinchus* originaires de la façade atlantique américaine répartis en quatre groupes (Canada, USA Atlantique moyen, USA sud-est, USA Golfe du Mexique). Tous les échantillons de la Baltique (sauf un) ont été assignés au

groupe d'*A. oxyrinchus* canadiens par le logiciel STRUCTURE, confirmant l'hypothèse d'une colonisation de la Baltique à partir d'*A. oxyrinchus* issus des populations américaines les plus septentrionales (St-Laurent, St-John), qui avait été émise à partir de l'analyse des données mitochondriales (Ludwig *et al.* 2002b).

Remarque importante toutefois, les 586 écailles dermiques d'esturgeons analysées par Ludwig *et al.* (2008) n'appartiennent pas forcément à des individus différents (Arne Ludwig, communication personnelle). La redondance des données n'étant pas indiquée, son influence sur les analyses est difficile à estimer. Les résultats fondamentaux de cette étude ne sont néanmoins pas remis en cause.

### ■ Confirmation de la présence médiévale d'*A. oxyrinchus* en Pologne

Les données de Ludwig *et al.* (2002b ; 2008) indiquant la présence d'*A. oxyrinchus* en Baltique reposent principalement sur des échantillons allemands. Pour confirmer la présence de cette espèce ailleurs en Baltique, Ludwig *et al.* (2009b) ont analysé 34 échantillons d'esturgeons provenant de quatre sites archéologiques polonais datant pour l'un de 4,5 - 4 ka BP et pour les autres de 1,3 - 1 ka BP. Seuls cinq échantillons des sites médiévaux donnèrent des résultats sur l'ADNmt (Dloop), mais tous portaient l'haplotype A d'*A. oxyrinchus*. Cette étude confirme donc la présence d'*A. oxyrinchus* en Mer Baltique dans les eaux polonaises pendant la période médiévale.

## II-C-2-c *A. oxyrinchus* en Europe hors de la Baltique

### ■ Données en Mer du Nord

Même s'ils sont rares, plusieurs spécimens de musée des 19<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> siècles capturés en Europe en dehors de la Mer Baltique ont été génétiquement identifiés comme *A. oxyrinchus*. Il s'agit en particulier d'un individu pêché dans le fleuve Oste en Allemagne en 1912 (Ludwig *et al.* 2002b) et de deux individus pêchés en Angleterre dans deux petits fleuves du Yorkshire, le Don et le Wharfe, respectivement en 1861 et 1891 (Ludwig *et al.* 2009b). Ces trois individus attestent de la présence ponctuelle d'*A. oxyrinchus* hors de la Mer Baltique mais n'impliquent pas forcément l'existence de populations fonctionnelles. En effet, les esturgeons atlantiques *A. oxyrinchus* sont capables de longues migrations lors de leur phase de



vie marine, et des individus des populations américaines ont ainsi été capturés en mer au large des côtes de Guyane (Duméril 1867 reporté dans Magnin 1962) ou encore des Bermudes, du Vénézuéla ou du Labrador (Lee *et al.* 1980), impliquant des migrations de plusieurs milliers de kilomètres. Mais ces performances ne sont pas nécessaires pour notre cas européen : la Mer Baltique est voisine de la Mer du Nord. De plus même si ces esturgeons ont une fidélité importante vis-à-vis de leur fleuve natal (comportement de 'homing'), il leur arrive de fréquenter temporairement les estuaires d'autres fleuves au cours de leurs déplacements sur le plateau continental (Secor & Waldman 1999). Ainsi, ces trois esturgeons capturés dans des fleuves mineurs tributaires de la Mer du Nord pourraient correspondre à des individus de la population Baltique vagabondant hors de leur bassin natal.

### ■ Données sur la façade atlantique française

L'analyse archéozoologique des restes d'esturgeons découverts sur trois sites archéologiques français suggère également la présence d'*A. oxyrinchus* hors de la Mer Baltique (Desse-Berset 2009a). Ces trois sites sont (i) Le Langon (Vendée), ancien port sur la rivière Vendée où 22 écailles dermiques datant d'environ 2000 ans BP ont été découverts, (ii) Saint-Germain d'Esteuil (Gironde), sur la berge sud de l'estuaire de Gironde, où 65 restes datant de 2,3 à 1,8 ka BP ont été trouvés, et (iii) Ponthezières (Ile d'Oléron) dans l'Océan Atlantique entre La Rochelle et Royan, d'où 36 ossements datant d'environ 5 ka BP ont été exhumés.

La détermination spécifique réalisée repose intégralement sur l'aspect superficiel des écailles dermiques, qui rappelons-le donne une indication du statut spécifique mais est sujette à un taux d'erreur non négligeable par rapport aux informations génétiques (Ludwig *et al.* 2008). Au Langon les 22 écailles sont attribuées à *A. oxyrinchus*, à Ponthezières une majorité d'écailles montrent un aspect typique d'*A. oxyrinchus* et une minorité un aspect typique d'*A. sturio* (mais aucun chiffre précis n'est indiqué) et enfin à Saint-Germain d'Esteuil seulement cinq écailles sur 32 présentent les caractéristiques d'*A. oxyrinchus*. Le nombre minimum d'individus différents par site n'est pas précisé (il est juste indiqué qu'il y a plusieurs individus au Langon), or un seul spécimen peut porter plus d'une centaine d'écailles dermiques. Au vu des données publiées, il est tout à fait envisageable que les restes étudiés ne proviennent que de quelques spécimens par site ; dans le compte rendu

d'analyse du site de Ponthezières, Desse-Berset (2009b) précise d'ailleurs que les 36 restes de Ponthezières correspondent à un nombre minimum d'individus de sept.

La localisation géographique des trois sites est également à considérer. En effet, les sites du Langon et de Ponthezières étant respectivement situés au niveau d'un fleuve mineur et d'une île dans l'océan Atlantique, ils ne correspondent pas à une population fonctionnelle en particulier (il est peu probable que des esturgeons aient frayé dans la rivière Vendée même si ce n'est pas exclu, et il est impossible qu'ils aient frayé sur l'île d'Oléron). Les restes qui ont été découverts à ces emplacements correspondent à des esturgeons provenant des populations installées dans les grands fleuves voisins, avec une probabilité importante qu'ils viennent de populations locales (telles celles de Gironde ou de Loire) mais aussi avec une probabilité non nulle qu'ils viennent de populations éloignées (telles celles de Seine, du Rhin, de l'Elbe et même pourquoi pas de Baltique). En ce qui concerne le site de St-Germain d'Esteuil qui est situé dans l'estuaire de la Gironde, les restes proviennent sûrement de la population de Gironde ; la proportion d'écaillés attribuées à *A. oxyrinchus* sur ce site est faible puisque seulement cinq plaques dermiques sur 32 (qui pourraient correspondre à un seul individu) présentent une structure superficielle alvéolaire typique d'*A. oxyrinchus*. Les individus de l'espèce *A. oxyrinchus* pouvant se déplacer lors de leur vie marine loin de leur fleuve natal dans des estuaires voisins (Secor & Waldman 1999), il n'est pas exclu que les restes d'*A. oxyrinchus* provenant du site de St-Germain d'Esteuil correspondent à un individu vagabond d'une autre population que celle de Gironde.

Ces analyses sont uniquement basées sur des critères morphologiques et s'appuient sur un faible nombre d'individus provenant de sites archéologiques qui ne sont pas directement situés au bord d'un fleuve majeur, ce qui limite la portée des résultats. Au vu des données obtenues, la présence d'*A. oxyrinchus* sur la façade atlantique française semble avérée il y a environ 5 ka BP et 2 ka BP, mais des preuves génétiques sont indispensables. De plus, il est impossible d'affirmer à partir des données publiées qu'une population fonctionnelle d'*A. oxyrinchus* existait en France et encore moins de déterminer où se situait cette population. L'obtention de nouvelles données tirées de sites archéologiques situés à l'intérieur des terres au

bord de grands fleuves, ou tirées de spécimens de musée capturés dans ces grands fleuves plus récemment sont nécessaires pour avancer sur ces questions.

### II-C-2-d *A. oxyrinchus* en Europe hors de la Baltique : apport de cette thèse

#### ■ Données sur la façade atlantique française

Au cours de cette thèse, nous avons été amenés à analyser par les méthodes de la paléogénétique des restes archéologiques et des spécimens de musées appartenant à l'espèce *A. oxyrinchus*. Comme pour *A. naccarii*, l'identification de ces restes anciens n'était pas forcément attendue puisque le cœur de l'étude porte sur l'esturgeon européen *A. sturio*. Néanmoins, les relations d'*A. sturio* avec les autres espèces d'esturgeons sont importantes dans le sens où elles ont pu façonner les patrons de diversité observés, c'est pourquoi nous nous y sommes intéressés.

C'est ainsi que nous avons analysé dès l'été 2008 cinq échantillons archéologiques fournis par Nathalie Desse-Berset, provenant des trois sites archéologiques français mentionnés dans la partie précédente et dont les données archéozoologiques ont été publiées (Desse-Berset 2009a). Nous avons également analysé plus d'une vingtaine de spécimens de musée des 19<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> siècles capturés sur la façade atlantique française. L'ensemble de ces échantillons anciens a été étudié au niveau mitochondrial (D-loop et *Cyt b*) ainsi qu'au niveau nucléaire (à l'aide des trois locus diagnostiques établis entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus* dans l'article n°1) (i) pour tester la présence d'*A. oxyrinchus* en plus de celle d'*A. sturio* sur la façade atlantique française, (ii) pour détecter l'éventuelle présence d'hybrides et (iii) pour préciser au niveau spatio-temporel l'arrivée d'*A. oxyrinchus* en Europe.

**ARTICLE 2 : AN AMERICAN STURGEON IN FRANCE, PALEOGENETIC  
EVIDENCE.**

Olivier CHASSAING, Nathalie DESSE-BERSET, Marilynne DUFFRAISSE, Sandrine HUGHES,  
Patrick BERREBI, Catherine HÄNNI,  
*En préparation.*

## An American sturgeon in France: paleogenetic evidence

Olivier CHASSAING <sup>1,2</sup>, Nathalie DESSE-BERSET <sup>3</sup>, Marilynne DUFFRAISSE <sup>1</sup>, Sandrine HUGHES <sup>1</sup>, Patrick BERREBI <sup>2</sup>, Catherine HANNI <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Paléogénétique et Evolution Moléculaire, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, INRA, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France.

<sup>2</sup> Institut des Sciences de l'Evolution, UMR 5554 CNRS/UM2/IRD, Université Montpellier 2, cc065, place Bataillon, 34095 Montpellier cedex 05, France.

<sup>3</sup> UMR 6130, CEPAM/CNRS, université de Nice Sophia-Antipolis, 250, avenue Albert-Einstein, 06560 Valbonne, France.

**Keywords:** ancient DNA, sturgeons, *Acipenser sturio*, *Acipenser oxyrinchus*, hybridization, museum specimens

### Corresponding author

Patrick Berrebi, Tel. (33) 467143732, Fax. (33) 467143622,  
Email: patrick.berrebi@univ-montp2.fr

**Abstract:**

The Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus* was long considered an American species, until the recent discovery, based on analyses of archaeological remains, of its presence in Europe's Baltic Sea. This was a surprise as the European sturgeon *A. sturio* was thought to be the only sturgeon species on the European Atlantic coast. It was hypothesized that migrants from North America founded the Baltic population of Atlantic sturgeon around 1.2 ka before present (BP).

More recently, the presence of *A. oxyrinchus* was suggested by morphological analyses on three French Atlantic sites of 1.8 to 5 ka BP. We analysed by paleogenetic means some remains from these archaeological sites as well as museum specimens from the 19<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> centuries and we found *A. oxyrinchus* genetic signature on the French Atlantic coast – i.e. out of the Baltic Sea – in both ancient and more recent samples. On a total of 26 samples, six museum specimens and three archaeological remains originating from the French Atlantic coast present *A. oxyrinchus* mitochondrial or nuclear sequences. Two of these museum samples show signs of hybridization between *A. sturio* and *A. oxyrinchus*. All other samples yielded only *A. sturio* DNA sequences, allowing the discovery of a new control region haplotype in this species. Two scutes of 5 ka are the oldest sturgeon remains, to our knowledge, that yielded ancient DNA.

Molecular evidence of *A. sturio* and *A. oxyrinchus* sympatry and natural hybridization on the French Atlantic coast have important implications for conservation and reintroduction of both species in Europe. In light of these findings, new hypotheses are presented to explain the history and geographic range of *A. oxyrinchus* presence in Europe.

**Introduction:**

Climate change is a major factor shaping distribution and geographical patterns in the genetic diversity of species (Taberlet *et al.* 1998; Hofreiter & Stewart 2009). Numerous ancient DNA studies have shown that these patterns may change over time, sometimes extremely rapidly (Leonard *et al.* 2000; Orlando *et al.* 2002; Perry *et al.* 2005; Hofreiter *et al.* 2007). In a conservation biology perspective, it is important to shed light on distribution and genetic shifts that occurred in the past, as discussed for terrestrial animals such as brown bears (Leonard *et al.* 2000; Paabo 2000; Calvignac *et al.* 2008), or for aquatic animals (Hutchinson *et al.* 2003; Riccioni *et al.* 2010). How climatic and environmental changes affected populations in the past could indeed be helpful to anticipate their impact in the future. This topic is particularly relevant in the context of rapid global warming. Sturgeons, big fishes that produce caviar, provide us with a model to study changes in species distribution and genetic diversity through time and to reveal the complex evolutionary history of emblematic and economically important species.

Sturgeons (Acipenseridae) together with paddlefishes (Polyodontidae) form Acipenseriformes, a very old group of ray-finned fishes that appeared in the fossil record during the Jurassic, approximately 200 Mya (Bemis *et al.* 1997). Phylogenetic studies based on molecular data have clarified relationships between the 27 extant species of Acipenseriformes (Birstein & DeSalle 1998; Ludwig *et al.* 2001; Peng *et al.* 2007; Krieger *et al.* 2008), but biogeography of the group remains poorly documented. Absence of extensive studies in entire regions of the distribution and extirpation of many populations within the historic ranges of several species, together with polyploidy and hybridization explain the fragmented image we currently have. As 19 species of this group are classified as 'endangered' or 'critically endangered' on the IUCN Red List (2010), this problem is likely to persist. Ancient DNA (aDNA) analyses, by unveiling informations about extinct populations, are of great interest to put the missing pieces of the puzzle together.

The European sturgeon *Acipenser sturio* and the Atlantic sturgeon *A. oxyrinchus* are sister species and constitute a basal 'sea sturgeons' clade among Acipenseriformes (Peng *et al.* 2007; Krieger *et al.* 2008). Both species are anadromous – spending most of their

lives at sea but returning to fresh water to breed – and have homing behaviour, so that populations from different rivers are genetically differentiated (Wirgin *et al.* 2000; Waldman *et al.* 2002). The divergence between the two species can be explained by coastal dispersal and vicariance after the opening of the North Atlantic Ocean (Choudhury & Dick 1998), and is estimated to have occurred 60 Mya based on molecular data (Peng *et al.* 2007). This long isolation did not lead to strong morphological differentiation, as only few meristic characters are diagnostic features (Magnin 1964; Debus 1999). Nevertheless both species can be easily distinguished based on mitochondrial and nuclear DNA sequences (Birstein & DeSalle 1998; Ludwig & Gessner 2007; Chassaing *et al.* submitted).

*A. oxyrinchus* populations are settled in many rivers along the Atlantic coast of North America, from the Mississippi River, USA to the St. Lawrence River, Canada (Stabile *et al.* 1996; Waldman & Wirgin 1998; Waldman *et al.* 2002). Gulf coast (*A. o. desotoi*) and Atlantic coast (*A. o. oxyrinchus*) forms are considered subspecies (Vladykov 1955; Birstein 1993; Ong *et al.* 1996). Concerning *A. sturio*, only one population subsists in the Gironde-Garonne-Dordogne basin (herein called "Gironde") on the French Atlantic coast, with an estimated population size of a few thousand individuals (Lepage & Rochard 1993; Williot *et al.* 1997). *A. sturio* is therefore 'critically endangered' (IUCN 2010) and ex situ conservation efforts have been undertaken, leading to artificial propagation and release of broodstock juveniles in the Gironde (Williot *et al.* 2000; Gonthier 2009). Until the 19<sup>th</sup> century, other sturgeon populations were settled on the European Atlantic coast – from the Baltic Sea to Portugal – but they became extinct before being extensively studied and were considered to belong to the species *A. sturio*. Until very recently, the paradigm upheld was that sea sturgeons along the North Atlantic Ocean's west shores are *A. oxyrinchus* and *A. sturio* on the east shores.

However, combined archaeological and aDNA analyses surprisingly revealed the presence of *A. oxyrinchus* in the Baltic Sea during the Middle Ages and up until sturgeons became extinct in this area in the 1960s (Ludwig *et al.* 2002). The Baltic population of *A. oxyrinchus* would have been founded by a small number of migrants originating from northernmost American populations, which created a self-sustaining population and replaced *A. sturio* in this area. This colonization was thought to have occurred some 1.2 ka BP and to have been restricted to the Baltic Sea (Ludwig *et al.* 2008), but recent



archaeological evidence suggests the presence of *A. oxyrinchus* along the French Atlantic coast around 2 and 5 ka BP (Desse-Berset 2009a). As all sturgeon populations from the Baltic Sea to Portugal are now extinct – except the Gironde population – the geographical extent and historical range of *A. oxyrinchus* occupation in Europe remains to be fully analysed.

In this study we investigated the sympatry of *A. oxyrinchus* and *A. sturio* on the French Atlantic coast by analysing 21 museum specimens dating from the 19<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> centuries on one hand, and five archaeological remains dating from 1.8 to 5 ka BP which were morphologically analysed in Desse-Berset (2009a) on the other hand. Morphological determinations are subject to error depending on the state of sample preservation, therefore we used morphological criteria as well as mitochondrial and nuclear DNA analyses to distinguish between both sea sturgeon species. Molecular data also provided phylogeographical informations and allowed identification of hybrids. In light of our findings, new hypotheses are put forward to explain the past presence of *A. oxyrinchus* in Europe.

### **Material and methods:**

#### ***Archaeological samples***

Details of the five samples are presented in Table 1 (nos. 1-5). Samples come from three different archaeological sites: Ponthezières, Le Langon and Saint-Germain d'Esteuil. The archaeozoological description of sturgeon material from these sites has been detailed in Desse-Berset (2009a, b). Ponthezières is the oldest site, around 5 ka BP according to the archaeological context, and is located on Oléron Island. Langon and Saint-Germain-d'Esteuil are more recent, around 2 ka BP, and are located in Sèvres-Niortaise/Vendée and Gironde estuaries respectively (see Fig. 1 for geographical location). All samples consisted in dermal scutes, which were selected by NDB using archaeozoological criteria to ensure they stem from different individuals.

#### ***Museum samples***

Details of the 21 naturalized or ethanol-preserved specimens from the 19<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> centuries are presented in Table 1 (nos. 6-26). 19 specimens are from the Atlantic coast

of France, one specimen comes from Italy and one is of unknown origin. From the 19 Atlantic specimens, six were caught in the Gironde basin (including Garonne and Dordogne rivers, and their common estuary named Gironde), four in the Loire basin, three in the Seine basin and six in minor rivers or in coastal areas (see Fig. 1 for geographical location).

Two tissue samples per specimen were taken so that independent replication of paleogenetic analyses can be carried out. We used a sterile scalpel, oversleeves and gloves that we changed between each sample to avoid cross contamination. Sampling areas on each naturalized specimen were chosen to minimize their visual impact and to optimize success of paleogenetic analyses (see Table S1). Whenever possible, bony parts were taken, as DNA is well preserved over time in sturgeon bone tissue (Pages *et al.* 2009).

### **Morphology**

The surface structure of dermal bony scutes is tubercular for *A. sturio* and alveolar for *A. oxyrinchus* (Magnin 1962, 1964). This criterion has been previously used as a species-specific marker in several studies (Ludwig *et al.* 2002; Ludwig *et al.* 2008; Desse-Berset 2009a). The surface of dermal plates was therefore scrutinized during sampling of museum specimens used in this study. The morphological determination of archaeological samples is detailed in Desse-Berset (2009a).

The number of lateral and dorsal scutes also distinguishes *A. sturio* from *A. oxyrinchus* (Magnin 1962, Debus 1999), and was counted for museum specimens to confirm species determination.

Morphological determination is dependent of sample preservation and hybridization cannot be detected by phenotype analysis, underlining the importance of performing ancient DNA analyses.

### **DNA extraction and PCR amplification of ancient DNA**

Ancient DNA analyses were completed following the discipline's strict criteria to avoid contaminations and to ensure sequence authentication (Cooper & Poinar 2000; Loreille *et al.* 2001; Gilbert *et al.* 2005). DNA extraction and pre-PCR work were both performed on the Palgene Platform (ENS Lyon, CNRS) in different rooms specifically dedicated to

ancient DNA work and topographically isolated from post-PCR facilities. All the Palgene rooms are over-pressurized, decontaminated by UV lights and cleaned with Actril cold-sterilant (Minntech). No Atlantic sturgeon DNA has ever been handled in the Platform before. For all samples, at least two independent DNA extractions were carried out by different lab members (see Table S1 for replication details), following a silica-based DNA extraction protocol adapted from Rohland & Hofreiter (2007). Silica pellets were eluted twice in 10 mM Tris-Cl, pH 8.5, with a final volume of 200 µl. For each targeted DNA fragment and each sample, several separate PCR were done on independent DNA extracts and at least two PCR amplicons were cloned (Topo TA cloning kit, Invitrogen) and sequenced to establish a consensus sequence and rule out artefactual substitutions linked to post-mortem DNA degradation. Contaminations were monitored throughout the process by performing three different blanks, including one serving as a cross contamination control as described in Loreille *et al.* (2001) and Hughes *et al.* (2006). To avoid cross-contamination between sturgeon samples, 15 independent sessions of DNA extraction were carried out, with archaeological and museum samples in separate sessions.

### ***Amplification and analyses of targeted mitochondrial markers***

*A. oxyrinchus* and *A. sturio* differ in several diagnostic substitutions in mitochondrial DNA, particularly in the *Cytb* gene (Ludwig *et al.* 2000; Peng *et al.* 2007; Krieger *et al.* 2008) and in the control region (Ludwig *et al.* 2000). At first, we chose to amplify a ~210 base pair (bp) fragment of the control region, using previously described primers Hetero I and Hetero II (Ludwig & Jenneckens 2000). This portion of the mitochondrial DNA is highly variable and was used for intraspecific studies in both species (Wirgin *et al.* 2000; Ludwig *et al.* 2002; Waldman *et al.* 2002; Ludwig *et al.* 2009a). Because ancient DNA can be highly degraded depending on preservation conditions, it was not possible to amplify the 210 bp fragment for some DNA extracts. In this case, the region was amplified by two overlapping fragments of ~120 bp using primers Hetero I, Stu-CR1-For (5'-AAATTGTACATACATAAACAT-3'), Stu-CR2-Rev (5'-TRTATAGGTAAACATTRGTAT-3') and Hetero II for *A. sturio*, and primers Hetero I, Oxy-CR1-For (5'-AAATTRCTTATRCATGGACAT-3'), Oxy-CR2-Rev (5'-AATGTATATATAAACATTGRTAT-3') and Hetero II for *A. oxyrinchus*. For extracts which did not yield amplicons with 210 or 120 bp fragments, we also tried amplification of shorter fragments of the control region and *Cytb*. Control

region fragments of 40 bp long for *A. sturio* using primers Stu-CR1-For and Stu-CR3-Rev (5'-AATTTAATRTATAGGTAAACAT-3') and 59 bp long for *A. oxyrinchus* using Oxy-CR1-For and Oxy-CR3-Rev (5'-ATGTTTCATGTACTTAAATGG-3') were targeted. An 86 bp fragment of *Cytb*, previously described in Pages *et al.* (2009) to distinguish both species, was also tested. New primers used in this study (Stu-CR and Oxy-CR) were designed from known haplotypes listed in Table 2. PCRs on mitochondrial DNA were carried out in a 25 µL reaction volume containing 1x AmpliTaq Gold buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U of AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems), 1 mg.ml<sup>-1</sup> BSA (Roche), 250 µM of each dNTP and 0.5 µM of primers. For each PCR attempt, 0.5 to 5 µL of DNA extract was added to find a compromise between inhibitor's concentration which generally cannot be totally removed from DNA extracts, and target DNA molecule quantity (Hänni *et al.* 1995). DNA was amplified with 55 cycles of denaturation (94°C, 30 s), annealing (50°C, 30 s) and elongation (72°C, 45 s).

A median-joining network was generated to infer phylogenetic relationships between control region sequences obtained in this study using Network 4.516 (Bandelt *et al.* 1999). 61 sequences available in Genbank were also included in the dataset, corresponding to all known intraspecific variability of *A. sturio* and *A. oxyrinchus* (Table 2). After alignment of all sequences, 207 sites were considered for network construction.

### ***Amplification and analyses of nuclear markers targeted***

By comparing mitochondrial and nuclear DNA, hybrids between *A. oxyrinchus* and *A. sturio* can be detected. Three microsatellites loci – Aox23, AoxD161 and LS68 (May *et al.* 1997; King 2001; Henderson-Arzapalo & King 2002) – have been described as diagnostic nuclear markers to distinguish between both species and were determined as particularly suited for analysis of museum specimens or archaeological remains (Chassaing *et al.* submitted). Amplified allele size is between 80 and 130 bp for all three microsatellite loci, allowing amplification on fragmented DNA. To perform more repetitions and save ancient DNA extracts, we amplified these loci using a two steps multiplex protocol derived from the one described by Krause *et al.* (2006). A first amplification of 25 cycles was realised in the same conditions described for mitochondrial DNA but containing 0.5 µM of the six different nuclear primers, and with a low annealing temperature of 52°C. This amplification was diluted 10 fold and 2 µL of the dilution was used as template in each of three single amplification reactions. Reagent

concentrations were as above, except that a single primer pair was used at a concentration of 1  $\mu$ M for each primer. This second – locus specific – amplification last for 35 cycles with the same temperature profile as above. Allele size was determined by capillary electrophoresis on an ABI PRISM 3130XL sequencer (Applied Biosystems). Genotype validation was made following Taberlet *et al.* (1996) recommendations. Each identified allele was cloned and sequenced from at least two independent amplicons, as allele sequence is sometimes required to distinguish *A. sturio* and *A. oxyrinchus*. Note that AoxD161 allele size is sufficient to distinguish between both species so its alleles were not always sequenced.

## **Results:**

### ***DNA sequences authentication***

We are confident that the results obtained are authentic for different reasons. 1) Neither blank, aerosol nor cross control contaminations were observed during the entire experimentation. 2) Consistent sequences have been obtained from independent extractions for all successfully amplified individuals but five, for which one of the extraction did not yield any result (Table S1). 3) We independently replicated the analysis of one sample (no. 25 in Table 1, from Tiber River in Italy) that was first studied by Ludwig *et al.* (2002). Identical results were obtained in both studies. 4) Among 26 samples, 25 gave positive results for mitochondrial DNA but only 18 for nuclear DNA. This difference was expected as sequences from mitochondrial loci are easier to recover from fossil remains than single-copy nuclear sequences, owing to the presence of numerous copies of mitochondrial DNA per cell (Willerslev & Cooper 2005; Schwarz *et al.* 2009). An inverse relationship between amplification length and success was observed for mitochondrial DNA, also supporting authenticity (Paabo *et al.* 2004). 5) For mitochondrial as well as for nuclear DNA, type 2 transitions (C $\rightarrow$ T/G $\rightarrow$ A) constitute the majority of errors identified while analysing sequenced clones and deducing the final consensus sequence (data available on request). These errors, due to post-mortem damage of DNA, are commonly encountered in ancient DNA studies and mainly resulted from hydrolytic deamination of cytosine to uracil (Hofreiter *et al.* 2001; Gilbert *et al.* 2003; Briggs *et al.* 2007). For microsatellite loci, slippage errors among clones

sequenced occurred at a rate of 0-20%, consisting in the lack of one motif in the microsatellite core repeat (Schlotterer & Tautz 1992; Pompanon *et al.* 2005). This rate was expected given the peak ratio observed after capillary electrophoresis between stutter peak and genuine peak.

### ***Mitochondrial DNA***

A 210 bp portion of the control region has been successfully amplified – in one piece or in two overlapping fragments – on all sturgeon samples but nos. 2, 18 and 19 (Table 1 but see also Table S2 for number of PCR products and clones sequenced).

Sample nos. 2 and 18 yielded amplifications on shorter fragments of the control region and *Cytb* gene that allow species determination (at least five fixed differences) and presents respectively *A. oxyrinchus* and *A. sturio* sequences. Sample no. 19 did not yield any amplification at all. On the 23 samples successfully amplified on the 210 control region fragment, 16 showed *A. sturio* haplotypes, and seven *A. oxyrinchus* haplotypes. Both species haplotypes are separated by 22 fixed differences, so that no confusion is possible when plotted on a phylogenetic network (Fig. 2). Three different haplotypes were identified for *A. sturio*: As1 (nine museum specimens and two archaeological remains), As2 (three museum specimens) and As8 (two museum specimens). As1 and As2 have been previously found on the European Atlantic coast (Ludwig *et al.* 2000; Ludwig *et al.* 2008). As8 is a new haplotype, closer to Iberian haplotype As7 than to As1 and As2 (Fig. 2). Two haplotypes were found for *A. oxyrinchus*: A (four museum specimens and two archaeological remains) and B (one museum specimen). Both haplotypes A and B are present in extant North American *A. oxyrinchus* populations, but only haplotype A was previously found in Europe, along with haplotypes BS1, BS2 and UK1 (Ludwig *et al.* 2008; Ludwig *et al.* 2009b).

Both *A. sturio* and *A. oxyrinchus* mitochondrial sequences were identified on the French Atlantic coast around 1.8 and 5 ka BP (Fig. 1a) as well as during 19<sup>th</sup>-20<sup>th</sup> centuries (Fig. 1b). *A. oxyrinchus* was present in the three archaeological sites, which are located close to the mouth of Sèvres Niortaise/Vendée and Gironde rivers. *A. sturio* was found in the two archaeological sites close to the Gironde River mouth (Fig. 1a). Concerning museum samples, *A. oxyrinchus* was found in the Loire, Seine and Vertonne rivers, but not in

Brittany neither south of the Veronne River where only *A. sturio* was detected. Both species were present in sympatry in the Seine and Loire rivers (Fig. 1b).

### ***Nuclear DNA and hybrids detection***

Three diagnostic microsatellite markers were successfully amplified on 18 sturgeon individuals. One individual present missing data on two loci, and 17 individuals were validated on all three loci (Table 1 but see also Table S2 for number of PCR products and clones sequenced). Nuclear results were congruent with mitochondrial ones except for two museum specimens caught in the Seine (nos. 6 and 7 in Table 1). Results have been reproduced on two independent extracts for each specimen (Table S1), and numerous independent PCR support their hybrid nature (Table S2). Specimen no. 6 is an introgressed specimen, carrying *A. sturio* mitochondrial haplotype As2 but *A. oxyrinchus* microsatellites sequences. Specimen no. 7 carries *A. oxyrinchus* mitochondrial haplotype A, but two microsatellites show both *A. sturio* and *A. oxyrinchus* alleles. The presence of two hybrids individuals in the Seine River attests that reciprocal hybridization occurred between *A. sturio* and *A. oxyrinchus*, at least in this river.

### ***Comparison of morphological and molecular results***

Species determination based on scutes morphological aspect – alveolar for *A. oxyrinchus*, tubercular for *A. sturio* – was possible for all samples except no. 6 for which only the head of the specimen is available and no scutes were preserved (Table 1). Relevant illustrations are given in Desse-Berset (2009a) for archaeological samples (and modern samples for comparisons) and in Fig. S1 for museum specimens. Count of lateral and dorsal scutes was done for 14 museum specimens and lead to identical species assignation than scute superficial sculpting (Fig. S2).

Morphological and molecular species determinations are congruent except for samples nos. 3 and 12 (Table 1). The former carries scutes with alveolar sculpting but *A. sturio* mitochondrial DNA – no nuclear DNA have been obtained for this sample. The latter carries scutes with tubercular sculpting but *A. oxyrinchus* mitochondrial and nuclear DNA. Hybrid state (samples nos. 6 and 7) and incongruences between morphology and genetics (samples nos. 3 and 12) does not seem to correlate.

## **Discussion:**

We performed aDNA analyses of 26 sturgeons samples, that combined with archaeozoological evidence published in Desse-Berset (2009a) clearly demonstrates the presence of both *A. oxyrinchus* and *A. sturio* on the French Atlantic coast, in prehistoric (around 5 and 2 ka BP) and historic (19<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> centuries) times (Table 1 and Fig. 1). Paleogenetic data also evidenced hybridization between these species in the Seine River during the 19<sup>th</sup> century, and provided phylogeographic informations.

### ***Sturgeon populations and migrations***

Determination of the population from which each of the 26 individuals originates requires details of sturgeons' life cycle and depends on the sampling location – i.e. river, estuary or sea (Table 1). Like the majority of species within the genus *Acipenser*, both the European sturgeon *A. sturio* and the Atlantic sturgeon *A. oxyrinchus* are anadromous fishes, living at sea but migrating back to their natal river to reproduce (Bemis & Kynard 1997). Each river therefore holds a unique population, genetically differentiated from the other, as shown for *A. oxyrinchus* (Stabile *et al.* 1996; Wirgin *et al.* 2002). Nevertheless, during their sea life adults and subadults can cover great distances as revealed by tagging experiments and accidental catches (Lee *et al.* 1980; Smith 1985; Williot *et al.* 1997), and may also occasionally wander into non-natal estuaries (Secor & Waldman 1999). *A. sturio* from the Gironde population were for example commonly caught from the Bay of Biscaye to the English Channel or the North Sea (Williot *et al.* 1997).

Given this information, river individuals (nos. 1, 6, 11-13, 18, 23-25 in Table 1) surely belong to the specific population of the river from which they were caught or found. Estuary individuals (nos. 4-5, 7-10, 14-15, 19-22 in Table 1) are likely to stem from the population corresponding to the river, although stochastic wandering of individuals from neighbour populations cannot be excluded. Most *A. oxyrinchus* individuals we found come from river or estuary samples, so that we can exclude wandering individuals of Baltic origin. Sea samples are more problematic, as they can come from several populations in the large neighbourhood from where they were caught or found. Samples nos. 2, 3, 16 and 17 are part of these samples, but most likely came from the Garonne-Dordogne or the Loire populations given their geographical origin. However, we cannot



exclude that some came from distant populations such as the Seine and the Rhine northward, or Portuguese populations southward.

Numerous environmental factors are required for sturgeon spawning, such as appropriate spawning substrate and river width, depth, temperature and flow rate (Billard & Lecointre 2001). Rivers with limited width and water discharge are not suitable for sustaining a sturgeon population. The Sèvres-Niortaise/Vendée and the Charentes are borderline and could have sustained modest sturgeon populations, but the Elorn and the Vertonne are certainly too small. Specimens in our study that were caught in these rivers (nos. 9 and 15 in Table 1) most likely represent wandering individuals from important neighbouring populations, such as of the Loire, Seine or Gironde.

### ***Sea sturgeons sympatry in French rivers***

Both *A. sturio* and *A. oxyrinchus* were found on the French Atlantic coast during the 19<sup>th</sup>-20<sup>th</sup> centuries as demonstrated by the museum samples we analysed. *A. oxyrinchus* specimens were caught in the Seine, Loire and Vertonne rivers whereas only *A. sturio* specimens were found southward to the Vertonne River (Fig. 1b). Both species were found in sympatry in the Loire River, and a partially hybrid population was found in the Seine River. Noticeably there was no *A. oxyrinchus* among the five specimens from the Gironde basin that gave DNA results, suggesting that both species were not sympatric in this basin, at least recently.

Sturgeon remains stemming from three archaeological sites dated from 5 to 1.8 ka BP, also provided evidences of sympatry between *A. sturio* and *A. oxyrinchus*, based on archaeological (Desse-Berset 2009a) and paleogenetic evidence (this study). Few remains – essentially dermal scutes – were found on each site (between 22 and 36), likely representing only few individuals. However, on five dermal scutes selected by NDB for the molecular study – stemming with certainty from distinct individuals – three belong to *A. oxyrinchus* and two to *A. sturio* according to mitochondrial DNA (Table 1 and Fig. 1a), validating the sympatry of both species in prehistoric times.

### ***Mitochondrial variability of A. sturio***

We identified three different control region haplotypes for *A. sturio* on the French coast: As1, As2 and As8 (Table 1 and Fig. 2). As1 was the only haplotype found in

archaeological remains and was predominant in museum specimens, consistent with the fact it is the only haplotype identified in the extant Gironde population (Ludwig *et al.* 2000; Ludwig *et al.* 2002). Ludwig *et al.* (2002) also identified the As1 haplotype in a North Sea museum specimen from the 19<sup>th</sup> century. The As2 haplotype was found in three museum specimens caught in the Seine, Gironde and Tiber rivers (nos 6, 20, 25). This haplotype, probably lost in the present day Gironde population, has a broad geographical range (Table 2) as it was also met in one museum individual from the Po River (Ludwig *et al.* 2002) and in seven dermal scutes from the Baltic Sea (Ludwig *et al.* 2008). Haplotype As8 is a new haplotype found in two museum specimens (nos. 10 and 16) probably caught during sea life, some distance from their natal river. It is close to the As7 haplotype found in the Iberian Peninsula (Fig. 2).

Both specimens with this haplotype might come from French populations, but it is not excluded they belong to uncharacterized populations from the Iberian Peninsula. Haplotype diversity in North-Western Europe is weak compared with Spain and Portugal, where four haplotypes have been identified on only five archaeological remains (Ludwig *et al.* 2009a). The Iberian Peninsula could therefore have been a refugium for *A. sturio* during recent cold periods, from which colonization occurred after deglaciation.

### ***Mitochondrial variability of Acipenser oxyrinchus***

We identified two different control region haplotypes in French *A. oxyrinchus*: A and B (Table 1 and Fig. 2). The only individual showing haplotype B was caught in the Vertonne estuary, and as suggested by the small size of this river, it certainly corresponds to a wandering individual from a neighbour population. Both haplotypes are present in North America, but it is the first time haplotype B is described in Europe. Haplotype A has been previously described as predominant in the Baltic region, and found in archaeological sites from the Middle Ages as well as in museum samples from 19<sup>th</sup>-20<sup>th</sup> centuries (Ludwig *et al.* 2002; Ludwig *et al.* 2008). It was also found in one specimen from the 19<sup>th</sup> century caught in the Wharfe River on the East coast of England (Ludwig *et al.* 2009b). Three other haplotypes – missing in North America – have also been described in Europe: haplotypes BS1 and BS2 were found in Baltic archaeological remains, in one dermal scute each (Ludwig *et al.* 2008), and haplotype UK1 was found in only one specimen from the 19<sup>th</sup> century caught in the Don River on the British East

coast (Ludwig *et al.* 2009b). Haplotype diversity in North-Western Europe is similar to northernmost American populations – with one to three haplotypes per population – corresponding to rivers that were glaciated and then colonized after the Last Glacial Maximum (LGM) (Wirgin *et al.* 2000). On the contrary, sturgeon populations from nonglaciated American rivers show an important mitochondrial diversity – with seven to 17 control region haplotypes (Wirgin *et al.* 2000).

### ***Impact of climate on sturgeons phylogeography in Western Europe***

In North-Western Europe, genetic diversity is low for *A. sturio* – when compared to the Iberian Peninsula – as well as for *A. oxyrinchus* – when compared to non glaciated American rivers. This low genetic diversity could be the result of post-glacial colonization, once the European ice-sheet and glaciers, which extended at their maximum from Scandinavia to the British Isles around the LGM (ca. 30-25 ka BP, e.g. Clark *et al.*, 2009), had melted, i.e. at the latest after the Younger Dryas cold interval (ca. 12 ka BP) (Ehlers and Gibbard, 2004). Climatic conditions in Europe favoured a permafrost extension as far south as 45-50°N during the last glacial period, and most of the European rivers probably iced during winter (Renssen and Vandenberghe, 2003; Toucanne *et al.*, 2009). As a result, it is likely that sturgeons were absent from glaciated rivers northward to 50°N and only survived in southern refugia. A possible refugium is the Iberian Peninsula, described as such for multiple taxa (Taberlet *et al.* 1998; Hewitt 2000). Whether a population survived in the Gironde basin during the LGM or not is questionable.

The European deglaciation occurred from ca 20 ka with major discharge of periglacial rivers, especially those connected to the retreating ice-sheets (Toucanne *et al.* 2010), likely not convenient for sturgeon spawning. Colonization of the rivers could have occurred after the Younger Dryas, i.e. during the Holocene period, or even during the Bölling-Alleröd (ca. 15-13 ka BP), a warm interval bracketed between the LGM and the Younger Dryas. Until 6 ka BP and throughout the last glacial period, the sea level was also significantly lower than today, with the European continental shelf partially emerged, resulting in modified drainage systems (Gibbard 1988). The North Sea and the Baltic Sea were for example emerged, and watersheds from the region flowed into the Atlantic Ocean either northward to the Nordic Seas, or southwards through the Fleuve Manche palaeoriver (English Channel area) which gathered present-day Seine, Somme,

Solent, Meuse, Rhine and Thames rivers (Toucanne *et al.* 2010). Colonization routes could thus have been different, depending on the timing of this colonization.

### ***Space and time frame of *A. oxyrinchus* arrival in Europe***

*A. oxyrinchus* probably arrived in Europe after the LGM through accidental long range migration from America. During their sea life, American *A. oxyrinchus* can indeed venture as far as Bermuda, Venezuela and Labrador (Lee *et al.* 1980) so that some may be swept away to Europe by the Gulf Stream and the North Atlantic Drift, powerful, warm and swift oceanic currents. To enter the Baltic Sea from the North Atlantic Drift, sturgeons had to swim on the Scottish and/or on the French coast. A colonization of French coasts by *A. oxyrinchus* prior to the Baltic population foundation 1.2 ka BP is therefore likely, as corroborated by its presence in the area around 5 ka BP. In this case, the Baltic population must have been founded by migrants from North Sea or West European rivers, and be the result of a two step founder effect.

Our paleogenetic data indicate the presence of only control region haplotypes A and B in France, consistent with contributions of northernmost American populations to the foundation of the European population. Haplotype A is indeed fixed in northernmost American populations such as those from St Lawrence and St John, and haplotype B is found only in Hudson and Delaware populations (Grunwald *et al.* 2007). The presence of three purely European haplotypes close to haplotype A – BS1, BS2 and UK1 (Ludwig *et al.* 2008; Ludwig *et al.* 2009b) – suggest that genetic variability of *A. oxyrinchus* has expanded locally after the foundation of European populations. The time frame of French coast colonization is rather imprecise, likely occurring between the LGM and 5 ka BP, i.e. at time of the post-glacial emersion of the English Channel and North Sea areas.

To explain this colonization pattern, the thermal tolerance of both species can be put forward as previously suggested (Ludwig *et al.* 2002; Ludwig *et al.* 2008). *A. sturio* prefers spawning temperatures between 18 and 22°C and *A. oxyrinchus* between 13 and 26°C (Ludwig & Gessner 2007), *A. sturio* should therefore have been more sensitive to cold periods – such as the Little Ice Age during the Middle Ages – than *A. oxyrinchus*. This physiological characteristic may have played a role when post-glacial colonization of NW Europe Rivers occurred, few *A. oxyrinchus* migrants from North America probably competing with more numerous *A. sturio* migrants from southern Europe refugia. In this

case, *A. oxyrinchus* tolerance to cold waters, and especially during spawning period, may have favoured this species in northern rivers.

### ***Hybridization and introgression between A. sturio and A. oxyrinchus***

We detected traces of ancient hybridization between both sea sturgeon species. Hybridization is common in Acipenseriformes, occurring even between distant species in the wild (review in Rochard *et al.* 1991; Birstein *et al.* 1997). Hybrids mitochondrial DNA come either from *A. sturio* (no. 6) or from *A. oxyrinchus* (no. 7) maternal lineages, suggesting that hybridization can possibly occur in either direction. No F1 hybrids have been detected, meaning 1) F1 hybrids are fertile and backcrosses with parental individuals leading to introgression (Rhymer & Simberloff 1996) and 2) hybridization was already ancient in the Seine River in 1820-1860. Proportion of individuals showing signs of hybridization or introgression was low (two specimens among 18 that yielded nuclear sequences i.e. 11%), consistent with Ludwig *et al.* (2008) findings in the Baltic region (7 scutes among 49 i.e. 14%). These results are not compatible with mass hybridization as suggested by Tiedemann *et al.* (2007) for the Baltic Sea based on data from the MHC. Nevertheless, if hybridization seems relatively rare at the species level, we found two hybrids on three specimens of the Seine, suggesting that some populations may have been more hybridized. The use of three diagnostic nuclear markers in our study allows a more accurate characterization of hybridization and introgression than in former attempts. For example, if we had only analysed the Aox23 marker as in Ludwig *et al.* (2002; 2008) the hybrid state of specimen no. 7 would have been missed (Table 1). It is therefore likely that the proportion of individuals showing signs of ancient hybridization has been underestimated in previous studies. Even with the analysis of three nuclear markers, we may have missed some hybrids, and more species specific nuclear markers are needed.

Species determination based on morphology and using DNA gave congruent results in our study, with one disagreement on five comparisons for archaeological remains (20%) and one disagreement on 19 comparisons for museum specimens (5%). Proportion of disagreements was also reported in Ludwig *et al.* (2008) for Baltic Sea archaeological remains and in this case varied widely between *A. sturio* (23 disagreements on 34 comparisons i.e. 68%) and *A. oxyrinchus* (4/176 i.e. 2%) morphological determinations. One explanation could be the poor preservation of morphological characters used to

discriminate between both species. Little is known about nuclear genomes of Acipenseriformes, but morphological features such as scutes number and sculpting must be coded by some developmental genes as it is the case for other fishes (Harris *et al.* 2008; Sire *et al.* 2009). Disagreement between molecular and morphological analyses could also reflect different specific inheritance of the genes controlling scute development and of mitochondrial and nuclear markers analysed here. Studying more nuclear markers is therefore necessary to improve the description of hybrid genomes.

### **Conservation outcomes**

Only *A. sturio* was found in museum specimens from the Gironde basin, but archaeological samples showed that *A. oxyrinchus* could have lived in sympatry with *A. sturio* in the Gironde 2 ka ago (Desse-Berset 2009a; this study). Both species can hybridize, so it is possible that the extant Gironde population of *A. sturio* experienced some gene flow with *A. oxyrinchus* in the past. As it's the last population, Gironde is now considered as a reference for *A. sturio*. However, some shared characters with *A. oxyrinchus* could have been misinterpreted as ancestral while they were in fact the result of introgression. To determine if this process occurred and left traces in *A. sturio* nuclear genome, it is necessary to study geographically distant populations of *A. sturio* – such as Mediterranean ones, that did not come into contact with *A. oxyrinchus* recently, – and to compare them with the extant Gironde population. The use of numerous nuclear markers is also required, as only small chromosomal regions are expected to remain after several generations of backcrossing (Martinsen *et al.* 2001).

The presence of both *A. sturio* and *A. oxyrinchus* in Loire and Seine rivers in the past century raises the question of which species to reintroduce. Potential source populations for reintroduction in these rivers are identified as northernmost American populations for *A. oxyrinchus* (Ludwig *et al.* 2008), and as the Gironde population for *A. sturio*. Nevertheless, as the Gironde population is the last remaining of the critically endangered *A. sturio* (IUCN, 2010) and as hybridization has been demonstrated with *A. oxyrinchus*, we think it is of high risk to reintroduce *A. oxyrinchus* in the Loire and Seine rivers, and even in the Rhine and Elbe rivers northwards. Indeed, the extant Gironde population has a very low effective size and no natural reproduction has occurred since 1994 (Lepage & Rochard 1993; Williot *et al.* 1997; Williot *et al.* 2000), such that a single hybridization event could endanger the entire population and then the

entire species, leading to extinction by hybridization (Rhymer & Simberloff 1996). Instead, *A. sturio* should be reintroduced in these rivers to establish buffer populations between the Gironde and the Baltic Sea where *A. oxyrinchus* has been reintroduced recently.

### **Acknowledgments:**

We thank curators of the Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris, France) and of the Muséum d'Histoire Naturelle de Nantes (France) who allowed sampling of museum specimens used in this study. We are grateful to Romain Causse (MNHN), Zora Gabsi (MNHN) and Thierry Boisgard (MHNN) who helped us during sampling and to Maud Pionnier (MNHN) and Patrick Jean (MHNN) for providing us some additional pictures of museum specimens.

We also thank archaeologists directors of the three archaeological sites E. Bernard, P. Garmy and L. Laporte, who provide NDB with the sturgeon scutes and the chronostratigraphical information concerning their sites.

We are grateful to Samuel Toucanne (IFREMER, Plouzané) for helpful comments on the manuscript, and to Joanne Burden (IGFL, Lyon) for linguistic improvements.

Data used in this work were produced in the Palgene Platform in Lyon (CNRS, ENS de Lyon, <http://igfl.ens-lyon.fr/PALGENE>) and were partly analysed through molecular genetic technical facilities of the IFR119 "Montpellier Environnement Biodiversité" (Université Montpellier 2, <http://tinyurl.com/2uwf8nq>). We thank Benjamin Gillet, Frédérique Cerqueira and Erick Desmarais for their constructive help during the experiments.

## References

- Bandelt HJ, Forster P, Rohlf A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 37-48.
- Bemis WE, Findeis EK, Grande L (1997) An overview of Acipenseriformes. *Environmental Biology of Fishes* **48**, 25-72.
- Bemis WE, Kynard B (1997) Sturgeon rivers: An introduction to Acipenseriform biogeography and life history. *Environmental Biology of Fishes* **48**, 167-184.
- Billard R, Lecointre G (2001) Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **10**, 355-392.
- Birstein VJ (1993) Sturgeons and Paddlefishes - Threatened fishes in need of conservation. *Conservation Biology* **7**, 773-787.
- Birstein VJ, Hanner R, DeSalle R (1997) Phylogeny of the Acipenseriformes: Cytogenetic and molecular approaches. *Environmental Biology of Fishes* **48**, 127-156.
- Birstein VJ, DeSalle R (1998) Molecular phylogeny of Acipenserinae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **9**, 141-155.
- Briggs AW, Stenzel U, Johnson PLF, *et al.* (2007) Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 14616-14621.
- Calvignac S, Hughes S, Tougaard C, *et al.* (2008) Ancient DNA evidence for the loss of a highly divergent brown bear clade during historical times. *Molecular Ecology* **17**, 1962-1970.
- Chassaing O, Hanni C, Berrebi P (submitted) Distinguishing species and hybrids of European sturgeons using microsatellite allele sequences. (*submitted*).
- Choudhury A, Dick TA (1998) The historical biogeography of sturgeons (Osteichthyes : Acipenseridae): a synthesis of phylogenetics, palaeontology and palaeogeography. *Journal of Biogeography* **25**, 623-640.
- Clark PU, Dyke AS, Shakun JD, *et al.* (2009) The Last Glacial Maximum. *Science* **325**, 710-714.
- Cooper A, Poinar HN (2000) Ancient DNA: Do it right or not at all. *Science* **289**, 1139-1139.
- Debus L (1999) Meristic and morphological features of the Baltic sturgeon (*Acipenser sturio* L.). *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie* **15**, 38-45.
- Desse-Berset N (2009a) First archaeozoological identification of Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus* Mitchill 1815) in France. *Comptes Rendus Palevol* **8**, 717-724.
- Desse-Berset N. (2009b) La pêche dans l'économie de subsistance des sites de Ponthezières et de la Perroche (île d'Oléron, Néolithique final). In : Laporte (L.) (dir.), *Des premiers paysans aux premiers métallurgistes sur la façade atlantique de la France (3500 -2000 av. J.-C.)*. Éd. Association des publications Chauvinoises, Mémoire XXXIII, Chauvigny : 584-609.
- Ehlers J, Gibbard PL (2004) Quaternary Glaciations - Extent and Chronology, Part I: Europe. *Developments in Quaternary Science*, vol. 2a. Elsevier, Amsterdam.
- Gibbard PL (1988) The History of the Great Northwest European Rivers During the Past 3 Million Years. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **318**, 559-602.



- Gilbert MTP, Hansen AJ, Willerslev E, *et al.* (2003) Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage. *American Journal of Human Genetics* **72**, 48-61.
- Gilbert MTP, Bandelt HJ, Hofreiter M, Barnes I (2005) Assessing ancient DNA studies. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 541-544.
- Gonthier P (2009) European sturgeon ... A come back? *Cahiers Agricultures* **18**, 195-198.
- Grunwald C, Maceda L, Waklman J, Stabile J, Wirgin I (2007) Conservation of Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*: delineation of stock structure and distinct population segments. *Conservation Genetics*.
- Hanni C, Brousseau T, Laudet V, Stehelin D (1995) Isopropanol Precipitation Removes Pcr Inhibitors from Ancient Bone Extracts. *Nucleic Acids Research* **23**, 881-882.
- Harris MP, Rohner N, Schwarz H, *et al.* (2008) Zebrafish *eda* and *edar* Mutants Reveal Conserved and Ancestral Roles of Ectodysplasin Signaling in Vertebrates. *Plos Genetics* **4**.
- Henderson-Arzapalo A, King TL (2002) Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) population delineation and broodstock management. *Molecular Ecology Notes* **2**, 437-439.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907-913.
- Hofreiter M, Jaenicke V, Serre D, von Haeseler A, Paabo S (2001) DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Research* **29**, 4793-4799.
- Hofreiter M, Muenzel S, Conard NJ, *et al.* (2007) Sudden replacement of cave bear mitochondrial DNA in the late Pleistocene. *Current Biology* **17**, R122-R123.
- Hofreiter M, Stewart J (2009) Ecological Change, Range Fluctuations and Population Dynamics during the Pleistocene. *Current Biology* **19**, R584-R594.
- Hughes S, Hayden TJ, Douady CJ, *et al.* (2006) Molecular phylogeny of the extinct giant deer, *Megaloceros giganteus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **40**, 285-291.
- IUCN (2010) International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species. Version 2010.1. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- King TL, B. A., Lubinski, *et al.* (2001) Microsatellite DNA variation in Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) and cross-species amplification in the Acipenseridae. *Conservation Genetics* **2** 103-119.
- Krause J, Dear PH, Pollack JL, *et al.* (2006) Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. *Nature* **439**, 724-727.
- Krieger J, Hett AK, Fuerst PA, Artyukhin E, Ludwig A (2008) The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited. *Journal of Applied Ichthyology* **24**, 36-45.
- Lee DS, Gilbert CR, Hocutt CH, *et al.* (1980) Atlas of North American freshwater fishes. North Carolina State Museum of Natural History, Raleigh.
- Leonard JA, Wayne RK, Cooper A (2000) Population genetics of Ice age brown bears. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 1651-1654.
- Lepage M, Rochard E (1993) Threatened fishes of the world: *Acipenser sturio* Linnaeus, 1758 (*Acipenseridae*). *Environmental Biology of Fishes* **43**, 28.

- Loreille O, Orlando L, Patou-Mathis M, *et al.* (2001) Ancient DNA analysis reveals divergence of the cave bear, *Ursus spelaeus*, and brown bear, *Ursus arctos*, lineages. *Current Biology* **11**, 200-203.
- Ludwig A, Jenneckens I (2000) A PCR test for mitochondrial heteroplasmy in sturgeon. *Animal Genetics* **31**, 153-154.
- Ludwig A, May B, Debus L, Jenneckens I (2000) Heteroplasmy in the mtDNA control region of sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics* **156**, 1933-1947.
- Ludwig A, Belfiore NM, Pitra C, Svirsky V, Jenneckens I (2001) Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics* **158**, 1203-1215.
- Ludwig A, Debus L, Lieckfeldt D, *et al.* (2002) When the American sea sturgeon swam east - A colder Baltic Sea greeted this fish from across the Atlantic Ocean in the Middle Ages. *Nature* **419**, 447-448.
- Ludwig A, Gessner J (2007) What makes the difference? - Sea sturgeon on both sides of the Atlantic Ocean. *Anadromous Sturgeons: Habitats, Threats, and Management. American Fisheries Society Symposium* **56**, 285-300.
- Ludwig A, Arndt U, Lippold S, *et al.* (2008) Tracing the first steps of American sturgeon pioneers in Europe. *Bmc Evolutionary Biology* **8**.
- Ludwig A, Arndt U, Debus L, Rosello E, Morales A (2009a) Ancient mitochondrial DNA analyses of Iberian sturgeons. *Journal of Applied Ichthyology* **25**, 5-9.
- Ludwig A, Makowiecki D, Benecke N (2009b) Further evidence of trans-Atlantic colonization of Western Europe by American Atlantic sturgeons. *Archaeofauna* **18**, 185-192.
- Magnin E (1962) Recherches sur la systématique et la biologie des Acipenséridés. *Annales de la station centrale d'hydrobiologie appliquée* **9**, 7-242.
- Magnin E (1964) Validité d'une distinction spécifique entre les deux Acipenséridés : *Acipenser sturio* L. d'Europe et *Acipenser oxyrinchus* d'Amérique du Nord. *Le Naturaliste Canadien* **16**, 3-20.
- Martinsen GD, Whitham TG, Turek RJ, Keim P (2001) Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution* **55**, 1325-1335.
- May B, Krueger CC, Kincaid HL (1997) Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**, 1542-1547.
- Ong TL, Stabile J, Wirgin I, Waldman JR (1996) Genetic divergence between *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* and *A-o-desotoi* as assessed by mitochondrial DNA sequencing analysis. *Copeia*, 464-469.
- Orlando L, Bonjean D, Bocherens H, *et al.* (2002) Ancient DNA and the population genetics of cave bears (*Ursus spelaeus*) through space and time. *Molecular Biology and Evolution* **19**, 1920-1933.
- Paabo S (2000) Of bears, conservation genetics, and the value of time travel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 1320-1321.
- Paabo S, Poinar H, Serre D, *et al.* (2004) Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics* **38**, 645-679.

- Pages M, Desse-Berset N, Tougard C, *et al.* (2009) Historical presence of the sturgeon *Acipenser sturio* in the Rhone basin determined by the analysis of ancient DNA cytochrome b sequences. *Conservation Genetics* **10**, 217-224.
- Peng ZG, Ludwig A, Wang DQ, *et al.* (2007) Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces : Acipenseriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **42**, 854-862.
- Perry AL, Low PJ, Ellis JR, Reynolds JD (2005) Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science* **308**, 1912-1915.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* **6**, 847-859.
- Renssen H, Vandenberghe J (2003) Investigation of the relationship between permafrost distribution in NW Europe and extensive winter sea-ice cover in the North Atlantic Ocean during the cold phases of the Last Glaciation. *Quaternary Science Reviews* **22**, 209-223.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 83-109.
- Rochard E, Williot P, Castelnaud G, Lepage M (1991) Eléments de systématique et de biologie des populations sauvages d'esturgeons. In: *ACIPENSER* (ed. P. Williot - Cemagref Publ. A, France : 475-507).
- Rohland N, Hofreiter M (2007) Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols* **2**, 1756-1762.
- Schlotterer C, Tautz D (1992) Slippage Synthesis Of Simple Sequence Dna. *Nucleic Acids Research* **20**, 211-215.
- Schwarz C, Debruyne R, Kuch M, *et al.* (2009) New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains. *Nucleic Acids Research* **37**, 3215-3229.
- Secor DH, Waldman JR (1999) Historical Abundance of Delaware Bay Atlantic Sturgeon and Potential Rate of Recovery *in* Life in the Slow Lane: Ecology and Conservation of Long-Lived Marine Animals. Editor J. Musick. American Fisheries Society Symposium, Vol. 23, pp. 203-216.
- Sire JY, Donoghue PCJ, Vickaryous MK (2009) Origin and evolution of the integumentary skeleton in non-tetrapod vertebrates. *Journal of Anatomy* **214**, 409-440.
- Smith TIJ (1985) The fishery, biology, and management of atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*, in North-America. *Environmental Biology of Fishes* **14**, 61-72.
- Stabile J, Waldman JR, Parauka F, Wirgin I (1996) Stock structure and homing fidelity in gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotoi*) based on restriction fragment length polymorphism and sequence analyses of mitochondrial DNA. *Genetics* **144**, 767-775.
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, *et al.* (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* **24**, 3189-3194.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**, 453-464.
- Tiedemann R, Moll K, Paulus KB, *et al.* (2007) Atlantic sturgeons (*Acipenser sturio*, *Acipenser oxyrinchus*): American females successful in Europe. *Naturwissenschaften* **94**, 213-217.

- Toucanne S, Zaragosi S, Bourillet JF, *et al.* (2009) Timing of massive 'Fleuve Manche' discharges over the last 350 kyr: insights into the European ice-sheet oscillations and the European drainage network from MIS 10 to 2. *Quaternary Science Reviews* **28**, 1238-1256.
- Toucanne S, Zaragosi S, Bourillet JF, *et al.* (2010) The first estimation of Fleuve Manche palaeoriver discharge during the last deglaciation: Evidence for Fennoscandian ice sheet meltwater flow in the English Channel ca 20-18 ka ago. *Earth and Planetary Science Letters* **290**, 459-473.
- Vladykov VD (1955) A comparison of atlantic sea sturgeon with a new subspecies from the Gulf of Mexico (*Acipenser oxyrinchus desotoi*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **12**, 754-761.
- Waldman JR, Wirgin, II (1998) Status and restoration options for Atlantic sturgeon in North America. *Conservation Biology* **12**, 631-638.
- Waldman JR, Grunwald C, Stabile J, Wirgin I (2002) Impacts of life history and biogeography on the genetic stock structure of Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*, Gulf sturgeon *A-oxyrinchus desotoi*, and shortnose sturgeon *A-brevirostrum*. *Journal of Applied Ichthyology* **18**, 509-518.
- Willerslev E, Cooper A (2005) Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **272**, 3-16.
- Williot P, Rochard E, Castelnaud G, *et al.* (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, Brun R, Pelard M, Mercier D (2000) Induced maturation and spawning in an incidentally caught adult pair of critically endangered European sturgeon, *Acipenser sturio* L. *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie* **16**, 279-281.
- Wirgin I, Waldman JR, Rosko J, *et al.* (2000) Genetic structure of Atlantic sturgeon populations based on mitochondrial DNA control region sequences. *Transactions of the American Fisheries Society* **129**, 476-486.
- Wirgin I, Waldman J, Stabile J, Lubinski B, King T (2002) Comparison of mitochondrial DNA control region sequence and microsatellite DNA analyses in estimating population structure and gene flow rates in Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus*. *Journal of Applied Ichthyology* **18**, 313-319.

## Figures and tables captions

**Fig. 1** Map of the French Atlantic coast, with circles indicating locations of (a) archaeological and (b) museum sturgeon samples analysed in this study. Circle size is proportional to the number of samples coming from a given location. Hatching corresponds to hybrids (when mitochondrial and nuclear data are available). Roman numbers refer to sampling locations given in Table 1.

**Fig. 2** Median joining network based on 207 sites from partial tRNA-Pro gene and mitochondrial Dloop, computed with Network 4.516 (Fluxus Technology Ltd). 61 haplotypes described in Genbank (see Table 2) and 23 sequences obtained in this study are included. Circle and shape colours correspond to *A. sturio* and both subspecies of *A. oxyrinchus* – *A. o. oxyrinchus* and *A. o. desotoi*. For legibility purposes “//” represent 33 mutated positions. Samples used in this study are indicated in black, and circle surface areas are proportional to the numbers of sampled individuals. Empty circles represent potential ancestral haplotypes added by the algorithm. Haplotypes are indicated by names as provided in Table 2. New *A. sturio* haplotype As8 is indicated in bold and italic. Samples are indicated by numbers in bold and italic as provided in Table 1.

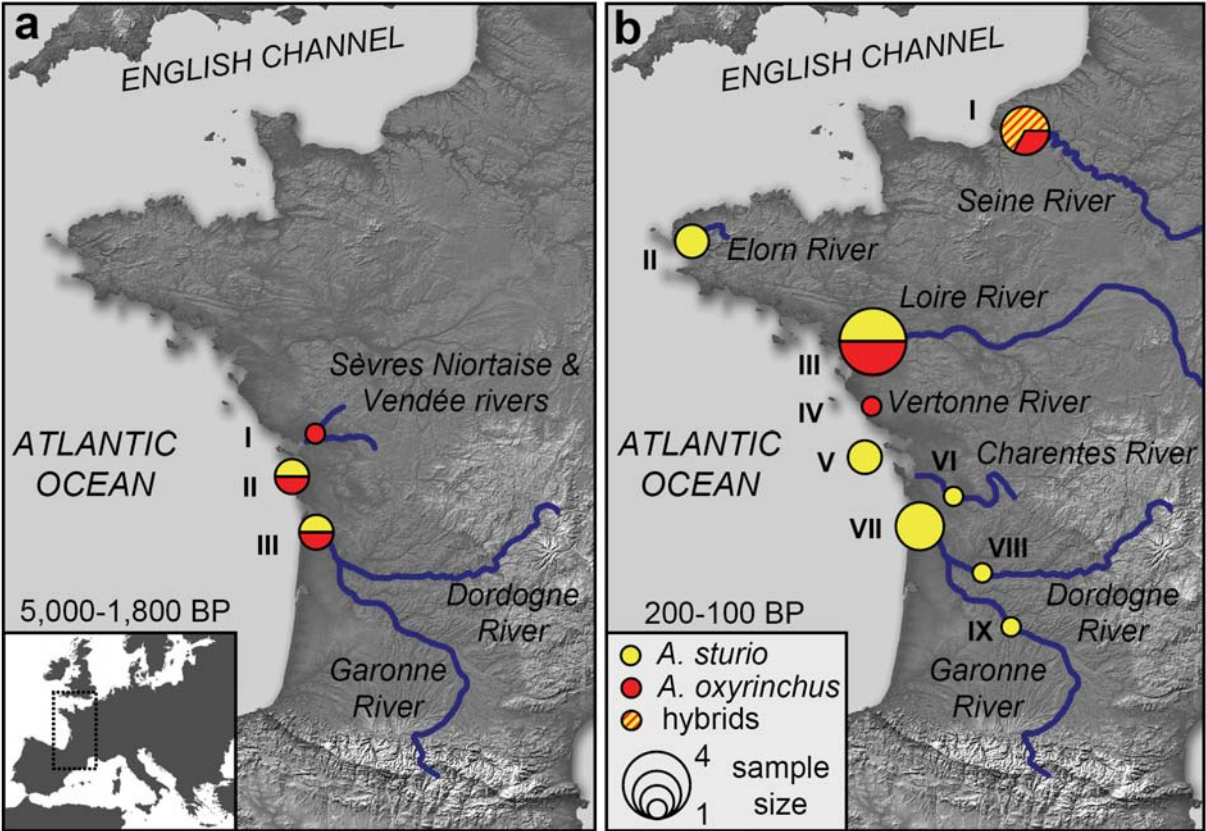


Figure 1

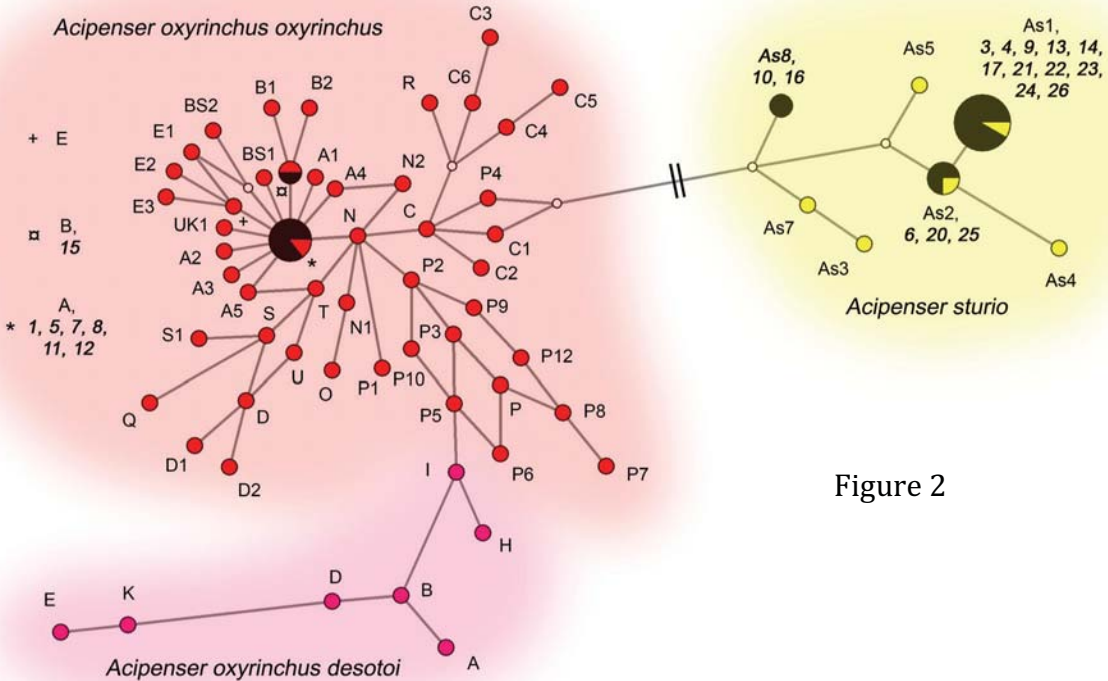


Figure 2

**Table 1** Samples used in this study along with sampling place, sampling date and species determination based on morphology, mitochondrial, and nuclear DNA. Mitochondrial haplotypes refer to a 210 bp fragment of the control region and are indicated into brackets following Table 2 designations. Nuclear DNA analyses rely on three diagnostic microsatellite loci – Aox23, AoxD161 and LS68 – described elsewhere (Chassaing *et al.* submitted).

Sample no.	Sampling place	(1)	(2)	Sampling date	Morphology	Mitochondrial DNA	Nuclear DNA			(3)
							Aox23	AoxD161	LS68	
Archaeological samples	1	Le Langon (Vendée)	R a-I	2000 BP	<i>A. oxyrinchus</i>	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	oxy	oxy	oxy/oxy	O
	2	Ponthezières (Oleron Island)	S a-II	≈ 5000 BP	<i>A. oxyrinchus</i>	<i>A. oxyrinchus</i> ‡	-	-	-	O
	3	Ponthezières (Oleron Island)	S a-II	≈ 5000 BP	<b><i>A. oxyrinchus</i></b>	<b><i>A. sturio</i> (As1)</b>	-	-	-	S
	4	Saint-Germain d'Esteuil (Gironde)	E a-III	2300-1800 BP	<i>A. sturio</i>	<i>A. sturio</i> (As1)	stu □	stu	stu □	S
	5	Saint-Germain d'Esteuil (Gironde)	E a-III	2300-1800 BP	<i>A. oxyrinchus</i>	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	oxy/oxy	oxy	oxy □	O
Museum samples	6	Seine River	R b-I	1858	-	<i>A. sturio</i> (As2)	oxy/oxy	oxy	oxy	H
	7	Seine River estuary	E b-I	1823	<i>A. oxyrinchus</i>	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	oxy/oxy	oxy/stu	oxy/stu	H
	8	Seine River estuary	E b-I	1851	<i>A. oxyrinchus</i>	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	oxy/oxy	oxy	oxy/oxy	O
	9	Elorn River estuary in Brittany	E b-II	unknown	<i>A. sturio</i>	<i>A. sturio</i> (As1)	stu/stu	stu *	stu	S
	10	Estuary in Brittany	E b-II	before 1870	<i>A. sturio</i>	<i>A. sturio</i> (As8)	stu/stu	stu/stu *	stu/stu	S
	11	Loire River at Chevire (Nantes)	R b-III	1880	<i>A. oxyrinchus</i>	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	oxy	oxy	oxy/oxy	O
	12	Loire River at Chevire (Nantes)	R b-III	1896	<b><i>A. sturio</i></b>	<b><i>A. oxyrinchus</i> (A)</b>	<b>oxy</b>	<b>oxy/oxy</b>	<b>oxy/oxy</b>	<b>O</b>
	13	Loire River	R b-III	1886	<i>A. sturio</i>	<i>A. sturio</i> (As1)	stu/stu	stu *	stu/stu	S
	14	Loire River estuary	E b-III	unknown	<i>A. sturio</i>	<i>A. sturio</i> (As1)	stu/stu	stu *	stu/stu	S
	15	Veronne River estuary near Les Sables d'Olonne	E b-IV	before 1870	<i>A. oxyrinchus</i>	<i>A. oxyrinchus</i> (B)	oxy/oxy	oxy	oxy	O
	16	Atlantic Ocean near La Rochelle	S b-V	1830	<i>A. sturio</i>	<i>A. sturio</i> (As8)	stu	stu/stu *	stu	S
	17	Atlantic Ocean near La Rochelle	S b-V	1830	<i>A. sturio</i>	<i>A. sturio</i> (As1)	-	stu *	-	S
	18	Charentes River at Saintes	R b-VI	before 1962	<i>A. sturio</i>	<i>A. sturio</i> ‡	-	-	-	S
	19	Gironde River at Saint-Ciers	E b-VII	1939	<i>A. sturio</i>	-	-	-	-	-
	20	Gironde River	E b-VII	before 1870	<i>A. sturio</i>	<i>A. sturio</i> (As2)	-	-	-	S
	21	Gironde River	E b-VII	1850	<i>A. sturio</i>	<i>A. sturio</i> (As1)	-	-	-	S
22	Gironde River	E b-VII	1850	<i>A. sturio</i>	<i>A. sturio</i> (As1)	-	-	-	S	
23	Dordogne River near Libourne	R b-VIII	before 1894	<i>A. sturio</i>	<i>A. sturio</i> (As1)	stu	stu *	stu/stu	S	
24	Garonne River	R b-IX	unknown	<i>A. sturio</i>	<i>A. sturio</i> (As1)	stu/stu	stu/stu *	stu	S	
25	Tiber River near Roma, Italy	R -	1823	<i>A. sturio</i>	<i>A. sturio</i> (As2)	stu	stu *	stu/stu	S	
26	unknown	-	-	unknown	<i>A. sturio</i> (As1)	-	-	-	S	

‡ amplification of only small fragments of the control region (40 bp for sample no.18 and 59 bp for sample no. 2) and Cytb gene (86 bp for both) allowing species identification but not haplotype distinction.

\* species distinction by allele size (determined by capillary electrophoresis), without sequencing (AoxD161 only)

□ only one PCR product cloned and sequenced

(1) location type: sea (S), estuary (E), or river (R)

(2) location on Figure 1, from the North to the South

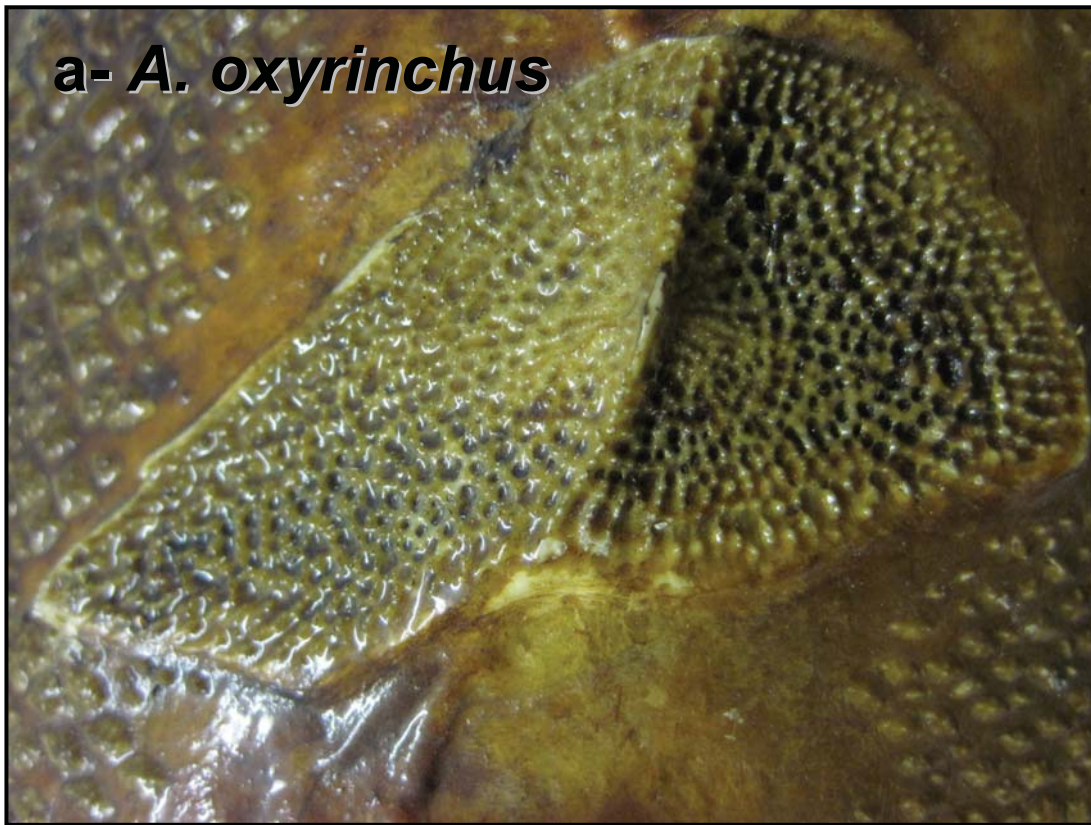
(3) genetic assignment: *A. sturio* (S), *A. oxyrinchus* (O), hybrid (H)

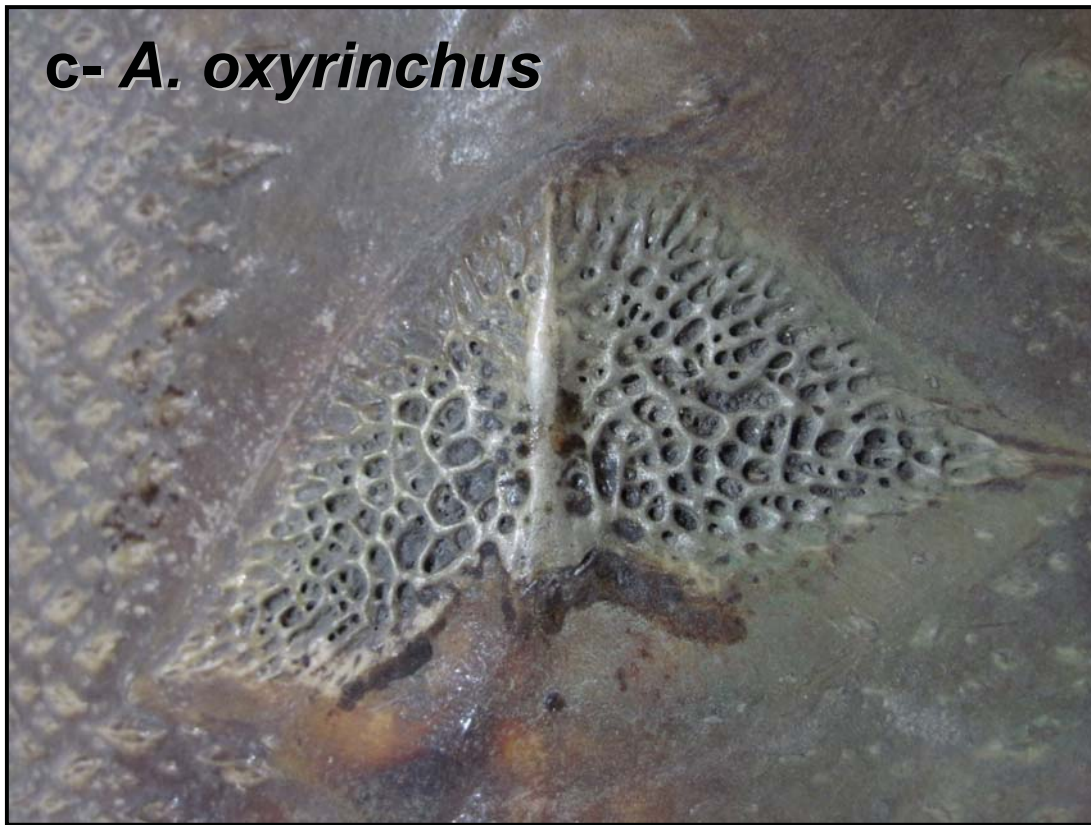
**Table 2** All known control region haplotypes of sea sturgeons *A. sturio*, *A. o. desotoi* and *A. o. oxyrinchus*.

Haplotype name	GenBank accession no.	Publication	Published geographical range
As1	AJ249673	Ludwig& Jenneckens, 2000	Atlantic Europe
As2	AJ428274	Ludwig <i>et al.</i> , 2002	Atlantic Europe†, Baltic Sea†, Mediterranean Sea†
As3	EU420003	Ludwig <i>et al.</i> , 2009	Iberia†
As4	EU420004-5	Ludwig <i>et al.</i> , 2009	Iberia†
As5	EU420006	Ludwig <i>et al.</i> , 2009	Iberia†
As7	EU420007	Ludwig <i>et al.</i> , 2009	Iberia†
As8	XXXXXX	this study	Atlantic†
AodA-E	DQ088959-63	Kreiser& Parauka, unpublished	Gulf of Mexico
AodF-K	none	Ong <i>et al.</i> , 1996	Gulf of Mexico
AooA-U	AF162716-54	Wirgin <i>et al.</i> , 2000	Atlantic America, Atlantic Europe (A & B)†
AooA5-P12	EU726274-79	Grunwald <i>et al.</i> , 2007	Atlantic America
AooBS1-2	EU684143-44	Ludwig <i>et al.</i> , 2008	Baltic Sea†
AooUK1	EU420008	Ludwig <i>et al.</i> , 2009b	United Kingdom†

† extinct in the area

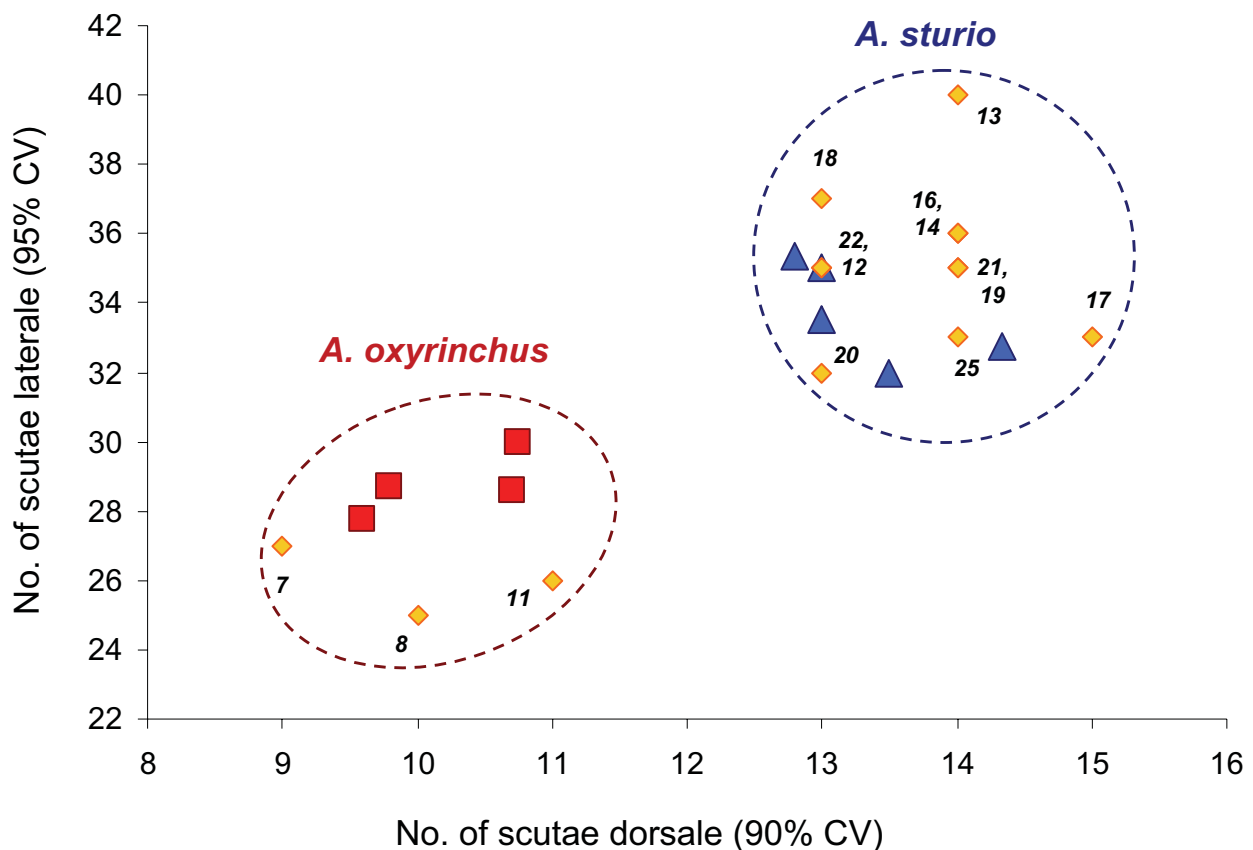








**Supplementary figure S1:** dermal scutes photography showing alveolar structure typical of *A. oxyrinchus* (b, c, d) and tubercular structure typical of *A. sturio* (a, e, f).  
a – Lateral scute (varnished), sample number 7 in table 1, MNHN Paris 0000-3115 (photography Olivier Chassaing).  
b – Lateral scute (varnished), sample number 8 in table 1, MNHN Paris 0000-3108 (photography Olivier Chassaing).  
c – Lateral scute (varnished), sample number 11 in table 1, MHNN Nantes Z.019558 (photography Olivier Chassaing).  
d – Lateral scutes (painted), sample number 13 in table 1, MHNN Nantes Z.019398 (photography Patrick Jean).  
e – Lateral scutes (varnished), sample number 14 in table 1, MHNN Nantes Z.58274 (photography Patrick Jean).  
f – Dorsal scute, sample number 18 in table 1, MNHN Paris 1962-1295 (photography Maud Pionnier).



**Supplementary Figure S2** Number of lateral (y-axis) and dorsal (x-axis) scutes of museum samples from our study (♦ lozenges) plotted with values corresponding to different populations of *A. sturio* (▲ triangles) and *A. oxyrinchus* (■) taken from Debus (1999). Numbers are referring to samples as in Table 1. Scute count was made after sampling, based on quality pictures. Incomplete specimens (only head: samples 6, 23, 24, 9) or specimens for which pictures do not allow accurate scute count (samples 10, 15, 26) are not included.

**Table S1** Details concerning samples and paleogenetic results reproduction. For each sample is indicated: museum/archaeological collection and accession number, storage conditions. For each DNA extract is indicated: source material, dry mass used for DNA extraction and success in amplifying mitochondrial and nuclear markers. For each sample, at least two DNA extract were analysed.

Sample no	Museum / archaeological collection and accession no.	Storage conditions	DNA extract ID	Material	Dry mass for DNA extraction (mg)	Mitochondrial DNA (control region haplotype)	Nuclear DNA		
							Aox23	AoxD161	LS68
1	Le Langon UF 196-2	dried	CH1009-1	dermal scute (underside)	398	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	oxy	oxy	-
			CH1009-2		446	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	oxy	oxy	oxy/oxy
2	Ponthezières Co3 d10 H9	dried	CH793-1	dermal scute (underside)	350	-	-	-	-
			CH793-2		200	<i>A. oxyrinchus</i>	-	-	-
			CH793-3		226	<i>A. oxyrinchus</i>	-	-	-
3	Ponthezières Co 3 d10 E4	dried	CH1008-1	dermal scute (underside)	303	<i>A. sturio</i> (As1)	-	-	-
			CH1008-2		403	<i>A. sturio</i> (As1)	-	-	-
4	Saint-Germain d'Esteuil 3016	dried	CH1010-1	dermal scute (underside)	266	<i>A. sturio</i> (As1)	-	stu	-
			CH1010-2		236	<i>A. sturio</i> (As1)	stu	stu	stu
5	Saint-Germain d'Esteuil 3065	dried	CH1011-1	dermal scute (underside)	357	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	oxy/oxy	oxy	-
			CH1011-2		326	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	oxy/oxy	oxy	oxy
6	MNHN Paris 0000-5160	alcohol (head)	CH1289	bony scute from operculum	65	<i>A. sturio</i> (As2)	oxy/oxy	oxy	oxy
			CH1290	bone from vertebral column	90	<i>A. sturio</i> (As2)	oxy/oxy	oxy	oxy
7	MNHN Paris 0000-3115	stuffed	CH1305	pectoral fin	75	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	oxy/oxy	oxy/stu	stu
			CH1306	skin of the belly	130	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	oxy/oxy	oxy/stu	oxy/stu
8	MNHN Paris 0000-3108	stuffed	CH1307	pectoral fin	40	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	-	-	-
			CH1308	skin and bony scute near the anus	47	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	oxy/oxy	oxy	oxy/oxy
9	MNHN Paris B-2609	stuffed (head)	CH1309	pectoral fin	117	-	-	-	-
			CH1310	skin of the belly	139	<i>A. sturio</i> (As1)	stu/stu	stu*	stu
10	MNHN Paris 0000-3119	stuffed	CH1299	bony scute near the anus	31	<i>A. sturio</i> (As8)	stu/stu	-	stu/stu
			CH1300	pectoral fin	110	<i>A. sturio</i> (As8)	stu/stu	stu/stu*	stu/stu
11	MHNN Nantes Z.019558	stuffed	CH1313	caudal fin	41	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	-	-	-
			CH1314	skin of the belly	218	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	oxy	oxy	oxy/oxy
12	MHNN Nantes Z.019631	skeleton	CH1315	caudal fin	43	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	oxy	oxy/oxy	oxy/oxy
			CH1316	muscle and bone from the belly	104	<i>A. oxyrinchus</i> (A)	oxy	oxy/oxy	oxy/oxy
13	MHNN Nantes Z.019398	stuffed	CH1317	pectoral fin	40	-	-	-	-
			CH1318	skin of the belly	48	<i>A. sturio</i> (As1)	stu/stu	stu *	stu/stu
14	MHNN Nantes Z.58274	stuffed	CH1319	caudal fin	45	<i>A. sturio</i> (As1)	-	-	-
			CH1320	bony scute from the belly	83	<i>A. sturio</i> (As1)	stu/stu	stu *	stu/stu
15	MNHN Paris 0000-3573	stuffed	CH1311	pectoral fin	366	<i>A. oxyrinchus</i> (B)	oxy/oxy	oxy	oxy
			CH1312	bone of the head	205	<i>A. oxyrinchus</i> (B)	-	oxy	oxy
16	MNHN Paris 0000-5162	alcohol	CH1291	pectoral fin	9	<i>A. sturio</i> (As8)	-	-	-
			CH1292	branchial arch	169	<i>A. sturio</i> (As8)	stu	stu/stu*	stu
17	MNHN Paris 0000-5162	alcohol	CH1293	pectoral fin	6	<i>A. sturio</i> (As1)	-	-	-
			CH1294	branchial arch	64	<i>A. sturio</i> (As1)	-	stu *	-
18	MNHN Paris 1962-1295	alcohol	CH1297	bone from the head	32	-	-	-	-
			CH1298	pectoral fin	43	<i>A. sturio</i>	-	-	-
19	MNHN Paris 1939-0008	alcohol	CH1325	branchial arch	141	-	-	-	-
			CH1326	anal fin	4	-	-	-	-
20	MNHN Paris 0000-5159	alcohol	CH1283	caudal fin	6	-	-	-	-
			CH1284	branchial arch	28	<i>A. sturio</i> (As2)	-	-	-
21	MNHN Paris 0000-2610	alcohol	CH1285	muscle	13	<i>A. sturio</i> (As1)	-	-	-
			CH1286	skin of the tongue	11	<i>A. sturio</i> (As1)	-	-	-
22	MNHN Paris 0000-2610	alcohol	CH1287	intestine	16	-	-	-	-
			CH1288	pectoral fin	13	<i>A. sturio</i> (As1)	-	-	-
23	MNHN Paris 1894-0087	stuffed (head)	CH1301	pectoral fin	77	<i>A. sturio</i> (As1)	stu	stu *	stu
			CH1302	skin	64	<i>A. sturio</i> (As1)	-	-	stu/stu
24	MNHN Paris B-2611	stuffed (head)	CH1303	pectoral fin	73	<i>A. sturio</i> (As1)	stu	-	stu
			CH1304	skin and bony scute from the head	146	<i>A. sturio</i> (As1)	stu/stu	stu/stu*	stu
25	MNHN Paris 0000-5165	alcohol	CH1295	skin of the belly	58	<i>A. sturio</i> (As2)	stu	-	stu
			CH1296	branchial arch	144	<i>A. sturio</i> (As2)	stu	stu *	stu/stu
26	MHNN Nantes Z.58275	stuffed	CH1321	caudal fin	63	<i>A. sturio</i> (As1)	-	-	-
			CH1322	skin of the belly	34	<i>A. sturio</i> (As1)	-	-	-

\* species distinction by allele size (determined by capillary electrophoresis), without sequencing (AoxD161 only)

**Table S2** Number of PCR products and clones sequenced to obtain consensus sequences for each mitochondrial and nuclear fragment. Mitochondrial fragment 1: 210 bp Dloop; fragments 2& 3: overlapping 120 bp fragments covering fragment 1; fragment 4: 82 bp (sample no. 18) or 100 bp (sample no. 2) Dloop fragments partial fragment 1; fragment 5: 121 Cytb fragment.

Sample no.	Mitochondrial DNA					Nuclear DNA		
	Number of sequenced PCR products and clones (into brackets)					Number of sequenced PCR products and clones (into brackets)		
	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4	Fragment 5	Aox23	AoxD161	LS68
1	4 (37)	-	-	-	-	2 (15)	4 (31)	3 (29)
2	-	-	-	3 (23)	2 (16)	-	-	-
3	3 (29)	1 (5)	-	-	-	-	-	-
4	4 (35)	-	-	-	-	1 (8)	2 (15)	1 (4)
5	4 (36)	-	-	-	-	4 (26)	3 (24)	1 (1)
6	3 (24)	-	-	-	-	5 (53)	3 (24)	3 (23)
7	3 (24)	-	-	-	-	7 (50)	5 (37)	3 (19)
8	3 (23)	-	-	-	-	3 (23)	2 (16)	2 (16)
9	2 (14)	-	-	-	-	2 (14)	-	2(12)
10	3 (22)	-	-	-	-	3 (19)	-	3 (24)
11	2 (16)	-	1 (8)	-	-	2 (15)	2 (16)	2 (15)
12	3 (22)	-	-	-	-	3 (23)	3 (24)	5 (38)
13	2 (13)	-	-	-	-	3 (22)	-	2 (15)
14	4 (28)	-	-	-	-	2 (16)	-	2 (13)
15	2 (16)	2 (14)	2 (16)	-	-	2 (14)	2 (16)	2 (15)
16	3 (23)	-	-	-	-	2(16)	-	2 (15)
17	3 (24)	1 (6)	1 (8)	-	-	-	-	-
18	-	-	-	2 (12)	2 (12)	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	2 (16)	2 (16)	-	-	-	-	-
21	1 (8)	2 (15)	2 (16)	-	-	-	-	-
22	-	3 (24)	2 (15)	-	-	-	-	-
23	3 (21)	-	-	-	-	2 (11)	-	3 (21)
24	4 (32)	-	-	-	-	3 (23)	-	3 (18)
25	3 (23)	-	-	-	-	3 (22)	-	3 (22)
26	1 (8)	2 (16)	3 (23)	-	-	-	-	-

### ■ Discussion des résultats : bilan général

Sur un total de 26 échantillons d'esturgeons français de la façade atlantique, six spécimens de musée et trois restes archéologiques présentent des séquences mitochondriales et/ou nucléaires d'*A. oxyrinchus*. Deux des spécimens de musée montrent des signatures d'hybridation ou d'introggression entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus*.

Ces résultats sont importants à plusieurs égards :

1) ils soutiennent la présence d'*A. oxyrinchus* sur les côtes françaises il y a 5 ka BP et 2 ka BP, puisque trois restes sur cinq provenant des sites de Langon, St-Germain d'Esteuil et Ponthezières sont génétiquement des *A. oxyrinchus*. Les deux restes d'esturgeons de Ponthezières sont d'ailleurs à notre connaissance les restes d'esturgeons les plus anciens à partir desquels des séquences ADN ont été obtenues.

2) ils démontrent la présence d'*A. oxyrinchus* sur la façade atlantique française aux 19<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> siècles, alors que seul *A. sturio* était considéré comme étant présent à cette époque auparavant. En effet, six spécimens de musée capturés en particulier dans la Loire et la Seine suggèrent l'existence de populations d'*A. oxyrinchus* installées dans ces fleuves en sympatrie avec *A. sturio* (Loire) ou bien hybridées avec *A. sturio* (Seine). Ces informations sont soutenues par l'existence de restes archéologiques récents exhumés au bord de la Seine au niveau du Louvre, qui présentent des structures morphologiques typiques d'*A. oxyrinchus* (Desse-Berset, sous presse). Ces données permettent d'étendre l'aire de répartition effective de l'espèce en Europe, et permettent de construire des scénarii évolutifs au sujet de l'arrivée d'*A. oxyrinchus* en Europe.

3) ils confirment la possibilité d'hybridation et d'introggression entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus*, ainsi que l'utilité du jeu de marqueurs nucléaires diagnostiques établi dans l'article n°1 pour la détection des individus hybrides et introgressés. De plus l'existence de populations plus introgressées que d'autres est suggérée par la présence de deux hybrides sur trois spécimens capturés dans la Seine alors que dans la Loire, les deux *A. sturio* et les deux *A. oxyrinchus* identifiés ne montrent pas

de signes d'hybridation ni d'introggression. Au vu des résultats obtenus ici et de ceux obtenus par Ludwig *et al.* (2008) sur la région baltique, l'introggression de gènes d'*A. oxyrinchus* vers *A. sturio* (5 individus) semble plus importante que celle de gènes d'*A. sturio* vers *A. oxyrinchus* (1 individu).

4) ils élargissent les connaissances génétiques sur les esturgeons *A. oxyrinchus* installés en Europe, aussi bien au niveau mitochondrial que nucléaire. L'haplotype mitochondrial B a en effet été détecté sur un spécimen capturé dans l'estuaire de la Veronne alors qu'il n'avait jamais été identifié en Europe. Cet haplotype se rajoute à ceux déjà précédemment découverts en Baltique (majoritairement A, plus une occurrence pour les haplotypes BS1 et BS2) et au Royaume-Uni (uniquement A). L'haplotype B est présent en Amérique du Nord uniquement dans les populations des fleuves Hudson et Delaware (Wirgin *et al.* 2000 ; Waldman *et al.* 2002 ; Grunwald *et al.* 2007 ; Wirgin *et al.* 2007), et sa présence en Europe pourrait indiquer la participation d'individus de ces populations américaines à la fondation de la population européenne ; l'hypothèse d'une mutation locale à partir de l'haplotype A est également possible puisqu'une seule substitution sépare les haplotypes mitochondriaux A et B d'*A. oxyrinchus*. Au niveau nucléaire, les génotypes des six spécimens de musée de l'espèce *A. oxyrinchus* ou hybrides *A. sturio* - *A. oxyrinchus* ont été obtenus (voir la partie III-A-2 pour des détails sur les méthodes utilisées) ; comparé aux génotypes d'individus de trois populations nord-américaines d'*A. oxyrinchus* ainsi qu'aux génotypes de l'ensemble des *A. sturio* analysés à ce jour (spécimens actuels de Gironde et échantillons anciens publiés ou analysés dans cette thèse, voir partie III-B-5), les génotypes des quatre *A. oxyrinchus* purs et des deux hybrides introgressés se groupent avec ceux d'*A. oxyrinchus* – résultat cohérent avec Ludwig *et al.* (2008).

### ■ Discussion des résultats : hypothèses évolutives sur *A. oxyrinchus*

Au vu de l'ensemble des résultats, l'arrivée d'*A. oxyrinchus* en Europe semble s'être produite bien avant la colonisation de la Baltique vers 1,2 ka BP et avoir concerné une bonne partie de la façade atlantique européenne.

Les hypothèses envisageables pour cette colonisation sont exposées à la figure II-19 qui présente un scénario en quatre étapes :



1) La colonisation des fleuves septentrionaux nord américains. Lors du dernier maximum glaciaire (LGM par la suite), les fleuves américains les plus septentrionaux étaient gelés et donc inoccupés par les esturgeons. Après la déglaciation, ces fleuves furent recolonisés par *A. oxyrinchus*. Cette recolonisation se serait produite vers 12-10 ka BP (Wirgin *et al.* 2000) avec effet fondateur à partir des populations méridionales qui elles existent sans doute depuis des millions d'années sans discontinuité ; cet effet fondateur se matérialise au niveau génétique par la fixation d'un seul haplotype mitochondrial (haplotype A) dans les populations canadiennes post-glaciaires (St Laurent, St John), alors que les populations plus au sud (à partir du fleuve Hudson) sont chacune caractérisées par 4 à 18 haplotypes mitochondriaux différents (Grunwald *et al.* 2007). Au niveau nucléaire aussi, l'hétérozygotie et la diversité allélique des microsatellites sont bien plus faibles dans les populations canadiennes que dans les populations plus au sud (Ludwig *et al.* 2008).

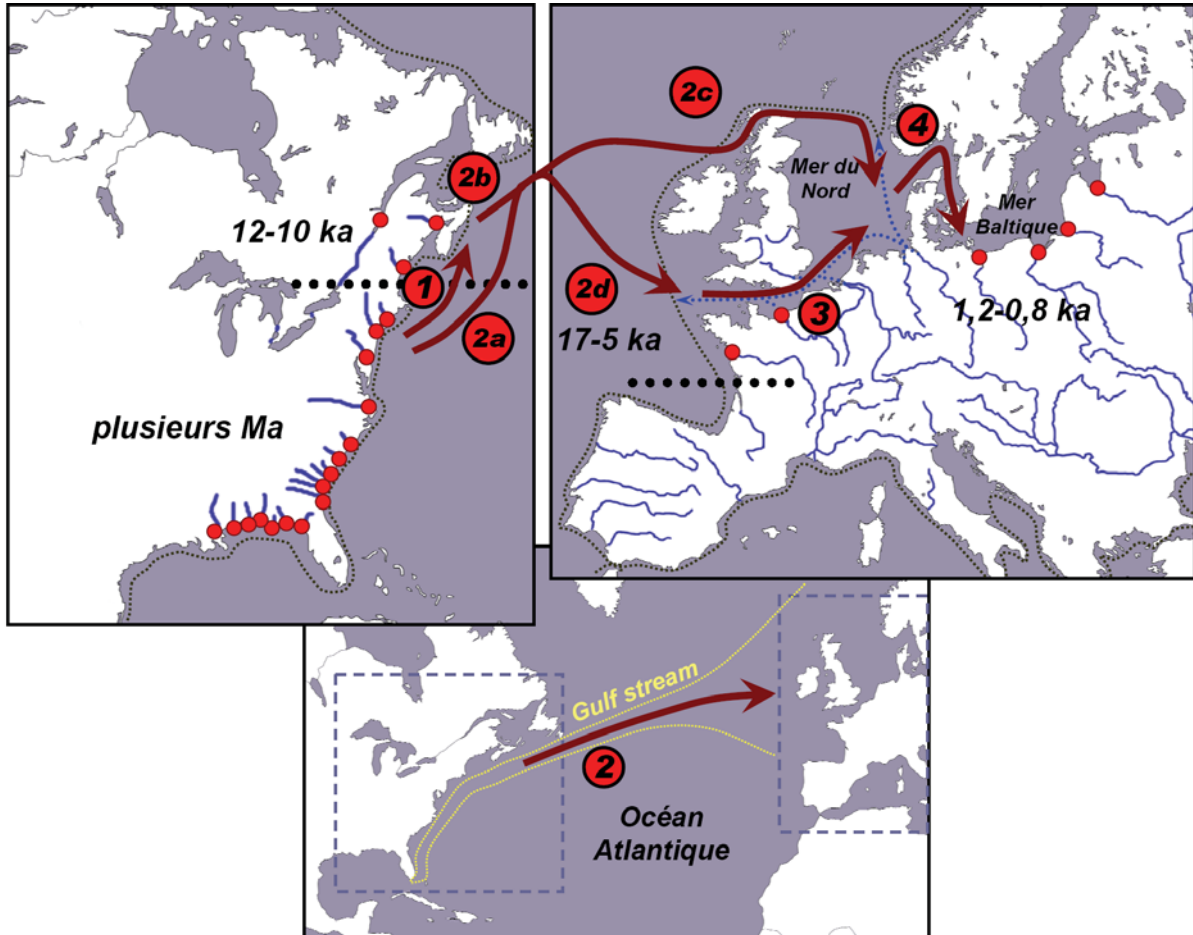
2) La colonisation de la côte atlantique européenne. La présence d'*A. oxyrinchus* est attestée sur les côtes françaises vers 5 ka BP (site de Ponthezières, Desse-Berset 2009a et article n°2 de cette thèse). Une calotte de glace recouvrant l'Europe du Nord jusqu'à la fin du LGM vers 17 ka BP, l'arrivée des esturgeons en Europe date probablement de 17-5 ka BP. Les populations source pourraient être les mêmes que celles à partir desquelles les fleuves canadiens ont été recolonisés (flèche 2a), mais la probabilité pour que deux événements fondateurs indépendants aboutissent à la fixation du même haplotype est faible (la fréquence de l'haplotype A est d'environ 25% dans l'Hudson et de 35% dans le Delaware, les deux fleuves non gelés lors de la dernière glaciation situés les plus au nord). Il est donc probable que la population européenne ait été fondée à partir d'individus provenant des fleuves canadiens néo-colonisés et présentant des populations durables (flèche 2b), avec une participation faible des populations issues des fleuves américains non gelés (flèche 2a) ; dans ce cas l'intervalle d'arrivée des esturgeons en Europe peut être affiné entre 10 et 5 ka BP. Même si les esturgeons ne quittent normalement pas le plateau continental (Rochard *et al.* 1997 ; Billard & Lecointre 2001), il est probable que les migrants aient traversé l'océan Atlantique en pleine mer portés par le Gulfstream (un passage par la côte nord du Labrador puis par la côte sud du Groenland et l'Islande serait étonnant mais pas exclu). La zone d'arrivée en Europe fut sans doute le plateau continental au large de l'Irlande, et les esturgeons ont alors soit bifurqué vers le sud pour rejoindre

la façade atlantique française (flèche 2c), soit vers le nord pour rejoindre la Mer du Nord (flèche 2d). Des populations d'*A. oxyrinchus* se sont alors installées par effet fondateur, sûrement sur la façade atlantique française (Loire, Seine où elles ont sans doute subsisté jusqu'à leur extinction au 20<sup>e</sup> siècle ; pour une discussion sur la Gironde voir plus loin), peut-être en Mer du Nord.

3) La colonisation de la Mer du Nord. Le niveau marin étant plus bas qu'aujourd'hui lors du LGM, la Mer du Nord était alors un plateau émergé et partiellement recouvert de glaces continentales. Avec la montée du niveau marin, la Mer du Nord a progressivement été mise en eau jusqu'à son niveau actuel, atteint vers 6 ka BP (Gibbard 1988). Les analyses archéoichthyologiques de plusieurs sites (Ludwig *et al.* 2002b ; voir figure II-18) n'indiquent pas la présence d'*A. oxyrinchus* en Mer du Nord après 5 ka BP, alors que dans cet intervalle récent il était présent plus à l'ouest (Desse-Berset 2009a et article n°2 de cette thèse). L'analyse de nouveaux restes archéologiques est nécessaire afin de déterminer si des populations d'*A. oxyrinchus* se sont installées dans les fleuves tributaires de la Mer du Nord, que ce soit en passant par le nord directement en provenance d'Amérique (flèche 2c) ou par le sud par les côtes françaises (flèche 3). Aucune donnée ne permet pour l'instant de savoir si des populations d'*A. oxyrinchus* ont vécu en Mer du Nord à une période donnée.

4) La colonisation de la Mer Baltique. Ludwig *et al.* (2002b) ont montré qu'*A. oxyrinchus* était présent en Mer Baltique vers 1,2 ka BP et que les populations avaient subsisté jusqu'à l'extinction locale des esturgeons. L'installation des populations baltiques s'est encore produite par effet fondateur sans doute à partir d'un sous-échantillon des populations déjà installées ailleurs en Europe (Loire, Seine ? selon les arguments paléogéographiques exposés plus haut). Dans ce scénario biogéographique, le nombre successif de goulots démographiques subits par les esturgeons de la Baltique se porte donc à trois (fleuves américains non gelés → gelés ; fleuves américains gelés → façade atlantique européenne ; façade atlantique européenne → Mer Baltique). La diversité génétique des populations baltiques est donc logiquement faible, et proche de celle des populations canadiennes (Ludwig *et al.* 2008). A partir de ces données génétiques Ludwig *et al.* (2008) ont estimé que la population de la Baltique avait été fondée par 3 à 20 individus – ce qui est extrêmement faible – et ils ont proposé les populations

canadiennes comme source. La population baltique ayant plus probablement été fondée par des *A. oxyrinchus* déjà installés en Europe, le nombre de fondateurs pourrait être bien plus élevé en réalité.



**Figure II-19 :** Schéma hypothétique de l'arrivée de l'esturgeon atlantique *A. oxyrinchus* en Europe depuis l'Amérique du Nord. Les pointillés noirs indiquent le trait de côte au moment du dernier maximum glaciaire (vers 25-20 ka BP ; Ehlers & Gibbard 2004) et les pointillés bleu les paléo-fleuves du Nord de l'Europe (Fleuve Manche et paléo-Elbe ; Toucanne 2010). Le trait horizontal noir pointillé représente la limite sud des fleuves gelés en permanence pendant cette période. Les points rouges indiquent les populations fonctionnelles d'*A. oxyrinchus* (réelles en Amérique, probables en Europe) et les dates correspondent à leur âge possible (pour les populations européennes, une fourchette est indiquée pour tenir compte de l'incertitude). Les numéros correspondent aux différentes étapes de migration 1- colonisation des fleuves gelés nord-américains après la déglaciation 2- colonisation de l'Europe depuis l'Amérique (2a / 2b à partir des populations américaines des fleuves non gelés / gelés recolonisés ; 2c / 2d vers le fleuve Manche / le Nord de l'Angleterre) 3- colonisation de la Mer du Nord (hypothèse alternative à 2c) 4- colonisation de la mer Baltique.

### ■ Discussion des résultats : hypothèses sur les interactions *A. sturio* / *A. oxyrinchus* en Europe

La colonisation des fleuves européens par *A. oxyrinchus* n'a pas été dépendante que du climat et des courants marins. Les interactions avec son espèce sœur *A. sturio* ont sans doute également joué un grand rôle, même si nous ne disposons que de peu d'informations à ce sujet. Réciproquement, l'arrivée d'*A. oxyrinchus* en Europe a sans doute conditionné le patron biogéographique de l'esturgeon européen sur la façade atlantique, d'où l'importance de traiter ce thème. Les principaux points seront exposés ici, mais cette discussion sera poursuivie dans la partie III-B-6 dédiée à l'étude de la diversité génétique de l'espèce *A. sturio*.

Lors du LGM, les conditions climatiques ne permettaient pas la survie de populations d'esturgeons au Nord de l'Europe, qui était occupé par une calotte glaciaire (Clark *et al.* 2009). Le permafrost s'étendait sur une grande partie du continent et seuls les fleuves au sud du 45° de latitude n'étaient pas gelés en permanence (Renssen & Vandenberghe 2003). L'esturgeon européen a donc sans doute subsisté pendant la dernière glaciation dans les fleuves de la façade atlantique ibérique et de la Méditerranée.

Lors du dégel entre 20-17 ka BP, des fleuves puissants (et froids) ont charrié les eaux de fonte de la calotte européenne, en particulier le fleuve Manche (qui drainait les eaux de la Tamise, du Rhin et de la Seine actuels et se déversait au large de la Bretagne) et le paléo-Elbe (qui se déversait par période soit dans le fleuve Manche soit directement dans l'océan entre l'Ecosse et la Norvège) (Toucanne *et al.* 2010). Les eaux de fonte extrêmement froides et le climat encore rude n'ont sans doute pas rendu possible la colonisation de ces fleuves périglaciaires par les esturgeons avant les réchauffements de l'interstade Bölling-Alleröd (ca 15-13 ka BP) puis de l'Holocène (après 10 ka BP) entre lesquels eut lieu l'épisode froid du Younger Dryas (ca 12 ka BP), caractérisé par une extension du permafrost jusqu'en Ecosse et au Danemark (Isarin & Renssen 1999).



**Figure II-20 :** Schéma hypothétique indiquant les voies de recolonisation post-glaciaire des fleuves d'Europe du Nord par *A. sturio*. Même légende qu'à la figure II-19 sauf que les points bleus indiquent les populations d'*A. sturio* fonctionnelles. Les dates font référence aux intervalles de colonisation possibles au vu des données climatiques et archéologiques.

L'esturgeon européen *A. sturio* a probablement recolonisé les fleuves européens gelés à partir des refuges ibériques et/ou de la Gironde (flèche 1 de la figure II-20), et ce à peu près en même temps qu'*A. oxyrinchus* arrivait d'Amérique. Les deux espèces sont donc sans doute entrées en compétition pour la colonisation des fleuves libérés des glaces, *A. oxyrinchus* ayant un avantage car il est plus adapté aux conditions froides qu'*A. sturio*. En effet, *A. sturio* fraie dans une eau entre 18 et 20 °C alors qu'*A. oxyrinchus* peut fraier dans une eau entre 13°C (populations canadiennes) et 26°C (populations du Golfe du Mexique) (Ludwig & Gessner 2007).

Néanmoins, le nombre de migrants venant des populations d'*A. sturio* de Gironde ou d'Ibérie était sans doute beaucoup plus important que celui des *A. oxyrinchus* traversant par hasard l'Atlantique ; désavantagé par la physiologie, *A. sturio* était pourtant favorisé par le nombre, ce qui pourrait expliquer sa percée en Mer du Nord alors qu'*A. oxyrinchus* ne semble pas s'y être installé (du moins en était-il absent postérieurement à 5 ka BP d'après Ludwig *et al.* 2002b).

Enfin, *A. sturio* semble avoir été le premier à coloniser la Mer Baltique, comme en atteste les restes archéologiques exhumés dans la région vers 1,5 ka BP (Ludwig *et al.* 2002b). L'histoire post-glaciaire de la zone baltique est complexe mais peut être

résumée en deux phases : (i) entre 18 et 8 ka BP elle est occupée par un ou plusieurs lacs d'eau douce provenant de la fonte de la calotte glaciaire scandinave, (ii) après 8 ka BP le niveau de la mer dépasse l'altitude du détroit d'Oresund, la zone baltique est alors inondée et devient une mer en contact avec la Mer du Nord (Bjorck 1995). La colonisation de la Baltique par *A. sturio* s'est donc déroulée entre 8 et 1,5 ka BP (flèche 2 de la figure II-20). Vers 1,2 ka BP, cette population d'*A. sturio* a commencé à décliner et a été remplacée par une population d'*A. oxyrinchus*. La différence de température de fraie a été avancée par Ludwig *et al.* (2002b) pour expliquer ce remplacement.

### ■ Discussion des résultats : sur la conservation de l'esturgeon européen

L'identification de l'esturgeon atlantique *A. oxyrinchus* en France est un fait à prendre en compte. Comme la découverte de cette espèce en Baltique, elle pourrait conduire à l'idée d'une réintroduction d'*A. oxyrinchus* dans les fleuves français tels que la Seine et la Loire.

Pour plusieurs raisons, une telle réintroduction est peu pertinente à l'heure actuelle (tant qu'il reste un espoir de survie dans le milieu naturel pour *A. sturio*) :

1) il ne reste qu'une seule population d'esturgeon *A. sturio* au monde, alors que plus d'une douzaine de populations d'esturgeon *A. oxyrinchus* – souvent en relative bonne santé – vivent en Amérique du Nord. *A. sturio* est donc une priorité en conservation, dans une zone géographique d'où elle est a priori native depuis plus longtemps qu'*A. oxyrinchus*.

2) la dernière population d'*A. sturio* est par ailleurs en danger critique d'extinction, et les deux espèces pouvant s'hybrider et donner une descendance fertile, le risque de voir le patrimoine génétique d'*A. sturio* dilué par introgression n'est pas négligeable. L'espèce *A. sturio* pourrait alors tout bonnement disparaître par hybridation (Rhymer & Simberloff 1996 ; Allendorf *et al.* 2001). Ce risque existe déjà avec la réintroduction d'*A. oxyrinchus* en Mer Baltique (des captures d'individus ont déjà été reportées en Mer du Nord ; Eric Rochard, communication personnelle), et serait très important si cette espèce était réintroduite à proximité de la Gironde. Le nombre de reproducteurs de la population relictuelle de Gironde étant très bas, un seul croisement entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus* pourrait menacer la population toute entière.

3) la population européenne d'*A. oxyrinchus* a une identité uniquement géographique, son histoire évolutive étant partagée avec celle des populations canadiennes (puisqu'elle en est issue et n'a pas eu le temps de diverger en quelques milliers d'années) qui ne sont pas une priorité en conservation. Etendre la distribution d'*A. sturio* en Europe du Nord aurait donc plus de sens, en particulier en regard des modifications climatiques qui devraient conduire à un décalage des zones propices aux esturgeons vers le Nord.

### ■ Discussion des résultats : sur l'influence des paradigmes

Parmi les spécimens de musée des 19<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> siècles analysés dans l'article 2 de cette thèse, 16 proviennent du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris. Ces spécimens ont fait l'objet d'une analyse morphologique par Magnin (1964), qui les avait utilisés pour affirmer que les critères morphologiques qu'il avait établis pour discriminer *A. sturio* et *A. oxyrinchus* étaient valables quelle que soit l'origine géographique des individus.

Si les critères distinctifs avancés par Magnin sont bien pertinents (en particulier l'aspect superficiel alvéolé ou tuberculé des écailles ainsi que le nombre d'écailles dorsales et latérales), il est étonnant qu'il n'ait pas identifié les trois spécimens du MNHN étiquetés *A. sturio* mais présentant des critères typiques d'*A. oxyrinchus* (voir les figures S1 et S2 de l'article n°2 pour des photos des écailles et un graphique indiquant le nombre d'écailles dermiques dorsales et latérales ; codes MNHN 3108, 3115, 3573). Etant persuadé de leur appartenance à l'espèce *A. sturio* par leur origine géographique française, Magnin les a sans doute considérés comme des exceptions qui confirment la règle.

L'histoire des études du couple *A. sturio* / *A. oxyrinchus* nous rappelle donc un point primordial dans l'attitude du scientifique : garder l'esprit ouvert et ne pas s'enfermer dans des chemins de pensée routiniers.

II-C-2-e Sur les limites de la distribution géographique d'*A. oxyrinchus* en Europe

Au cours de cette thèse, nous avons identifié un spécimen de musée pêché dans le bassin méditerranéen comme étant un hybride, possédant l'ADNmt d'*A. oxyrinchus* et un mélange d'allèles nucléaires d'*A. sturio* et *A. oxyrinchus* (code musée MNHNîmes 245, code labo CH554) ; il a été pêché dans le Rhône en 1871. Cet individu porte l'haplotype mitochondrial A, comme l'écrasante majorité des *A. oxyrinchus* d'Europe, et ne s'en distingue pas non plus par ses allèles microsattellites. L'homogénéité d'*A. oxyrinchus* en Europe limite le pouvoir de discrimination des marqueurs génétiques et ne permet pas de trancher sur l'origine locale ou non de cet esturgeon.

D'autres mentions d'*A. oxyrinchus* en Méditerranée occidentale ont été faites par les équipes de recherche espagnoles de Séville et de Cadix à l'origine de la polémique au sujet d'*A. naccarii* en péninsule ibérique et en Méditerranée occidentale (Garrido-Ramos *et al.* 2009).

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer l'identification d'*A. oxyrinchus* en Méditerranée :

- l'hypothèse d'une contamination lors des analyses génétiques peut être éliminée pour le spécimen CH554, car nous avons respecté des conditions expérimentales strictes (voir Annexe 1), parce que la quantification par qPCR indique une quantité importante d'ADN endogène (voir Annexe 5), et parce que les résultats obtenus sont cohérents avec notre connaissance génétique d'*A. oxyrinchus* en Europe ;
- les spécimens pourraient avoir été mal étiquetés à leur arrivée au musée, et pourraient en fait provenir d'autres populations européennes. L'homogénéité génétique d'*A. oxyrinchus* en Europe ne permet pas de trancher sur ce point ;
- les spécimens pourraient avoir été correctement étiquetés et provenir malgré tout d'autres populations d'*A. oxyrinchus* installées en Europe ; la non identification d'*A. oxyrinchus* dans les restes archéologiques de Méditerranée occidentale et de péninsule ibérique (jeu de données II-C-1-c de l'Annexe 3 et Ludwig *et al.* 2009c), la possibilité pour *A. oxyrinchus* d'effectuer ponctuellement de longues migrations (la traversée de l'Atlantique par exemple, voir Ludwig *et al.* 2002b) et le vagabondage



reporté d'individus dans des estuaires où ils ne sont pas nés (Secor & Waldman 1999) plaident en la faveur de cette hypothèse. Là encore l'homogénéité génétique d'*A. oxyrinchus* en Europe ne permet pas de trancher.

- les spécimens pourraient provenir de populations installées en Méditerranée occidentale, dans le Rhône ou dans l'Ebre. Le faible nombre d'individus trouvés, ainsi que toutes les raisons citées au point précédent s'opposent cependant fortement à cette hypothèse.

En conclusion, d'avantages d'arguments doivent être apportés pour affirmer la présence de populations fonctionnelles d'*A. oxyrinchus* en Méditerranée. Dans l'état actuel des connaissances, l'hypothèse de captures ponctuelles d'individus vagabonds est la plus plausible.

## II-C-3 CONCLUSIONS



**Figure II-21 :** Distribution historique possible des esturgeons en Europe il y a 200 ans, actualisée grâce aux études récentes de paléogénétique et de morphologie, ainsi que grâce aux données de cette thèse. Les points correspondent aux populations fonctionnelles supposées, les pointillés aux aires de répartition marines supposées.

Les données que nous venons de développer nous permettent désormais de répondre aux interrogations qui restaient en suspens à la fin de la partie II-A et d'actualiser la figure II-3 (Figure II-21) :

- la sympatrie entre *A. sturio* et *A. naccarii* était probablement restreinte à la Mer Adriatique, car l'existence de populations fonctionnelles d'*A. naccarii* en Méditerranée occidentale n'est pas avérée ;
- la sympatrie entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus* s'étendait probablement en dehors de la Mer Baltique, avec de possibles populations fonctionnelles d'*A. oxyrinchus* dans la Seine ou la Loire ;

- *A. oxyrinchus* serait arrivé en Europe bien avant le Moyen-Âge, probablement après la fin du dernier maximum glaciaire ou au début de l'Holocène ; ce point reste à documenter à l'aide de restes archéologiques ;
- *A. oxyrinchus* et *A. sturio* sont probablement entrés en compétition pour la colonisation des habitats post-glaciaires, le premier étant favorisé par sa plus grande tolérance thermique, le second par la proximité de populations importantes en Europe du Sud. La nature précise de ces interactions reste inconnue tant qu'un nombre important de restes archéologiques datant de la première partie de l'Holocène ne sera pas exhumé et étudié ;
- *A. sturio* ne s'est à première vue pas hybridé avec *A. naccarii* dans leur zone de sympatrie, il n'y a donc pas eu d'échange de matériel génétique entre ces deux espèces ;
- *A. sturio* et *A. oxyrinchus* se sont hybridés en France et en Mer Baltique, avec un taux apparemment variable suivant les populations (sans doute dépendant du ratio des deux espèces). Les hybrides, en se croisant avec les espèces parentales, ont conduit à de l'introggression c'est-à-dire à un échange de matériel génétique entre les deux espèces. L'importance de ces flux de gènes et leurs conséquences sont à étudier plus en détail.

Les interactions avec les autres espèces d'esturgeon présentes en Europe ont sans doute influencé l'histoire évolutive récente de l'esturgeon européen *A. sturio*, au même titre que d'autres paramètres tels que le climat ou les activités humaines. Ces influences ont été exceptionnellement importantes du fait de la distribution ancienne d'*A. sturio*, la plus étendue parmi les espèces d'esturgeon européennes, permettant le développement de populations sous des climats très variés et le contact sympatrique avec de nombreuses autres espèces d'esturgeons. L'analyse de la diversité génétique intraspécifique peut permettre de détecter l'empreinte de tels facteurs, ce à quoi nous allons nous intéresser dans la troisième partie de cette thèse.

## CHAPITRE III

### DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ L'ESTURGEON EUROPEEN *A. STURIO*

#### Publications associées

Article n°3 :

Chassaing O. *et al* (en préparation). Microsatellites on ancient DNA : pitfalls and potential.

Article n°4 :

Chassaing O. *et al* (en préparation). Phylogeography of the endangered European sturgeon *Acipenser sturio* : what we lost.

Article n°5 :

Chassaing O. *et al* (en préparation). Diachronic study of the extinct sturgeon population from the Rhone River (France).

### **RESUME :**

La diversité intraspécifique de l'esturgeon européen restait méconnue jusqu'à présent, essentiellement à cause de la disparition de presque toutes les populations. Nous avons analysé plus d'une centaine de restes anciens d'esturgeon européen couvrant la distribution historique de l'espèce par les méthodes paléogénétiques. Les marqueurs génétiques les plus variables ont été utilisés : la région de contrôle de l'ADNmt et cinq marqueurs microsatellites nucléaires. L'étude des microsatellites sur substrat ADN dégradé nécessite une méthodologie adaptée, que nous avons définie et à laquelle nous nous sommes conformés.

La diversité génétique historique de l'esturgeon européen était importante, particulièrement au cœur de la distribution (Ibérie atlantique, Méditerranée occidentale et Adriatique). Les marges de la distribution (Atlantique - Europe du Nord et Mer Noire) étaient moins variables, probablement en raison d'événements de colonisation récents. L'origine possible des patrons phylogéographiques observés a été discutée.

Le suivi des populations du Rhône et de la Gironde au cours du temps permet par ailleurs de relativiser le statut de la population actuelle de Gironde et fournit des informations potentiellement utiles à la conservation de l'espèce.

### **ABSTRACT:**

Intraspecific diversity of the European sturgeon was poorly known until now, because almost all natural populations got extinct. We analysed by paleogenetics means more than one hundred ancient sturgeon remains from the entire former range of the species. Variable genetic markers have been used: the control region of mtDNA and five nuclear microsatellites. Analysing microsatellites on degraded DNA requires specific methodologies, which were defined and used in this thesis.

Genetic diversity of the European sturgeon was high, especially in the geographic core of the distribution (Atlantic Iberia, Western Mediterranean and Adriatic). Margins of the distribution (Atlantic - Northern Europe and the Black Sea) were less variable, probably because they were recently colonized. Origins of observed phylogeographic patterns were discussed.

Diachronic study of Rhône River and Gironde populations allows comparisons with the extant Gironde population and provides informations useful for the conservation of the species.

### **III- DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ L'ESTURGEON EUROPEEN**

#### **ACIPENSER STURIO**

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, toutes les populations d'esturgeon européen sauf celle de Gironde se sont éteintes au cours des deux derniers siècles. De fait, la mesure de la diversité intraspécifique qui existait au sein de l'espèce ne peut se faire que par l'analyse de matériel ancien, que ce soit des restes archéologiques ou bien des spécimens conservés dans les musées.

#### **III-A COMMENT LA MESURER ?**

##### ***III-A-1 LA MORPHOLOGIE***

Sur l'ensemble de l'aire de répartition préindustrielle d'*A. sturio*, aucune sous-espèce ou variant morphologique n'a été identifié. Les populations de Mer Noire, de Mer Adriatique, de Mer Méditerranée et de l'Océan Atlantique sont morphologiquement similaires (D'Ancona 1924 ; Classen 1944 ; Paccagnella 1948 ; Magnin & Beaulieu 1963 ; Ninua 1976 ; discussion dans Holcik, 1989 ; Doda *et al.* 1981). La seule variation importante reportée concernait la population d'esturgeons de la Mer Baltique, mais nous avons vu dans le chapitre précédent que cette population était en fait constituée d'esturgeons atlantiques *A. oxyrinchus* : les variations observées étaient donc interspécifiques et non pas intraspécifiques.

L'homogénéité morphologique au sein de l'espèce *A. sturio* pourrait résulter de plusieurs facteurs non exclusifs :

1) un faible taux d'évolution. Les Acipensériformes sont caractérisés par un faible taux d'évolution, au niveau moléculaire (Krieger & Fuerst 2002) et morphologique (les espèces du groupe montrant une grande ressemblance malgré parfois plusieurs dizaines de millions d'années de divergence). Une évolution lente prévient la différenciation morphologique dans le sens où des populations isolées mettront plus de temps à acquérir des caractères propres les distinguant les unes des autres.

2) une histoire évolutive commune dans un passé récent. Si les populations qui étaient installées aux marges de la distribution proviennent de colonisations récentes, il est normal qu'elles n'aient pas eu le temps de diverger morphologiquement des populations sources dont elles sont issues.

3) des flux migratoires non négligeables. Les migrations entre populations ont tendance à limiter l'adaptation locale et la différenciation (Spieth 1974), même lorsque le taux de migration est faible (Mills & Allendorf 1996). La fidélité des esturgeons européens à leur fleuve natal est importante (Williot *et al.* 1997), mais nous ignorons les capacités d'expansion de cette espèce vers des rivières sans concurrence conspécifique.

A noter que contrairement à son espèce sœur *A. sturio*, deux sous-espèces d'esturgeon atlantique – *A. oxyrinchus oxyrinchus* sur la façade atlantique et *A. oxyrinchus desotoi* dans le Golfe du Mexique – sont distinguables par certains critères morphologiques, en particulier la longueur de la rate (Vladykov 1955). Ces deux sous-espèces sont séparées géographiquement par le détroit de Floride et sont probablement isolées depuis longtemps, ce qui pourrait expliquer leur différenciation morphologique (même si elle reste très faible, ce qui est en accord avec les observations effectuées chez *A. sturio*).

Puisque les données morphologiques ne permettent pas de détecter de diversité intraspécifique chez *A. sturio*, passons aux données moléculaires.

### **III-A-2 L'ADN MITOCHONDRIAL**

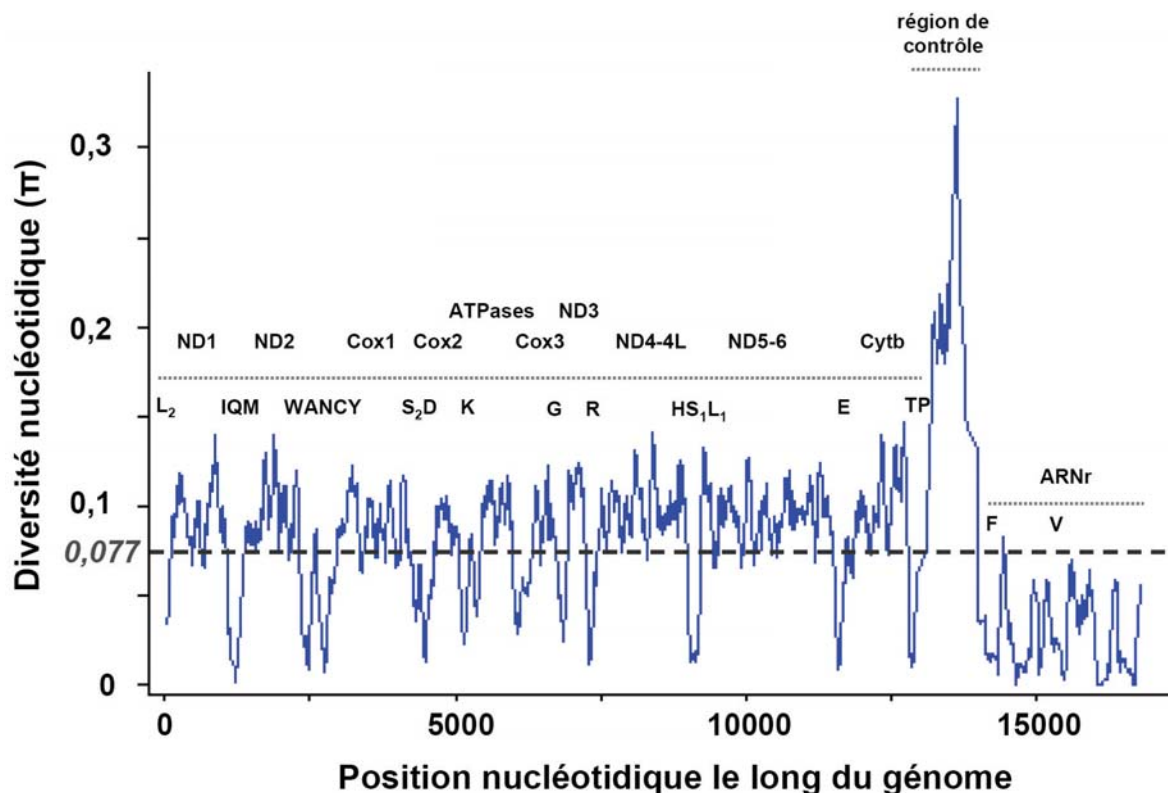
#### III-A-2-a La zone la plus variable : la région de contrôle

##### ■ Diversité nucléotidique le long de l'ADNmt entre Acipensériformes

La diversité nucléotidique ( $\pi$ ) d'un jeu de séquences correspond au nombre moyen de substitutions par site (nucléotide) entre paires de séquences (Nei & Li 1979 ; Nei 1987). Par exemple  $\pi = 0,1$  signifie qu'en moyenne un site sur dix diffère entre paires de séquences. La diversité nucléotidique est utilisée comme un indicateur du polymorphisme existant au sein d'une espèce (voir par exemple Horai

& Hayasaka 1990) ou entre espèces (par exemple voir Ironside & Filatov 2005). La diversité nucléotidique d'un jeu de séquences de grande taille peut être calculée par portion de taille définie, afin d'identifier les portions les plus polymorphes.

Afin d'identifier les régions interspécifiques les plus variables du génome mitochondrial des Acipensériformes, le calcul de la diversité nucléotidique a été réalisé à partir de 11 génomes mitochondriaux complets (Figure III-1). Ont été inclus neuf génomes complets disponibles dans les banques de données publiques, plus ceux d'*A. sturio* et *A. oxyrinchus* obtenus au cours de cette thèse par PCR chevauchantes et séquençage.



**Figure III-1 :** Diversité nucléotidique calculée grâce au logiciel DNAsp 5 (Librado & Rozas 2009) à partir des génomes mitochondriaux complets de *Psephurus gladius* (AY571339), *Polyodon spathula* (AY510086), *Scaphirynchus albus* (AP004354), *Huso huso* (AY442351), *Acipenser stellatus* (AJ585050), *A. gueldenstaedtii* (FJ392605), *A. transmontanus* (AB042837), *A. sinensis* (EU719645), *A. dabryanus* (AY510085), *A. sturio* (cette thèse) et *A. oxyrinchus* (cette thèse) alignés avec MUSCLE (Edgar 2004). La ligne en tirets indique la moyenne sur l'ensemble du génome. Les codes des protéines, ARNr (au-dessus des pointillés) et ARNt (en-dessous des pointillés) sont indiqués en regard de leur position le long du génome. Le calcul de  $\pi$  a été réalisé sur une fenêtre glissante couvrant 100 pb et décalée par pas de 25 pb, en utilisant la formule de Nei (1987).



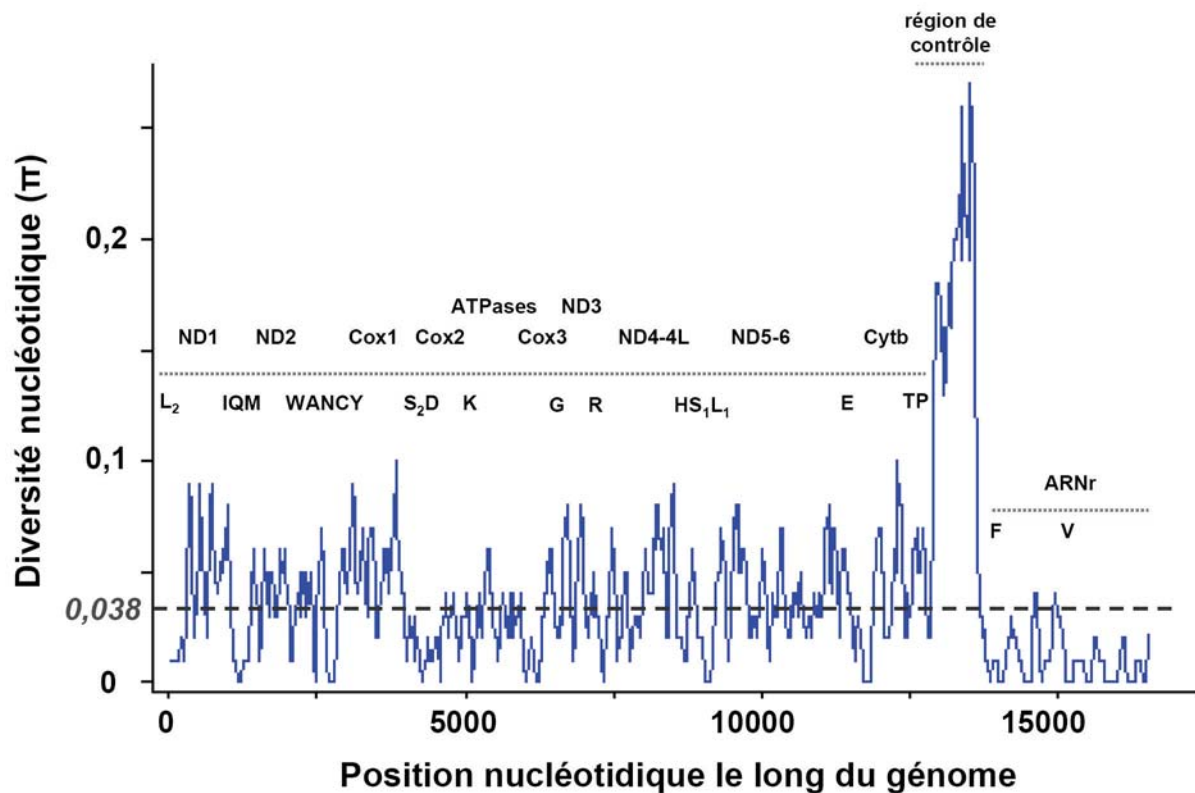
L'analyse de la figure III-1 révèle un polymorphisme nucléotidique de 7,7% sur l'ensemble du génome, avec des disparités suivant les régions :

- un polymorphisme très faible (< 5%) au niveau des gènes codant pour les ARNt, qui sont les portions les plus conservées du génome mitochondrial des Acipensériformes. Leur rôle d'intermédiaire unique lors de la traduction explique cette extrême conservation ;
- un polymorphisme globalement très faible (< 5%) au niveau des gènes codant pour les ARNr (12S et 16S) avec néanmoins certaines portions plus variables ( $\pi \approx 5\%$ ). L'alternance tige-boucle explique cette variabilité dans la diversité nucléotidique, les boucles étant généralement plus variables que les tiges chez les Eucaryotes (Smit *et al.* 2007). Les fonctions structurales des ARNrs lors de la traduction expliquent leur conservation importante ;
- un polymorphisme moyen (5-15%) au niveau des gènes codant les protéines mitochondriales. La majorité des mutations sont des substitutions en troisième position des codons (données non présentées), position présentant de nombreux synonymes (ne modifiant pas l'acide aminé codé). Ce polymorphisme en troisième position du codon est une situation commune à la quasi totalité des séquences codantes (Yang 1996) ;
- un polymorphisme élevé (15-30%) au niveau de la région de contrôle, principale région non codante de l'ADNmt. La divergence au sein du groupe des Acipensériformes résulte pour cette portion en de multiples substitutions (prises en compte dans le calcul de  $\pi$ ) et insertions/délétions (non prises en compte dans le calcul de  $\pi$ ). La région de contrôle est donc la région la plus variable de l'ADNmt chez les Acipensériformes, comme chez beaucoup d'autres taxons (Hoelzel *et al.* 1991 ; Lee *et al.* 1995). Elle est en particulier souvent plus variable que le Cyt *b*. En faisant l'hypothèse que les régions les plus variables au niveau interspécifique sont également les plus variables au niveau intraspécifique, la région de contrôle semble être le marqueur idéal pour l'analyse de la diversité génétique intraspécifique chez les esturgeons (Doukakis *et al.* 2005) et donc chez *A. sturio* en particulier.

### ■ Diversité nucléotidique entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus*

La comparaison directe des génomes d'*A. sturio* et *A. oxyrinchus* (Figure III-2) conduit aux mêmes résultats, avec néanmoins un polymorphisme nucléotidique globalement plus faible et des variations moins marquées entre régions du fait de la

proximité phylogénétique des deux espèces. La région de contrôle est la zone qui évolue le plus vite, avec une densité de sites polymorphes cinq fois plus importante que sur le reste du génome mitochondrial ( $\pi_{moyen} = 18,1\%$  contre  $3,8\%$  pour l'ensemble du génome). Cette région est donc potentiellement la plus pertinente à étudier pour analyser le polymorphisme intraspécifique chez *A. sturio*.



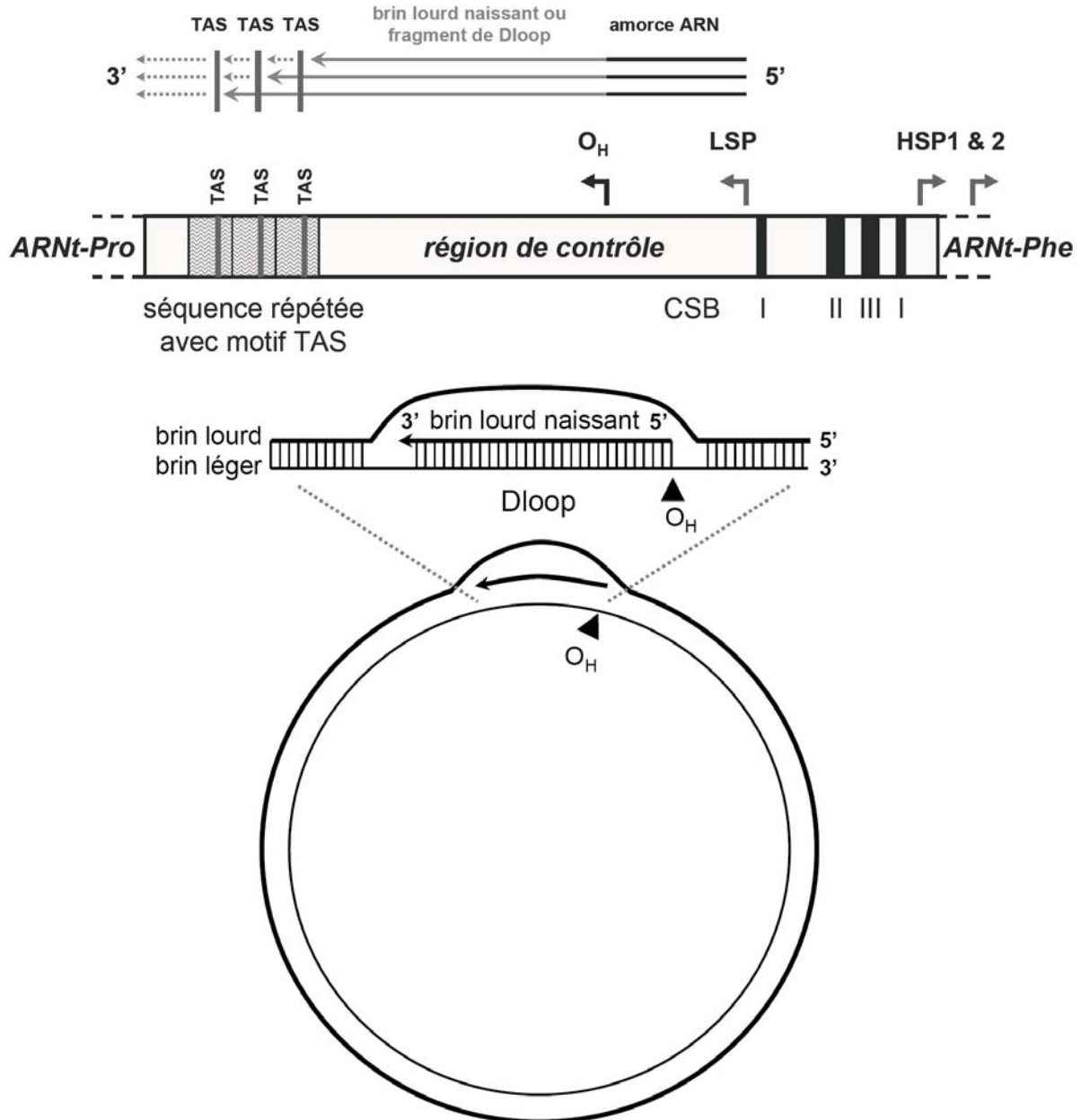
**Figure III-2 :** Diversité nucléotidique calculée à partir des génomes d'*A. sturio* et *A. oxyrinchus* (obtenus durant cette thèse) suivant la même procédure qu'à la Figure III-1.

### III-A-2-b Caractéristiques de la région de contrôle de l'ADNmt des esturgeons

#### ■ Description générale

La région de contrôle est la portion non codante la plus longue du génome mitochondrial chez tous les animaux. Chez les esturgeons elle comporte entre 800 et 1000 pb et sa structure générale (Figure III-3) est similaire à celle rencontrée chez les autres Vertébrés (Brown *et al.* 1986 ; Lee *et al.* 1995). Elle comprend en particulier trois blocs de séquences conservés (CSBI, II et III) ainsi que des motifs TAS (pour Termination Associated Sequences) – ACATTAAAPyPyAAT chez les

Mammifères (Doda *et al.* 1981), APyATTAAPyPy chez les esturgeons (Brown *et al.* 1992 ; Ludwig *et al.* 2000a) – impliqués dans la régulation de la réplication de l'ADNmt (Clayton 1991 ; Falkenberg *et al.* 2007).



**Figure III-3 :** Structure de la région de contrôle et rôle dans l'initiation de la réplication de l'ADNmt chez les esturgeons. Le brin lourd est indiqué en gras dans la deuxième partie de la figure. La D-loop est une zone ADN triple brin résultant d'une réplication limitée du brin lourd, stoppée au niveau de motifs de terminaison TAS. O<sub>H</sub> : origine de réplication du brin lourd, LSP : promoteur de la transcription du brin léger, HSP : promoteur de la transcription du brin lourd, CSB : bloc de séquence conservé dans la région de contrôle. Cette figure est inspirée de Doda *et al.* (1981), Brown *et al.* (1992) et Falkenberg *et al.* (2007).

Comme chez tous les animaux, la région de contrôle contient également les zones promotrices de la transcription des brins lourd et léger ainsi que l'origine de réplication du brin lourd. Généralement, l'initiation de la réplication du brin lourd se bloque – au moins temporairement – au niveau des motifs TAS (Bogenhagen & Clayton 1978), donnant une zone où l'ADN est sous forme triple brin avec le brin lourd matrice déplacé par le brin lourd naissant (Clayton 1991) : il s'agit de la D-loop, nommée ainsi d'après la forme schématisée en D de la boucle (Figure III-3). La Dloop ne couvre qu'une partie de la région de contrôle, mais les deux termes sont souvent abusivement utilisés comme synonymes (y compris dans cette thèse).

Bien que son évolution soit souvent considérée comme neutre (parce que non codante), certaines portions de la région de contrôle ont donc une importance fonctionnelle cruciale pour la régulation de la transcription et de la réplication de l'ADNmt. Les pressions de sélection qui s'exercent sur la région de contrôle sont néanmoins encore peu connues.

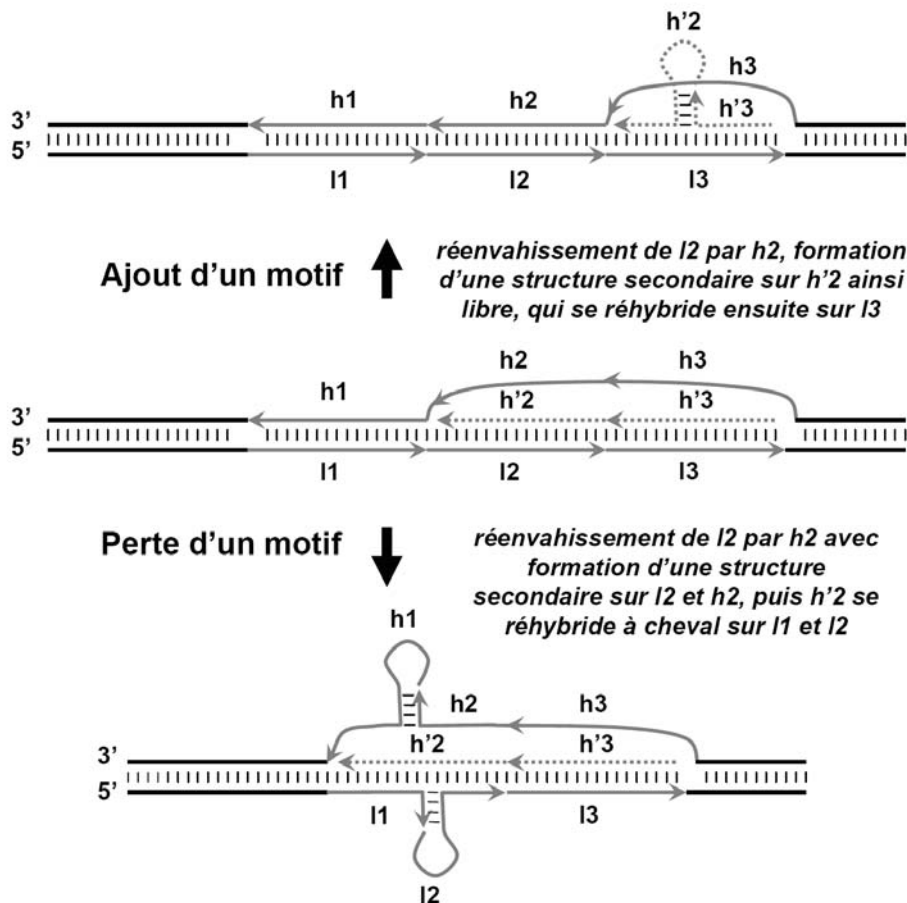
### ■ Motif répété et hétéroplasmie de longueur

Chez les esturgeons, la région proche de l'ARNt-Pro (ARN de transfert pour la proline) est caractérisée par la présence d'un motif répété en tandem d'environ 80 pb, chaque répétition incluant un motif TAS et pouvant adopter une structure secondaire simple brin (Brown *et al.* 1992 ; Brown *et al.* 1996 ; Ludwig & Jenneckens 2000). Le nombre de répétitions est variable en fonction des espèces et même parfois au sein d'un même individu. Le fait qu'un individu possède plusieurs variants de longueurs de l'ADNmt – différant par le nombre de motif répété en tandem – est appelé hétéroplasmie de longueur. C'est un phénomène très fréquent chez les esturgeons (Ludwig *et al.* 2000a). Lorsque plusieurs répétitions sont présentes en tandem, certaines d'entre elles peuvent être plus ou moins divergentes par rapport au motif canonique, indiquant un relâchement des contraintes sélectives sur les différentes copies.

Afin d'expliquer la génération de cette hétéroplasmie de longueur, Buroker *et al.* (1990) ont proposé un modèle basé sur la compétition entre le brin de Dloop et le brin lourd pour l'hybridation sur le brin léger (Figure III-4). Un alignement incorrect au niveau de la zone répétée avant la reprise de l'élongation conduit en effet à l'ajout ou

la perte d'un motif, opération facilitée par l'adoption d'une structure secondaire stable par le motif répété (que ce soit dans le brin de Dloop = ajout d'un motif, ou dans les brins léger et lourd = perte d'un motif). Les différentes répétitions en tandem n'ont pas besoin d'être parfaitement identiques pour qu'un tel phénomène se produise, mais elles doivent néanmoins pouvoir s'hybrider.

Chez l'esturgeon européen, la portion de région de contrôle suivant l'ARNt-Pro comprend un motif de 76 pb (dit imparfait) suivi d'un motif de 80 pb (dit parfait) qui peut être répété en tandem. Les motifs imparfait et parfait sont identiques en séquences à 80% (voir plus loin pour une discussion à la lumière des résultats obtenus au cours de cette thèse).

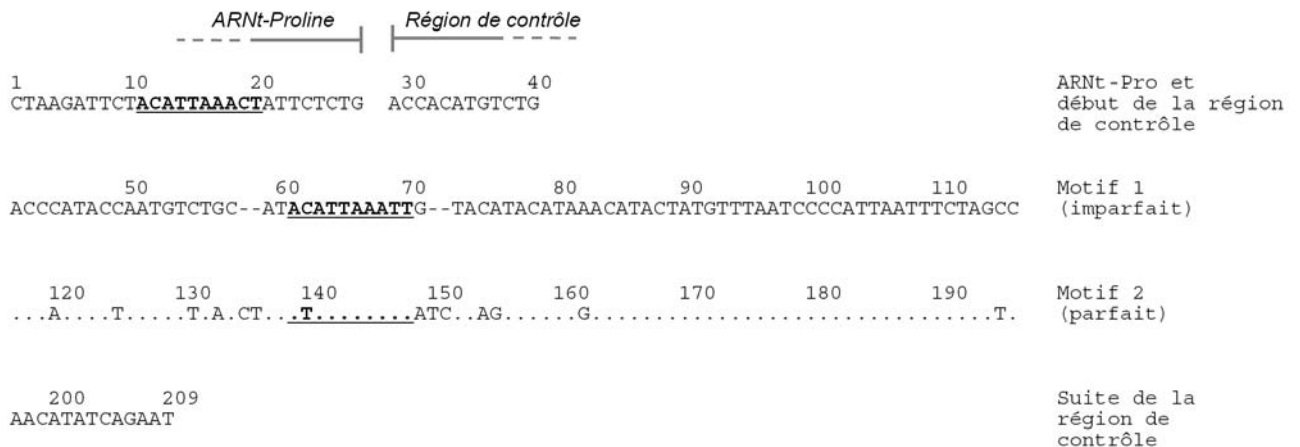


**Figure III-4 :** Modèle d'ajout ou de perte d'un motif répété lors de la réplication de la région de contrôle de l'ADNmt, modifié d'après Buroker *et al.* (1990). La molécule initiale comporte trois motifs répétés. Si le brin lourd réenvahit le brin léger, le brin de Dloop se trouve libre à son extrémité 3' ; dans cette configuration, si une structure secondaire simple brin se forme sur le brin de Dloop ou sur les brins lourds et légers, la réhybridation du brin de Dloop sur le brin léger conduit respectivement à l'ajout ou à la perte d'un motif.

III-A-2-c Utilisation de la région de contrôle comme marqueur de diversité intraspécifique chez *A. sturio*

■ La portion la plus étudiée : la zone répétée

Les zones les plus variables de la région de contrôle sont souvent différentes d'une espèce d'esturgeon à l'autre (Waldman *et al.* 2002 ; Doukakis *et al.* 2005), il est donc difficile de faire des extrapolations. Néanmoins au niveau de la zone comportant les motifs répétés en tandem, le polymorphisme est toujours relativement important (Brown *et al.* 1992 ; Brown *et al.* 1996 ; Ludwig & Jenneckens 2000 ; Ludwig *et al.* 2000a). De multiples publications étudiant la diversité intraspécifique chez les esturgeons se sont donc focalisées sur une zone d'environ 250 pb comprenant une partie de l'ARNt-Pro et englobant les motifs répétés de la région de contrôle ; pour faciliter les comparaisons, un seul des motifs répétés est généralement pris en compte lors de l'analyse des séquences. Ce fragment de 250 pb situé en 5' du brin léger de la région de contrôle sera noté Dlo-5' dans la suite du manuscrit ; sans les amorces, il correspond à une séquence d'environ 210 pb. Son organisation chez l'esturgeon européen est indiquée à la figure III-5.



**Figure III-5 :** Séquence du fragment Dlo-5' chez les *A. sturio* de la population actuelle de Gironde (haplotype As1). La zone amplifiée comprend quatre régions : une partie de l'ARNt-Pro suivi du début de la région de contrôle, un motif imparfait de 76 pb, un motif parfait de 80 pb très proche du motif imparfait, puis la suite de la région de contrôle. Les points dans le motif parfait indiquent une identité de séquence avec le motif imparfait. Les tirets correspondent à des indels. Les séquences TAS sont indiquées en gras souligné.

### ■ Données bibliographiques sur la zone répétée

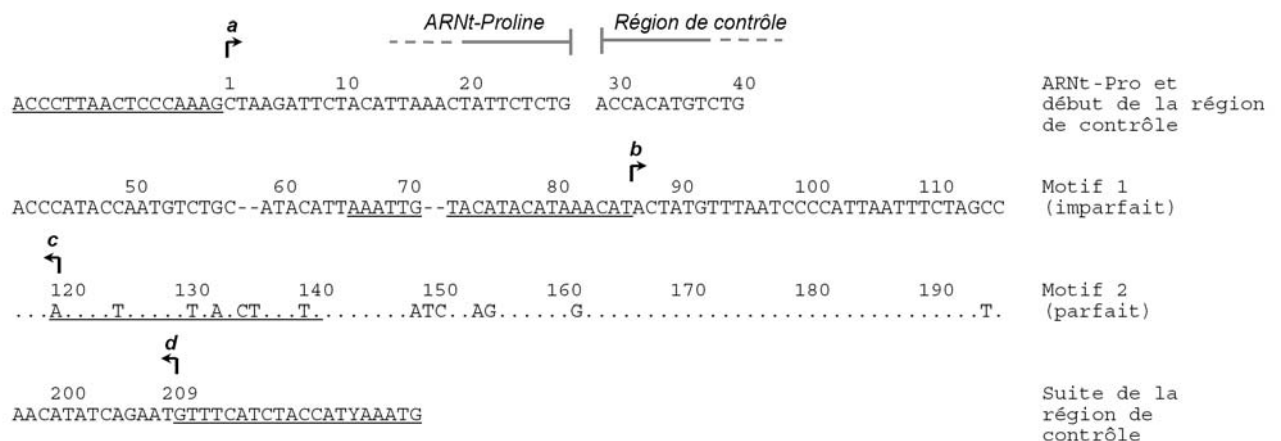
La diversité génétique intraspécifique chez *A. sturio* reste peu étudiée. La majorité des données disponibles proviennent de l'étude de la dernière population résiduelle habitant la Gironde, la seule pour laquelle du tissu frais est utilisable. L'analyse de plusieurs dizaines de spécimens provenant de cette population n'a de prime abord permis de détecter aucun polymorphisme mitochondrial quelle que soit la zone considérée ; le fragment Dlo-5' de la région de contrôle est en particulier monomorphe dans cette population (voir la figure III-5 pour la séquence), alors que 51 haplotypes différents ont été identifiés sur la même zone chez l'espèce sœur *A. oxyrinchus* (séquences obtenues dans Ong *et al.* 1996 ; Wirgin *et al.* 2000 ; Grunwald *et al.* 2007 ; Ludwig *et al.* 2008 ; Ludwig *et al.* 2009b et listées dans le tableau 2 de l'article n°2). Toujours dans la population girondine actuelle, aucun variant de longueur n'a été détecté, ce qui a conduit certains auteurs à suggérer l'absence d'hétéroplasmie chez *A. sturio* (Ludwig *et al.* 2000a ; Ludwig *et al.* 2002b).

Contrairement à ce que laissait penser la seule analyse de la population de Gironde, l'étude paléogénétique de matériel biologique ancien provenant d'autres populations aujourd'hui disparues a permis de montrer que la région de contrôle était bien une zone polymorphe chez l'esturgeon européen. L'amplification du fragment Dlo-5' a été réalisée avec succès sur plusieurs spécimens naturalisés et restes archéologiques (Ludwig *et al.* 2002b ; Ludwig *et al.* 2008 ; Ludwig *et al.* 2009c) : six haplotypes différents comprenant au total neuf sites polymorphes ont ainsi été mis en évidence. Par ailleurs, un haplotype identique à celui de la Gironde mais comprenant un motif supplémentaire a également été identifié (la séquence est donc identique à celle de la figure III-5, avec le motif parfait répété deux fois en tandem) ; aucune trace d'hétéroplasmie n'a en revanche été détectée. La signification biologique de ces polymorphismes de séquence et de longueur sera discutée dans les parties III-B et III-C.

### ■ Apport de cette thèse sur la zone répétée

Au cours de cette thèse nous avons étudié au niveau génétique environ 120 échantillons anciens d'*A. sturio* vieux de 50 à 2500 ans et couvrant l'ensemble de l'aire de répartition préindustrielle de l'espèce (voir l'annexe 2).

Les données déjà publiées portant toutes sur le fragment Dlo-5', nous avons décidé dans un premier temps de nous focaliser sur cette zone. Cette portion d'environ 250 pb a donc été amplifiée par PCR sur tous les extraits ADN disponibles ; l'amplification a été réalisée en un seul fragment sur les extraits où l'ADN était le mieux préservé, en utilisant les amorces Hétéro-1 et Hétéro-2 mises au point par Ludwig & Jenneckens (2000) ; pour les extraits où l'ADN était moins bien conservé et où le fragment de 250 ne pouvait être amplifié avec succès d'un seul tenant, il fut amplifié en deux fragments chevauchants d'environ 160 pb chacun en utilisant les couples d'amorces Hétéro-1 / Stu-CR2-Rev (5'-TRTATAGGTAAACAT-TRGTAT-3') et Stu-CR1-For (5'-AAATTGTACATACATAAACAT-3') / Hétéro-2 (voir figure III-6). Les amorces Stu-CR1-For et Stu-CR2-Rev ont été dessinées pour être compatibles avec tous les haplotypes identifiés chez *A. sturio* et pour être spécifique d'une des deux motif (motif imparfait ou motif parfait).



**Figure III-6 :** Localisation des amorces utilisées pour amplifier la portion Dlo-5' par PCR en un seul fragment (a+d) ou en deux fragments (a+c et b+d). Zones soulignées : sites d'amorçage, flèches : début des zones amplifiées.

Sur la zone Dlo-5', nous avons ainsi identifié 18 haplotypes différents, dont 14 jamais décrits auparavant. Au total (données publiées + cette thèse) 20 haplotypes différents ont été mis en évidence sur la région Dlo-5' chez l'esturgeon européen, comprenant 30 sites polymorphes dont deux indels (de 12 et 1 pb) et 17 substitutions (toutes des transitions). Les haplotypes et polymorphismes sont présentés à la figure



III-7. Une nomenclature simple a été utilisée dans tout le manuscrit de cette thèse ainsi que dans les articles scientifiques reliés : As (pour *Acipenser sturio*) suivi du numéro de l'haplotype.

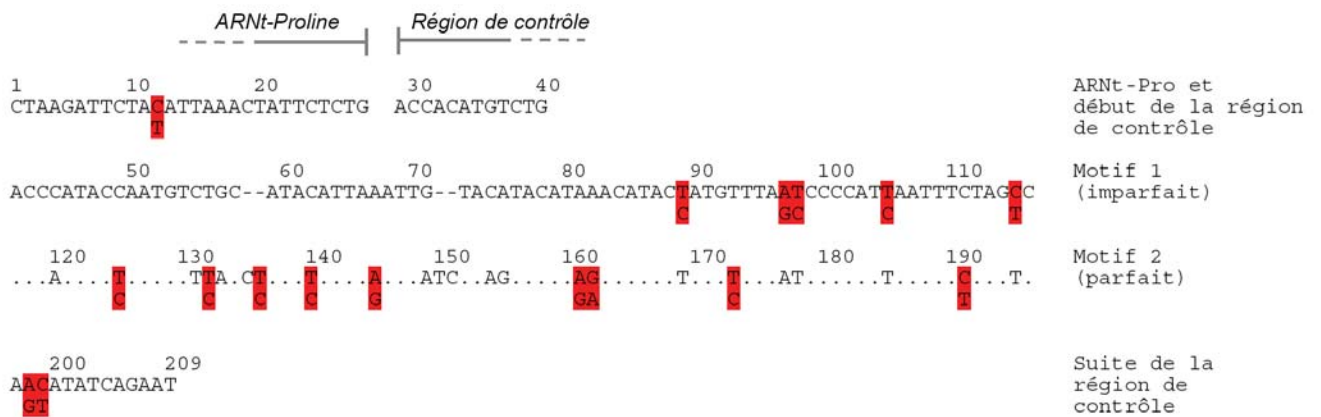
	12	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	89	97	98	105	115	123-24	125	132	136	140	145	161	162	173	191	198	199	
As1	C	A	C	A	T	G	T	C	T	G	A	C	C	T	A	T	T	C	-	T	T	T	T	A	A	G	T	C	A	C	
As2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	C	T	.	T	
As4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	.	.	.	.	.	.	T	.	.
As6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
As7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	T	.	T	
As8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	G	.	.	.	T	.	T	
As9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T		
As10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	G	.	.	T	.	T	
As11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	T	.	T	
As12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	A	.	T	.	T	
As13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	
As15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	T	.	T	
As17	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	T	.	T	
As20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	

**Figure III-7 :** Haplotypes identifiés sur le fragment Dlo-5' chez *A. sturio* (lignes) et sites polymorphes associés (colonnes). La position des sites polymorphes est indiquée suivant la numérotation de la figure III-5 (l'insertion de l'haplotype As4 est située entre les sites 123 et 124). Les points matérialisent une identité de séquence avec l'haplotype As1 utilisé comme référence, les tirets correspondent aux délétions.

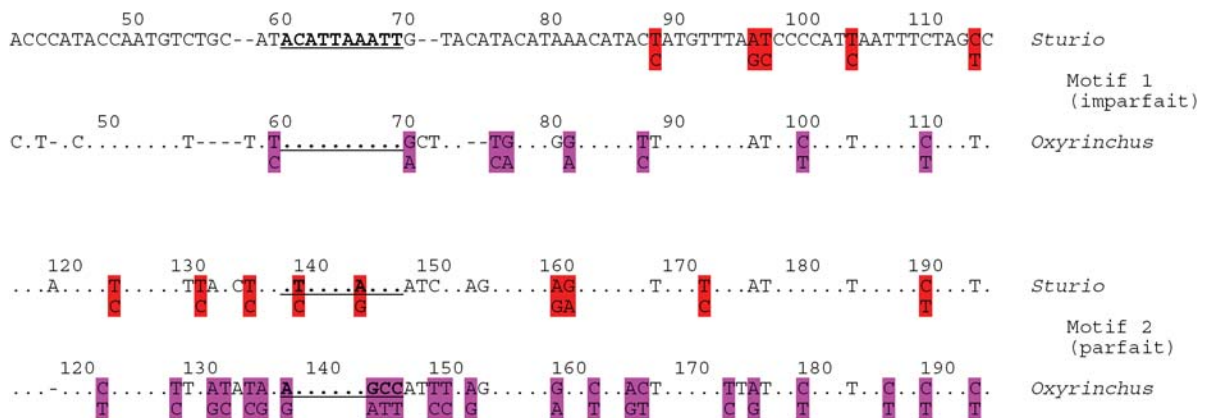
La position des polymorphismes chez *A. sturio* n'est pas corrélée entre le motif imparfait et le motif parfait, i.e. un site polymorphe sur le motif imparfait n'est pas forcément polymorphe sur le motif parfait (Figure III-8). Il ne est de même chez l'espèce sœur *A. oxyrinchus*, ainsi qu'entre motif parfait d'*A. sturio* et d'*A. oxyrinchus* et entre motif imparfait d'*A. sturio* et d'*A. oxyrinchus* (Figure III-9). Ces observations suggèrent une évolution indépendante des motifs imparfait et parfait au sein de chacune des deux espèces, et ce depuis relativement longtemps (peut-être la spéciation).

Il est intéressant de noter également que le motif imparfait est moins variable que le motif parfait, aussi bien chez *A. sturio* (7% vs 11%) que chez *A. oxyrinchus*

(11% vs 29%). Le motif TAS est en particulier exempt de polymorphisme sur les motifs imparfaits des deux espèces, ce qui n'est pas le cas sur les motifs parfaits (Figure III-9). Si le motif parfait semble donc évoluer sans contrainte sélective particulière, ce n'est apparemment pas le cas du motif imparfait.



**Figure III-8 :** Sites polymorphes identifiés sur le fragment Dlo-5' chez *A. sturio* (en rouge). La séquence de référence correspond à l'haplotype As1, les nucléotides alternatifs observés sur d'autres haplotypes sont indiqués en dessous de la séquence de référence. Les points au niveau du motif parfait correspondent à une identité de séquence avec le motif imparfait.



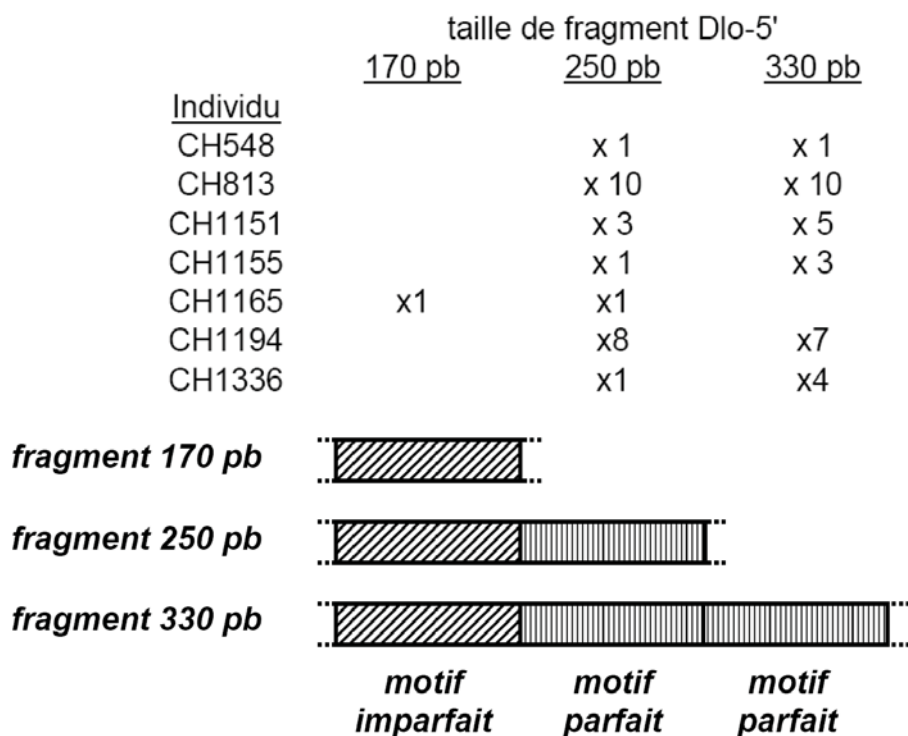
**Figure III-9 :** Comparaison des motifs imparfaits et parfaits de la région de contrôle chez *A. sturio* et *A. oxyrinchus*. Les haplotypes de référence sont respectivement As1 et AooA et les polymorphismes identifiés sont indiqués sur la ligne en dessous respectivement en rouge et en violet. Les motifs TAS sont en gras souligné. Les points indiquent une identité de séquence avec le motif imparfait d'As1.

■ Apport de cette thèse : nombre de motifs répétés et hétéroplasmie

Les analyses réalisées par Ludwig *et al.* (2000a) sur la population actuelle de Gironde n'ont pas permis de détecter d'hétéroplasmie, les auteurs concluant à l'absence d'hétéroplasmie chez l'espèce toute entière. Or la population girondine actuelle est une population quasi clonale – comme en témoigne la présence d'un seul haplotype mitochondrial – qui ne représente assurément pas l'ancienne diversité génétique de l'espèce, aujourd'hui disparue.

L'hétéroplasmie est difficile à détecter sur des extraits d'ADN ancien, car un motif répété supplémentaire augmente la taille du fragment amplifié de 80 pb, limitant sa préservation dans le temps et donc les possibilités de le détecter par PCR.

Néanmoins, au cours de cette thèse nous avons identifié sept individus présentant une hétéroplasmie de longueur (Figure III-10), six d'entre eux possédant à la fois des ADNmt avec deux et trois motifs répétés, et le dernier possédant à la fois des ADNmt avec un et deux motifs.



**Figure III-10 :** Individus *A. sturio* présentant une hétéroplasmie de longueur. Pour chaque individu, le nombre de PCR positives correspondant aux différents variants est indiqué. La taille canonique du fragment Dlo-5' est de 250 pb, le variant à 330 pb présentant deux motifs parfaits et celui à 170 pb en étant dépourvu.

L'ADN ancien extrait de ces individus hétéroplasmiques était relativement bien préservé au regard des quantifications effectuées par qPCR (voir l'annexe 5), ce qui pourrait expliquer l'amplification réussie de molécules aussi longues que 320 pb en un seul tenant. Nous n'avons en effet retenu comme individus hétéroplasmiques que ceux dont le fragment Dlo-5' a pu être amplifié en un seul morceau, ceci afin d'éviter d'éventuels artefacts liés à un mauvais appariement des amorces Stu-CR1 et Stu-CR2. Les fragments de différentes longueurs ont tous été clonés et séquencés avec succès, confirmant l'ajout / la perte du motif parfait de 80 pb comme source des variations de longueurs observées. Au vu de ces résultats, l'hétéroplasmie existait donc bien chez *A. sturio*, contrairement à ce qui avait été dit auparavant.

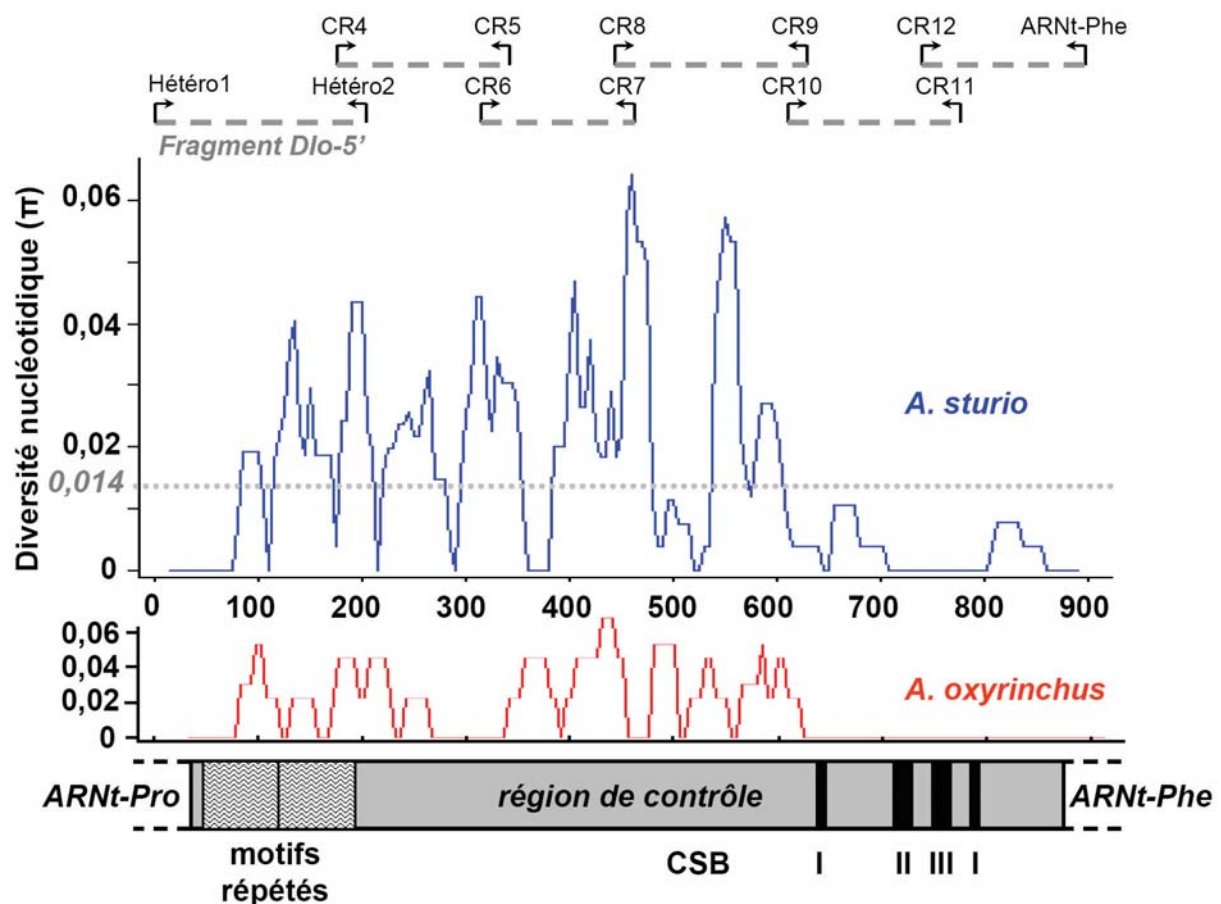
### ■ Apport de cette thèse : la zone la plus étudiée est-elle la meilleure ?

Afin d'obtenir plus d'informations à partir de l'ADNmt, nous avons décidé d'analyser la région de contrôle dans son intégralité pour certains échantillons. Pour cela nous avons tout d'abord amplifié par PCR la région de contrôle entière (fragment d'environ 900 pb) de quelques échantillons modernes de Gironde grâce au couple d'amorce Hétéro-1 / ARNt-Phe-Rev (5'-CATCTTAACATCTTCAGTG-3'). L'amorce ARNt-Phe-Rev a été dessinée à partir des séquences de l'ARNt Phénylalanine disponibles chez les Acipensériformes (les ARNts étant très conservés, la séquence d'amorçage s'est trouvée être identique chez *A. sturio* et chez les autres Acipensériformes). Cette étape nous a permis d'obtenir la séquence entière de la région de contrôle correspondant à l'haplotype As1 identifié sur le fragment Dlo-5'.

Tous les autres haplotypes ayant été identifiés sur le fragment Dlo-5' à partir d'échantillons anciens, leur extension à la région de contrôle entière en un seul fragment de 900 pb était impossible. Nous avons donc utilisé la séquence entière obtenue pour l'haplotype As1 afin de dessiner de nouvelles amorces permettant d'amplifier la zone manquante en cinq fragments chevauchants d'environ 200 pb (voir figure III-11) : Stu-CR4-For (5'-ATCCCCATTAATTTYTAGTC-3'), Stu-CR5-Rev (5'-CCAGTAATARTTCAGTTATG-3'), Stu-CR6-For (5'-GTAATAAGAGCCGAACATA-3'), Stu-CR7-Rev (5'-GGTACTTCYAACATTAATCA-3'), Stu-CR8-For (5'-CATAAC-TGAACTGTRTCC-3'), Stu-CR9-Rev (5'-TATGTCATTATATCATTCACT-3'), Stu-

CR10-For (5'-TTGAAGGTGGAACAGTATA-3'), Stu-CR11-Rev (5'-AAGGCTTGT-YCGACGTAA-3') et Stu-CR12-For (5'-ACGCTTATTATCGACAAAC-3').

Pour chaque haplotype identifié sur le fragment Dlo-5', nous avons ensuite sélectionné quelques individus anciens dont l'ADN était très bien préservé (voir la partie suivante sur l'utilisation de la PCR quantitative pour réaliser une telle sélection). La région de contrôle de ces individus a été amplifiée en cinq fragments, clonée et séquencée.



**Figure III-11 :** Diversité nucléotidique ( $\pi$ ) calculée avec le logiciel DNAsp (Librado & Rozas 2009) à partir des 20 haplotypes de la région de contrôle d'*A. sturio* (en bleu, graphe du haut) et de 4 haplotypes de la même zone d'*A. oxyrinchus* (en rouge, en bas). Le calcul de  $\pi$  a été réalisé sur une fenêtre de 25 pb par pas de 5 pb en utilisant la formule de Nei (1987). La position des amorces utilisées et des fragments amplifiés sur les échantillons anciens est indiquée au dessus du graphe. L'organisation de la région étudiée est rappelée en dessous des graphes.

En utilisant cette méthode, nous avons pu obtenir la région de contrôle entière de 34 *A. sturio* anciens (sur les 120 analysés au cours de cette thèse), correspondant à 13 des 20 haplotypes identifiés sur le fragment Dlo-5'. Nous ne disposons pas d'échantillons portant les haplotypes As4 et As7 (publiés par Ludwig *et al.* 2009c), et les échantillons anciens portant les haplotypes As16, As17, As18, As19 et As20 contenaient trop peu d'ADN : ces haplotypes n'ont donc pas été obtenu sur la région de contrôle entière.

Parmi les 34 séquences obtenues, certaines correspondant au même haplotype Dlo-5' se sont révélées être différentes sur les 700 pb restantes de la région de contrôle : dans ce cas, les variants longs ont été nommés d'après le nom de l'haplotype Dlo-5' correspondant, en rajoutant une lettre minuscule (par exemple As2a, As2b, As2c...). Au total, nous avons identifié 20 régions de contrôle différentes sur les 34 individus séquencés, comprenant un total de 75 sites polymorphes dont trois indels (de 12, 2 et 1 pb) et 60 substitutions (toutes des transitions). Les haplotypes et polymorphismes sont présentés à la figure III-12.

La diversité nucléotidique par site est importante au niveau de la fin du fragment Dlo-5', mais d'autres portions de la région de contrôle se révèlent être au moins aussi intéressantes en terme de densité de sites polymorphes et sont même plus discriminantes (Figure III-11).

Pour comparaison, nous avons également étendu quatre haplotypes Dlo-5' d'*A. oxyrinchus* (extrait d'ADN moderne provenant de poissons américains) à toute la région de contrôle (amorces Hétéro-1 et ARNt-Phe-Rev), permettant d'observer une situation semblable (Figure III-11) : la zone répétée n'est donc pas forcément la plus informative chez les esturgeons de mer *A. sturio* et *A. oxyrinchus*.

Lors de futures études analysant la diversité intraspécifique chez *A. sturio*, il semble pertinent de continuer à s'intéresser à la zone répétée – pour laquelle la quantité de données accumulées est importante – mais aussi à la portion située entre les sites 395 et 608 pb qui est la plus variable. Pour l'amplification de ce second fragment, le couple d'amorces Stu-CR13-For (5'-ACATCTGGTTCCTATTTTC-A-3') / Stu-CR14-Rev (5'-ATATATCAGAATATGTCATTAT-3') est tout indiqué.

DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : ADNMT

As1a	A	C	A	T	G	T	C	T	G	A	C	C	T	A	G	A	C	C	C	C	T	A	T	G	A	G	C	G	T	T	G	
As1b	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
As2a	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As2b	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As2c	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As2d	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As2e	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As3	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As5	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As6	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As8	.	.	.	.	.	.	C	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As9	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As10	.	.	.	.	.	.	C	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As11a	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As11b	.	.	.	.	.	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As12	.	.	.	.	.	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As13	.	.	.	.	.	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As14	.	.	.	.	.	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As15a	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
As15b	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

44	A	G	C	C	G	A	T	T	C	C	A	G	A	T	T	A	G	T	G	G	T	T	T	G	-	-	-	-	-	-	-	
45	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
46	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
47	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
48	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
49	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
50	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
51	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
52	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
53	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
54	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
55	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
56	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
57	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
58	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
59	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
60	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
62	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
63	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
64	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
65	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
66	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
67	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
68	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
69	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
70	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
71	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
72	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
73	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
74	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
75	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
76	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
77	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
78	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
79	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
80	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
81	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
82	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
83	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
84	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
85	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
86	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
87	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
88	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
89	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
90	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
91	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
92	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
93	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
94	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
95	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
96	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
97	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
98	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
99	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
100	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**Figure III-12 :** Haplotypes identifiés sur la région de contrôle entière chez *A. sturio* (lignes) et sites polymorphes associés (colonnes). La position des sites polymorphes est indiquée en référence à l'haplotype As1a. Les points matérialisent une identité de séquence avec cet haplotype, les tirets correspondent aux insertions/délétions. Le trait vertical en tirets correspond à la fin de la zone couverte par le fragment D1o-5'

III-A-2-d Sur la qualité des séquences mitochondriales anciennes obtenues

■ Conditions de manipulations

L'ADN de tous les échantillons anciens analysé dans cette thèse a été extrait et manipulé en respectant les standards de la paléogénétique, garantissant l'authenticité de nos résultats (Annexe 1).

■ Evaluation de l'état de l'ADNa : désamination des cytosines

Nous avons calculé le taux de désamination observé sur le fragment d'ADNmt Dlo5', et ce pour chaque individu. Le calcul a été réalisé sur les séquences des clones obtenus à partir de différents produits de PCR indépendants (Figure III-13A). La désamination des cytosines en uraciles conduit donc à des transitions artefactuelles GC/AT (la désamination C → U apparaît comme une transition C → T si le brin séquencé est celui sur lequel la modification a eu lieu, et comme une transition G → A si le brin séquencé est le brin complémentaire) et constitue la majorité des modifications chimiques affectant l'ADNa (Hofreiter *et al.* 2001b ; Briggs *et al.* 2007 ; Gilbert *et al.* 2007). Nous avons donc calculé le taux de substitutions GC/AT et nous l'avons comparé au taux de toutes les autres mutations possibles.

Principe de calcul (Figure III-13B) :

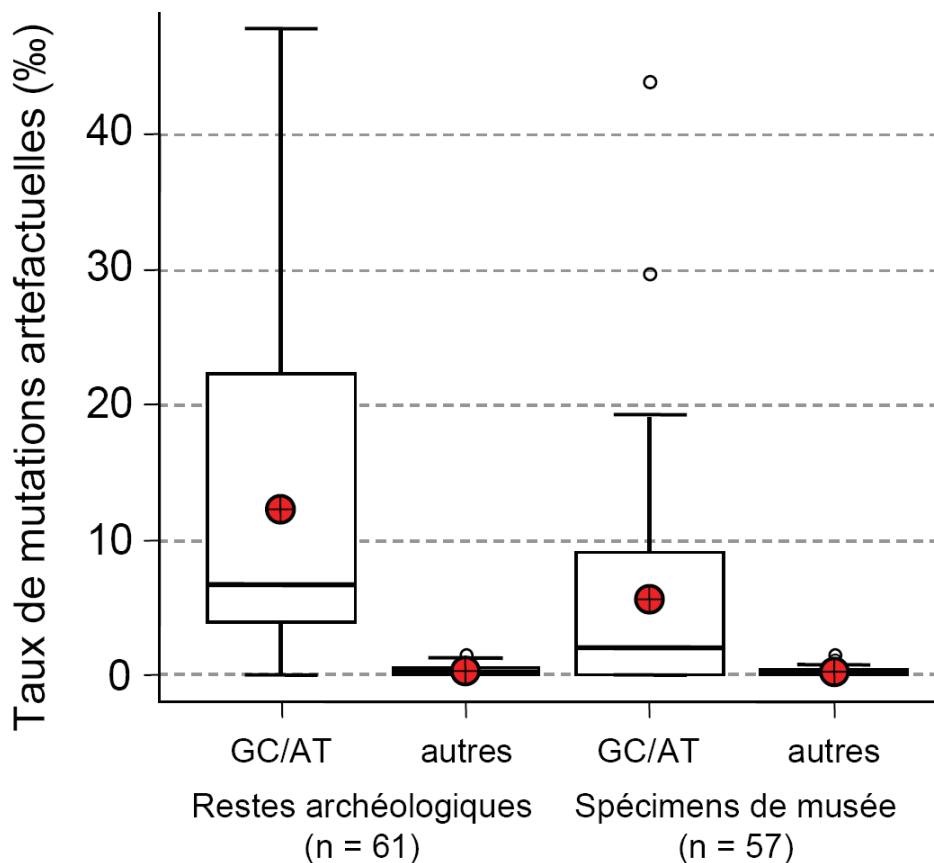
- le taux de dégradations GC/AT a été normalisé au taux de GC des séquences, afin de ne pas biaiser les mesures interindividuelles et de permettre des comparaisons avec d'autres fragments (comme les fragments d'ADNnuc, voir partie III-A-2-c).
- les dégradations consistantes (*i.e.* qui touchent tous les clones d'un même produit de PCR) ont été comptées à part des dégradations non consistantes (*i.e.* qui touchent seulement un clone d'un produit de PCR indépendant). Lors du calcul du taux de dégradation global, les dégradations consistantes ont été pondérées par le nombre de clones qu'elles affectent.

Les résultats obtenus (Figure III-14) mettent en évidence la prédominance des mutations GC/AT par rapport aux autres types de mutations, aussi bien pour les restes archéologiques (13,2‰ contre 0,3‰) que pour les spécimens de musée (6,1‰ contre 0,3‰). Des taux similaires avaient été observés par Pagès *et al.* (2009). Cette signature mutationnelle correspond aux désaminations de cytosines et



confirme l'origine ancienne de l'ADN analysé. Par ailleurs le taux de désamination est en moyenne supérieur pour les restes archéologiques par rapport aux spécimens de musée, probablement en raison de leur exposition plus longue aux outrages du temps. Le nombre de mutations GC/AT consistantes est également en moyenne plus élevé pour les restes archéologiques, sans doute en raison d'une plus faible concentration en ADN dans ces échantillons et d'une initiation fréquente de la PCR à partir d'une seule molécule (voir paragraphe suivant).

Si les substitutions GC/AT artefactuelles ont tendance à toucher surtout les échantillons les plus anciens, la corrélation entre mutation et âge n'est pas soutenue statistiquement (régression linéaire  $R^2 = 0,13$ ).



**Figure III-14 :** Caractérisation des mutations artefactuelles sur les séquences du fragment D1o5' de l'ADNmt. La distinction est faite entre transition GC/AT et autres mutations, pour les restes archéologiques et les spécimens de musée. Les diagrammes de Tukey représentent les distributions des taux par échantillon. La croix dans le cercle rouge indique la moyenne, les barres horizontales du rectangle indiquent de bas en haut le premier quartile, la médiane et le troisième quartile, les frontières hautes et basses sont calculées à partir des distances interquartiles et les cercles vides correspondent à des valeurs atypiques.

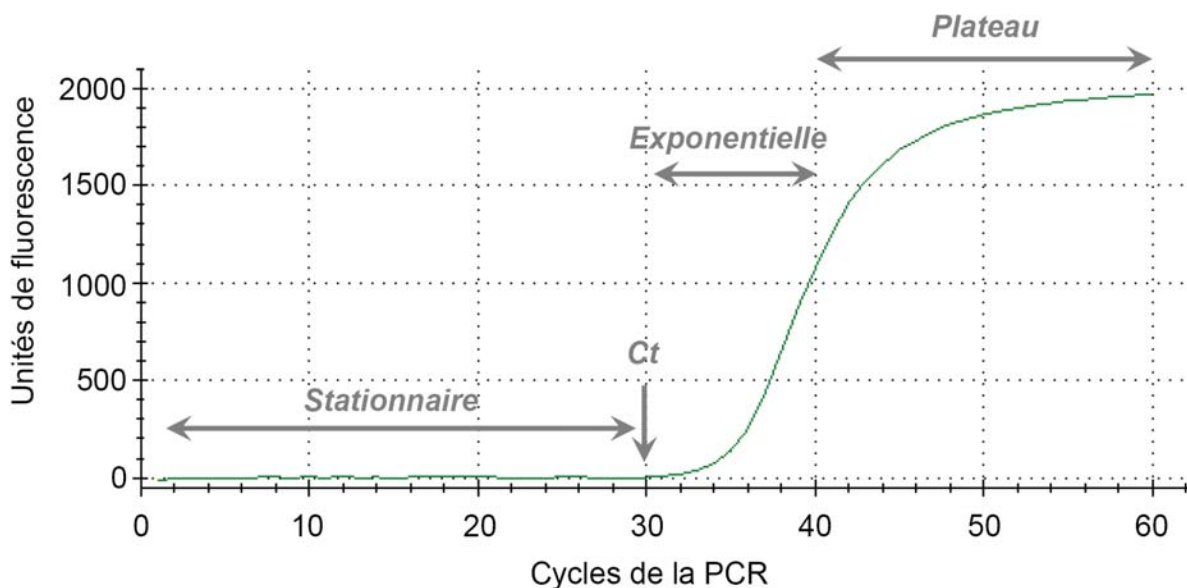


■ Evaluation de l'état de l'ADNa : dosage par qPCR

La qPCR – ou PCR en temps réel – repose sur la quantification cycle après cycle de l'ADN cible amplifié lors d'une PCR (Higuchi *et al.* 1992 ; Higuchi *et al.* 1993). La détection des amplicons se fait à l'état double brin grâce à une sonde fluorescente spécifique (technologies Taqman® et Molecular Beacon® ; Heid *et al.* 1996 ; Tyagi & Kramer 1996) ou bien à l'aide d'un agent intercalant fluorescent (technologie SYBR® ; Wittwer *et al.* 1997).

L'amplification qPCR peut se résumer en trois grandes phases (Figure III-15) :

- 1) phase stationnaire : la fluorescence reste à un niveau de référence stationnaire dans les premiers cycles, car les molécules d'ADN sont encore trop peu nombreuses pour constituer un signal fluorescent ;
- 2) phase exponentielle : lorsqu'un seuil critique de molécules d'ADN est atteint, la fluorescence qui leur est liée est détectable et augmente de façon proportionnelle au nombre de molécules. L'ADN étant amplifié de façon exponentielle au cours des cycles, la fluorescence augmente également suivant une courbe exponentielle. Le cycle auquel le seuil de détectabilité est atteint est noté Ct pour « cycle threshold » ;
- 3) phase de plateau : lorsque les réactifs de la PCR commencent à s'épuiser, la phase exponentielle s'arrête et la fluorescence atteint un plateau.



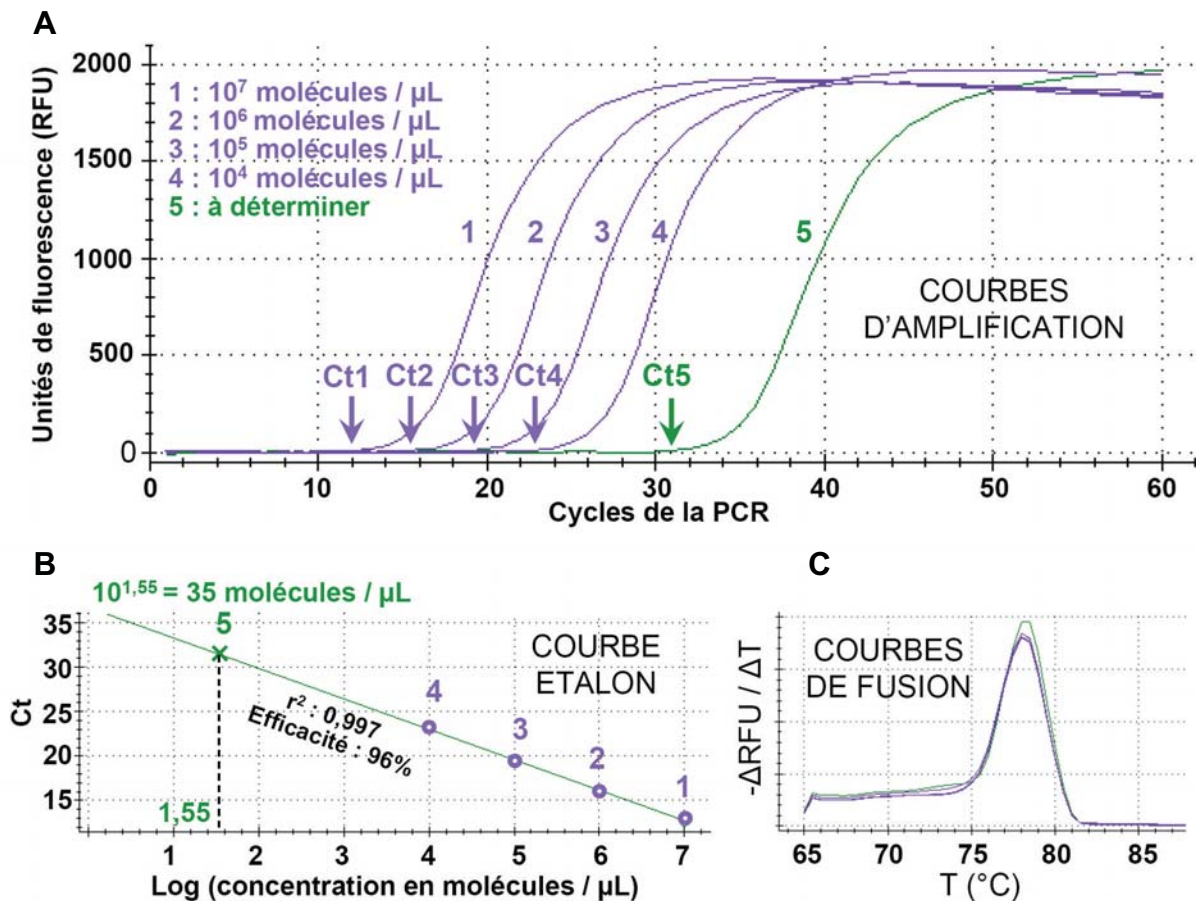
**Figure III-15 :** Les différentes phases de la PCR, visualisées par fluorescence de l'ADN double brin au contact de SYBR green lors d'une qPCR. Le graphe correspond à l'amplification d'un fragment de *Cyt b* sur un esturgeon ancien (ce qui explique l'atteinte tardive du seuil de visualisation Ct).

En amplifiant une gamme étalon (de concentration connue) en même temps que les échantillons d'intérêt (de concentration inconnue) et en comparant les Ct obtenus, il est possible d'estimer le nombre de molécules présentes initialement dans les échantillons d'intérêts (Heid *et al.* 1996 ; voir figure III-16). La qualité de la gamme étalon et la spécificité de la qPCR doivent être vérifiées ( $r^2$  et efficacité de la droite étalon, unicité des pics de la courbe de fusion des produits finaux) avant d'interpréter les résultats (Bustin *et al.* 2009 ; voir figure III-16).

Au cours de cette thèse, nous avons quantifié par qPCR l'ADN présent dans les extraits d'esturgeons à notre disposition, et ce pour deux fragments d'ADNmt de taille différente (respectivement 121 et 86 pb amorces incluses). L'ADNa étant fragmenté au cours du temps du fait des réactions d'hydrolyse et d'oxydation, plus un fragment est long, moins il a de chance d'être préservé : les fragments courts sont donc normalement présents en un plus grand nombre de copies que les fragments longs (Pääbo *et al.* 2004).

La zone choisie pour la quantification par qPCR de l'ADNmt des esturgeons est le Cyt *b*, et ce pour plusieurs raisons : (i) le Cyt *b* est beaucoup moins variable que la région de contrôle, il est donc plus facile de dessiner des amorces spécifiques et d'éviter un problème d'amorçage chez certains individus dû à d'éventuels polymorphismes inconnus, (ii) au début des expérimentations, la seule zone séquencée de la région de contrôle de l'esturgeon européen était la zone répétée (fragment D1o5'), qui ne se prête pas à la qPCR à cause du risque d'amorçage aspécifique sur l'un ou l'autre des motifs répétés.

Le fragment long de 121 pb a été amplifié à l'aide des amorces Stu-Cytb-For7 (5'-AACAYCCRTTCGTCTTAATTGGA-3') et Stu-Cytb-Rev7 (5'-CTACTAGGGCAG-TTTCAGTTTA-3'), celui long de 86 pb à l'aide du couple Stu-Cytb-For8 (5'-ACAGTC-TATTCACCCTGTTTT-3') et Stu-Cytb-Rev7.



**Figure III-16 :** Quantification par qPCR de l'ADN présent dans un extrait. L'extrait à quantifier est en vert (n°5), les extraits de concentration connue (gamme étalon) sont en violet (n°1 à 4).

A : Courbe d'amplification. Les tubes de la gamme étalon sont amplifiés en parallèle du tube d'intérêt et dans les mêmes conditions.

B : Courbe étalon. A partir des Ct déterminés pour les points étalons sur la courbe d'amplification, la droite étalon  $\text{Ct} = f(\log(\text{concentration}))$  est tracée. Avec une gamme dont les points correspondent à une dilution de 10 en 10 (comme ici), l'opposé de la pente  $x$  de la droite est le nombre de cycles nécessaires pour multiplier la concentration d'ADN par 10. L'amplification étant idéale si la quantité d'ADN est multipliée par deux à chaque cycle, la pente idéale est telle que  $2^x = -10$  soit  $x = -\log_{10} / \log 2 = -3,32$ . L'efficacité  $E$  de la qPCR ( $E = 10^{-1/x} - 1$ ) mesure l'adéquation entre la pente observée et la pente idéale ; une valeur entre 85% et 115% est considérée comme acceptable. Le coefficient de régression de la droite  $r^2$  mesure la qualité de l'alignement des points de la gamme ; une valeur supérieure à 0,985 est considérée comme acceptable. Si  $E$  et  $r^2$  sont convenables, il est alors possible d'utiliser la gamme pour quantifier les points d'échantillons : dans notre exemple, le Ct de l'extrait 5 correspond à un  $\log(\text{concentration})$  de 1,55 soit une concentration de  $10^{1,55} = 35$  molécules amplifiables /  $\mu\text{L}$ .

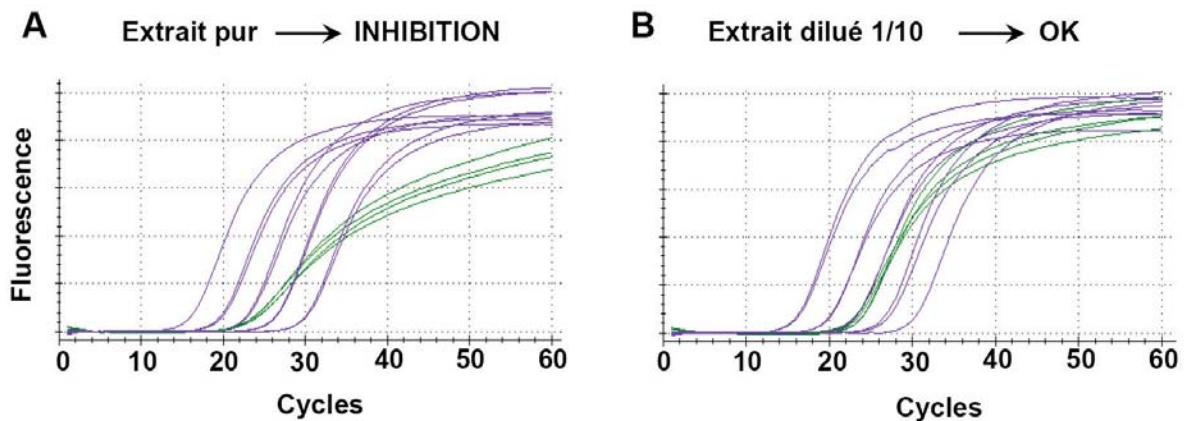
C : Courbe de fusion. A l'issue de la qPCR, les produits sont soumis à une dénaturation finale entre 60 et 90°C par palier de 0,5°C. Lors de la dénaturation, l'ADN passe à l'état simple brin et la fluorescence diminue, phénomène visualisable sous la forme d'un pic sur la dérivée de la fluorescence en fonction de la température. Chaque produit a une température de dénaturation particulière, produisant un pic spécifique. Si les pics correspondant aux échantillons sont identiques à ceux de la gamme, les produits amplifiés sont identiques : la spécificité de la qPCR est donc satisfaisante et les résultats fiables.

Au niveau pratique, les gammes étalon ont été préparées à partir de produits de PCR purifiés sur colonne Qiaquick®, dosés au nanodrop (cinq points par produit pour limiter les écarts de mesure) et dilués dans du tampon 10 mM Tris-Cl, pH 8,5 (dilutions sériées de 10 en 10). Des aliquots de 20 µL ont été congelés et utilisés l'un après l'autre pour éviter la fragmentation liée aux congélations-décongélations.

Toutes les qPCR ont été réalisées dans les mêmes conditions (volume final de 30 µL avec tampon Invitrogen Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG 1X, amorces 0,5 µM, BSA 0,66 mg/µL) et sur la même machine (Biorad® CFX96). Les échantillons ont été systématiquement amplifiés simultanément avec une gamme étalon présentant cinq dilutions de 10 en 10 – chaque point de dilution étant traité en duplicat ou triplicat – ainsi qu'avec des contrôles négatifs sans ADN. Pour chaque extrait ancien et chaque fragment, quatre réplicats (volume d'essai de 1,5 µL) ont été réalisés ; la moyenne des réplicats a été considérée pour les calculs.

Lors de la procédure d'extraction de l'ADN ancien, d'autres molécules peuvent être coextraites. Ces molécules, en fonction de leur nature et de leur concentration, peuvent inhiber les réactions d'amplification de l'ADNa par PCR (Hagelberg *et al.* 1989 ; Hanni *et al.* 1990 ; Handt *et al.* 1994 ; Hanni *et al.* 1995) ; la qPCR reposant sur le postulat que l'efficacité de l'amplification est optimale (multiplication par deux du nombre de molécules cibles à chaque cycle), l'estimation obtenue peut être biaisée par la présence d'inhibiteurs dans les extraits anciens (King *et al.* 2009). Afin de limiter ce problème, nous avons utilisé des protocoles d'extraction de l'ADNa basés sur l'affinité spécifique de l'ADN pour la silice, qui s'affranchissent de la majorité des inhibiteurs (Rohland & Hofreiter 2007a, b) ; nous avons également ajouté de l'albumine de sérum bovin (BSA) au mélange réactionnel de la PCR, connue pour améliorer l'efficacité des PCRs en présence d'inhibiteurs (Rohland & Hofreiter 2007b). La présence résiduelle d'inhibiteurs a néanmoins été suivie par sécurité lors des qPCR (i) par l'observation de la pente de la courbe d'amplification des points d'échantillons (qui doit être similaire à celle des points de gamme étalon), et (ii) par la réalisation de tests de dilution des extraits (les différentes dilutions devant conduire à la même estimation de concentration). Aucune inhibition résiduelle n'a été détectée pour la majorité des échantillons ; une inhibition faible (<20%) a été détecté sur une dizaine d'échantillons, et une inhibition forte (>20%) à très forte (>50%) a été rencontré pour une demi-douzaine d'échantillons correspondant tous à

des spécimens de musée (Figure III-17 pour une illustration sur l'extrait CH1137). La présence dans les extraits de produits chimiques utilisés lors de la naturalisation des poissons et inhibiteurs de la PCR semble être l'hypothèse la plus plausible (Moran & Baker 2002).



**Figure III-17 :** Détection d'inhibiteurs de PCR dans l'extrait d'esturgeon CH1137.

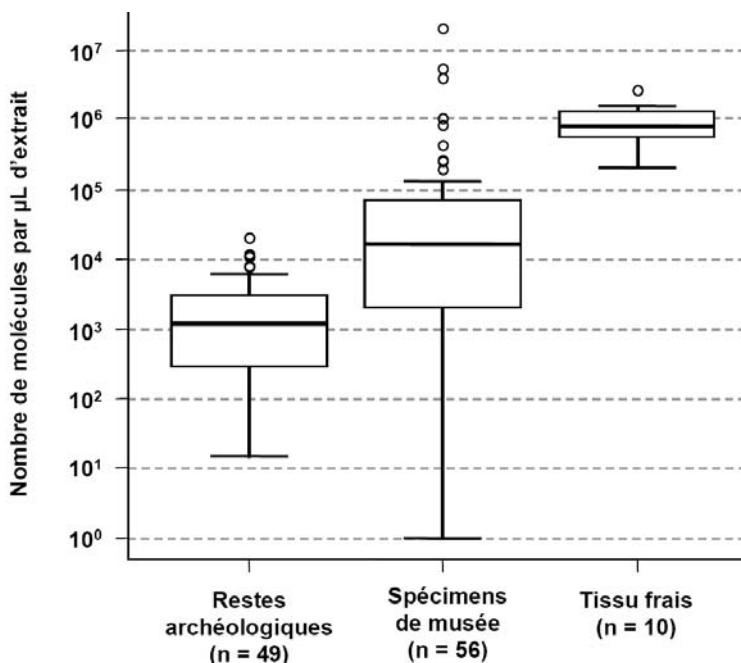
**A :** Sans dilution, la pente d'amplification des quatre réplicats correspondant à l'échantillon (en vert) est bien inférieure à celle des points de gamme (en violet). La concentration d'ADN est équivalente à celle du troisième point de gamme.

**B :** Avec une dilution au 1/10, la pente d'amplification de l'échantillon est identique à celle de la gamme étalon. La concentration d'ADN est encore équivalente à celle du troisième point de gamme, alors que la gamme étalon utilisée est la même ; cela signifie que le même nombre de molécules d'ADN a été détecté en A et B, alors que l'extrait était pourtant dilué 10 fois en B. Les inhibiteurs ont donc freiné l'amplification en A à hauteur de 90% (taux d'inhibition). A une dilution au 1/20, le nombre de molécules détecté pour l'échantillon est deux fois moindre qu'à la dilution 1/10, signe que l'inhibition est nulle entre les dilutions 1/10 et 1/20. L'estimation basée sur la dilution 1/10 est donc fiable.

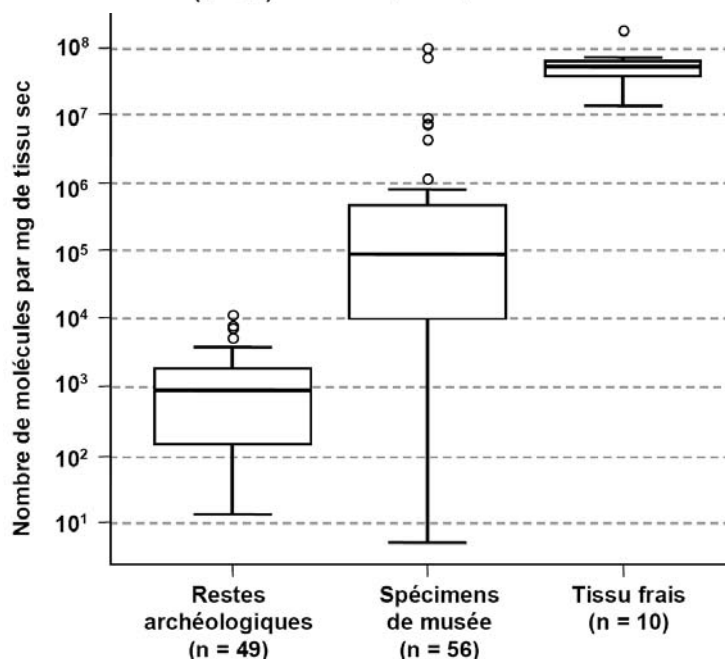
Au cours de cette thèse, l'ADNmt de 105 échantillons anciens d'esturgeons a été quantifié sur les deux fragments de Cyt *b* (voir l'annexe 5 pour les résultats par échantillon). Dix échantillons de tissu frais ont également été traités pour comparaison. Neuf échantillons anciens ont donné des résultats négatifs sur le fragment long, portant à 96 le nombre d'échantillons anciens pour lesquels une comparaison entre les quantifications des fragments longs et courts est possible. Une grande variabilité du nombre de molécules par  $\mu\text{L}$  a été observée entre extraits anciens, de quelques unités pour certains, à plusieurs millions pour d'autres. Cette variabilité était attendue au vu de la diversité de l'origine des échantillons traités. Il ressort néanmoins que les extraits issus des échantillons de musée contiennent globalement plus d'ADN que ceux issus des échantillons archéologiques (voir la figure III-18 pour une comparaison sur le fragment court de 86 pb), avec des

médianes respectivement à 16 300 et 1 200 molécules par  $\mu\text{L}$ . Le nombre de molécules dans les extraits de tissu frais était très supérieur, avec une médiane à 776 000 molécules par  $\mu\text{L}$ .

La normalisation du nombre de molécules d'ADN par rapport à la masse de tissu sec utilisée pour l'extraction conduit à des résultats similaires, avec néanmoins un creusement du décalage entre les restes archéologiques et les autres échantillons (Figure III-19). En effet, la masse sèche extraite était en moyenne plus élevée pour les restes archéologiques ( $332 \pm 108$  mg) que pour les spécimens de musée ( $58 \pm 54$  mg) et le tissu frais ( $3 \pm 1$  mg), du fait qu'il s'agissait exclusivement de tissus osseux.



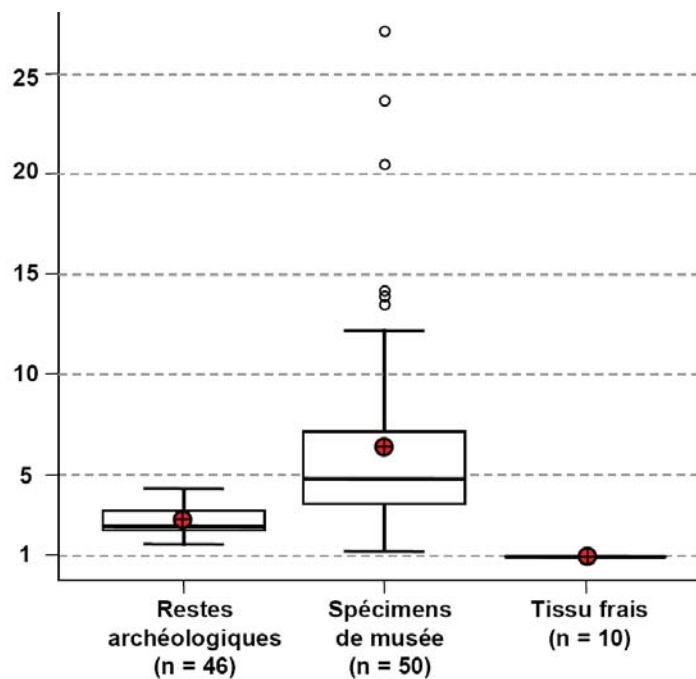
**Figure III-18 :** Quantification de l'ADNmt sur le fragment de 86 pb du Cyt *b*. Les diagrammes de Tukey représentent la distribution du nombre de molécules d'ADN estimé par qPCR pour les extraits de restes archéologiques, de spécimens de musée et de tissu frais. Le rectangle est coupé par la médiane et marque les premier (bas) et troisième quartiles (haut) ; la longueur des moustaches est 1,5 fois celle de l'interquartile. Les cercles vides marquent les valeurs atypiques. Les ordonnées sont en échelle logarithmique.



**Figure III-19 :** Quantification normalisée de l'ADNmt sur le fragment de 86 pb du Cyt *b*. Les diagrammes de Tukey représentent le nombre de molécules d'ADN normalisé à la masse de tissu sec extrait pour les restes archéologiques, spécimens de musée et le tissu frais. Les ordonnées sont en échelle logarithmique.

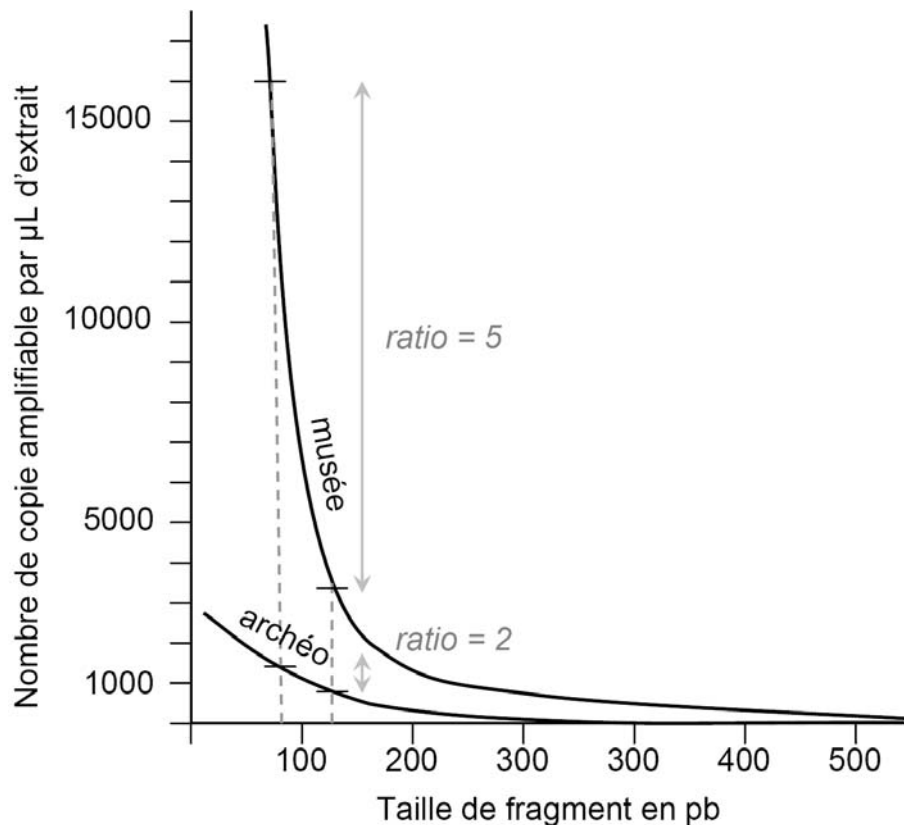


Pour chaque extrait ancien, le nombre de molécules par unité de volume était plus élevé pour le fragment court (86 pb) que pour le fragment long (121 pb) – avec un rapport moyen de 2,5 pour les restes archéologiques et de 6,5 pour les spécimens de musée – signe d'un substrat fragmenté (Figure III-20). En comparaison, l'ADN extrait de tissu frais n'est pas du tout fragmenté, puisque le ratio entre fragment court et fragment long vaut 1 (Figure III-20). Cette fragmentation est un indicateur de l'authenticité de nos résultats, au même titre que la présence des désaminations de cytosines (Pääbo *et al.* 2004).



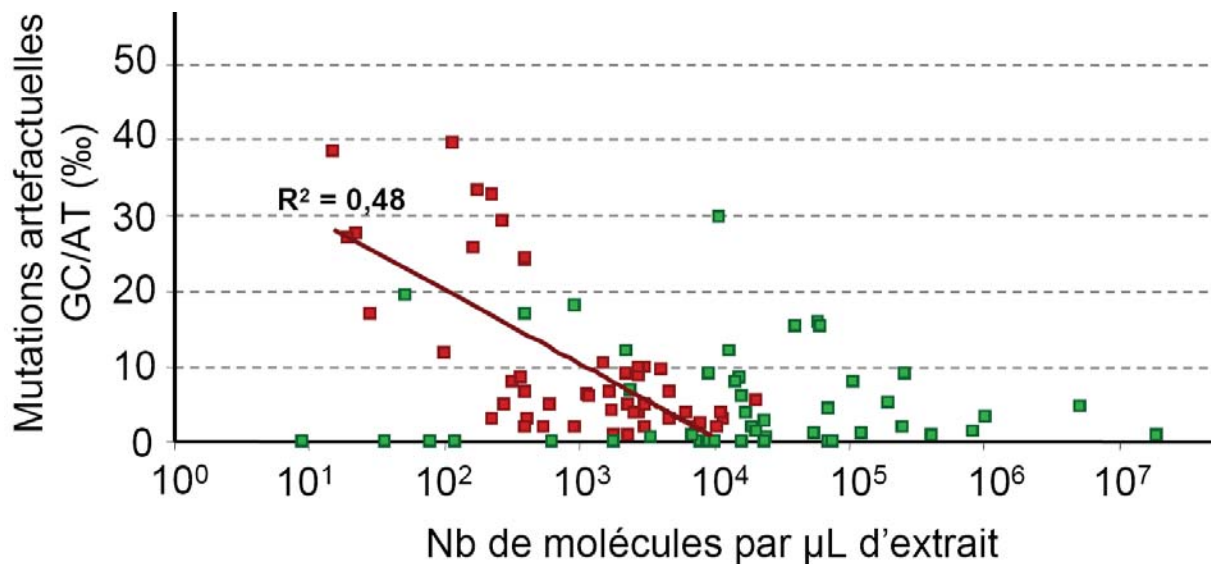
**Figure III-20 :** Ratio du nombre de fragments courts et du nombre de fragments longs par unité de volume, pour les restes archéologiques (à gauche), les spécimens de musée (au centre) et les échantillons frais (à droite). Le rectangle est coupé par la médiane et marque les premier (bas) et troisième quartiles (haut) ; la longueur des segments est 1,5 fois celle de l'interquartile. Le cercle rouge marqué d'une croix indique la moyenne. Les cercles vides marquent les valeurs atypiques.

Le nombre de molécules amplifiables varie théoriquement en fonction de la taille du fragment visé suivant une loi exponentielle décroissante (Deagle *et al.* 2006 ; Brotherton *et al.* 2007), à partir de laquelle il est possible d'estimer la probabilité  $\lambda$  qu'un nucléotide donné soit endommagé. Des qPCR sériées ciblant plusieurs fragments de tailles différentes doivent être réalisées pour estimer précisément la dégradation de l'ADNa (Deagle *et al.* 2006 ; Poinar *et al.* 2006 ; Schwarz *et al.* 2009). Comme nous ne disposons que de deux points et que les lois de dégradation des échantillons de musée et des restes archéologiques sont *a priori* différentes (conditions de température et d'humidité différentes, contact avec des produits chimiques...), il est délicat d'interpréter la différence observée entre les ratios moyens fragment court / fragment long pour ces deux types d'échantillons (Figure III-21).



**Figure III-21 :** Lois de dégradation de l'ADN compatibles avec les observations effectuées (nombre moyen de molécules pour les fragments de 86 et 121 pb et ratio moyen), pour les échantillons de musée et les restes archéologiques. Attention, d'autres lois compatibles existent, ceci n'est qu'une illustration possible.

La concentration en ADN et le taux de désamination des cytosines ne sont pas corrélés en ce qui concerne les échantillons de musée (Figure III-22), sans doute parce que leur taux de désamination est globalement faible. Par contre, il semble pour les restes archéologiques que le taux de désamination soit d'autant plus élevé que la concentration en molécule est faible, en particulier lorsqu'il y a moins de 1000 molécules par µL (Figure III-22) ; la corrélation est néanmoins statistiquement faible ( $R^2 = 0,48$ ). Ce résultat n'est pas surprenant car (i) les réactions chimiques conduisant à la désamination des cytosines et à la fragmentation de l'ADN sont favorisées par les mêmes conditions environnementales (humidité, température) donc quand l'ADN est fragmenté, il a aussi de bonnes chances d'être aussi désaminé et (ii) la méthode de calcul du taux de désamination est biaisé par les mutations consistantes qui résultent probablement d'une initiation de la PCR à partir d'une seule molécule matrice ; or moins l'extrait est concentré, plus il y a de chances que la PCR s'initie à partir d'une seule molécule matrice, et plus il y aura de mutations consistantes et donc un taux de désamination estimé élevé.



**Figure III-22 :** Taux de désamination des cytosines en fonction de la concentration en ADN (quantification non normalisée sur le fragment court de 86 pb) pour 105 extraits d'esturgeons anciens. Les points correspondants aux échantillons archéologiques sont en rouge ; la droite de régression a pour formule  $y = -4,2713\ln(x) + 39,812$ . Les points correspondant aux échantillons de musée sont en vert ; droite de régression non indiquée.

La région de contrôle de l'ADNmt est donc un outil intéressant pour l'étude de la diversité intraspécifique chez *A. sturio*, puisque sa variabilité est bien plus importante que ne le laissait supposer les premières études réalisées sur la population actuelle de Gironde. L'analyse des patrons de désamination et de fragmentation observés soutien par ailleurs l'authenticité de nos résultats, dont l'interprétation biologique peut donc être réalisée en toute confiance.

L'ADNmt est néanmoins un génome haploïde, hérité maternellement et généralement sans recombinaison (Dawid & Blackler 1972 ; Hutchison *et al.* 1974 ; Birky 2001) ; il se comporte donc différemment de l'ADNnuc et n'enregistre pas les mêmes informations évolutives et démographiques, ou du moins pas de la même façon ; il ne permet en particulier d'accéder qu'à l'histoire maternelle. Par ailleurs l'ADNmt n'est pas un marqueur globalement neutre – du fait de la présence d'une majorité de séquences codantes et de l'absence de recombinaison – et le taux d'évolution qui le caractérise n'est pas toujours homogène d'une lignée à l'autre : son intérêt pour étudier l'histoire évolutive et démographique des populations a donc été remis en cause (Ballard & Whitlock 2004 ; Galtier *et al.* 2009). Afin d'obtenir un point de vue génétique indépendant par rapport à l'ADNmt, nous nous sommes donc intéressé à des marqueurs nucléaires, ce que nous allons voir dans la partie suivante.

### **III-A-3 L'ADN NUCLEAIRE : CHALLENGE DES MICROSATELLITES**

Les microsatellites sont les marqueurs moléculaires dont l'usage est le plus répandu pour l'analyse de la diversité génétique intraspécifique (Schlotterer 2004). Par ailleurs chez les esturgeons, ils constituent la majorité des marqueurs nucléaires disponibles (voir figure II-8). Afin d'étudier la diversité intraspécifique nucléaire chez *A. sturio*, nous avons donc décidé de nous intéresser à plusieurs locus microsatellites. La démarche d'analyse des microsatellites a été adaptée à l'utilisation d'échantillons anciens, de la sélection des locus à la validation des génotypes.

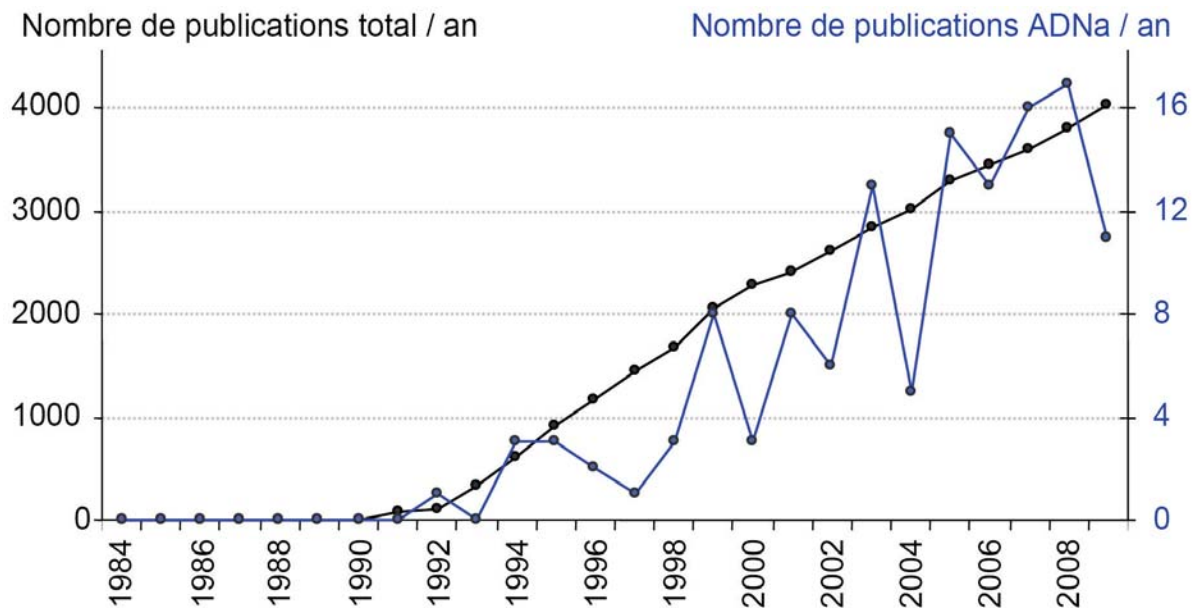
#### III-A-3-a Les microsatellites : généralités

##### ■ Bref historique

La découverte des microsatellites remonte au début des années 1980, lorsque l'omniprésence de séquences répétitives simples – polyA, polyT, poly GT, poly AT en particulier – fut mise en évidence dans les génomes eucaryotes (Hamada & Kakunaga 1982; Hamada *et al.* 1982; Gebhard & Zachau 1983; Tautz & Renz 1984; Greaves & Patient 1985; Schafer *et al.* 1986). Le glissement de l'ADN polymérase (aussi appelé bégaiement) et un mauvais réappariement lors de la réplication de l'ADN (slippage-mispairing) furent rapidement soupçonnés d'être à l'origine de ces courtes séquences répétées (Tautz & Renz 1984; Tautz *et al.* 1986; Levinson & Gutman 1987). Se trouvant généralement dans des régions non codantes, elles ont été considérées comme neutres vis-à-vis de la sélection.

Grâce à la PCR, le polymorphisme de longueur des locus microsatellites fut rapidement mis en évidence à l'échelle intraspécifique, démontrant l'utilité de telles séquences en tant que marqueurs moléculaires (Litt & Luty 1989; Tautz 1989; Weber & May 1989). Informativité (polymorphisme important + disomie), ubiquité dans les génomes eucaryotes et neutralité, telles sont les qualités des microsatellites qui conduisirent à leur utilisation massive pour la cartographie génique, les recherches de parenté et l'analyse de la structure des populations. La progression importante du

nombre de publications faisant référence aux microsatellites à partir du début des années 1990 atteste de ce succès (Figure III-23).



**Figure III-23 :** Evolution du nombre annuel de publication sur les microsatellites depuis 1984 (en noir) et fraction appliquée à l'ADN ancien (en gris). Source : résultats bibliométriques obtenus sur ISI Web of Knowledge en utilisant respectivement les mots-clefs « microsatellite\* » et « microsatellite\* AND (ancient DNA OR paleogenetics OR museum) ».

■ Facilités d'analyse

Un autre avantage des microsatellites est leur facilité d'utilisation. La zone répétée hypervariable est généralement restreinte à moins de 100 bp et il est donc aisé de dessiner des amorces dans les régions flanquantes du microsatellite pour l'amplifier par PCR (Schlotterer 2004). L'utilisation d'amorces fluorescentes permet par ailleurs une visualisation simple et rapide des allèles amplifiés après PCR, par électrophorèse sur polymère d'acrylamide : les allèles apparaissent sous forme de bandes, dont la taille varie en fonction du nombre de motifs répétés.

Le multiplexage des locus (amplification simultanée de plusieurs locus, chacun distingué par un fluorophore spécifique), l'électrophorèse sur tubes capillaires et les logiciels d'analyse tels Genemapper® ont permis d'augmenter significativement le débit d'acquisition des données microsatellites, réduisant d'autant le temps nécessaire pour générer un jeu de donnée intéressant.

### ■ Erreurs de génotypage

Les microsatellites sont des marqueurs de choix, mais ils ne sont pas pour autant dépourvus de défauts. S'ils sont négligés, ces biais peuvent sérieusement affecter la qualité des résultats, il est donc crucial de les prendre en compte (Pompanon *et al.* 2005).

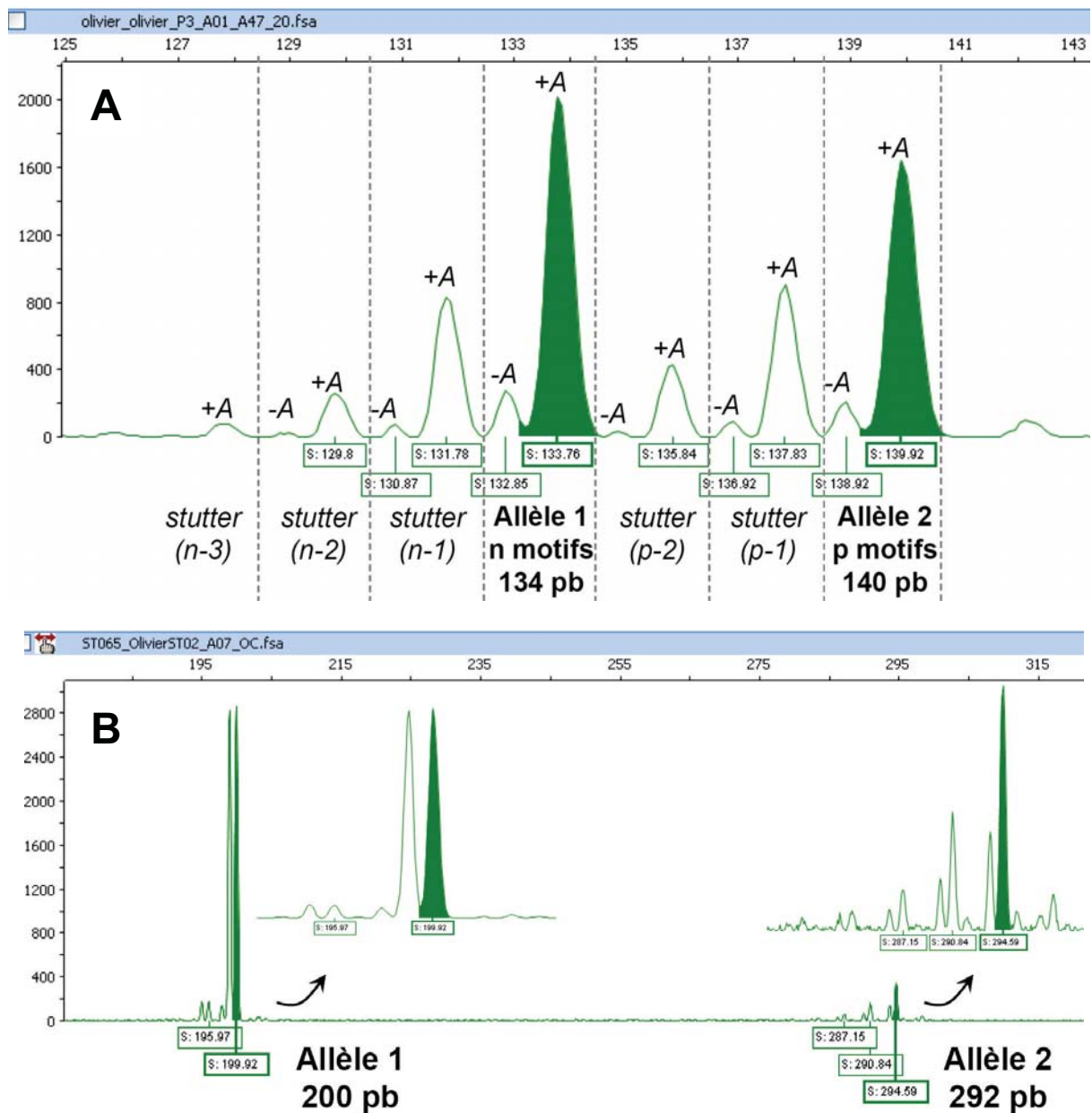
Au cours de l'amplification par PCR des locus microsatellites, la *Taq* polymérase bégaie fréquemment, conduisant au rajout ou plus souvent à l'élimination d'un (ou plusieurs) motif(s) par rapport aux allèles originaux (Hauge & Litt 1993; Litt *et al.* 1993; Walsh *et al.* 1996; Shinde *et al.* 2003; Olejniczak & Krzyzosiak 2006). La génération de ces sous-produits peut poser problème, en particulier pour les motifs dinucléotidiques (Odelberg & White 1993), même si en général les séquences originales restent largement majoritaires. Les sous-produits sont visualisés sous la forme de bandes de bégaiement (stutter bands ou shadow bands) sur les fluorogrammes d'électrophorèse, d'intensité inférieure aux allèles originaux et de taille correspondant à un, deux voire trois motifs de moins que chacun des allèles originaux (Figure III-24A). L'intensité et le nombre de bandes de bégaiement varient suivant les locus (en fonction du motif répété surtout ; les motifs dinucléotidiques sont plus sensibles que les tri- ou tétranucléotidiques ; comparer les figures III-24A et B), suivant les allèles d'un même locus (en fonction de la taille des allèles ; plus le nombre de motifs répétés est important, plus les bégaiements sont importants ; Figure III-24B) et suivant les conditions de PCR (Walsh *et al.* 1996; Lai & Sun 2003; Shinde *et al.* 2003). Une bonne connaissance des locus analysés est importante pour identifier sans ambiguïté les bandes de bégaiement ; utiliser des locus à motifs tri- ou tétranucléotidiques permet également de limiter ce problème.

La *Taq* polymérase génère également un autre type d'artéfact lors de la PCR. Elle rajoute souvent une adénosine à l'extrémité des fragments synthétisés, mais pas systématiquement, ce qui conduit parfois à deux pics jumeaux séparés d'une paire de base. Cet artefact +A peut induire des erreurs de génotypage (Smith *et al.* 1995; Brownstein *et al.* 1996; Magnuson *et al.* 1996), un allèle pouvant être confondu avec l'allèle voisin, surtout dans le cas des motifs dinucléotidiques. Il est nécessaire de définir la gamme de taille correspondant à chaque allèle sans équivoque afin d'éviter

ce biais (Figure III-24A). Pour les motifs tri- et tétranucléotidiques, l'artefact +A ne pose pas de problème car l'écart entre deux allèles successifs est suffisant pour distinguer sans ambiguïté les allèles.

Un autre biais d'amplification est fréquemment observé quand à un locus donné deux allèles de tailles très différentes sont coamplifiés, l'allèle le plus court étant alors amplifié plus efficacement que l'allèle long (Figure III-24-B ; voir Walsh *et al.* 1992; Wattier *et al.* 1998) : ce phénomène est appelé dominance de l'allèle court. Dans certains cas, l'allèle long peut ainsi passer inaperçu aux yeux de l'expérimentateur ou du logiciel d'analyse. La dominance de l'allèle court est amplifiée lors du multiplexage de plusieurs locus, la compétition interlocus se rajoutant à la compétition interallèle pour les réactifs de la PCR.

Enfin, les microsatellites sont généralement identifiés à partir d'une librairie génomique générée sur un faible nombre d'individus d'une espèce (Zane *et al.* 2002). Chaque couple d'amorce correspondant à un locus est dessiné à partir de la séquence flanquante d'un clone positif de cette librairie. Or des mutations peuvent exister dans les régions flanquantes d'autres allèles de la même espèce (et plus encore dans les allèles d'autres espèces), qui, si elles se trouvent dans les sites d'amorçage, empêchent leur amplification (Callen *et al.* 1993; Paetkau & Strobeck 1995; Pemberton *et al.* 1995). Ces allèles nuls, qui restent invisibles aux yeux de l'expérimentateur, ont tendance à enfler de façon artificielle le taux d'homozygotie du locus affecté et la différenciation génétique entre individus à ce locus (Chapuis & Estoup 2007; Carlsson 2008). Le problème des allèles nuls est à prendre particulièrement en considération lorsque des locus microsatellites mis au point sur une espèce X sont utilisés sur une espèce Y avec les mêmes couples d'amorces. Afin de tester la présence d'allèles nuls, différents couples d'amorces peuvent être utilisées sur un même locus (Chapuis & Estoup 2007).



**Figure III-24 :** Interprétation de fluorogrammes microsatellites. Les ordonnées indiquent l'intensité de la fluorescence (~ quantité de produit) et les abscisses la taille des fragments (en pb).

A : Bandes de bégaiement (stutter) et artefact +A sur un locus à motif dinucléotidique. Les pointillés verticaux indiquent la gamme de taille de chaque allèle connu. L'individu présenté est hétérozygote car il possède les allèles 134 et 140 pb (respectivement avec n et p=n+3 motifs répétés)

B : Dominance de l'allèle court et augmentation relative de l'importance des bandes de bégaiements avec la taille des allèles amplifiés sur un microsatellite à motif tétranucléotidique. L'allèle à 200 pb est amplifié sept fois plus efficacement que l'allèle à 292 pb (intensité relative de fluorescence). Un seul bégaiement faible est observé pour l'allèle court, quatre bégaiements dont un relativement importants sont observés pour l'allèle long.



### III-A-3-b Les microsatellites appliqués à l'ADN ancien : synthèse bibliographique

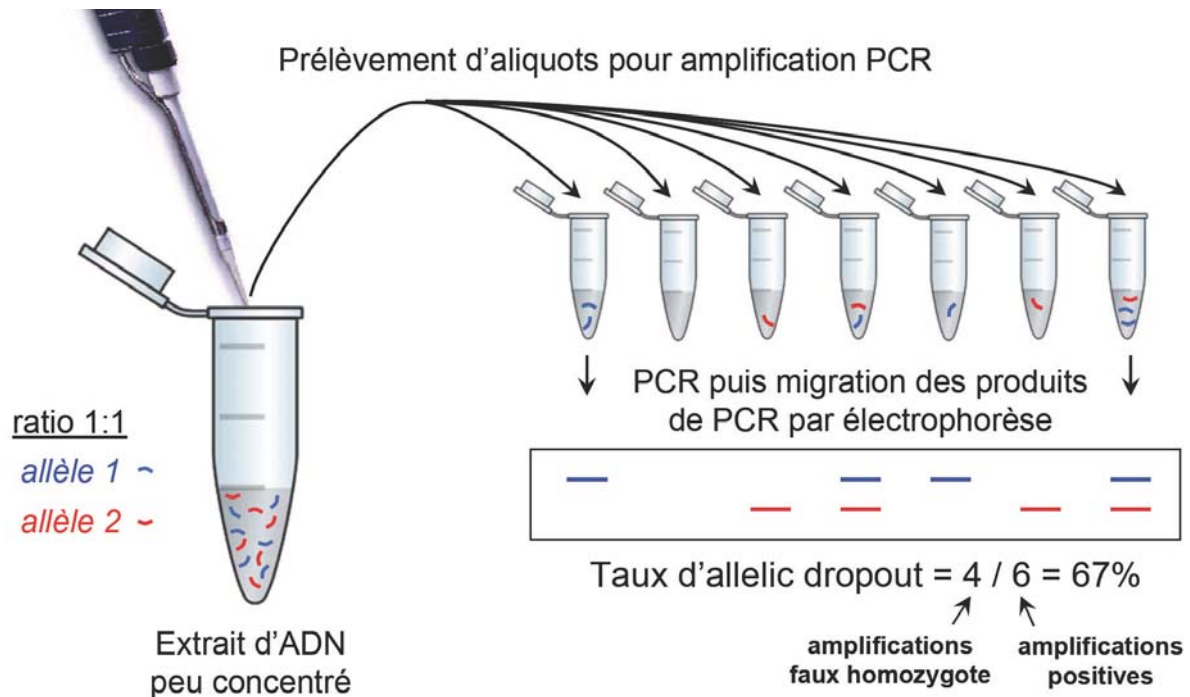
#### ■ Difficultés supplémentaires liées aux substrats ADN dégradés

Alors que les microsatellites s'imposaient comme le marqueur de référence en génétique des populations actuelles, leur utilisation sur des échantillons anciens est restée marginale, ne dépassant que récemment la dizaine de publications par an (Figure III-23).

Cette sous-utilisation est sans doute liée à la rareté de l'ADN nucléaire relativement à l'ADN mitochondrial. Comme tous les marqueurs nucléaires, les microsatellites sont en effet présents en seulement deux copies par cellule – contre parfois plusieurs dizaines voire centaines pour l'ADN mitochondrial – ce qui réduit les chances qu'ils soient préservés au cours du temps. L'étude de l'ADN nucléaire est donc souvent restreinte aux échantillons où les biomolécules sont les mieux préservées.

Par ailleurs lorsque la quantité d'ADN matrice dans les échantillons est faible, de nouveaux biais accompagnent l'utilisation des microsatellites, ce qui rend difficile l'obtention de génotypes microsatellites fiables :

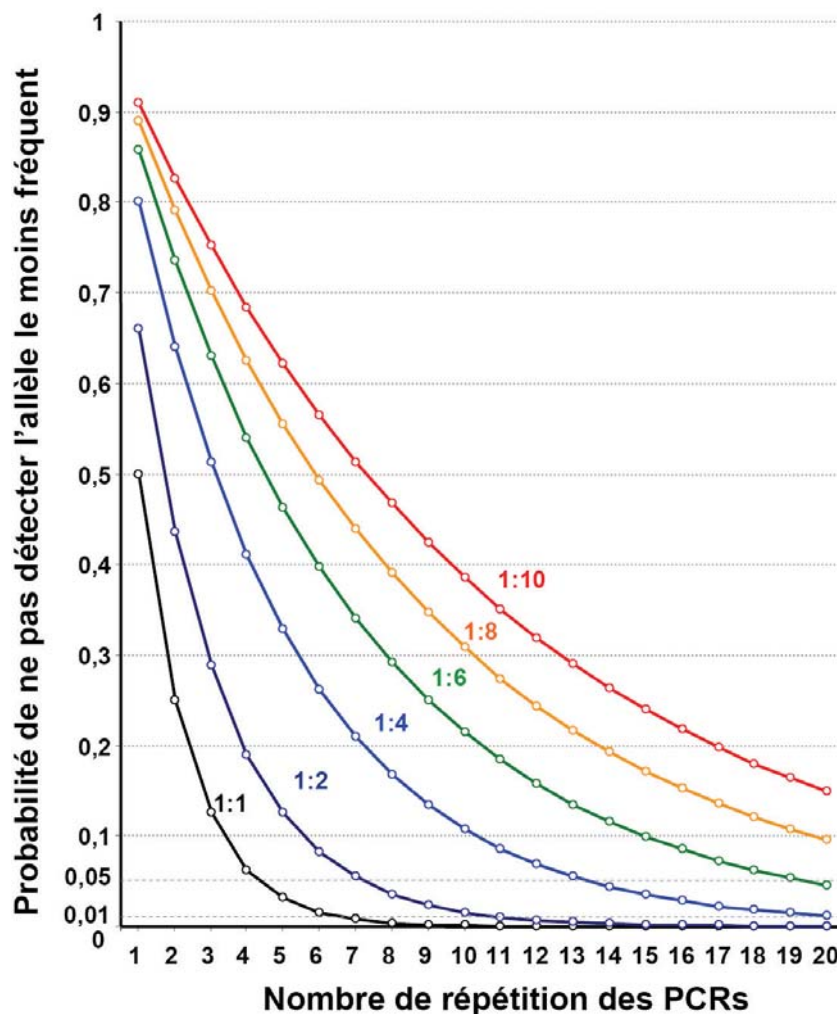
1) Un des deux allèles chez un individu hétérozygote peut ne pas être détecté lors de la PCR, conduisant à un génotypage incorrect de cet individu comme homozygote : c'est l'allelic dropout (Navidi *et al.* 1992; Gerloff *et al.* 1995; Taberlet *et al.* 1996; Gagneux *et al.* 1997; Taberlet *et al.* 1997). Ce biais résulte du pipetage aléatoire d'un seul des deux allèles lors de la préparation des PCRs (Figure III-25). Une solution efficace pour s'affranchir de ce biais est la répétition des PCRs ; en effet, si les deux allèles sont présents à la même concentration dans l'extrait (ratio 1 : 1), la probabilité de ne pas détecter l'un des deux allèles après  $n$  répétition est  $(1/2)^n$  ; après cinq répétitions, cette probabilité tombe en dessous de 5% et après sept répétitions en dessous de 1% (Figure III-26). Sur cette base, Taberlet *et al.* (1996) suggèrent de réaliser trois répétitions dans un premier temps puis quatre supplémentaires en cas d'homozygotie. Le taux d'allelic dropout peut être défini comme le nombre d'amplifications avec dropout (fausse homozygotie) divisé par le nombre total d'amplifications réussies (Broquet & Petit 2004).



**Figure III-25** : Approche multi-tubes et allelic dropout. Deux allèles (représentés en rouge et bleu) sont présents en faible quantité dans l'extrait à étudier (ratio 1 : 1), qui correspond donc à un individu hétérozygote pour ce locus. Lors de la préparation des PCR, un aliqout d'extrait (entre 0,5 et 5  $\mu$ L en général) est prélevé et ajouté dans chaque tube réactionnel. Dans certains tubes de PCR, seul un des deux allèle est présent, l'autre allèle n'ayant pas été pipeté : il y a allelic dropout. Cette situation se reproduit quatre fois sur six amplifications positives dans le cas étudié ici : le taux de dropout est donc de 67%.

2) Un des allèles chez un individu hétérozygote peut être préférentiellement conservé, conduisant à exacerber l'allelic dropout : nous appellerons par la suite ce phénomène allelic dropout amplifié. En effet, nous avons vu dans la partie III-A-2-d que la quantité de molécules amplifiables dans un extrait d'ADN ancien évolue suivant une loi exponentielle décroissante en fonction de la taille du fragment visé. Or les allèles microsatellites diffèrent les uns des autres par le nombre de motifs répétés et donc par la taille : les allèles les plus longs auront donc tendance à être préservés en moins grand nombre que les allèles courts, biaisant le ratio 1 : 1 utilisé par Taberlet *et al.* (1996) dans leur modélisation. Lorsque le ratio existant entre les quantités amplifiables de chacun des deux allèles augmente, le nombre de répétition nécessaire à la détection des deux allèles augmente également : ainsi pour détecter les deux allèles chez un hétérozygote alors qu'ils sont présents à un ratio 1 : 4 dans l'extrait d'ADN, il faut 13 répétitions pour avoir une confiance de 95% et 20

répétitions pour atteindre une confiance de 99% (Figure III-26). De plus, nous avons vu précédemment que la dominance des allèles courts lors de la PCR conduit à leur amplification préférentielle sur substrat moderne. Additionnée à l'allelic dropout amplifié, la dominance des allèles courts augmente encore la difficulté de détecter les allèles longs lorsqu'ils se retrouvent en mélange avec un allèle court, et force à répéter les expériences encore plus de fois. Les effets de l'allelic dropout amplifié et de la dominance des allèles courts sont d'autant plus importants que l'écart de taille entre les allèles est important. La répétition des expériences ayant un coût non négligeable en temps et en argent, la détermination de la loi de dégradation de l'ADN pour chaque échantillon se révèle intéressante afin de focaliser les analyses sur les échantillons les mieux conservés, où le risque d'allelic dropout restera mesuré. Si le ratio de concentration entre les deux allèles est très élevé, il est en effet illusoire d'espérer détecter les deux allèles.



**Figure III-26 :** Nombre de PCR indépendantes nécessaires pour détecter l'allelic dropout à un locus hétérozygote. Les différentes courbes correspondent à différents ratios de quantité des allèles dans l'extrait ADN étudié.

3) Un des allèles chez un individu hétérozygote peut être complètement dégradé : nous appellerons par la suite ce phénomène extinction allélique. Dans le cas où la différence de taille entre allèles est importante et suivant la loi de dégradation suivie par l'échantillon, l'allèle le plus long peut être complètement absent de l'extrait d'ADN ancien. Dans ce cas, quel que soit le nombre de répétitions effectuées, il sera impossible de détecter cet allèle éteint : le génotype sera à tort validé comme homozygote. Ce point, comme le précédent d'ailleurs, reste peu étudié ; nous mènerons donc des développements poussés pour illustrer les points 2 et 3 à partir de notre jeu de données sur les esturgeons.

4) Le bégaiement de la *Taq* polymérase peut conduire à la génération de faux allèles avec une fréquence *a priori* plus importante que sur de l'ADN moderne (Odelberg & White 1993; Taberlet *et al.* 1996; Parsons 2001). En effet, lorsque le nombre de molécules initiant la PCR est très faible, un bégaiement de la *Taq* dans les premiers cycles peut devenir majoritaire à la fin de la PCR par rapport à la séquence originale ; il sera à tort considéré comme un allèle. Le bégaiement de la *Taq* étant plus important sur les motifs mono- et dinucléotidiques, ces types de répétitions sont plus affectés par ce phénomène.

### ■ Un engouement variable pour l'utilisation des microsatellites suivant les différentes sources d'ADN dégradé

Trois grands types d'échantillons à ADN dégradé ont fait l'objet d'analyses utilisant les microsatellites :

1) Les restes paléontologiques et archéologiques enfouis dans les sédiments du sol sont principalement constitués d'ossements et de dents dont l'âge varie entre quelques dizaines d'années et plusieurs dizaines de milliers d'années. La préservation de l'ADN dans ces échantillons dépend de la température, de l'humidité, de la présence de microorganismes dans le milieu, et bien sûr de l'âge. Hormis dans des conditions exceptionnelles (permafrost, certaines grottes), l'ADN est globalement mal conservé dans ce type d'échantillon, et il est donc difficile d'analyser de l'ADN nucléaire et d'obtenir des résultats fiables sur les microsatellites. Très peu d'études se sont d'ailleurs intéressées aux microsatellites sur ce type de substrat (voir le tableau III-1 pour une synthèse bibliographique).

## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES

**Tableau III-1:** Revue des neuf études ayant utilisé les microsatellites sur des restes archéologiques. Les études basées sur des restes humains n'ont pas été incluses en raison du manque de fiabilité et du risque accru de contamination (voir par exemple Ramos *et al.* 1995; Hawass *et al.* 2010). Les études basées sur des microsatellites non nucléaires, sur des microsatellites mononucléotidiques ou avec moins de trois échantillons anciens n'ont pas été considérées.

Référence	Espèce(s)	Nombre, type, provenance et période couverte par les échantillons	Nombre de locus / X-nt / taille moyenne / gamme	Individus positifs / PCR positives	Allèles séquencés	Extraction / PCR indépendantes	Allèle dropout pris en compte / estimé	Faux allèles	Contrôle conservation ADNuc	Statistiques utilisées	Question abordée avec les microsatellites
Greenwood <i>et al.</i> , 2001	Mammouth laineux ( <i>Mammuthus primigenius</i> )	3 ossements de Sibérie et Alaska, 4500-26000 BP	1 / di-nt / 160 / allèle unique	100% / 100%	OUI : désaminations de cytosines	2 / 2 (1 par extraction)	O / N	ND	NON	-	Microsatellite comme contrôle positif de la conservation de l'ADN nucléaire.
Manen <i>et al.</i> , 2003	Vigne ( <i>Vitis vinifera</i> )	6 échantillons (pépins et pulpe) de sites français et hongrois, 1700-2600 BP	3 / di-nt / 130-200 / 10-20	50% / 39%	OUI. Attention, 3 allèles à certains locus car cultivars tetraploïdes	1 (sauf un individu pour lequel 10 pépins ont été extrait et analysés)	N / N	ND	NON	test d'assignation (GENECLASS)	Origine des cultivars anciens de vignes.
Edwards <i>et al.</i> , 2003	Bovins domestiques ( <i>Bos taurus</i> )	19 ossements d'un site irlandais, 1000-1100 BP	3 / di-nt / 75-120 / 15-25	58% / 71%	NON	approche multi-tubes (> 10)	O / 8-28%	ND	NON	Ho, nombre d'allèles, distance génétique	Origine du bétail irlandais actuel.
Shepherd <i>et al.</i> , 2005	Pinguin d'Adélie ( <i>Pygoscelis adeliae</i> )	15 ossements de l'île Inexpressible en Terre Adélie, 6000 BP	9 / mono- di-nt / 80-180 / 2-25	100% / <88%	NON	réplication d'un locus sur 5 échantillons et d'un deuxième locus sur 2 échantillons, mais nombre de PCR non indiqué	N / N	ND	NON	Fst, Ho, nombre d'allèles, fréquences alléliques, test d'assignation	Comparaison des populations anciennes et actuelles de pinguins d'Adélie.

**DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES**

**Tableau III-1 (suite)**

Référence	Espèce(s)	Nombre, type, provenance et période couverte par les échantillons	Nombre de locus / nt / taille moyenne / gamme	X-positifs / PCR positives	Allèles séquencés	Extraction / PCR indépendantes	Allelic dropout pris en compte / estimé	Faux allèles	Contrôle conservation ADNnuc	Statistiques utilisées	Question abordée avec les microsateellites
Lia <i>et al.</i> , 2007	Mais ( <i>Zea mays</i> )	51 graines de 4 sites des Andes, 400-1400 BP	3 / ND / 110-60 / 10-15	17% / ND	OUI. Clones aspécifiques (0-96% suivant les échantillons). Désaminations de cytosines.	plusieurs extractions et PCR indépendantes, mais nombre de réplicats non indiqué (dropout??)	O / IMPOSSIBLE, 100% d'homozygote (100% dropout??)	ND	INDIRECTE, migration sur gel ADN total	test d'assignation	Origine des cultivars andins actuels.
Nichols <i>et al.</i> , 2007	Grand dauphin ( <i>Tursiops truncatus</i> )	157 ossements du site anglais de Flixborough (58 individus minimum), 1000-1400 BP	5 / di-nt / <150 pb / ND	25% / ND	NON	1 / 2-13 suivant la qualité des échantillons	NON	ND	NON	Ho, Fst, test d'assignation (GENECLASS)	Statut de la population disparue de dauphins de Flixborough.
Ludwig <i>et al.</i> , 2008	Esturgeon Atlantique ( <i>A. oxyrinchus</i> )	50 ossements d'un site balistique, 700-1300 BP	7 / tri-tétra-nt / ND / ND	58% / ND	NON	2 / ND	NON	ND	NON	Ho, Fst, test d'assignation (STRUCTURE)	Population source à l'origine de la population d'esturgeons de la Baltique.
Allentoft <i>et al.</i> , 2009	Moas ( <i>Pachyornis elephantopus</i> , <i>Dinornis sp.</i> , <i>Euryapteryx sp.</i> )	74 ossements de 2 sites et de plusieurs musées, 700-3700 BP	1 / di-nt / 106-136 / 30	70% / ND	NON	ND / ND	O / pas d'estimation chiffrée	ND	INDIRECTE, qPCR sur ADNmt	Fis, Ho	Identification de locus microsateellites sur des espèces éteintes par séquençage massif.
Cappellini <i>et al.</i> , 2010	Vigne ( <i>Vitis vinifera</i> )	9 pépins de raisin de 2 sites italien et anglais, 500-1400 BP	5 / di-nt / 130-250 / 4-15	33% / ND	OUI	1 / 2	NON	Certains clones séquencés correspondent aux bandes de bégalement	INDIRECTE, taux de préservation des protéines	test d'assignation (GENECLASS), distances génétiques	Origine des cultivars anciens de vignes.

2) Les spécimens (entiers ou partiels) conservés dans les musées ou dans les collections naturalistes, simplement séchés (insectes, végétaux), naturalisés ou stockés dans l'alcool (ou le formol). Collectés depuis le début du 19<sup>e</sup> siècle, ces échantillons sont récents comparés aux restes archéologiques. La préservation de l'ADN dépend ici du type de tissu utilisé (muscle, os, phanères... ; Casas-Marce *et al.* 2010), des conditions de naturalisation (utilisation de produits chimiques, tannage... ; Hall *et al.* 1997), des conditions de conservation (température, humidité, microorganismes, produits chimiques ; Espeland *et al.* 2010) et de l'âge des échantillons. Ces conditions étant très variables, la quantité et la qualité de l'ADN sont également très variables en fonction des échantillons (Wandeler *et al.* 2007). De plus en plus d'études utilisent les microsatellites pour analyser ce type de matériel, souvent choisi pour contraster les données actuelles et mettre en évidence l'impact des activités humaines sur les populations naturelles depuis deux siècles (voir le tableau III-2 pour une synthèse bibliographique).

3) Les déchets et traces biologiques générés par les organismes pendant leur vie, qui sont donc très récents (hors exception comme dans Poinar *et al.* 2003). Cette catégorie comprend en particulier les fèces, les phanères (poils, écailles, plumes, mues...) et les traces de liquides biologiques (sang, sperme...). La conservation de l'ADN dans ces échantillons dépend de la température, de l'humidité et du temps depuis la séparation de l'organisme source ; concernant les fèces, la conservation de l'ADN dépend également de la source (régime alimentaire, vitesse de renouvellement des cellules du tractus intestinal...). En règle générale, la qualité de l'ADN est meilleure dans les phanères que dans les fèces, pour lesquelles l'inhibition et la contamination sont des facteurs courants. L'intérêt des enquêteurs de la police scientifique (phanères et liquides biologiques) et des biologistes réalisant le suivi de populations naturelles à partir d'échantillons non-invasifs (fèces et phanères) a conduit à l'utilisation massive des microsatellites sur ce type de substrat. Les études analysant les biais d'utilisation des microsatellites sur ADN dégradé traitent d'ailleurs en majorité de ce type d'échantillons (Taberlet *et al.* 1996; Gagneux *et al.* 1997; Gill *et al.* 2000; Morin *et al.* 2001).

**Tableau III-2:** Revue de 38 études ayant utilisé les microsatellites sur du matériel des collections d'histoire naturelles collectées depuis le début du 19<sup>e</sup> siècle. Les études basées sur des microsatellites non nucléaires ou traitant moins de cinq échantillons n'ont pas été considérées.

Référence	Espèce(s)	Types d'échantillons anciens	Echantillons anciens / récents	Période couverte par les échantillons anciens	Nombre de locus / X-nt / taille moyenne / gamme	Individus positifs / PCR positives	Allèles séquencés	Extraction / PCR indépendantes	Allèle dropout pris en compte / estimé	Faux allèles	Contrôle conservation ADNuc	Question biologique
Taylor <i>et al.</i> , 1994	Wombat à nez poilu ( <i>Lasiorhinus Kreffthi</i> )	fourrure et peau	5 / 51	1883-1884	16 / mono-di-tri-nt / 90-280 / 1-45	ND / ND	NON	1 / 1	N / N	ND	NON	Variation génétique après un goulot démographique
Miller & Kapuscinski, 1997	Brochet ( <i>Esox Zucius</i> )	écailles	196 / 72	1961-1977	7 / di-tri-nt / 125-165 / 2-16	100% ? / 100% ?	NON	1 / 1	N / N	ND	NON	Taille efficace au cours du temps d'une population introduite
Nielsen <i>et al.</i> , 1999	Saumon ( <i>Salmo salar</i> )	écailles	228 / 90	1913-1950	4 / ND / ND / ND	ND / ND	NON	1 / 1	O / N	ND	Migration de l'ADN total sur gel	Diversité génétique au cours du temps sur plusieurs populations
Culver <i>et al.</i> , 2000	Puma ( <i>Puma concolor</i> )	peau, poils et os	54 / 261	ND	10 / ND / ND / ND	ND / ND	NON	1 / 1	N / N	ND	NON	Répartition géographique et structuration génétique
Pertoldi <i>et al.</i> , 2001	Loutre d'Europe ( <i>Lutra lutra</i> )	canines	67 / 58	1883-1963	11 / di- et tétra-nt / 150-250 / 20-40	100% ? / 96 100%	NON	1 / 1 ?	O / N	ND	Migration de l'ADN total sur gel	Conséquences génétiques du déclin démographique
Ruzzante <i>et al.</i> , 2001	Morue ( <i>Gadus morhua</i> )	otolithes	574 / 570	1964-1978	6 / ND / 90-300 / 30-190	82% / 82%	NON	1 / 1	N / N	ND	NON	Stabilité génétique malgré un déclin démographique
Hoelzel <i>et al.</i> , 2002	Éléphant de mer ( <i>Mirounga angustirostris</i> )	os	16 / 185	1883-1892	4 / ND / 140-190 / 4-14	87% / ND	NON	1 / >6	O / N	ND	NON	Effet génétique et morphologique d'un goulot démographique



**DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES**

**Tableau III-2 (suite)**

Référence	Espèce(s)	Types d'échantillons anciens	Echantillons anciens / récents	Période couverte par les échantillons anciens	Nombre de locus / X-nt / taille moyenne / gamme	Individus positifs / PCR positives	Allèles séquencés	Extraction / PCR indépendantes	Allelic dropout com-menté / estimé	Faux allèles	Contrôle conservation ADNnuc	Question biologique
Heath <i>et al.</i> , 2002	Truite arc-en-ciel ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	écailles	180 / 90	1958-1984	7 / di-nt / 91-278 / 24-58	98% / ND	NON	1 / 1	N / N	ND	NON	Diversité génétique et Ne au cours du temps
Hauser <i>et al.</i> , 2002	Pagre ( <i>Pagrus auratus</i> )	écailles	372 / 96	1950-1986	7 / ND / ND / ND	ND / ND	NON	1 / 1	N / N	ND	NON	Perte de diversité génétique suite à un goulot démographique
Hansen <i>et al.</i> , 2002	Truite de mer ( <i>Salmo trutta</i> )	écailles	191 / 311	1910-1953	8 / di- tétra-nt / 95-230/ 10-50	>95% / ND	NON	1 / 1 (2 pour 10-40% suivant les locus)	O / ND	ND	NON	Stabilité génétique au cours du temps, estimation NE et adaptation locale
Hansen, 2002	Truite de mer ( <i>Salmo trutta</i> )	écailles	146 / 397	1945-1956	9 / di- tétra-nt / 95-342 / 10-50	> 90% / ND	NON	1 / 1 (2 pour 10-40% suivant les locus)	O / ND	ND	NON	Effets génétiques à long terme de l'introduction de truites d'élevage sur les populations locales
Bellinger <i>et al.</i> , 2003	Tétrras de prairie ( <i>Tympanuchus cupido</i> )	plumes	47 / 87	1951	6 / di-nt / 140-200 / ND	96% / 85-95%	NON	1 / 1 ( 2 pour 50% des échantillons)	O / 0%	ND	ND	Perte de diversité génétique suite à un goulot démographique
Sefc <i>et al.</i> , 2003	Passereaux africains ( <i>Vidua spp.</i> )	plumes	128 / 0	1966-1973	9 / tri- et tétra-nt / 180-300 / 2-25	ND / 82-92%	NON	2 (1 ou 2 plumes) / 2 positives pour hétéro- et 3 pour homo-zygotes	O / 12-19%	1-5% (stutter bands)	Succès d'amplification en fonction de la taille des fragments	Effets de la taille des allèles et de la quantité d'ADN sur le taux d'erreur de génotypage
Meldgaard <i>et al.</i> , 2003	Ombre commun ( <i>Thymallus thymallus</i> )	écailles	>87 / 185	1940-1946	8 / di-nt / < 300 / ND	ND / ND	NON	1 / 1 (2 PCR pour 27 échantillons)	N / N	ND	NON	Impact des chutes d'eau sur les populations
Flagstad <i>et al.</i> , 2003	Loup ( <i>Canis lupus</i> )	os et tissu	57 / 22	1829-1979	19 / di- tri- tétra- hexa-nt /	57% / ND	NON	>2 / >2	O / 9%	ND	NON	Variabilité génétique et migration lors du déclin démographique d'une population

**DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES**

**Tableau III-2 (suite)**

Référence	Espèce(s)	Types d'échantillons anciens	Echantillons anciens / récents	Période couverte par les échantillons anciens	Nombre de locus / X-nt / taille moyenne / gamme	Individus positifs / PCR positives	Allèles séquencés	Extraction / PCR indépendantes	Allèle dropout / commenté / estimé	Faux allèles	Contrôle conservation ADNnuc	Question biologique
Miller & Waits, 2003	Ours brun ( <i>Ursus arctos</i> )	os du crâne	110 / 0	1912-1981	8 / di-nt / 105-220 / 10-20	84% / ND	NON	1 (2 pour 30% des échantillons) / >3	O / 14%	1-5%	NON	Suivi de la taille efficace d'une population au cours du temps
Wisely <i>et al.</i> , 2004	Furet à pattes noires ( <i>Mustela nigripes</i> )	peau ou os cavité nasale	76 / 0	1893-1985	8 / di-nt / 104-227 / ND	ND / 67%	NON	1 / 1	O / 27%	ND	NON	ADN mieux préservé dans les os de la cavité nasale que dans la peau
Johnson <i>et al.</i> , 2004	Tétras de prairie ( <i>Tympanuchus cupido</i> )	plumes	83 / 159	1951-1954	6 / ND / ND / ND	ND / ND	NON	1 / 1 (3 pour les locus homozygotes)	N / 0%	ND	NON	Variations génétique et Ne au cours d'un goulot démographique
Hoffman <i>et al.</i> , 2004	Grenouille léopard ( <i>Rana pipiens</i> )	peau (1 cm <sup>2</sup> )	204 / 188	1971-1979	7 / tetra-nt / 135-607 / 26-300	100% ? / ND	NON	1 / 1	O / 0% ?	ND	NON	Structure génétique et Ne au cours du temps
Harper <i>et al.</i> , 2006	Papillon azuré bleu céleste ( <i>Polyommatus bellargus</i> )	pattes	20 / 74	1896	4 / mono- di- et hexa-nt / 145-255 / 10-60	ND / ND	NON	1 ? / 1 ?	N / N	ND	Migration de l'ADN total sur gel.	Dérive génétique importante associée à ur goulot démographique
Coughlan <i>et al.</i> , 2006	Truite de mer ( <i>Salmo trutta</i> )	écailles	282 / 0	1958-1995	7 / ND / ND / ND	"la plupart" / ND	NON	1 (2 pour 50% des échantillons) / 1 (2 pour 50% des échantillons)	N / 0%	ND	NON	Variation génétique (en particulier MHC) temporelle liée à l'aquaculture
Pertoldi <i>et al.</i> , 2006	Hermine ( <i>Mustela erminea</i> )	fourrure et peau (1 cm <sup>2</sup> )	43 / 86	1864-1961	11 / di-nt / 140-250 / ND	?	NON	1 (2 pour 27 échantillons) / ?	O / 0%	ND	NON	Comparaison population ancienne/actuelle : pas de perte de diversité génétique
Nystrom <i>et al.</i> , 2006	Renard polaire ( <i>Alopex lagopus</i> )	dents et os	51 / 31	1831-1924	5 / ND / ND / ND	41% / ND	NON	1 (2 pour 13 échantillons) / 2 (+2 supplémentaires si homozygotie)	O / 16%	ND	NON	Conséquences génétiques d'un goulot démographique

**DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES**

**Tableau III-2 (suite)**

Référence	Espèce(s)	Types d'échantillons anciens	Echantillons anciens / récents	Période couverte par les échantillons anciens	Nombre de locus / X-nt / taille moyenne / gamme	Individus positifs / PCR positives	Allèles séquencés	Extraction / PCR indépendantes	Allelic dropout estimé	Faux allèles	Contrôle conservation ADNnucc	Question biologique
Austin & Melville, 2006	Grenouilles d'Australie ( <i>Litoria spp.</i> )	foie, muscle de la cuisse, phalanges	7 / 0	1960-1975	1 / di-nt / 116-136 / 20	57% / ND	NON	1 / >2	0 / 0%	ND	NON	Faisabilité de l'amplification de microsatellites sur des spécimens de musée
Martinez-Cruz et al., 2007	Aigle royal ( <i>Aquila adalberti</i> )	pattes ou plumes	51 / 79	1853-1903	10 / di- tétra-nt / 98 223 / 2-32	63% / ND	NON	1 / 1 (3 pour 3 des 10 locus)	0 / <0,1%	ND	NON	Fragmentation des populations et structure génétique spatio-temporelle
Brown et al., 2007	Faucon pèlerin ( <i>Falco peregrinus</i> )	pattes	95 / 184	1885-1966	12 / di-nt / 96-206 / 2-20	la plupart / ND	NON	1 / 1 (2 pour 10% des échantillons)	0 / N	ND	NON	Impact génétique d'un goulot démographique induit par le DDT
Watts et al., 2007	Coléoptère Agrion de mercure ( <i>Coenagrion mercuriale</i> )	tibia	133 / 0	1924-1989	10 / di- tri-nt / 118-272 / 3-63	40% / 44%	NON	1 / >2	0 / N	ND	PicoGreen (dosage ADN total)	Faisabilité de l'utilisation des microsatellites sur des Insectes séchés de musée
Taylor et al., 2007	Passeraux Néozélandais ( <i>Petroica spp.</i> )	doigt de patte	87 / 334	1873-1965	32 / ND / 75-316 / 2-86	ND / ND	NON	1 (2 pour 22 échantillons)	0 / N	ND	Nanodrop (dosage ADN total)	Effets génétiques différents d'un goulot démographique sur deux espèces proches
Schwartz et al., 2007	Glouton ( <i>Gulo gulo</i> )	crânes	9 / 0	1891-1922	9 / di- tri-nt / 100-190 / 8-18	29% / ND	NON	1 / 3	N / N	ND	NON	Isolément géographique d'une population
Pertoldi et al., 2008	Marte ( <i>Martes martes</i> )	poils et dents	46 / 59	1892-1970	11 / ND / ND / ND	ND / ND	NON	1 (2 pour les homozygotes) / 2 (4 pour les homozygotes)	0 / N	ND	NON	Dérive génétique accentuée après goulot démographique
Wisely et al., 2008	Furet à pattes noires ( <i>Mustela nigripes</i> )	peau et os	86 / 11	1883-1985	8 / di-nt / 104-227 / ND	95% / 63%	NON	1 / >3	0 / 24%	ND	NON	Expansion holocène de populations nord-américaines

**DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES**

**Tableau III-2 (suite)**

Référence	Espèce(s)	Types d'échantillons anciens	Echantillons anciens / récents	Période couverte par les échantillons anciens	Nombre de locus / X-nt / taille moyenne / gamme	Individus positifs / PCR positives	Allèles séquencés	Extraction / PCR indépendantes	Allelic dropout estimé	Faux allèles	Contrôle conservation ADNnuc	Question biologique
Jacobsen <i>et al.</i> , 2008	Faucon pèlerin ( <i>Falco peregrinus</i> )	peau et plumes	38 / 0	1877-1955	11 / di-nt / ND / ND	92% / 99%	NON	1 / 2 ou 3	O / 3,1%	3,7%	NON	Influence génétique d'individus étrangers introduits dans une population menacée
Lozier <i>et al.</i> , 2009	Bourdon ( <i>Bombus spp.</i> )	pattes	111 / 106	1969-1972	9 / ND / ND / ND	ND / ND	NON	1 / 2	N / N	ND	NON	Diversité génétique comparée pour une espèce en déclin et une autre stable démographiquement
Groombridge <i>et al.</i> , 2009	Faucon des Seychelles ( <i>Falco araea</i> )	patte	43 / 60	1840-1940	11 / di- tetra- hexa- nt /	100% / 75%	NON	1 / 3	O / N	ND	NON	Diversité géénétique d'une espèce après goulot démographique et rétablissement récent
Riccioni <i>et al.</i> , 2010	Thon rouge ( <i>Thunnus thynnus</i> ), caudales	vertèbres caudales	219 / 256	1911-1927	8 / di- tétra- nt / 90- 220 / 8-80	94% / ND	OUI (tous les locus pour 20 échantillons)	1 / 1 (5 pour 20 des échantillons)	O / N	2 faux allèles à haute fréquence sur 2 locus pour 1 population ont poussé les auteurs à exclure celle-ci des analyses (n=111)		Structuration des populations et rétention de diversité génétique dans des populations dépeuplées
Casas-Marce <i>et al.</i> , 2010	Lynx ( <i>Lynx pardinus</i> )	peau, coussinet, os et dents	25 / 0	1954-2006	1 / di-nt / 177-185 / 8	100% / 0-100%	NON	8 / 3	N / N	ND	qPCR ADNmt et ADNnuc	Meilleure conservation de l'ADN dans les os que dans les tissus
Mizuki <i>et al.</i> , 2010	Bourdon ( <i>Bombus diversus</i> )	pattes	55 / 143	1986-1987	8 / ND / ND / ND	83% / ND	NON	1 / 1	O / "peu élevé"	ND	NON	Impact mineur du broutage des cerfs sur la diversité génétique des bourdons
Lambert <i>et al.</i> , 2010	Huia dimorphe † ( <i>Heteralocha acutirostris</i> )	pattes	43 / 0	1870-1969	6 / di- tri-nt / 72- 186 / 2-16	72% /	NON	1 (2 pour 4 échantillons) / 7	O / 3-20% suivant les locus	0,007	NON	Faible structuration génétique malgré l'incapacité à voler

### III-A-3-c Les microsatellites appliqués à l'ADN ancien : sélection des locus

#### ■ Critères de sélection généraux

Lorsque les locus sont nouvellement décrits, ou s'ils ont été identifiés originellement sur une autre espèce, il est important de tester leurs caractéristiques d'amplification sur l'espèce cible avant d'entreprendre une étude à grande échelle. Cette étape consiste à amplifier les microsatellites sur de l'ADN extrait d'échantillons actuels représentant au mieux la diversité de l'espèce, et permet (i) d'identifier d'éventuels défauts d'amplification – allèle nul, signal faible – liés à des polymorphismes dans les zones d'amorçage, (ii) de vérifier le polymorphisme de longueur de chacun des locus (plus il y a d'allèles, plus le locus est informatif) et (iii) de vérifier leur héritabilité (transmission mendélienne de génération en génération).

#### ■ Critères de sélection pour l'ADNa : sur la taille des fragments

Comme pour l'ADNmt, les fragments nucléaires courts ont plus de chance d'être préservés au cours du temps que les fragments longs. L'expérience acquise sur les microsatellites appliqués aux collections zoologiques montre que les locus dont les allèles dépassent 200 pb s'amplifient mal voire pas du tout (Nielsen *et al.* 1999; Taylor *et al.* 2007; Lozier & Cameron 2009) ; la taille des fragments ciblés doit donc être inférieure à 200 pb, et dans l'idéal la plus courte possible. Par ailleurs, cibler des locus longs revient souvent à cibler des locus avec un nombre important de répétition du motif central, or plus il y a de répétitions et plus le bégaiement de la polymérase est important donc plus les risques de confondre les allèles (génération de faux allèles) sont grands. Ne s'intéresser qu'aux locus relativement courts permet de s'affranchir de ce biais.

Si certains locus intéressants sont trop longs, il est envisageable lorsque cela est possible de réduire la taille de fragments amplifiés en dessinant de nouvelles amorces dans les régions flanquantes (Flagstad *et al.* 2003; Watts *et al.* 2007).

L'utilisation de PCR nichées (ou nested PCR ; un couple d'amorce externe dans une première phase d'amplification puis un couple d'amorces internes lors d'une seconde phase) n'est pas recommandée sur les microsatellites anciens, car même si elles augmentent la spécificité d'amplification elles nécessitent de cibler des fragments plus longs (le succès d'amplification sera donc réduit).

Afin de limiter la dominance de l'allèle court et l'allelic dropout (et donc d'éviter l'extinction allélique), les allèles d'un même locus doivent rester dans une gamme de taille relativement restreinte (Nielsen *et al.* 1999). Dans le cas contraire, les allèles les plus longs seront trop dégradés par rapport aux allèles courts pour être coamplifiés avec ceux-ci chez les individus hétérozygotes. Une variation de taille de l'ordre de 10-50 pb semble raisonnable.

### ■ Critères de sélection pour l'ADNa : sur les motifs répétés

L'intensité des artefacts de glissement lors de la PCR dépend de la nature du motif répété : les microsatellites les plus sujets aux artefacts sont dans l'ordre les mononucléotidiques > dinucléotidiques > trinuéotidiques et tétranucléotidiques (Edwards *et al.* 1991; Chakraborty *et al.* 1997; Schug *et al.* 1998). Les motifs tri- et tétranucléotidiques sont donc à privilégier pour les études sur ADNa afin de limiter les faux allèles potentiellement générés par les bandes de glissement (Ramos *et al.* 1995).

La sélection des locus à motifs tri- et tétranucléotidiques est néanmoins à double tranchant, car le motif de base étant plus long, les allèles de ces locus couvrent généralement une gamme de taille plus grande (10 allèles consécutifs différant par l'ajout d'un motif répété couvrent 20 pb si le motif de base est dinucléotidique, 30 pb s'il est trinuéotidique et 40 pb s'il est tétranucléotidique). Le choix de locus tri- ou tétranucléotidique dont la gamme de taille d'allèles est réduite biaise donc *a priori* la sélection vers des locus moins polymorphes (Watts *et al.* 2007).

### ■ Application à l'esturgeon européen

De nombreux locus microsatellites ont été identifiés à partir d'*A. oxyrinchus* (King 2001; Henderson-Arzapalo & King 2002), *A. fluvescens* (May *et al.* 1997; McQuown *et al.* 2002; Welsh *et al.* 2003; Welsh & May 2006), *A. naccarii* (Zane *et al.* 2002; Forlani *et al.* 2008), *A. sinensis* (Zhu *et al.* 2005) ou encore *Scaphirhynchus platyrinchus* (McQuown *et al.* 2000). Nous avons puisé dans ce vivier existant pour sélectionner cinq locus parmi 27 testés, utilisables sur substrat ADN ancien pour étudier la diversité intraspécifique chez *A. sturio* (Figure III-27).

Seule la population girondine d'*A. sturio* subsiste actuellement, l'amplificabilité des locus n'a donc été testée que sur cette population résiduelle (non représentative de l'ensemble de l'espèce). Afin de prendre la mesure du polymorphisme des locus, nous les avons également testés sur trois populations d'*A. oxyrinchus*, considérant qu'un locus polymorphe à l'échelle de l'espèce *A. oxyrinchus* avait de fortes chances d'être polymorphe à l'échelle de l'espèce *A. sturio* du fait de leur proximité phylogénétique. Les échantillons actuels analysés sont les mêmes que ceux utilisés dans l'article n°1.

Parmi les 27 locus testés sur *A. sturio*, 12 s'amplifiaient mal ou pas du tout, trois étaient monomorphes (un seul allèle) et un ne présentait pas une hérédité mendélienne (Figure III-27). Ces 16 locus ont été éliminés.

Sur les 11 locus restants, deux présentaient des allèles trop longs (>200 pb) et une gamme de taille d'allèles trop variables (>100 pb entre les allèles les plus courts et les plus longs) et un autre comportait un motif dinucléotidique. Ces trois locus ont aussi été écartés (Figure III-27).

Enfin, parmi les huit locus potentiellement utilisables sur l'ADN ancien, nous en avons retenu cinq sur la base de leur utilisation préalable sur substrat ancien (Ludwig *et al.* 2008), sur leur capacité à également discriminer les espèces d'esturgeons d'Europe (voir l'article n°1) et sur la taille et le nombre des allèles identifiés.

Une fois les cinq locus choisis – LS19, LS54, LS68, Aox23 et AoxD161 – nous avons raccourci les fragments correspondant aux locus LS19, LS54, LS68 et AoxD161, afin de faciliter leur amplification sur les extraits d'ADNa. Les amorces LS19-Fshort (5'-CCACAGAAAACCCCATAGTC-3'), LS19-Rshort2 (5'-CCCTAATAC-AATGGCAATTATATAG-3'), LS54-Fshort (5'-TCTKTCAAGGTATACTTTAG-3'), LS54-Rshort (5'-GCAGACAAAATAGCATTTCAG-3'), LS68-Fshort2 (5'-TATACAGCT-CAGCAWAAGCA-3') et AoxD161-Rshort (5'-CAGCTAATACACAGATAGTGT-3') ont ainsi été dessinées, permettant de raccourcir les fragments de respectivement 36, 68, 28, et 22 pb pour LS19, LS54, LS68 et AoxD161. Le fragment visant le locus Aox23 n'a pas été raccourci en raison de la proximité des amorces avec la zone répétée.

## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES

**Figure III-27 :** Procédure de sélection de locus adaptés à l'ADNa pour l'analyse intraspécifique d'*A. sturio*.

Locus	Espèce source et référence	Motif répété (a)	Amplification sur <i>A. sturio</i>	Taille des allèles oxy-stu (b)	Gamme de taille oxy-stu (b)	Nombre d'allèles oxy/stu (c)	Héritabilité	Déjà utilisé sur ADNa
An16	<i>A. naccarii</i> (Zane <i>et al.</i> , 2002)	tétra	-	-				-
An20	<i>A. naccarii</i> (Zane <i>et al.</i> , 2002)	di & tétra	-	-				-
AnacB11	<i>A. naccarii</i> (Forlani <i>et al.</i> , 2008)	di	+	136-152	16	5 / 2	disomique mendélienne	-
AnacA6	<i>A. naccarii</i> (Forlani <i>et al.</i> , 2008)	di	-					-
AnacB3	<i>A. naccarii</i> (Forlani <i>et al.</i> , 2008)	di	+	204-328	124	3 / 1	disomique mendélienne	-
AnacB10	<i>A. naccarii</i> (Forlani <i>et al.</i> , 2008)	tri	-					-
AnacB7	<i>A. naccarii</i> (Forlani <i>et al.</i> , 2008)	di	-					-
AnacC11	<i>A. naccarii</i> (Forlani <i>et al.</i> , 2008)	tétra	+	115	0	1 / 1	disomique mendélienne	-
AnacG8	<i>A. naccarii</i> (Forlani <i>et al.</i> , 2008)	di	-					-
AnacE4	<i>A. naccarii</i> (Forlani <i>et al.</i> , 2008)	di	-					-
AnacA1	<i>A. naccarii</i> (Forlani <i>et al.</i> , 2008)	di	+	138-150	12	3	trisomique atypique	-
AnacD3	<i>A. naccarii</i> (Forlani <i>et al.</i> , 2008)	tétra	+/-					-
Spl120	<i>S. platyrhynchus</i> (McQuown <i>et al.</i> 2000)	tétra	+/-					-
Aox-12	<i>A. oxyrinchus</i> (King <i>et al.</i> 2001)	di & hexa	+	149-203	54	5 / 1	disomique mendélienne	+
Aox-23	<i>A. oxyrinchus</i> (King <i>et al.</i> 2001)	tri	+	98-135	37	9 / 2	disomique mendélienne	+
Aox-45	<i>A. oxyrinchus</i> (King <i>et al.</i> 2001)	tri	+	106-151	45	11 / 3	disomique mendélienne	+
LS-19	<i>A. fulvescens</i> (May <i>et al.</i> 1997)	tri	+	120-144	24	4 / 2	disomique mendélienne	+
LS-34	<i>A. fulvescens</i> (May <i>et al.</i> 1997)	tri	+/-					-
LS-39	<i>A. fulvescens</i> (May <i>et al.</i> 1997)	tri	+/-					+
LS-54	<i>A. fulvescens</i> (May <i>et al.</i> 1997)	tétra	+	168-192	24	3 / 2	disomique mendélienne	+
LS-68	<i>A. fulvescens</i> (May <i>et al.</i> 1997)	tétra	+	136-168	32	9 / 2	disomique mendélienne	+
AoxC45	<i>A. oxyrinchus</i> (Henderson & King 2002)	tétra	+/-					-
AoxC55	<i>A. oxyrinchus</i> (Henderson & King 2002)	tétra	+	114-142	28	3 / 3	disomique mendélienne	-
AoxD161	<i>A. oxyrinchus</i> (Henderson & King 2002)	tétra	+	128-174	46	7 / 4	disomique mendélienne	-
AoxD170	<i>A. oxyrinchus</i> (Henderson & King 2002)	tétra	+	142-190	48	8 / 2	disomique mendélienne	-
AoxD241	<i>A. oxyrinchus</i> (Henderson & King 2002)	tétra	+	148-268	120	19 / 3	disomique mendélienne	-
AoxD234	<i>A. oxyrinchus</i> (Henderson & King 2002)	tétra	+	198-318	120	17 / 3	disomique mendélienne	-

(a) type de motif : di-, tri-, tétra- ou hexanucléotidique

(b) taille et écart de taille maximal des allèles identifiés chez *A. oxyrinchus* et *A. sturio*

(c) Nombre d'allèles identifiés chez *A. oxyrinchus* et *A. sturio*



Le séquençage de tous les allèles modernes identifiés pour *A. sturio* et *A. oxyrinchus* sur ces cinq locus a permis d'établir des outils diagnostiques au niveau spécifique (article n°1), mais aussi une référence moderne solide à laquelle les allèles amplifiés sur les échantillons anciens d'*A. sturio* pourront être comparés.

La maîtrise de l'analyse des locus sur des échantillons modernes est un préalable indispensable au passage sur des échantillons anciens, l'étude de ces derniers s'accompagnant souvent d'artefacts qu'il est important de pouvoir facilement identifier par comparaison avec la référence moderne.

### III-A-3-d Les microsatellites appliqués à l'ADN ancien : protocole d'amplification

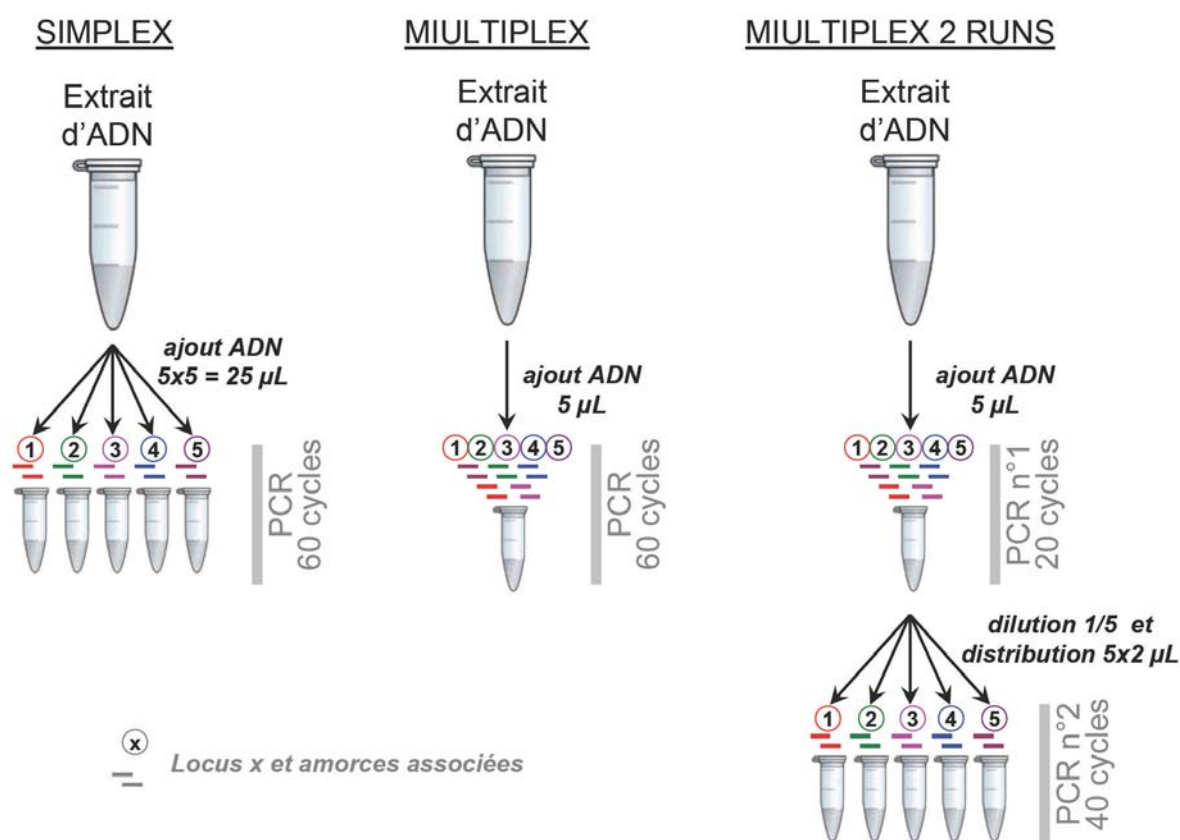
#### ■ Simplex, multiplex ou multiplex en deux runs ?

Plusieurs types de protocole peuvent être utilisés pour amplifier les locus microsatellites. Le plus simple dit « PCR simplex » consiste à amplifier séparément les différents locus (Figure III-28) ; ce protocole est assez lourd car il implique un nombre de tubes important ; de plus il est très consommateur de substrat (*i.e.* d'extrait ADN), qui doit en effet être ajouté dans chaque tube réactionnel.

Afin de minimiser le temps d'expérimentation et d'économiser le substrat, il est très courant de multiplexer les réactions de PCR (Chamberlain *et al.* 1988; Edwards *et al.* 1991; Kimpton *et al.* 1993), c'est-à-dire de coamplifier plusieurs locus dans la même réaction (Figure III-28) ; cette méthode conduit néanmoins à un taux d'amplification aspécifique plus important (le nombre de combinaison d'amorçage aspécifique augmentant avec le nombre d'amorces en solution) ainsi qu'à des biais d'amplification (l'efficacité d'amplification des différents locus étant variable, certains locus sont parfois mieux amplifiés que d'autres) (Edwards & Gibbs 1994). Ces biais étant démultipliés sur ADNa, il est peu recommandé d'utiliser un protocole PCR multiplex sur substrat dégradé.

Un compromis entre simplex et multiplex existe avec la PCR multiplex en deux runs. Ce protocole consiste à amplifier tous les locus en multiplex dans une première phase, puis à utiliser les produits issus de cette première phase pour amorcer une PCR simplex sur chacun des locus (Figure III-28). Cette méthode permet de s'affranchir des inconvénients du multiplex, puisque les artefacts et les variations

d'efficacité entre locus sont gommés lors de la seconde phase d'amplification simplex. La méthode permet de plus d'économiser le substrat, puisque la première étape est multiplexée. Son seul désavantage est d'être plus lourde en manipulations puisque deux phases sont nécessaires au lieu d'une. La PCR multiplex en deux runs a été mise au point pour une utilisation sur substrat ADN dégradé (Bellemain & Taberlet 2004; Piggott *et al.* 2004) et a été utilisée à maintes reprises sur de tels substrats par la suite (Hedmark & Ellegren 2006; Krause *et al.* 2006; Rompler *et al.* 2006; Krause *et al.* 2008; Lampa *et al.* 2008).



**Figure III-28 :** Protocoles d'amplification simplex, multiplex et multiplex en deux runs.

■ Comparaison expérimentale des trois approches

Afin de vérifier l'efficacité relative des différents protocoles, nous avons réalisé une série d'amplifications sur le locus microsatellites LS19 dans différentes conditions. Pour cela, nous avons commandé des oligonucléotides synthétiques correspondant aux deux allèles identifiés sur les *A. sturio* de Gironde (respectivement 5 et 13 motifs TTG ; nommés a86 et a110 par la suite en référence à

leur taille après amplification avec les amorces LS19-Fshort et LS19-Rshort); ces molécules ont été livrées à une concentration précise garantie par le fournisseur (Eurogentec®), nous avons donc pu réaliser différents mélanges désignés A à F (Tableau III-3). Pour confirmer la validité des concentrations indiquées par le fournisseur, nous avons réalisé des quantifications par qPCR des solutions a86 et a110 ; les résultats obtenus sont concordants avec les indications du fournisseur. Afin de pouvoir les distinguer des molécules naturelles d'esturgeons par séquençage et qPCR (comparaison des courbes de fusion), la séquence des oligonucléotides synthétiques a été modifiée au niveau de six bases de la région flanquantes 3' par rapport à la séquence originale.

	[a86] (mol.L <sup>-1</sup> )	[a110] (mol.L <sup>-1</sup> )	Concen- tration	Ratio a86/a110
A	10 <sup>-14</sup>	10 <sup>-14</sup>	forte	1
B	10 <sup>-17</sup>	10 <sup>-17</sup>	faible	1
C	10 <sup>-14</sup>	5.10 <sup>-15</sup>	forte	2
D	10 <sup>-17</sup>	5.10 <sup>-18</sup>	faible	2
E	2,5.10 <sup>-14</sup>	5.10 <sup>-16</sup>	forte	50
F	2,5.10 <sup>-15</sup>	5.10 <sup>-18</sup>	faible	50

Pour indication : 10<sup>-14</sup> mol.L<sup>-1</sup> ~ 6000 molécules par µL  
 10<sup>-15</sup> mol.L<sup>-1</sup> ~ 600 molécules par µL  
 10<sup>-16</sup> mol.L<sup>-1</sup> ~ 60 molécules par µL  
 10<sup>-17</sup> mol.L<sup>-1</sup> ~ 6 molécules par µL

**Tableau III-3 :** Composition des mélanges A à F utilisés pour les tests d'amplification du locus LS19.

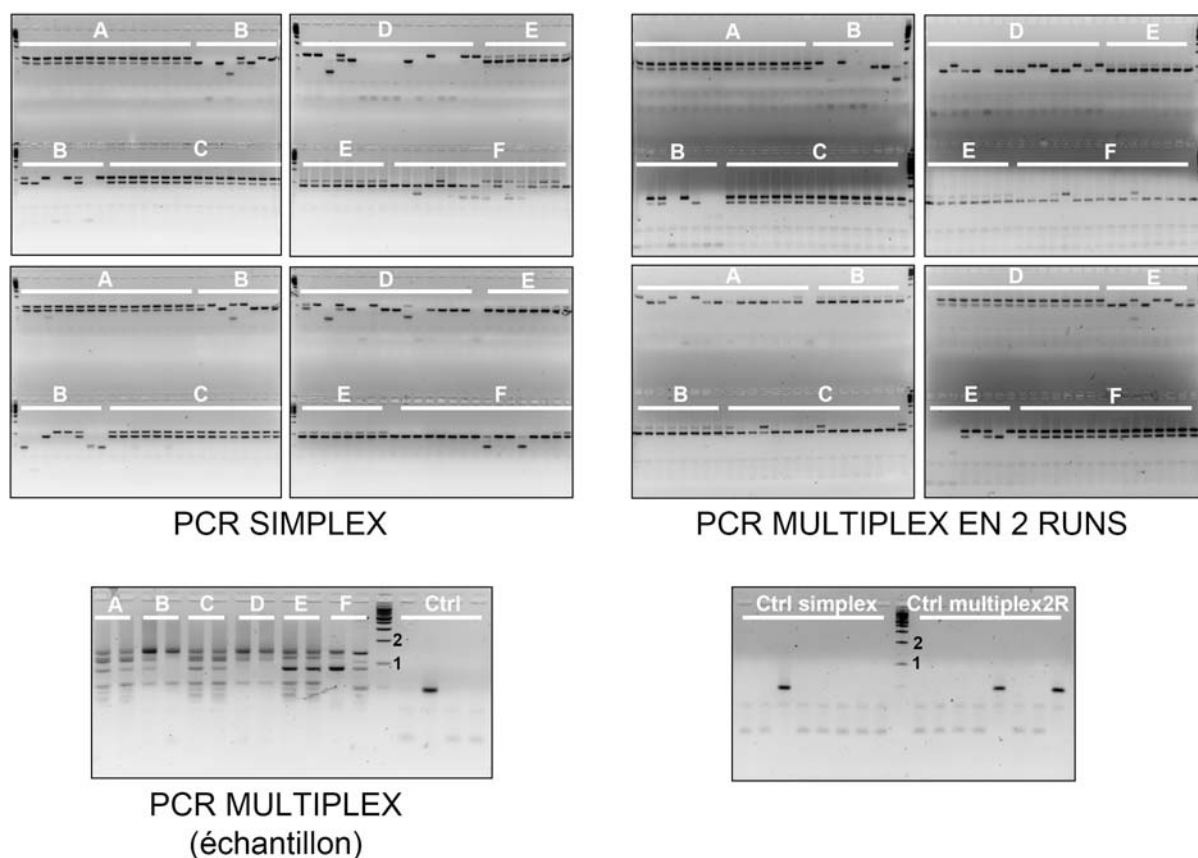
Le choix de réaliser la comparaison des protocoles d'amplification à partir d'oligonucléotides synthétiques – et pas à partir d'extraits anciens d'esturgeons – est basé sur la possibilité de pouvoir contrôler tous les paramètres réactionnels. En particulier, la concentration relative des allèles court / long ainsi que l'inhibition sont variables d'un échantillon naturel à l'autre, ce qui ne facilite pas les comparaisons basées sur des extraits anciens.

Nous avons testé l'amplification des fragments a86 et a110 dans les différents mélanges A à F en utilisant un protocole simplex, un protocole multiplex et un protocole multiplex en deux runs. Les réactions se sont déroulées dans un volume

de 25 µL comprenant 1 µL de mélange d'allèles LS19 ; pour l'amplification simple, les conditions sont les mêmes que celles utilisées dans l'article n°1 ; pour l'amplification multiplex en deux runs, les conditions sont explicitées dans la partie suivante sur l'ADNa ; pour l'amplification multiplex, les conditions sont les mêmes que celles de la première phase de la PCR multiplex en deux runs. Dans tous les cas, l'ADN polymérase Taq Gold (ABI) a été utilisé. Les fragments de 86 et 100 pb ont été obtenus en utilisant les amorces LS19Fshort et LS19Rshort, LS19-Fshort étant marquée avec un fluorochrome 6-FAM pour détection lors du génotypage. Dans le cas des protocoles multiplex et multiplex en deux runs, les quatre autres locus ont été coamplifiés avec LS19 en utilisant des amorces non fluorescentes pour ne pas interférer avec la détection du locus LS19. Des produits de PCR correspondant à chacun des quatre autres locus ont été purifiés, dosés au nanodrop puis dilués et mélangés afin d'obtenir une solution équimolaire à  $10^{-14}$  mol.L<sup>-1</sup> et une solution équimolaire à  $10^{-17}$  mol.L<sup>-1</sup> ; la solution la plus concentrée a été utilisée comme matrice pour la coamplification avec LS19 dans les mélanges A, C et E ; la solution la moins concentrée comme matrice de coamplification avec LS19 dans les mélanges B, D et F.

Pour chaque condition de protocole et de mélange, 32 réplicats ont été effectués. Pour la moitié des réplicats, un aliquot d'extrait d'ADNa d'ours des cavernes a été ajouté (4% du volume réactionnel) afin de prendre en compte d'éventuels effets carrier (amplification favorisée par des molécules d'ADN aspécifiques) et d'inhibition. Les résultats des 16 tubes avec extrait d'ours n'étant pas différents des 16 tubes sans extrait d'ours (quelles que soient les conditions), nous avons regroupé les 32 tubes lors des analyses statistiques.

L'ensemble des produits de PCR a été déposé et séparé par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure III-29). Afin de confirmer les observations réalisées à partir des gels, les produits ont également été génotypés sur un séquenceur ABI PRISM 3130XL par électrophorèse en tube capillaire, permettant en particulier de déterminer précisément la taille des fragments amplifiés et l'importance des bandes de bégaiement artefactuelles. Le génotypage était indispensable pour le protocole multiplex puisque les produits correspondant aux différents locus se retrouvent mélangés à l'issue de la PCR.



**Figure III-29 :** Test des protocoles PCR simplex, multiplex et multiplex en deux runs sur différents mélanges contenant des proportions variables des allèles a86 et a110 du locus LS19. Pour la PCR multiplex, seul un échantillon des 192 amplifications est présenté. Pour les PCR simplex et multiplex en deux runs, les contrôles sans ADN sont présentés sur un gel à part (en bas à droite). Les bandes du marqueur de taille à 100 et 200 pb sont indiquées (1 et 2).

Les résultats obtenus confirment la validité du modèle expérimental établi (Tableau III-4). En effet, pour les mélanges les moins concentrés en ADN (B, D et F), le succès d'amplification est moindre et l'allelic dropout très important comparé aux mélanges plus concentrés (A, C et E). De plus, les mélanges où les allèles a86 et a110 n'étaient pas présents en concentration équimolaire sont caractérisés par un déséquilibre du succès d'amplification en faveur de l'allèle le plus concentré (a86 en l'occurrence ; mélanges D et F).

Les trois protocoles d'amplification sont tous aussi efficaces lorsque la concentration en molécules matrices est suffisante (mélanges A, C et E), et ce même si l'allèle le plus court est 50 fois plus concentré que l'allèle long (mélange E). Dans ces conditions, une coamplification des deux allèles est systématiquement observée.

## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES

Protocole	Mix	% amplification positive	% artefact	% allelic dropout	% hétérozygotie apparent	% homozygotie apparent	ratio a86 / a110 observé
Simplex	A	100	0	0	100	0	1
	B	72	3	78	16	56	1
	C	100	0	0	100	0	1
	D	63	3	80	13	50	1,2
	E	100	0	0	100	0	1
	F	97	9	71	28	69	3
Multiplex	A	100	0	0	100	0	1
	B	41	9	85	6	34	1,5
	C	100	0	0	100	0	1
	D	47	13	93	3	44	1,7
	E	100	0	0	100	0	1
	F	100	16	88	12	88	6
Multiplex en 2 runs	A	100	0	0	100	0	1
	B	69	0	73	19	50	1,2
	C	100	0	0	100	0	1
	D	88	0	86	13	75	2,6
	E	100	0	0	100	0	1
	F	100	0	72	28	72	4

**Tableau III-4 :** Comparaison des résultats obtenus à partir des trois protocoles d'amplification. Le pourcentage d'hétérozygotie correspond au pourcentage de coamplification des deux allèles. Le pourcentage d'homozygotie correspond au pourcentage d'amplification d'un seul des deux allèles. Le ratio a86/a110 correspond au nombre de tubes où l'allèle a86 a été amplifié divisé par le nombre de tubes où l'allèle a110 a été amplifié.

Lorsque la concentration en molécules matrices est faible (mélanges B, D et F) – modélisant des conditions d'ADN dégradé – les trois protocoles ne sont plus aussi efficaces (Tableau III-4). Le taux de coamplification des deux allèles passe en dessous de 30 %, des échecs d'amplification sont observés et des artefacts apparaissent (produits avec un ou deux motifs répétés de moins que les allèles a86 et a110 dans 13 cas sur 17 observés). De façon intéressante, le protocole multiplex en deux runs apparaît supérieur au protocole multiplex car les taux moyens d'amplification sont supérieurs de 30 à 40% pour les mélanges B et D (où la concentration de départ ne dépasse pas quelques molécules par  $\mu\text{L}$ ) et l'allelic dropout est réduit de 7 à 16 % pour les mélanges B, D et F. De plus, aucun artefact d'amplification n'a été observé avec le protocole mutiplex. Les protocoles simplex et multiplex en deux runs sont très semblables au niveau des résultats obtenus, hormis les artefacts qui sont absents pour le second. L'absence d'artefacts pour le protocole multiplex en deux runs est probablement liée au renouvellement du milieu réactionnel permis par la double amplification.

Par ailleurs, l'importance des produits de bégaiement de l'ADN polymérase par rapport aux allèles authentiques reste similaire entre les différents protocoles, de l'ordre de 1-2 % pour l'allèle a86 et de l'ordre de 13-17% pour l'allèle a110 (Tableau III-5). Ces valeurs sont cohérentes avec la taille des allèles (plus l'allèle est long, plus l'intensité du bégaiement est importante) ainsi qu'avec les données observées sur substrat ADN moderne (voir figure III-53, les allèles à 5 et 8 motifs).

	Importance du premier pic de glissement / pic authentique (%) pour l'allèle a86		Importance du premier pic de glissement / pic authentique (%) pour l'allèle a110	
simplex	n = 76	2,6 ± 1,1	n = 79	14,5 ± 2,7
multiplex	n = 91	1,3 ± 0,6	n = 91	12,8 ± 1,9
multi2runs	n = 94	2,2 ± 0,7	n = 96	16,7 ± 2,4

**Tableau III-5 :** Importance relative du premier pic de bégaiement artefactuel (ou de glissement) et du pic authentique. La mesure de l'aire du premier pic artefactuel et du pic authentique a été réalisée grâce au logiciel PeakScanner à partir des fluorogrammes obtenus à l'issue de l'électrophorèse capillaire.

Pour résumer, le protocole PCR multiplex en deux runs apporte les avantages du multiplex (économie de substrat) sans ses inconvénients (peu d'artefacts, pas de diminution de l'efficacité d'amplification ni d'intensification de l'allelic dropout). Les résultats que nous avons obtenus sur notre modèle contrôlé sont cohérents avec ceux obtenus empiriquement sur des extraits d'ADN de fèces de marsupiaux (Piggott *et al.* 2004), d'ours (Bellemain & Taberlet 2004) ou de loutre (Lampa *et al.* 2008).

■ Protocole d'amplification sur les échantillons anciens d'esturgeon

Nous avons amplifié les cinq locus microsatellites sélectionnés en suivant un protocole de PCR multiplex en deux runs (Figure III-30). La première phase d'amplification – commune à tous les locus – a été réalisée dans un volume réactionnel de 25 µL contenant 2,5 U d'ADN polymérase Taq Gold (ABI), 1X de tampon associé, 250 µM de dNTPs, 1 mg/mL de BSA, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 500 nM de chacune des 10 amorces (correspondant aux cinq locus) et 1 à 5 µL d'extrait d'ADN ancien. L'amplification se déroule sur 20 cycles, chaque cycle comprenant 30s de dénaturation à 95°C, 30s d'hybridation à 52°C et 30s d'amplification à 72°C. La deuxième phase d'amplification – spécifique de chaque locus – a elle aussi été

réalisé dans un volume réactionnel de 25  $\mu\text{L}$ , mais en réduisant la BSA à 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , la Taq Gold à 1 U/tube, en ajoutant seulement le couple d'amorces spécifique du locus considéré et en utilisant comme matrice 2  $\mu\text{L}$  d'une dilution au 1/5<sup>e</sup> du produit PCR de la première phase. L'amplification se déroule sur 40 cycles identiques à ceux de la première phase sauf en ce qui concerne la température d'hybridation qui est de 52°C pour LS54 et Aox23, et de 57°C pour LS19, LS68 et AoxD161.

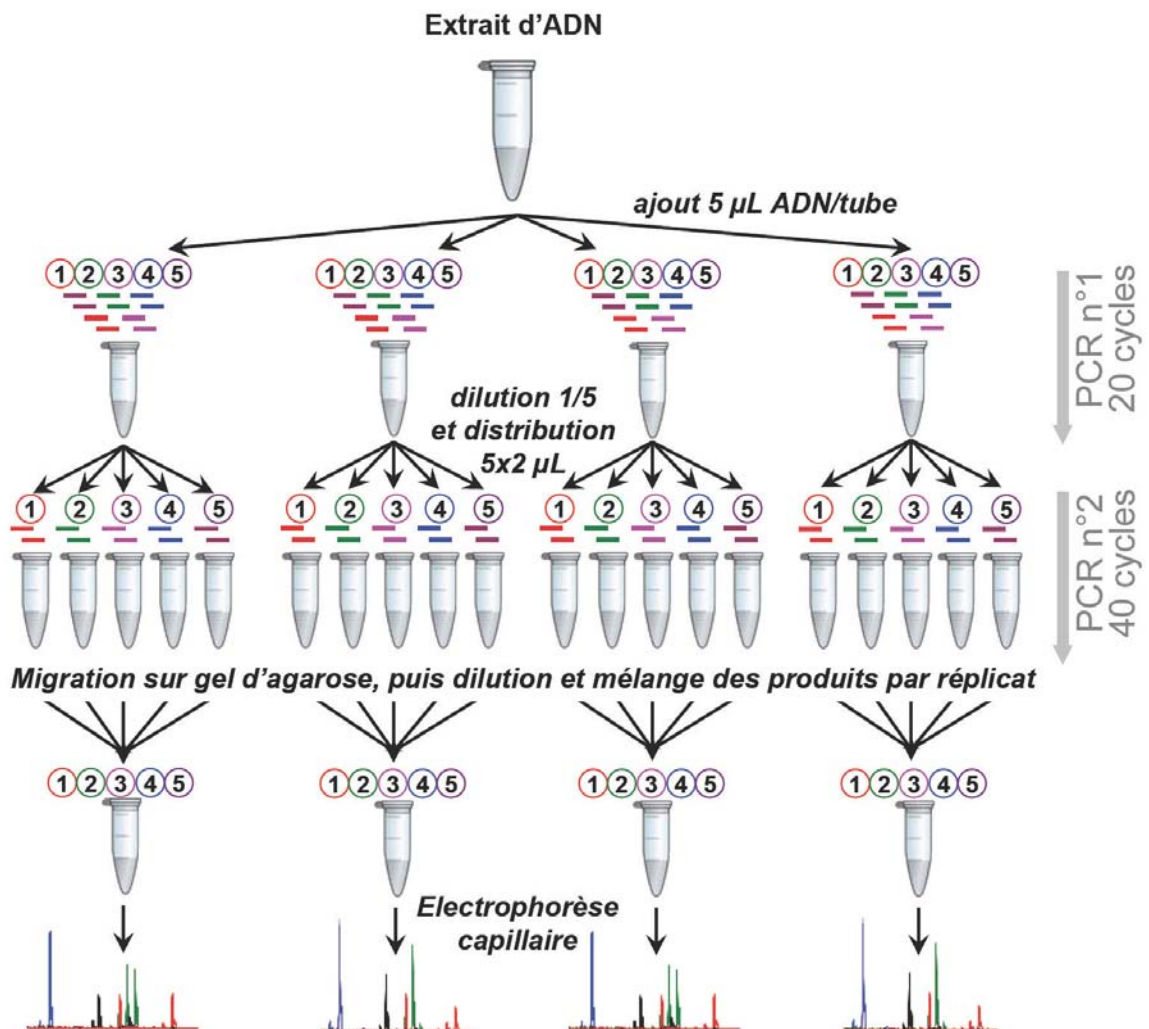
Une des amorces de chaque couple était marquée par un fluorochrome lors de la seconde phase d'amplification, afin de pouvoir détecter les produits PCR simultanément lors de l'électrophorèse capillaire. Les locus LS19, LS54, LS68, Aox23 et AoxD161 sont respectivement marqués par des fluorochromes 6-FAM, PET®, VIC®, NED® et PET® (ABI). Chaque fluorochrome fluoresce dans une longueur d'onde spécifique qui permet de distinguer les différents locus migrés ensemble ; les locus LS54 et AoxD161 sont marqués avec le même fluorochrome mais les tailles de leurs allèles n'étant pas chevauchantes, ces locus sont également facilement distinguables par électrophorèse capillaire. Les amorces utilisées lors de la première phase n'étaient pas marquées par souci d'économie.

Les mélanges réactionnels des deux phases de la PCR ont été systématiquement préparés ensemble dans la plateforme Palgene. Après ajout de l'ADN ancien dans les tubes correspondant à la première phase, ceux-ci ont été sortis de la Plateforme Palgene et la première phase d'amplification a été lancée ; les tubes correspondant à la seconde phase ont été conservés à 4°C sur glace pendant la durée de la première phase d'amplification, dans une salle propre indépendante du laboratoire d'ADN moderne. A l'issue de la première phase, les produits de PCR obtenus ont été dilués au 1/5<sup>e</sup> dans cette même salle, et 2  $\mu\text{L}$  de cette dilution a été utilisé pour amorcer la seconde phase d'amplification. A l'issue de la seconde phase d'amplification, la présence d'amplicons a été testée par migration sur gel à 1% d'agarose et 3% de Nusieve.

Pour chaque échantillon, 4 à 20 PCR ont été tentées au cours d'au moins deux sessions indépendantes. Une session typique comprend trois échantillons différents – avec quatre ou cinq réplicats par échantillon – un blanc de PCR et d'aérosol, un blanc de contamination croisée et un blanc d'extraction (voir l'annexe 1



pour plus de détails concernant les contrôles). Les PCR multiplex en deux runs ont été effectuées dans des plaques 96 puits pour des raisons pratiques, afin de limiter les erreurs de manipulation.



**Figure III-30 :** De l'amplification au génotypage d'un extrait d'ADN ancien. Les numéros indiquent les cinq locus microsatellites étudiés.

III-A-3-e Les microsatellites appliqués à l'ADN ancien : génotypage

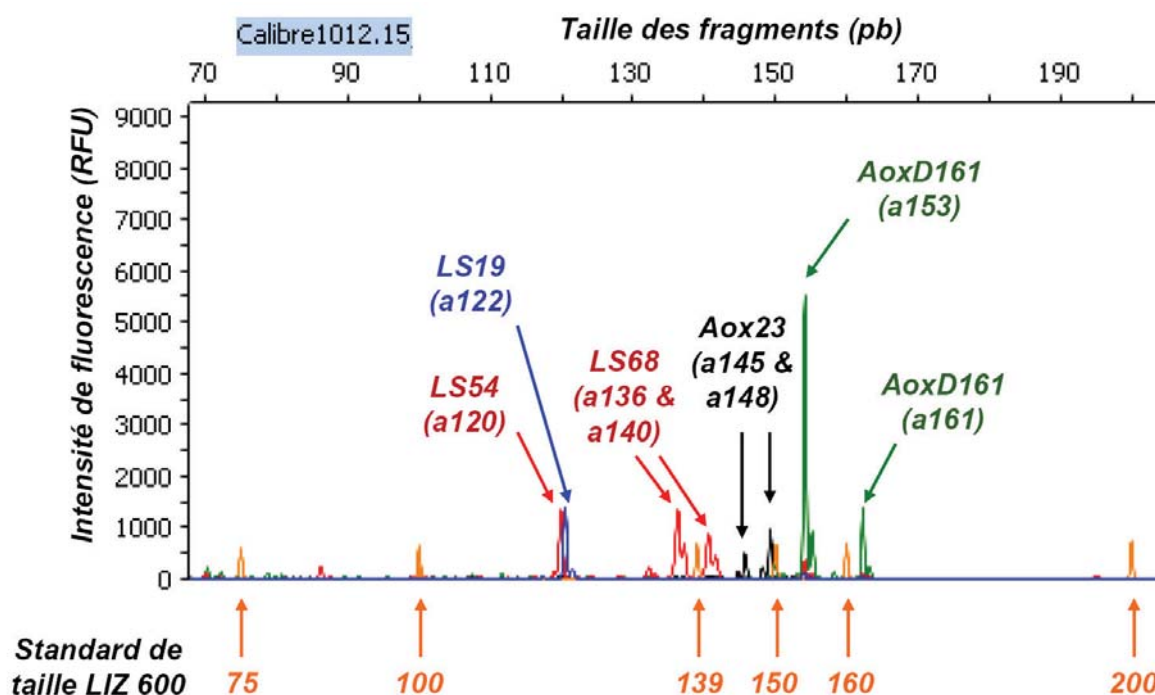
**N.B. :** à partir de ce point, les allèles sont nommés invariablement suivant la taille réelle des fragments (déterminée par séquençage) obtenus avec les amorces utilisées dans l'article n°1 (LS19F/R, LS54Fshort/Rshort, LS68F/R, Aox23Flong/R et AoxD161F-R), et ce pour faciliter les comparaisons entre références modernes et données anciennes.

■ Lecture des génotypes

En fonction de l'intensité relative des bandes visualisées lors de la migration sur gel d'agarose, les produits de PCR sont systématiquement dilués puis remultiplexés, avant lecture des génotypes par électrophorèse en tube capillaire sur un séquenceur ABI PRISM 3130XL (Figure III-31). Le remultiplexage est permis par l'utilisation de fluorochromes différents sur chaque locus. Les différents contrôles de PCR ont eux aussi été analysés par électrophorèse en tube capillaire.

Afin de déterminer la taille exacte des produits de PCR, le standard de taille Genescan™ 600 LIZ® (ABI) a été lu simultanément avec chaque produit. Par ailleurs, l'homogénéité de l'ensemble des résultats obtenus sur les trois années de cette thèse est garantie par l'analyse systématique du produit de PCR CH1012.15 à chaque session de génotypage sur le séquenceur (Figure III-31).

Afin d'éviter les problèmes de saturation lors de l'électrophorèse capillaire, chaque produit de PCR a été testé à deux dilutions différentes (en général 1/10<sup>e</sup> et 1/50<sup>e</sup>).



**Figure III-31 :** Exemple d'électrophorégramme obtenu à partir d'un esturgeon ancien sur une PCR multiplexée. L'individu en question est CH1012, et cette PCR (1012.15) a été utilisée comme calibre pour toutes les plaques passées sur le séquenceur. La taille des fragments est déterminée par comparaison avec le standard de taille LIZ 600 dont le fluorochrome est différent de ceux utilisés pour les locus microsatellites.

Les artefacts de PCR étant relativement courant lors des PCR sur substrat ancien, nous avons choisi d'analyser toutes les données manuellement car les logiciels de génotypage automatique sont susceptibles de considérer les artefacts comme des allèles. Les électrophorégrammes bruts ont ainsi été analysés pour chaque réplicat, chaque individu et chaque locus.

### ■ Etablissement d'un génotype fiable

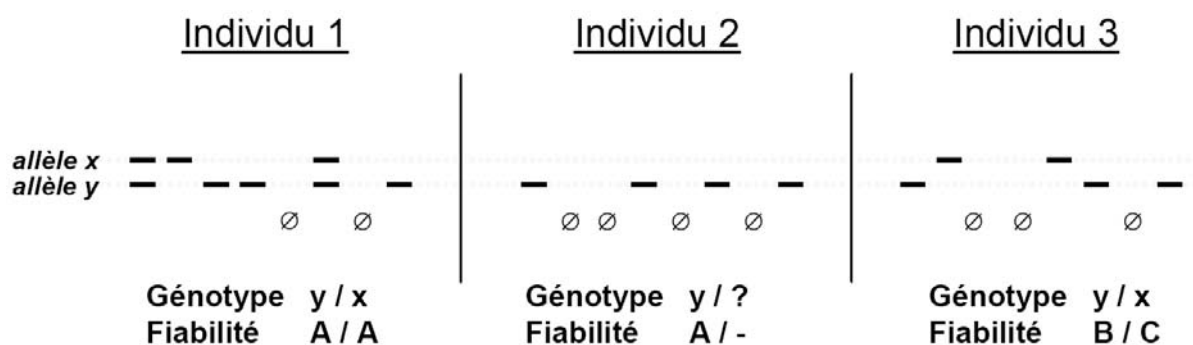
Un indice de confiance (allant de A pour « sûr » à E pour « artefact probable ») a été attribué à chaque allèle sur la base d'une série de règles exposées ci-dessous, tenant compte des remarques discutées au III-A-3 et utilisées pour la validation du génotype à un locus donné pour un individu donné. Plusieurs exemples de détermination de génotypes et de leur fiabilité sont présentés à la figure III-32.

1) Dans le cas où un seul allèle est identifié sur l'ensemble des réplicats. Cet allèle obtient un indice de fiabilité D si il est obtenu sur un seul réplicat, C s'il est obtenu sur deux réplicats, B s'il est obtenu sur trois réplicats et A s'il est obtenu sur quatre réplicats ou plus. Le génotype est considéré comme homozygote au-delà de 5 amplifications sans identification d'un autre allèle (ce qui correspond à une probabilité de fausse assignation d'homozygotie de 3% si le ratio allèle identifié / allèle fantôme vaut 1, de 12% si le ratio vaut 2, de 32% si le ratio vaut 4, etc. voir figure III-26). Si ce quota n'est pas atteint, le génotype reste incomplet et le second allèle est considéré comme manquant (qu'il corresponde en réalité à l'allèle identifié ou à un autre allèle).

2) Dans le cas où deux allèles sont amplifiés sur l'ensemble des réplicats. S'ils sont coamplifiés deux fois ou plus, leur indice de fiabilité vaut A et le génotype est considéré comme hétérozygote. S'ils sont coamplifiés une seule fois, leur indice vaut B s'ils sont par ailleurs amplifiés seuls une fois, et A si deux fois ou plus. Dans le cas où aucune coamplification ne se produit, la règle 1 s'applique sur chacun des allèles.

3) Les règles 1 et 2 s'appliquent aux allèles dont la taille et le patron d'amplification (intensité et nombre des bandes de glissement...) correspondent au standard du locus considéré. Dans le cas de l'amplification d'un produit ne correspondant pas exactement à ce standard, le statut d'allèle est soumis à validation par clonage

séquençage. Si la séquence correspond au locus considéré, l'indice de fiabilité du produit vaut E s'il est obtenu sur un seul réplicat, D s'il est obtenu sur deux réplicats et ainsi de suite jusqu'à A sur cinq réplicats ou plus.



**Figure III-32 :** Exemple de génotypes déterminés à partir de huit réplicats sur un même locus et pour trois individus différents. Les règles citées dans le texte ont été appliquées. Les tirets représentent les allèles visualisés sur gel d'agarose.

#### ■ Jeux de données validés

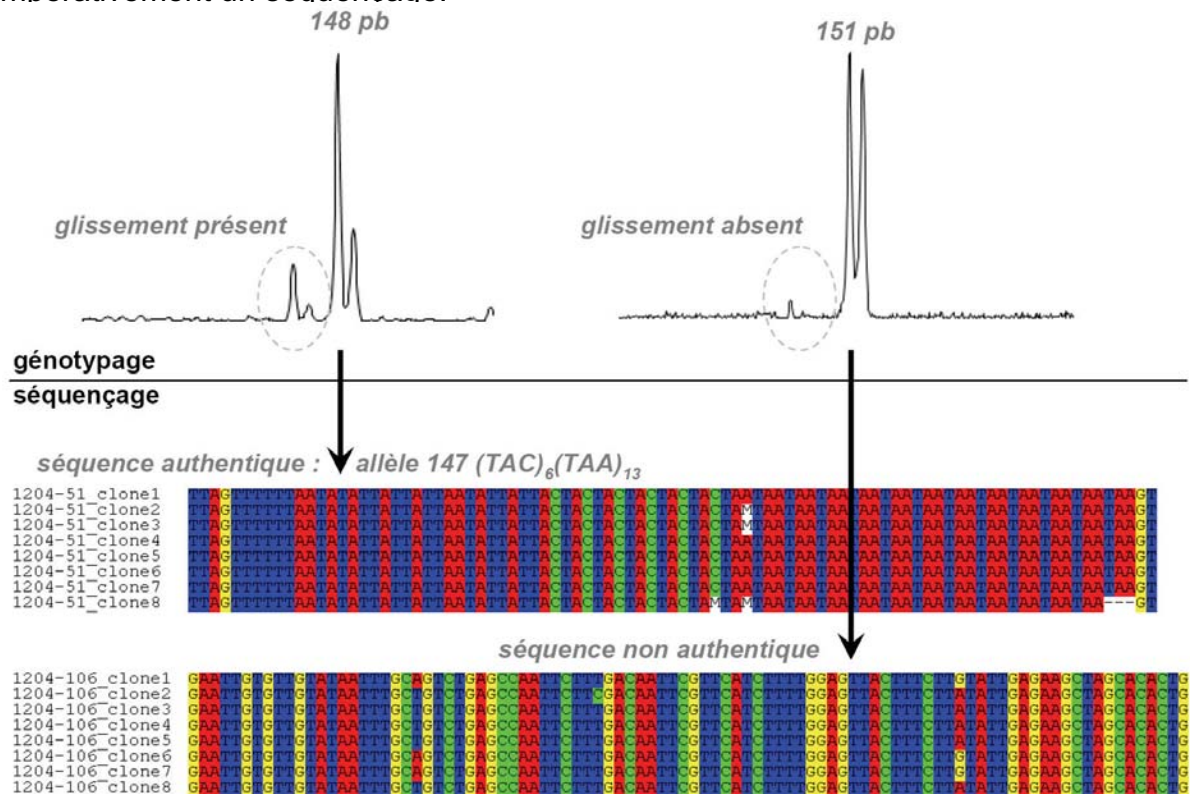
En appliquant les règles exposées ci-dessus, nous avons génotypé avec succès 79 esturgeons anciens, dont 69 *A. sturio* et 10 *A. oxyrinchus* ou hybrides *A. sturio* x *A. oxyrinchus* (voir l'annexe 4 pour les génotypes).

Nous avons décidé pour la suite des analyses de travailler à partir de trois jeux de données différents, dont la stringence va croissante. Le premier jeu de données – dit « basique » – par la suite – inclut tous les allèles dont la fiabilité est supérieure ou égale à C. Le second jeu de données – dit « conservatif » – inclut tous les allèles dont la fiabilité est supérieure ou égale à B. Enfin, un troisième jeu de données – dit « très conservatif » – rassemble uniquement les allèles de fiabilité maximale A. Pour chaque jeu de données, les individus validés sur un seul locus ont été écartés. Les jeux de données « basique », « conservatif » et « très conservatif » comprennent ainsi respectivement 79, 72 et 69 individus pour un total de 688, 646 et 627 allèles validés. Le nombre d'allèles dont la fiabilité vaut A, B et C est respectivement 627, 19 et 42 et le nombre de données manquantes est respectivement de 102, 74 et 63 (soit 13%, 10% et 9%) démontrant la qualité globale de notre jeu de données microsatellites.

III-A-3-f Les microsatellites appliqués à l'ADN ancien : séquençage

■ Pourquoi séquençer ?

Le séquençage des allèles microsatellites anciens permet de valider leur authenticité, en contrôlant la correspondance de séquence entre l'allèle obtenu et le locus ciblé. Le séquençage a ainsi permis d'identifier quelques faux allèles, dont la séquence ne correspondait pas au locus cible (Figure III-33). Nous avons vu également que pour les amplicons dont la taille est hors de la gamme de taille connue pour le locus considéré, la validation du statut d'allèle authentique nécessite impérativement un séquençage.



**Figure III-33 :** Identification d'un faux allèle sur le locus Aox23 grâce au séquençage. Au génotypage, l'amplicon de droite apparaît à une taille compatible avec les variations de longueur attendues (Aox23 est à motif trinuécléotidiques), mais aucune bande de glissement n'est visible suggérant une amplification aspécifique. Le séquençage apporte la confirmation définitive que l'amplicon de droite n'est pas un allèle mais une amplification aspécifique, la séquence ne correspondant pas du tout au locus ciblé.

Le séquençage des allèles microsatellites anciens permet également de discriminer les allèles homoplasiques en taille, i.e. dont la taille est identique mais

## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES

dont la séquence ne l'est pas. Des mutations dans les régions flanquantes du motif répété, ou bien un motif répété complexe (plusieurs motifs différents) peuvent être à l'origine de cette homoplasie de taille. De tels allèles sont présents pour les locus Aox23 et AoxD161 (Figure III-34).

### a- Aox23

Stu-133a	TATTATTATTAATATTAT	MMMMMM-	PPPPPPPP-----	GT
Stu-133b	.....	MMMM---	PPPPPPPPPPPP--	GT
Stu-139a	.....	MMMM---	PPPPPPPPPPPP---	..
Stu-139b	.....	MMMMMM--	PPPPPPPPPPPP----	..
Stu-139c	.....	MMMMMM-	PPPPPPPPPP-----	..
Stu-142a	.....	MMMM---	PPPPPPPPPPPP--	..
Stu-142d	.....	MMMMMM--	PPPPPPPPPPPP---	..
Stu-142c	.....	MMMMMM-	PPPPPPPPPPPP----	..
Stu-142b	.....	MMMMMMM	PPPPPPPPPP-----	..
Stu-145b	.....	MMM---	PPPPPPPPPPPPPPPP	..
Stu-145c	.....	MMMMMM--	PPPPPPPPPPPPPP--	..
Stu-145a	.....	MMMMMM-	PPPPPPPPPPPP---	..
Stu-145d	.....	MMMMMMM	PPPPPPPPPPPP----	..
Stu-148a	.....	MMMMMM--	PPPPPPPPPPPPPP--	..
Stu-148b	.....	MMMMMM-	PPPPPPPPPPPPPP---	..
Stu-148c	.....	MMMMMMM	PPPPPPPPPPPPPP----	..
Stu-151a	.....	MMMMMM-	PPPPPPPPPPPPPP--	..
Stu-151b	.....	MMMMMMM	PPPPPPPPPPPPPP---	..

### b- AoxD161

Stu-165a	AGGTACTTTCT	MMMMMMMMMMMM-	PMMMBMMMM	ACACTATCTGTGTATTA
Stu-165b	A.....	MMMMMMMMMMMM	PMMMBMMMM-	.....

**Figure III-34 :** Allèles homoplasiques identifiés par séquençage sur les locus Aox23 (a) et AoxD161 (b). Le nom d'allèle correspond à la taille amplifiée suivi d'une lettre distinguant les variants. Pour Aox23, M = TAC et P = TAA. Pour AoxD161, M = CTAT, P = CTGT et B = GTAT.

Malgré ces avantages, le séquençage des allèles microsatellites n'est que très rarement entrepris dans les études incluant des échantillons anciens, en particulier celles basées sur des échantillons de musée (Tableau III-2).

## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES

### ■ Bilan séquençage

Suivant les locus, nous avons cloné et séquencé entre 40% et 99% des allèles identifiés sur les esturgeons anciens, représentant au total plusieurs centaines d'allèles (Tableau III-6). Le locus sur lequel nous nous sommes le plus focalisé (99% d'allèles séquencés) est Aox23, en raison du motif répété mixte (TAC)<sub>x</sub>(TAA)<sub>y</sub> qui engendre beaucoup d'homoplasie de taille (Figure III-34) ; de ce fait, la distinction de tous les allèles nécessitait leur séquençage systématique.

		Dataset allèles 'A'		Dataset allèles 'A+B'		Dataset allèles 'A+B+C'	
		Nb d'individus	% d'allèles séquencés	Nb d'individus	% d'allèles séquencés	Nb d'individus	% d'allèles séquencés
LS19	Total	<b>72</b>	<b>75,3</b>	<b>77</b>	<b>74,4</b>	<b>81</b>	<b>73,3</b>
	<i>dont archéo</i>	33	79,4	36	78,4	39	75,0
	<i>dont muséum</i>	39	72,1	41	71,1	42	71,7
	<i>dont sturio</i>	63	81,0	68	79,4	72	77,8
	<i>dont oxy/hyb</i>	9	50,0	9	50,0	9	50,0
	<i>dont Rhône</i>	38	87,2	41	85,7	44	82,2
LS54	Total	<b>67</b>	<b>39,5</b>	<b>70</b>	<b>40,0</b>	<b>75</b>	<b>40,2</b>
	<i>dont archéo</i>	30	39,4	32	41,7	35	39,0
	<i>dont muséum</i>	37	39,6	38	38,8	40	41,2
	<i>dont sturio</i>	57	40,6	60	41,1	65	41,3
	<i>dont oxy/hyb</i>	10	33,3	10	33,3	10	33,3
	<i>dont Rhône</i>	36	46,3	37	48,8	40	47,9
LS68	Total	<b>64</b>	<b>61,1</b>	<b>67</b>	<b>60,5</b>	<b>74</b>	<b>58,9</b>
	<i>dont archéo</i>	29	52,9	30	51,9	37	47,6
	<i>dont muséum</i>	35	67,7	37	67,7	37	69,7
	<i>dont sturio</i>	55	56,1	58	55,3	64	53,6
	<i>dont oxy/hyb</i>	9	100,0	9	100,0	10	94,1
	<i>dont Rhône</i>	33	52,5	35	51,6	40	48,6
Aox23	Total	<b>64</b>	<b>99,1</b>	<b>66</b>	<b>97,4</b>	<b>72</b>	<b>94,2</b>
	<i>dont archéo</i>	29	100,0	31	96,3	35	93,2
	<i>dont muséum</i>	35	98,3	35	98,3	37	95,2
	<i>dont sturio</i>	54	97,9	56	95,9	62	92,4
	<i>dont oxy/hyb</i>	10	100,0	10	100,0	10	100,0
	<i>dont Rhône</i>	32	100,0	34	96,6	39	90,6
AoxD161	Total	<b>64</b>	<b>71,7</b>	<b>67</b>	<b>70,2</b>	<b>72</b>	<b>68,7</b>
	<i>dont archéo</i>	30	82,2	32	79,2	35	75,0
	<i>dont muséum</i>	34	63,0	35	62,5	37	62,7
	<i>dont sturio</i>	54	67,1	57	65,6	62	64,4
	<i>dont oxy/hyb</i>	10	100,0	10	100,0	10	100,0
	<i>dont Rhône</i>	33	81,1	35	76,8	39	74,2

**Tableau III-6 :** Pourcentage d'allèles séquencés pour les cinq locus microsatellites étudiés. Les trois jeux de données présentés correspondent à l'ensemble des allèles dont la fiabilité vaut A, A+B ou A+B+C (ces jeux sont identiques aux jeux très conservatif, conservatif et basique, au fait près que les individus validés sur un seul locus sont rajoutés, ce qui explique un nombre d'individus légèrement supérieur inclus ici).

### III-A-3-g Résultats par locus

Pour chaque locus, les résultats correspondant aux échantillons modernes (16 esturgeons capturés dans le milieu naturel en Gironde en 1994 ; mêmes individus qu'à l'article n°1) et aux échantillons anciens (sans distinction de provenance et d'âge) obtenus sur *A. sturio* sont présentés dans un premier temps.

Dans un second temps, les résultats obtenus pour *A. oxyrinchus* sont comparés. Les résultats concernant *A. oxyrinchus* comprennent les échantillons modernes (54 esturgeons capturés dans trois fleuves nord-américains ; mêmes individus qu'à l'article n°1) et les échantillons anciens (tous originaires d'Europe ; les hybrides entre *A. oxyrinchus* et *A. sturio* sont inclus dans cette catégorie par commodité).

Pour les échantillons anciens analysés dans cette partie, seuls les allèles de fiabilité A, B et C ont été pris en compte (voir partie III-A-3-d pour la signification de cette fiabilité). A noter que les calculs d'hétérozygotie observée et des tests d'équilibre de Hardy-Weinberg (global, déficit en hétérozygotes ou excès d'hétérozygotes) ont été réalisés grâce au logiciel Genepop (Raymond & Rousset 1995) en ne se basant que sur les génotypes pour lesquels les deux allèles sont fiables (élimination des génotypes avec données manquantes).

#### ■ Locus LS19 : *A. sturio*

Pour tous les échantillons anciens d'*A. sturio* (quelle que soit leur provenance), seul l'allèle 122 a été identifié, alors que les allèles 122 et 146 sont détectés sur les échantillons modernes de Gironde (Figure III-35). Ce monomorphisme des populations anciennes est surprenant. Deux types d'hypothèses peuvent être envisagées : (i) un biais expérimental, ou pourquoi l'allèle 146 (et d'autres peut-être) n'est pas détecté dans les échantillons anciens, alors qu'il est présent dans la population girondine actuelle ? (ii) une explication biologique, ou pourquoi l'allèle 146 est présent dans la population girondine actuelle alors qu'il est absent des populations anciennes ?



## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES

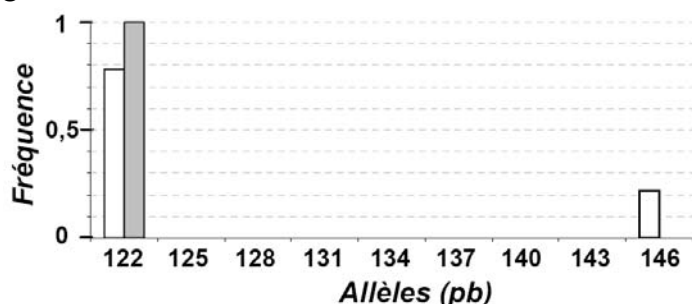
**a**

```
A.stu-146 /CTAATCGTATG MMMMMMMMMMMMMM TTTATCCCTTAAACTACTATATAATT
A.stu-122 /..... MMMMM----- .....
```

**b**

		<i>A. sturio</i>	
		Modernes (n=16)	Anciens (n=72)
Allèle 122	N	16	72
	f	0,78	1
Allèle 146	N	7	0
	f	0,22	0
Données manquantes		0/32	17/144
Allèles validés		32/32	127/144
Ho		0,44	0
He		0,34	0
Allèles différents		2	1
Génotypes différents		2/16	1/54

**c**



**Figure III-35 :** Allèles identifiés sur le locus LS19 chez *A. sturio*.

**a-** Alignement de séquence. Le motif répété (TTG) est noté M. Les séquences ont été tronquées en 5' (/).

**b-** Statistiques descriptives. Nombre d'individu porteur de chaque allèle (N), fréquence allélique (f), hétérozygotie observée (Ho) et attendue (He) et nombre d'allèles et de génotypes identifiés pour les échantillons modernes et anciens.

**c-** Fréquence allélique en fonction de la taille des allèles pour les échantillons modernes (blanc) et ancien (gris).

Un biais expérimental tel que la présence d'allèles nuls ou une extinction allélique est peu probable pour plusieurs raisons. D'abord, nous avons utilisé deux couples d'amorces différents pour amplifier le locus LS19 (LS19-F/R et LS19-Fshort/Rshort2), et nous avons obtenus uniquement l'allèle 122 quel que soit le couple utilisé, rejetant l'hypothèse d'allèles nuls. Ensuite, nous avons réussi à amplifier des allèles à l'état hétérozygote avec un écart de taille variant entre 15 pb (allèles 131-146) et 33 pb (allèles 131-164) sur des échantillons d'*A. oxyrinchus* anciens (voir les génotypes de CH1009 ou CH1308 par exemple, annexe 4), rejetant les hypothèses d'allelic dropout ou d'extinction allélique (en effet, l'écart de taille entre allèles 122 et 146 d'*A. sturio* est de 24 pb et l'ADN des échantillons anciens d'*A. sturio* n'est pas plus dégradé que l'ADN des échantillons anciens d'*A. oxyrinchus*). Enfin, le nombre d'*A. sturio* anciens que nous avons analysé sur ce locus n'est pas négligeable (n=72), il ne peut donc pas s'agir d'un biais d'échantillonnage.

Une hypothèse biologique envisageable fait intervenir l'hybridation entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus*. Si l'hypothèse de départ est une fixation de l'allèle 122 dans toutes les populations anciennes d'*A. sturio* (résultat d'une dérive génétique à ce locus), l'allèle 146 de la population girondine actuelle pourrait être un allèle *A. oxyrinchus* introgressé. Cette hypothèse est plausible car nous avons vu que les deux espèces s'hybridaient naturellement dans le bassin de la Seine, et qu'*A. oxyrinchus* était même présent plus au sud jusque dans la Loire (voir article n°2) ; l'absence de traces de cet hypothétique événement d'hybridation sur les autres locus microsatellites – en particulier LS68, Aox23 et AoxD161 – et sur l'ADNmt affaiblit cette éventualité mais ne l'exclut pas, car la proportion de gènes introgressés conservés est très variable suivant les situations d'hybridation et suivant les régions génomiques (Martinsen *et al.* 2001). Une étude comparative à l'échelle génomique entre les esturgeons *A. sturio* actuels de Gironde et les esturgeons *A. oxyrinchus* permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Le monomorphisme du locus LS19 sur les populations anciennes d'*A. sturio* rend ce marqueur non informatif pour l'étude de la diversité intraspécifique. La fixation de l'allèle 122 est néanmoins une opportunité qui a été exploitée pour quantifier par qPCR ce locus microsatellite, chose impossible à réaliser autrement ; en effet, si plusieurs allèles avaient été identifiés, les différences de taille auraient conduit à leur dégradation différentielle au cours du temps et aurait biaisé la quantification. La quantification directe d'un des locus microsatellites analysés est importante dans le sens où elle permet de s'affranchir de l'utilisation d'un marqueur nucléaire indépendant dont la préservation n'aurait pas forcément été identique.

### ■ Locus LS19 : comparaison avec *A. oxyrinchus*

Les séquences anciennes confirment l'observation effectuée initialement à partir des échantillons modernes (article n°1) : les allèles d'*A. sturio* et d'*A. oxyrinchus* sont indistinguables au niveau des séquences flanquantes (Figure III-36).

**a**

```

A. stu-146 /CTAATCGTATG M----- TTTATCCCTTAAACTACTATATAATT
A. oxy-164 /..... M-----
A. oxy-146 /..... M-----
A. oxy-131 /..... M-----
A. oxy-125 /..... M-----
A. oxy-122 /..... M-----
    
```

<i>A. oxyrinchus</i>			
<b>b</b>		Modernes	Anciens*
		(n=54)	(n=9)
Allèle 122	N	0	1
	f	0	0,06
Allèle 125	N	2	0
	f	0,02	0
Allèle 131	N	50	5
	f	0,70	0,33
Allèle 146	N	23	7
	f	0,23	0,56
Allèle 164	N	5	1
	f	0,05	0,06
Données manquantes		0/108	0/18
Allèles validés		108/108	1,00
Ho		0,48	0,56
He		0,45	0,58
Allèles différents		4	4

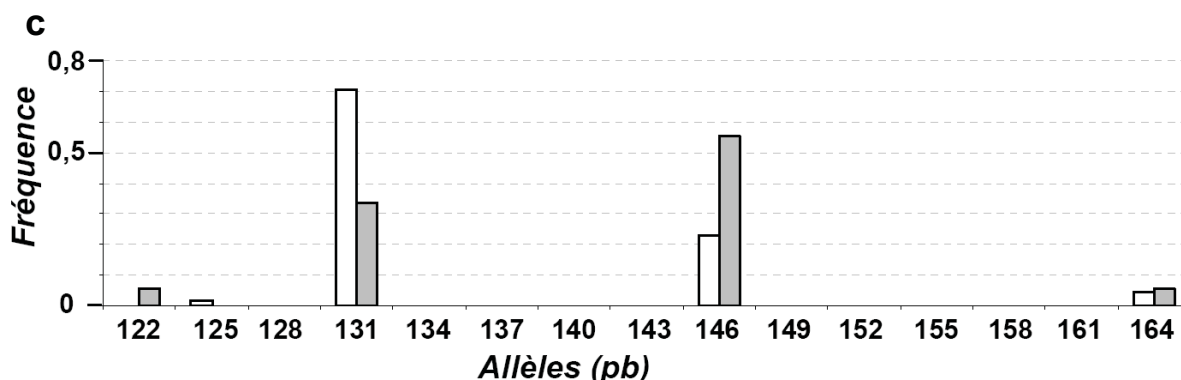
\* *A. oxyrinchus* et hybrides avec *A. sturio*

**Figure III-36** : Allèles identifiés sur le locus LS19 chez *A. oxyrinchus*.

**a-** Alignement des séquences et comparaison avec *A. sturio*, M = TTG.

**b-** Statistiques descriptives sur les groupes modernes et anciens.

**c-** Fréquence allélique en fonction de la taille des allèles pour les échantillons modernes (blanc) et ancien (gris).



Quatre allèles ont été identifiés dans les populations modernes d'*A. oxyrinchus*, répartis sur une gamme de taille assez large (Figure III-36). De grandes plages alléliques sont ainsi inoccupées (aucun allèle entre 134-143 pb ni entre 149-161 pb). Peu d'allèles ont également été détectés chez *A. naccarii* (voir article n°1). Peu d'allèles et de grandes plages alléliques inoccupées chez *A. oxyrinchus* et *A. naccarii* : le locus LS19 apparaît comme faiblement mutable, ce qui pourrait expliquer la fixation d'un allèle dans les populations anciennes d'*A. sturio*. La faible mutabilité du locus LS19 est également soutenue par la faible intensité des bandes de glissement lors de la PCR (voir figure III-53).

## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES

Quatre allèles ont également été identifiés chez les *A. oxyrinchus* et les hybrides *A. oxyrinchus* x *A. sturio* anciens. L'allèle 122 détecté chez un des individus correspond probablement à un allèle d'origine parentale *A. sturio*, puisque l'allèle 122 n'est pas présent chez les *A. oxyrinchus* modernes. L'allèle 146 est majoritaire, observation compatible avec une éventuelle origine introgressive de cet allèle chez *A. sturio*.

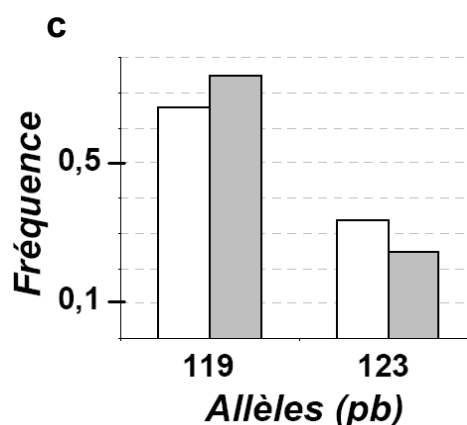
### ■ Locus LS54 : *A. sturio*

Seuls deux allèles ont été identifiés sur les échantillons anciens d'*A. sturio*, identiques à ceux détectés sur les échantillons modernes de Gironde (Figure III-37). Les fréquences alléliques sont similaires dans les deux cas. L'excès en hétérozygotes sur les échantillons modernes, et le déficit en hétérozygotes sur les échantillons anciens sont à la limite de la significativité ( $p = 0,051$  et  $p = 0,068$  respectivement).

**a**

```
A.stu-123   TAAACTGAATTATGCAAACC MMMMMMPPBPPPBPM GA
A.stu-119   ..... MMMMM-PPBPPPBPM ..
```

<b>b</b>	<i>A. sturio</i>	
	Modernes (n=16)	Anciens (n=65)
Allèle 119	N 16 f 0,66	56 0,75
Allèle 123	N 11 f 0,34	23 0,25
Données manquantes	0/32	10/130
Allèles validés	32/32	120/130
Ho	0,69	0,27
He	0,45	0,38
Allèles différents	2	2
Génotypes différents	2/16	3/55



**Figure III-37 :** Allèles identifiés sur le locus LS54 chez *A. sturio*.

**a-** Alignement des séquences. Les motifs GATA, GACA et GGCA sont respectivement notés M, P et B.

**b-** Statistiques descriptives sur les groupes modernes et anciens.

**c-** Fréquence allélique en fonction de la taille des allèles pour les échantillons modernes (blanc) et ancien (gris).

■ **Locus LS54 : comparaison avec *A. oxyrinchus***

Les séquences anciennes confirment l'identité des séquences flanquantes de LS54 chez *A. sturio* et *A. oxyrinchus* (Figure III-38). L'utilisation des amorces LS54F/R (non montré), confirme ce résultat.

**a**

```

A.stu-123   TAAACTGAATTATGCAAAACC MMMMMMPPBPPPBPBPM GA
A.oxy-123   ..... MMMMMMPPBPPPBPBPM ..
A.oxy-119   ..... MMMMM-PPBPPPBPBPM ..
A.oxy-99    ..... MMMM-----PPBPM ..
    
```

**b**

	<i>A. oxyrinchus</i>	
	Modernes (n=54)	Anciens* (n=10)
Allèle 99	N 5	1
	f 0,06	0,05
Allèle 119	N 48	10
	f 0,87	0,90
Allèle 123	N 8	1
	f 0,07	0,05
Données manquantes	0/108	0/20
Allèles validés	108/108	20/20
Ho	0,20	0,20
He	0,23	0,19
Allèles différents	3	3

\* *A. oxyrinchus* et hybrides avec *A. sturio*

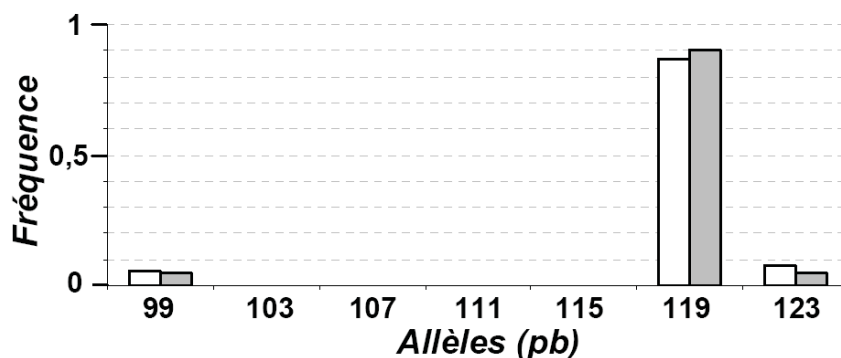
**Figure III-38 :** Allèles identifiés sur le locus LS54 chez *A. oxyrinchus*.

**a-** Alignement des séquences et comparaison avec *A. sturio*. M = GATA, P = GACA et B = GGCA

**b-** Statistiques descriptives sur les groupes modernes et anciens.

**c-** Fréquence allélique en fonction de la taille des allèles pour les échantillons modernes (blanc) et ancien (gris).

**c**



Trois allèles ont été identifiés chez *A. oxyrinchus*, aussi bien sur les échantillons modernes que sur les échantillons anciens. Les allèles 119 et 123 sont partagés avec *A. sturio*, et l'allèle 99 est spécifique d'*A. oxyrinchus*. La faible diversité allélique du locus LS54 chez ces deux espèces est sans doute liée à la mixité de la région répétée – où trois motifs différents sont présents – ce qui limite les bégaiements de l'ADN polymérase et donc les mutations. Lors des amplifications, l'intensité des artefacts de glissement est également faible (voir figure III-53).

### ■ Locus LS68 : *A. sturio*

11 allèles ont été identifiés à partir des échantillons anciens (Figure III-39). Tous les variants de longueur possibles sont représentés entre 132 et 172 pb, avec un pic de fréquence à l'allèle 144 et une asymétrie en faveur des allèles longs. Le pouvoir discriminant de LS68 au niveau intraspécifique est très important, puisque 31 des 56 génotypes obtenus à partir des échantillons d'*A. sturio* anciens sont différents (seuls sont considérés les génotypes où deux allèles sont validés).

Cette diversité passée contraste avec les deux allèles détectés sur la population actuelle de Gironde (144 et 168).

### ■ Locus LS68 : comparaison avec *A. oxyrinchus*

10 allèles ont été identifiés sur les populations modernes d'*A. oxyrinchus*, avec une gamme de taille – 136 à 172 pb – semblable à celle observée pour *A. sturio*. La distribution en fréquence est néanmoins décalée vers les allèles longs par rapport à *A. sturio*. Un allèle supplémentaire à 124 pb a été détecté sur un des échantillons anciens ; l'allèle 156a est le plus fréquent sur les individus anciens (Figure III-40).

Tous les allèles anciens obtenus confirment le critère diagnostique observé dans la région flanquante en 5' de la zone répétée : les allèles d'*A. sturio* portent une guanine à ce site, alors que les allèles d'*A. oxyrinchus* portent une adénine. Une exception existe pour les allèles 156a et 156b d'*A. oxyrinchus*, le premier portant un G (comme les allèles d'*A. sturio*) le second portant lui un A (comme tous les autres allèles d'*A. oxyrinchus*). Lors de l'étude basée uniquement sur les populations modernes (article n°1), nous avons remarqué que cet allèle 156a ne posait pas problème puisque aucun allèle de cette taille n'était présent chez les *A. sturio* modernes ; or les échantillons anciens nous montrent l'existence passée d'un allèle de 156 pb chez *A. sturio*, identique à l'allèle 156a d'*A. oxyrinchus*. Une incertitude spécifique subsiste donc au sujet de l'allèle 156 portant un G à la position diagnostique. Ce facteur est limitant car l'allèle 156a est l'allèle le plus fréquent parmi les *A. oxyrinchus* européens. Néanmoins, l'allèle 156 d'*A. sturio* n'est présent qu'à une faible fréquence (4%) et uniquement dans le bassin méditerranéen et en Mer



## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES

**a**

```

A.stu-172 /GCAACAAGCGATTAA MMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMM TTG
A.oxy-156a /..... MMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMM- - - - ...
A.oxy-172 /.....A..... MMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMM ...
A.oxy-164 /.....A..... MMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMM- - ...
A.oxy-160 /.....A..... MMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMHMM- - - ...
A.oxy-156b /.....A..... MMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMM- - - - ...
A.oxy-152 /.....A..... MMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMM- - - - - ...
A.oxy-148 /.....A..... MMMMMMMMMMMMMMMMMMMMM- - - - - ...
A.oxy-144 /.....A..... MMMMMMMMMMMMMMMMMMMMM- - - - - ...
A.oxy-140 /.....A..... MMMMMMMMMMMMMMMMMMMMM- - - - - ...
A.oxy-136 /.....A..... MMMMMMMMMMMMMMMMMMMMM- - - - - ...
A.oxy-124 /.....A..... MMMMMMMMMMMMMMMMM- - - - - - - - - ...
    
```

**b**

		<i>A. oxyrinchus</i>	
		Modernes (n=54)	Anciens* (n=10)
Allèle 124oxy	N	0	1
	f	0	0,05
Allèle 136oxy	N	2	0
	f	0,02	0
Allèle 140oxy	N	1	0
	f	0,01	0
Allèle 140stu (†)	N	0	1
	f	0	0,05
Allèle 144oxy	N	9	0
	f	0,08	0
Allèle 148oxy	N	31	3
	f	0,42	0,16
Allèle 152oxy	N	19	3
	f	0,19	0,21
Allèle 156oxya (‡)	N	7	9
	f	0,06	0,53
Allèle 156oxyb	N	4	0
	f	0,04	0
Allèle 160oxy	N	15	0
	f	0,14	0
Allèle 164oxy	N	2	0
	f	0,04	0
Allèle 172oxy	N	1	0
	f	0,01	0
Données manquantes		0/108	1/20
Allèles validés		108/108	19/20
Ho		0,70	0,78
He		0,76	0,65
Allèles différents		10	5

\* *A. oxyrinchus* et hybrides avec *A. sturio*

(†) allèle spécifique d'*A. sturio*

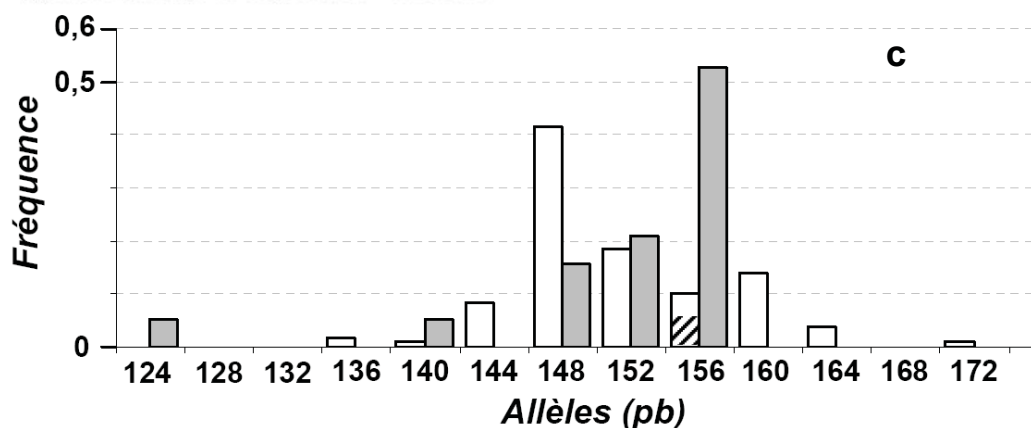
(‡) allèle partagé *A. oxyrinchus* - *A. sturio*

**Figure III-40 :** Allèles identifiés sur le locus LS68 chez *A. oxyrinchus*.

**a-** Alignement des séquences et comparaison avec *A. sturio*. M = GATA, H = GACA. Les allèles nouvellement identifiés à partir des échantillons anciens sont soulignés.

**b-** Statistiques descriptives sur les groupes modernes et anciens.

**c-** Fréquence allélique en fonction de la taille des allèles pour les échantillons anciens (gris) et modernes (blanc). La portion correspondant à l'allèle 156a est hachurée.





### ■ Locus Aox23 : *A. sturio*

10 tailles d'allèles différentes ont été identifiées sur les échantillons anciens d'*A. sturio*, correspondant à 22 allèles différents (Figure III-41a,b,c). En effet comme mentionné précédemment, ce locus est caractérisé par une hétéroplasmie de longueur très importante du fait de la présence d'une portion de motifs TAC et d'une portion de motifs TAA dans la zone répétée. Le séquençage de tous les allèles est donc nécessaire afin d'analyser correctement le locus Aox23, mais le jeu en vaut la chandelle puisqu'il se trouve finalement être encore plus informatif que LS68, avec 41 génotypes différents sur 54 génotypes validés (Figure III-41b).

Les 22 allèles identifiés sur les échantillons anciens contrastent avec les deux allèles identifiés en Gironde actuellement (148 et 154). L'allèle 154 est même presque fixé dans cette population relictuelle. Cette faible diversité résulte probablement de l'histoire des populations atlantiques et de la réduction de la population girondine.

### ■ Locus Aox23 : comparaison avec *A. oxyrinchus*

La distribution allélique chez *A. oxyrinchus* est plus hétérogène que chez *A. sturio* (Figure III-41d,e,f), avec des positions alléliques inoccupées (139, 142, 154, 160). Par ailleurs, la région flanquante en 5' de la zone répétée présente des indels d'une à deux paires de base sur certains allèles (ces allèles sont notés avec une étoile sur le graphe des fréquences alléliques), rendant le séquençage des allèles nécessaires à l'établissement des génotypes. L'intégralité des allèles modernes n'ayant pas été séquencés (12 individus séquencés sur 56, voir article n°1), nous avons indiqué les fréquences alléliques correspondant à des groupes d'allèles de tailles voisines non distingués lors du génotypage au séquenceur.

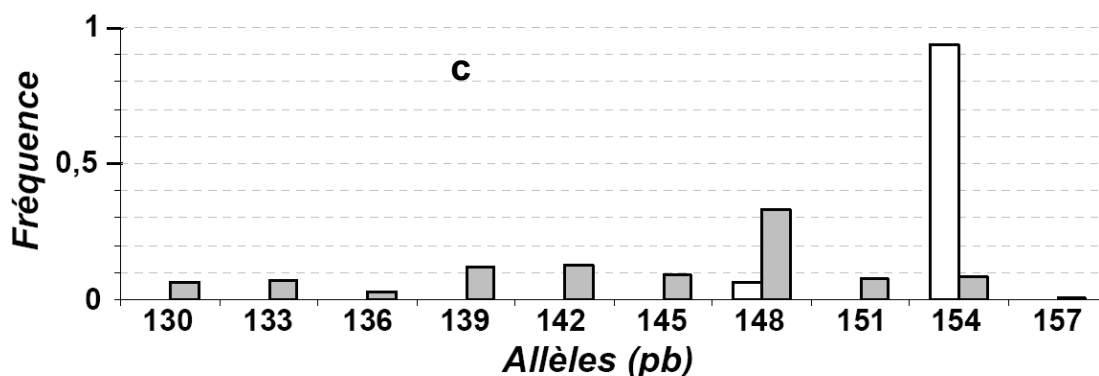
## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES

**a**

<u>Stu-157</u>	GA	///	TATTATTATTAATATTAT	MMMMMMPPPPPPPPPPPPPPPP	GT
<u>Stu-154</u>	GA	///	.....	MMMMMM-PPPPPPPPPPPPPPPP	..
<u>Stu-151a</u>	GA	///	.....	MMMMMM-PPPPPPPPPPPPPPPP-	..
<u>Stu-151b</u>	GA	///	.....	MMMMMMPPPPPPPPPPPPPPPP--	..
<u>Stu-148a</u>	GA	///	.....	MMMMMM--PPPPPPPPPPPPPPPP-	..
<u>Stu-148b</u>	GA	///	.....	MMMMMM-PPPPPPPPPPPPPPPP--	..
<u>Stu-148c</u>	GA	///	.....	MMMMMMPPPPPPPPPPPPPPPP---	..
<u>Stu-145a</u>	GA	///	.....	MMMMMM-PPPPPPPPPPPPPPPP---	..
<u>Stu-145b</u>	GA	///	.....	MMM---PPPPPPPPPPPPPPPP	..
<u>Stu-145c</u>	GA	///	.....	MMMMMM--PPPPPPPPPPPPPPPP--	..
<u>Stu-145d</u>	GA	///	.....	MMMMMMPPPPPPPPPPPPPPPP---	..
<u>Stu-142a</u>	GA	///	.....	MMMM---PPPPPPPPPPPPPPPP--	..
<u>Stu-142b</u>	GA	///	.....	MMMMMMPPPPPPPPPPPPPPPP----	..
<u>Stu-142c</u>	GA	///	.....	MMMMMM-PPPPPPPPPPPPPPPP----	..
<u>Stu-142d</u>	GA	///	.....	MMMMMM--PPPPPPPPPPPPPPPP----	..
<u>Stu-139a</u>	GA	///	.....	MMMM---PPPPPPPPPPPPPPPP----	..
<u>Stu-139b</u>	GA	///	.....	MMMMMM--PPPPPPPPPPPPPPPP----	..
<u>Stu-139c</u>	GA	///	.....	MMMMMM-PPPPPPPPPPPPPPPP----	..
<u>Stu-136</u>	GA	///	.....	MMMMMM-PPPPPPPPPPPPPPPP-----	..
<u>Stu-133a</u>	GA	///	.....	MMMMMM-PPPPPPPPPPPPPPPP-----	..
<u>Stu-133b</u>	GA	///	.....	MMMM---PPPPPPPPPPPPPPPP----	..
<u>Stu-130</u>	GA	///	.....	MMMMMM--PPPPPPPPPPPPPPPP-----	..

**b**

	<i>A. sturio</i>			<i>A. sturio</i>		
		Modernes (n=16)	Anciens (n=62)		Modernes (n=16)	Anciens (n=62)
Allèle 130	N	0	6	Allèle 145c	N	0
	f	0	0,06		f	0
Allèle 133a	N	0	5	Allèle 145d	N	0
	f	0	0,05		f	0
Allèle 133b	N	0	2	Allèle 148a	N	2
	f	0	0,02		f	0,06
Allèle 136	N	0	3	Allèle 148b	N	0
	f	0	0,03		f	0
Allèle 139a	N	0	7	Allèle 148c	N	0
	f	0	0,09		f	0
Allèle 139b	N	0	3	Allèle 151a	N	0
	f	0	0,03		f	0
Allèle 139c	N	0	1	Allèle 151b	N	0
	f	0	0,01		f	0
Allèle 142a	N	0	2	Allèle 154	N	16
	f	0	0,02		f	0,94
Allèle 142b	N	0	9	Allèle 157	N	0
	f	0	0,08		f	0
Allèle 142c	N	0	3	Données manquantes		0/32
	f	0	0,03	Allèles validés		32/32
Allèle 142d	N	0	1	Ho		0,13
	f	0	0,01	He		0,12
Allèle 145a	N	0	7	Allèles différents		2
	f	0	0,06	Génotypes différents		2/16
Allèle 145b	N	0	1			41/54
	f	0	0,01			



## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES

**d**

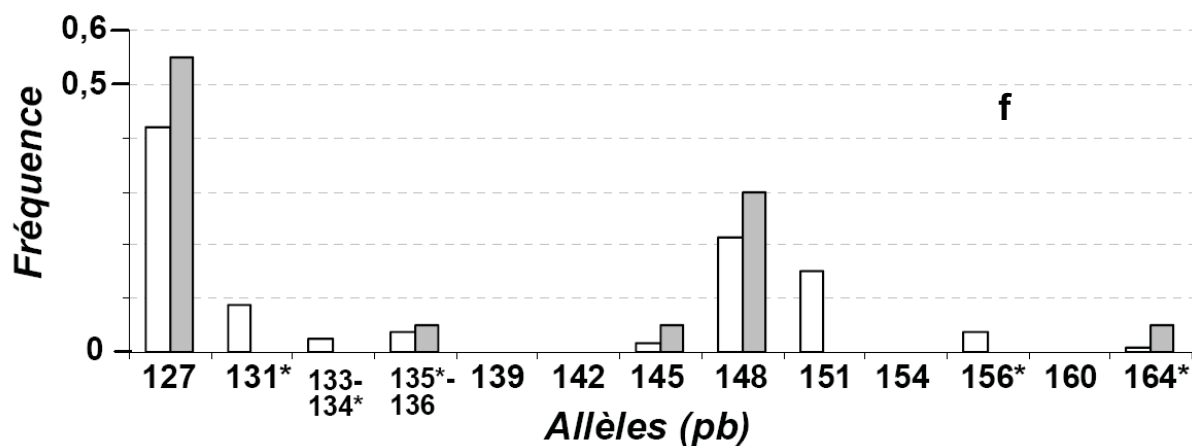
```

Stu-157   GA  ///  TATTATTATTAATATTAT  MMMMMMM-----PPPPPPPPPPPPPPPP  --GT
Oxy-164   AT  ///  .....-----MMMMMMMMMMMMMMMMMMMMPPPPPP----- .T..
Oxy-156   AT  ///  .....-----MMMMMMMMMMMMMMMMMMMM-----PPPPP----- TA..
Oxy-151   AT  ///  .....-----MMMMMMMMMMMMMMMMMMMM-----PPPPPP----- ....
Oxy-148a  AT  ///  .....-----MMMMMMMMMMMMMMMMMMMM-----PPPPP----- ....
Oxy-148b  AT  ///  .....-----MMMMMMMMMMMMMMMMMMMM-----PPPPP----- ....
Oxy-145a  AT  ///  .....-----MMMMMMMMMMMMMMMMMMMM-----PPPPPPPP----- ....
Oxy-145b  AT  ///  .....-----MMMMMMMMMMMMMMMMMMMM-----PPPPPP----- ....
Oxy-136   AT  ///  .....-----MMMMMMMMMMMM-----PPPPPPPP----- ....
Oxy-135   AT  ///  .....-----MMMMMMMMMMMMMMMM-----PPPPP----- TA..
Oxy-134   AT  ///  .....-----MMMMMMMMMMMMMMMM-----PPPPPP----- .T..
Oxy-133   AT  ///  .....-----MMMMMMMMMMMMMMMM-----PPPPP----- ....
Oxy-131   AT  ///  .....-----MMMMMMMMMMMM-----PPPPPP----- .T..
Oxy-127a  AT  ///  .....-----MMMMMMMMMMMM-----PPPPP----- ....
Oxy-127b  AT  ///  .....-----MMMMMMMMMMMM-----PPPPP----- ....
Oxy-127c  AT  ///  .....-----MMMMMMMMMMMM-----PPPPPP----- ....
    
```

e	<i>A. oxyrinchus</i>		
		Modernes (n=56)	Anciens (n=10)
Allèle 127a	N	36	5 0,25
Allèle 127b			4 0,30
Allèle 127c	f	0,419643	0
Allèle 131	N	8	0
	f	0,089286	0
Allèle 133	N	3	0
Allèle 134	f	0,026786	0
Allèle 135	N	4	0
Allèle 136	f	0,035714	1 0,05
Allèle 145a	N	2	0
Allèle 145b	f	0,017857	1 0,05

	<i>A. oxyrinchus</i>		
		Modernes (n=56)	Anciens (n=10)
Allèle 148oxya	N	22	4 0,25
Allèle 148oxyb	f	0,21	1 0,05
Allèle 151oxy	N	17	0
	f	0,15	0
Allèle 156oxy	N	4	0
	f	0,04	0
Allèle 164oxy	N	1	1
	f	0,01	0,05
Données manquantes		0/112	0/20
Allèles validés		112/112	20/20
Ho		0,73	0,60
He		0,74	0,78
Allèles différents		12	6

\* *A. oxyrinchus* et hybrides avec *A. sturio*



**Figure III-41** : Allèles identifiés sur le locus Aox23 chez *A. sturio* (a,b et c) et chez *A. oxyrinchus* (d, e et f)

**a et d**- Alignement de séquences. Les allèles nouvellement identifiés à partir des échantillons anciens sont soulignés. M = TAC et P = TAA.

**b et e**- Statistiques descriptives sur les échantillons modernes et anciens. A noter pour les *A. oxyrinchus* moderne la non distinction des allèles de taille identique ou très proche (une pb), car tous les individus n'ont pas été séquencés et il était donc impossible de calculer les fréquences alléliques réelles ; le groupe ancien d'*A. oxyrinchus* inclut des hybrides.

**c et f** - Fréquence allélique en fonction de la taille des allèles pour les échantillons modernes (blanc) et ancien (gris). Les allèles hétéroplasmiques ne sont pas distingués.

### ■ Locus AoxD161 : *A. sturio*

11 allèles ont été identifiés sur les échantillons anciens, avec une distribution normale des fréquences alléliques entre 149 et 185 pb (Figure III-42). Encore une fois, le pouvoir de discrimination intraspécifique de ce locus est important puisque 24 génotypes différents ont été observés sur les 54 génotypes validés. La seule hétéroplasmie de longueur identifiée correspond aux allèles 165a et 165b.

### ■ Locus AoxD161 : comparaison avec *A. oxyrinchus*

La validité du locus pour la discrimination spécifique est confirmée, tous les allèles d'*A. sturio* possédant une portion invariante (sauf pour l'allèle 165b) incluant deux motifs dégénérés (CTGT et GTAT au lieu de CTAT) dans la région 3' de la zone répétée (Figure III-43). Cette portion est absente des allèles d'*A. oxyrinchus*.

La discrimination purement basée sur la longueur des allèles (voir article n°1) n'est plus possible à cause de la découverte d'un allèle à 149 pb chez *A. sturio*, dont la taille est identique à celle du plus long allèle d'*A. oxyrinchus* ; ces deux allèles sont néanmoins toujours différenciables en séquence.

## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES

**a**

```

A.stu-185  AGGTACTTTCT  MMMMMMMMMMMMMMMMMMMPMMMMBMMMM  ACACTATCTGTGTATTA
A.stu-181  .....      MMMMMMMMMMMMMMMMMMM-PMMMMBMMMM  .....
A.stu-177  .....      MMMMMMMMMMMMMMMMMMM--PMMMMBMMMM  .....
A.stu-173  .....      MMMMMMMMMMMMMMMMMMM---PMMMMBMMMM  .....
A.stu-169  .....      MMMMMMMMMMMMMMMMMMM----PMMMMBMMMM  .....
A.stu-165a .....      MMMMMMMMMMMMMMMMMMM-----PMMMMBMMMM  .....
A.stu-165b .....      MMMMMMMMMMMMMMMMMMM-----PMMMMBMMM-  .....
A.stu-161  .....      MMMMMMMMMMMMMMMMMMM-----PMMMMBMMMM  .....
A.stu-157  .....      MMMMMMMMMMMMMMM-----PMMMMBMMMM  .....
A.stu-153  .....      MMMMMMMMMMMMMMM-----PMMMMBMMMM  .....
A.stu-149  .....      MMMMMMMMMMM-----PMMMMBMMMM  .....
    
```

**b**

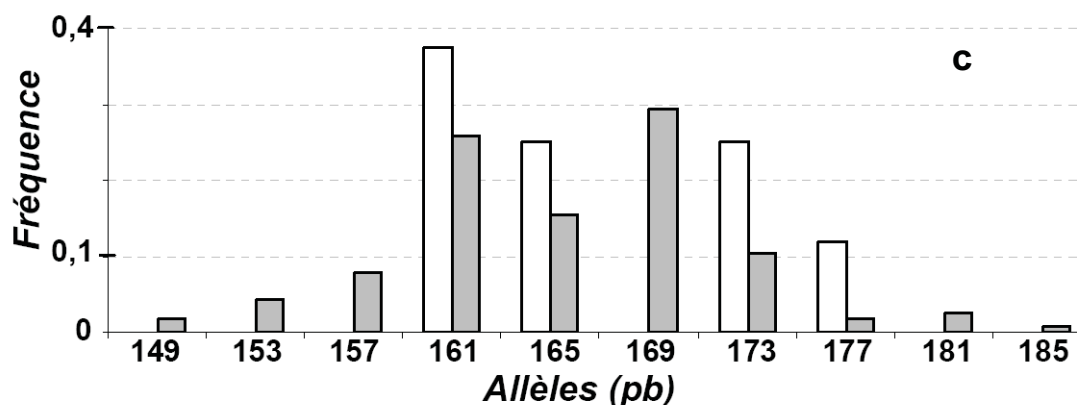
<i>A. sturio</i>			
		Modernes (n=16)	Anciens (n=62)
Allèle 149	N	0	2
	f	0	0,02
Allèle 153	N	0	5
	f	0	0,04
Allèle 157	N	0	9
	f	0	0,08
Allèle 161	N	10	26
	f	0,38	0,26
Allèle 165a	N	8	8
	f	0,25	0,07
Allèle 165b	N	0	8
	f	0	0,09
Allèle 169	N	8	27
	f	0,25	0,29
Allèle 173	N	4	10
	f	0,12	0,10
Allèle 177	N	0	2
	f	0	0,02
Allèle 181	N	0	3
	f	0	0,03
Allèle 185	N	0	1
	f	0	0,01
Données manquantes		0/32	8/124
Allèles validés		32/32	116/124
Ho		0,94	0,70
He		0,72	0,82
Allèles différents		4	11
Génotypes différents		6/16	24/54

**Figure III-42 :** Allèles identifiés sur le locus AoxD161 chez *A. sturio*.

**a-** Alignement de séquences. Les allèles nouvellement identifiés à partir des échantillons anciens sont soulignés. Code des motifs : M = CTAT, P = CTGT, B = GTAT.

**b-** Statistiques descriptives sur les groupes modernes et anciens.

**c-** Fréquence allélique en fonction de la taille des allèles pour les échantillons modernes (blanc) et ancien (gris).



**a**

```

A.stu-185   AGGTACTTTCT  MMMMMMMMMMMMMMMMM- PMMMMBMMMM  ACACTATCTGTGTATTA
A.oxy-149   .....      MMMMMMMMMMMMMMMMM----- .....
A.oxy-145   .....      MMMMMMMMMMMMMMMMM----- .....
A.oxy-141   .....      MMMMMMMMMMMMMMMMM----- .....
A.oxy-137   .....      MMMMMMMMMMMMMMMMM----- .....
A.oxy-133   .....      MMMMMMMMMMMMMMMMM----- .....
A.oxy-129   .....      MMMMMMMMMMMMMMMMM----- .....
A.oxy-125   .....      MMMMMMMMMMMMMMMMM----- .....
    
```

**b**

	<i>A. oxyrinchus</i>	
	Modernes (n=34)	Anciens* (n=10)
Allèle 125oxy	N 2 f 0,03	0
Allèle 129oxy	N 12 f 0,19	8
Allèle 133oxy	N 6 f 0,13	2
Allèle 137oxy	N 6 f 0,09	0
Allèle 141oxy	N 6 f 0,12	1
Allèle 145oxy	N 2 f 0,03	0
Allèle 149oxy	N 17 f 0,43	1
Allèle 153 (†)	N 0 f 0	1
Allèle 169 (†)	N 0 f 0	1
Données manquantes	0/68	0/20
Allèles validés	68/68	20/20
Ho	0,44	0,40
He	0,74	0,49
Allèles différents	7	6

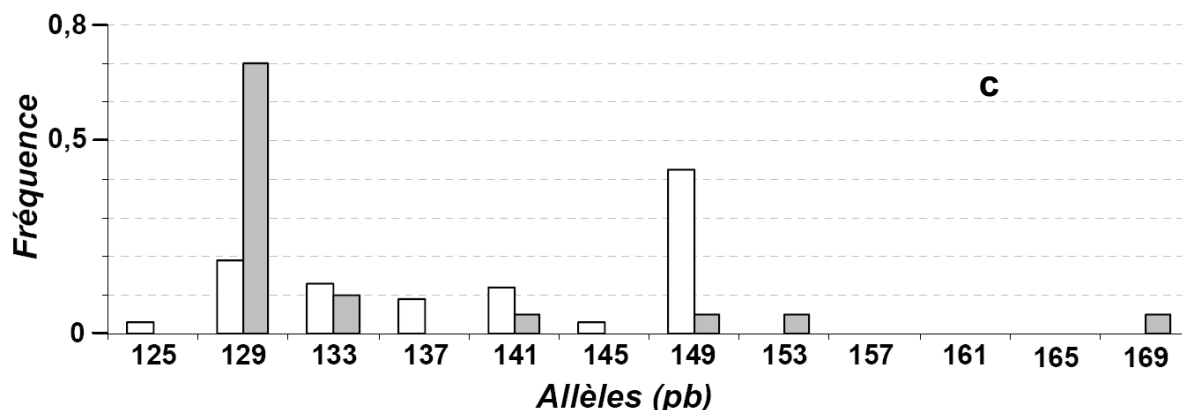
\* *A. oxyrinchus* et hybrides avec *A. sturio*  
 (†) allèles spécifiques d'*A. sturio*

**Figure III-43 :** Allèles identifiés sur le locus AoxD161 chez *A. oxyrinchus*.

**a-** Alignement des séquences et comparaison avec *A. sturio*. M = CTAT, P = CTGT, B = GTAT. Les allèles nouvellement identifiés à partir des échantillons anciens sont soulignés.

**b-** Statistiques descriptives sur les groupes modernes et anciens ; le groupe ancien inclut des hybrides.

**c-** Fréquence allélique en fonction de la taille des allèles pour les échantillons anciens (gris) et modernes (blanc).



### ■ Résultats par locus : bilan

La population résiduelle de Gironde étant la seule source de matériel frais utilisable lors de la phase de sélection des locus, il était difficile de présager de l'importance du polymorphisme des locus à l'échelle de l'espèce *A. sturio*. Au final, trois des cinq locus sélectionnés se révèlent extrêmement polymorphes sur les échantillons anciens d'*A. sturio*, assurant une discrimination intraspécifique efficace : il s'agit de LS68, Aox23 et AoxD161. La distribution des fréquences alléliques pour ces locus suit grossièrement une loi normale, signe de l'existence d'un équilibre entre mutations augmentant et mutations réduisant la taille des allèles existant (Lehmann *et al.* 1996; Xu *et al.* 2000). Les locus LS19 et LS54 se révèlent beaucoup moins polymorphes, le locus LS19 étant même monomorphe sur tous les échantillons anciens analysés. Ces deux locus sont toutefois utiles pour la discrimination interspécifique (voir article n°1).

Lors de la sélection des locus, un compromis entre fiabilité des résultats et polymorphisme doit être trouvé : rien ne sert d'amplifier des locus fiables s'ils ne sont pas informatifs, et inversement rien ne sert d'amplifier des locus très informatifs s'ils ne sont pas fiables. Nous avons choisi de nous focaliser sur la fiabilité, parfois au détriment du polymorphisme.

Pour obtenir une puissance statistique satisfaisante et fournir des informations pertinentes au niveau des populations, les locus microsatellites utilisés doivent être suffisamment informatifs. La majorité des simulations informatiques réalisées aboutissent à un nombre de locus minimum supérieur ou égal à 30 (Takezaki & Nei 1996; Pollock *et al.* 1998) ; en pratique, le nombre moyen de locus utilisé dans les analyses de génétique des populations actuelles tourne plutôt entre cinq et sept (Koskinen *et al.* 2004). Le critère le plus important n'est pas tant le nombre de locus que le nombre d'allèles par locus. Par exemple, Kalinowski (2002) a montré par des simulations que l'informativité de 16 locus possédant chacun deux allèles est équivalente à celle de deux locus possédant 16 allèles.

Pour des raisons de coût en temps et en argent, il nous était impossible d'analyser plus de cinq locus. Le faible polymorphisme de deux d'entre eux affaiblit la puissance statistique de notre jeu de données, mais celle-ci devrait néanmoins être suffisante car les trois autres locus sont extrêmement polymorphes avec 11 allèles pour LS68 et AoxD161 et 22 allèles pour Aox23 (soit 44 allèles en tout).

### III-A-3-h Sur la qualité des données microsatellites obtenues

N.B. : les données présentées dans cette partie correspondent à tous les *A. sturio* anciens, *A. oxyrinchus* anciens et hybrides *A. sturio* x *A. oxyrinchus* anciens testés sur les cinq locus microsatellites.

#### ■ Succès et répétitions des PCR (Tableau III-7)

Un total d'environ 5 000 réactions de PCR ont été réalisées sur microsatellites sur l'ensemble des échantillons, avec un succès d'amplification global d'environ 50% pour les échantillons archéologiques et de 75% pour les échantillons de musée (pour une moyenne d'environ 60% au total). Les succès d'amplification sont similaires pour tous les locus hormis LS19, dont les fragments légèrement plus courts ont été plus facilement amplifiés (70% de succès). Malgré la richesse de leurs motifs en purines (les bases qui sont le plus dégradées par hydrolyse), LS54 et LS68 n'ont pas été particulièrement pénalisés au niveau du succès d'amplification.

Les résultats généraux cachent d'importantes disparités à l'intérieur de chaque catégorie comme le montrent les écart-types très importants. Ainsi pour les échantillons archéologiques, le succès est proche de 90% à Montmajour alors qu'il est de 40% au Jardin d'Hiver ; l'âge des restes est sans doute le facteur prépondérant, le site de Montmajour étant plus récent que celui du Jardin d'Hiver (1100-200 BP contre 2600-2000 BP) ; des conditions de préservation variables pourraient également expliquer cette différence. Pour les échantillons de musée, le succès est toujours inférieur sur le Rhône par rapport aux autres régions ; la taille des prélèvements est sans doute impliquée, les échantillons du Rhône ayant fait l'objet d'un microprélèvement (1-10 mg) comparé aux autres échantillons (10-200 mg).

Le nombre moyen de PCR positives par individu est similaire pour tous les locus, aux environs de sept. Tous les produits de PCR obtenus ont été contrôlés par migration sur gel et génotypés. Ce nombre de réplicats important contribue à la fiabilité de nos résultats et correspond aux recommandations de Taberlet *et al.* (1996) pour obtenir des résultats fiables à 99% lorsque les allèles sont en



## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES

concentration équimolaire. Nous avons vu qu'un nombre bien plus important de réplicats est nécessaire pour valider de façon fiable les génotypes lorsque les allèles ne sont pas présents en concentration équimolaire (voir partie III-A-3-b), mais le rapport coût/bénéfice est bien trop élevé pour qu'une telle entreprise soit réalisée.

Locus	Echantillons	Nombre d'individus testés	Nombres d'individus positifs	Nombre de PCR tentées	Pourcentage moyen de réussite en PCR	Nombre moyen de PCR positive par individu
LS19	<b>Archéologiques</b>	<b>46</b>	<b>39</b>	<b>699</b>	<b>50,8 ± 38,5</b>	<b>8 ± 4,9</b>
	<i>dont Jardin Hiver</i>	30	26	504	42 ± 32,4	7,4 ± 5,2
	<i>dont Montmajour</i>	8	8	83	97,1 ± 5,4	10 ± 1,7
	<b>Muséum</b>	<b>43</b>	<b>42</b>	<b>366</b>	<b>89,6 ± 35,2</b>	<b>7,6 ± 1</b>
	<i>dont Italie</i>	14	14	110	95,2 ± 13,7	7,5 ± 2,4
	<i>dont Atlantique</i>	12	12	93	96,9 ± 7,6	7,5 ± 3
	<i>dont Rhône</i>	8	7	93	72,8 ± 34,6	9,2 ± 2,4
	<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>81</b>	<b>1065</b>	<b>69,5 ± 37,3</b>	<b>7,8 ± 3,9</b>
LS54	<b>Archéologiques</b>	<b>46</b>	<b>35</b>	<b>563</b>	<b>46,2 ± 39,3</b>	<b>7,7 ± 4</b>
	<i>dont Jardin Hiver</i>	30	22	370	38,8 ± 44,4	7,1 ± 4,4
	<i>dont Montmajour</i>	8	8	83	90,4 ± 12,9	9,2 ± 1,8
	<b>Muséum</b>	<b>43</b>	<b>40</b>	<b>362</b>	<b>79,5 ± 31,1</b>	<b>7,1 ± 2,3</b>
	<i>dont Italie</i>	14	14	110	93,3 ± 14,7	7,3 ± 2,2
	<i>dont Atlantique</i>	12	9	93	69 ± 43,7	8 ± 2,6
	<i>dont Rhône</i>	8	8	89	68 ± 21,7	7,1 ± 2,1
	<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>75</b>	<b>925</b>	<b>62,3 ± 39,1</b>	<b>7,4 ± 3,2</b>
LS68	<b>Archéologiques</b>	<b>46</b>	<b>37</b>	<b>550</b>	<b>46,4 ± 39,7</b>	<b>6,9 ± 4</b>
	<i>dont Jardin Hiver</i>	30	24	357	40,2 ± 38,3	6,5 ± 4,2
	<i>dont Montmajour</i>	8	8	83	89,5 ± 26,8	8,8 ± 1,6
	<b>Muséum</b>	<b>43</b>	<b>37</b>	<b>362</b>	<b>74,8 ± 37,8</b>	<b>7,4 ± 2,7</b>
	<i>dont Italie</i>	14	13	110	83,5 ± 32	7,2 ± 2,4
	<i>dont Atlantique</i>	12	9	93	71 ± 43,7	8,2 ± 2,4
	<i>dont Rhône</i>	8	6	89	51,6 ± 42,8	7,8 ± 4
	<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>74</b>	<b>912</b>	<b>60,1 ± 41,1</b>	<b>7,1 ± 3,4</b>
Aox23	<b>Archéologiques</b>	<b>46</b>	<b>35</b>	<b>527</b>	<b>45,9 ± 38,3</b>	<b>7,1 ± 3,2</b>
	<i>dont Jardin Hiver</i>	30	22	326	39,4 ± 43,3	6,5 ± 3,1
	<i>dont Montmajour</i>	8	8	83	84 ± 18,2	8,5 ± 1,7
	<b>Muséum</b>	<b>43</b>	<b>36</b>	<b>366</b>	<b>71,3 ± 37,8</b>	<b>7,1 ± 2,9</b>
	<i>dont Italie</i>	14	13	108	88,5 ± 30,2	7,4 ± 1,8
	<i>dont Atlantique</i>	12	9	91	64,8 ± 43,7	7,2 ± 2,4
	<i>dont Rhône</i>	8	6	97	44,7 ± 35,5	6,8 ± 5,8
	<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>71</b>	<b>893</b>	<b>58,6 ± 40</b>	<b>7,1 ± 3,1</b>
AoxD161	<b>Archéologiques</b>	<b>46</b>	<b>35</b>	<b>519</b>	<b>47,0 ± 38,0</b>	<b>7,2 ± 3,4</b>
	<i>dont Jardin Hiver</i>	30	22	326	39,5 ± 29,5	6,3 ± 3,5
	<i>dont Montmajour</i>	8	8	83	93,3 ± 12,4	9,5 ± 1,5
	<b>Muséum</b>	<b>43</b>	<b>37</b>	<b>358</b>	<b>74,4 ± 38,7</b>	<b>7,3 ± 2,9</b>
	<i>dont Italie</i>	14	13	110	87,3 ± 36,1	7,4 ± 2,4
	<i>dont Atlantique</i>	12	10	93	73,3 ± 38,9	7,3 ± 3,3
	<i>dont Rhône</i>	8	7	85	58,0 ± 38,8	7,2 ± 4,6
	<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>72</b>	<b>877</b>	<b>60,2 ± 40,5</b>	<b>7,2 ± 3,1</b>

**Tableau III-7 :** Succès d'amplification PCR et nombre moyen de produits par individu pour les cinq locus microsatellites testés. Le détail est donné pour les restes archéologiques (dont les sites du Jardin d'Hiver et Montmajour) et les spécimens de musée (dont l'Italie, l'Atlantique et le Rhône).

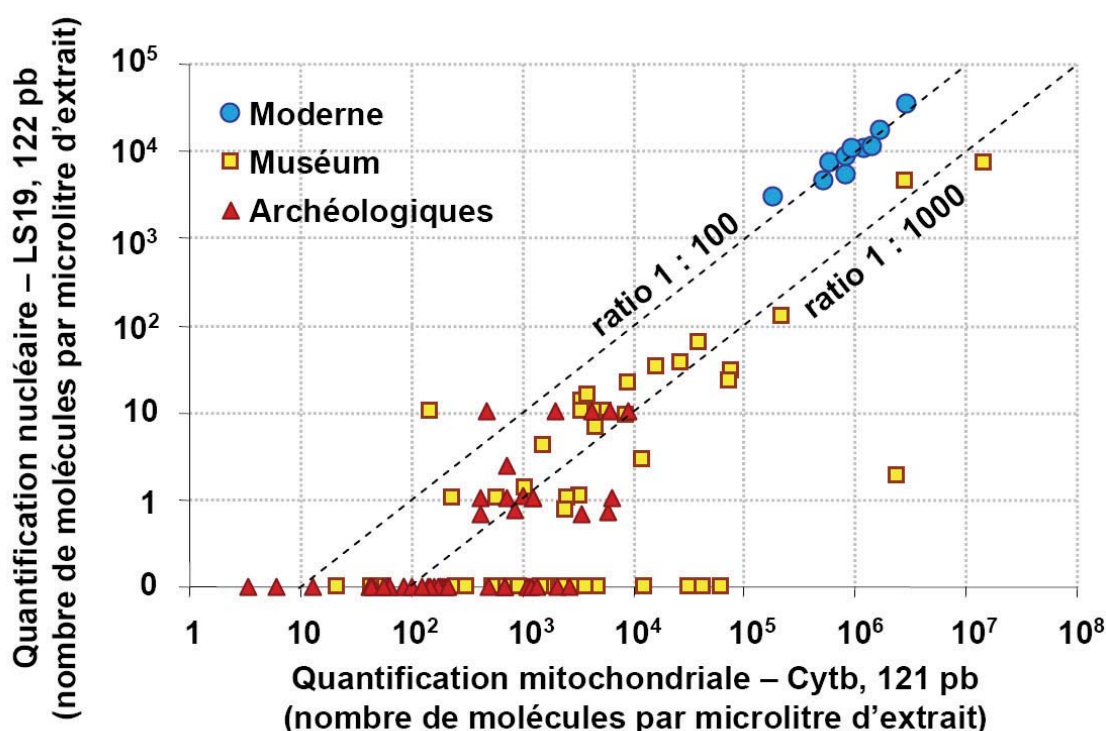
### ■ Quantification de l'ADN nucléaire par qPCR

Les méthodes de quantification utilisées sur l'ADNmt (voir partie III-A-2-d) ont été appliquées au locus microsatellite nucléaire LS19. Nous avons vu que ce locus est monomorphe pour les populations anciennes d'*A. sturio*, l'allèle 122 étant le seul à être identifié. Le locus LS19 est un parfait candidat pour la quantification de l'ADN nucléaire pour deux raisons : (i) quantification directe d'un des locus microsatellite étudié et (ii) pas de variants de longueur pouvant biaiser la quantification. Nous avons quantifié l'ADN nucléaire grâce aux deux couples d'amorces mises au point pour LS19 : le couple LS19-F/LS19-R amplifie l'allèle 122 en un fragment de 122 pb, alors que le couple LS19-Fshort/LS19-Rshort2 amplifie l'allèle 122 en un fragment de 86 pb. La taille des fragments nucléaire court et long (86 et 122 pb) est comparable à la taille des fragments mitochondriaux court et long (86 et 121 pb), ce qui permet des comparaisons directes.

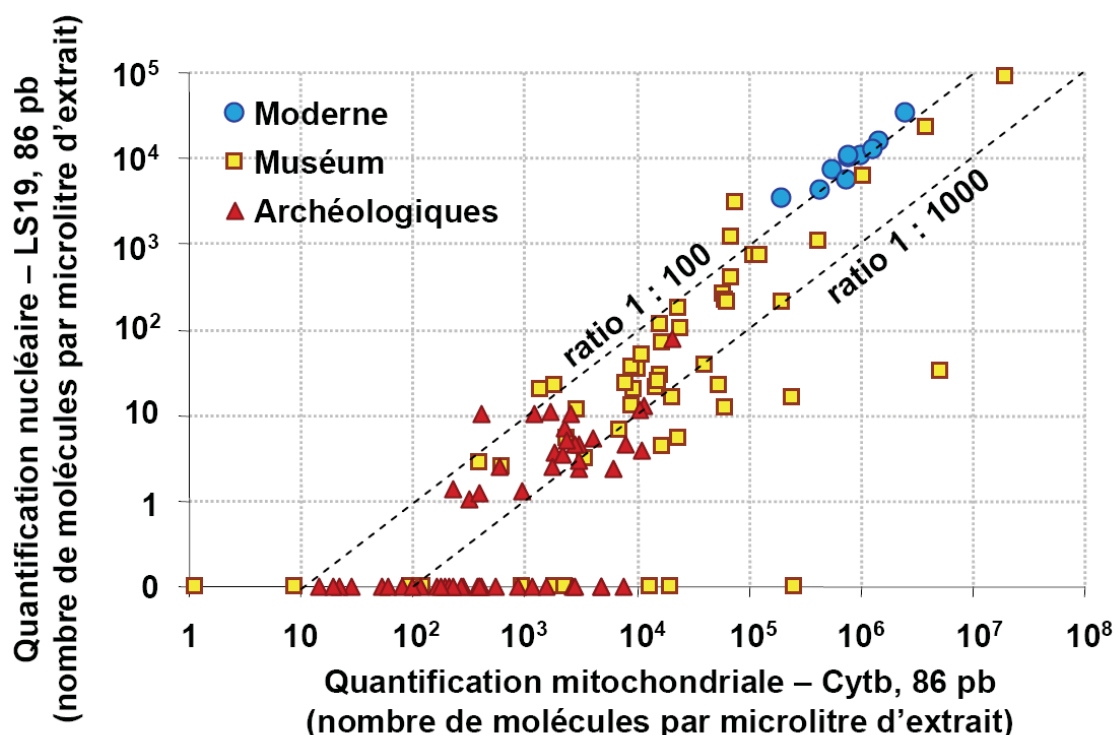
L'ADN nucléaire étant présent en un moins grand nombre de copies que l'ADN mitochondrial, le nombre d'échantillons anciens validés en qPCR est plus faible pour l'ADNnuc que pour l'ADNmt – i.e. de nombreux extraits d'ADN ancien ont une concentration en ADNnuc nulle alors que leur concentration en ADNmt est non nulle. Sur les 112 extraits anciens testés en qPCR, 109 ont pu être quantifié sur le fragment d'ADNmt de 86 pb contre 68 pour le fragment d'ADNnuc de même taille, et 101 ont été quantifié sur le fragment d'ADNmt de 121 pb contre seulement 44 sur le fragment nucléaire de même taille. N'ont été inclus que les estimations soutenues par deux réplicats ou plus.

Par ailleurs, le nombre d'échantillons validés en qPCR sur ADNnuc est inférieur au nombre d'échantillons dont les génotypes microsatellites ont été validés indépendamment par le protocole de PCR multiplex en deux runs (44 échantillons validés en qPCR sur le fragment de 122 pb, contre 79 validés par la PCR multiplex en deux runs). L'explication tient principalement à l'efficacité moindre du système PCR simplex basé sur la Taq Platinum Invitrogen® utilisé pour la qPCR, comparé à la PCR multiplex en deux runs utilisant la Taq Gold (ABI®) utilisé pour le génotypage.

Les quantités d'ADN nucléaire et d'ADN mitochondrial estimées par qPCR sont corrélées, avec un ratio généralement compris entre 100 et 1000, aussi bien pour les fragments longs (Figure III-44) que pour les fragments courts (Figure III-45). D'importantes variations sont néanmoins observées, deux extraits ayant la même concentration en ADNmt pouvant avoir des concentrations en ADNnuc variant d'un facteur 100 ; de telles variations – également observées chez le mammouth (Schwarz *et al.* 2009) – traduisent la conservation différentielle des deux types d'ADN dans chaque échantillon. Les échantillons modernes sont logiquement les plus concentrés, suivis des échantillons de muséum puis enfin des échantillons archéologiques. Les quantifications effectuées pour les échantillons modernes sur les fragments longs et les fragments courts sont semblables – environ  $10^6$  molécules d'ADNmt et  $10^4$  molécules d'ADNnuc par microlitre dans les deux cas – signe d'un ADN parfaitement préservé. Pour les échantillons anciens, une réduction des quantités amplifiables estimées est observée entre fragments courts (plus nombreux) et fragments longs (moins nombreux), matérialisant la dégradation de l'ADN.



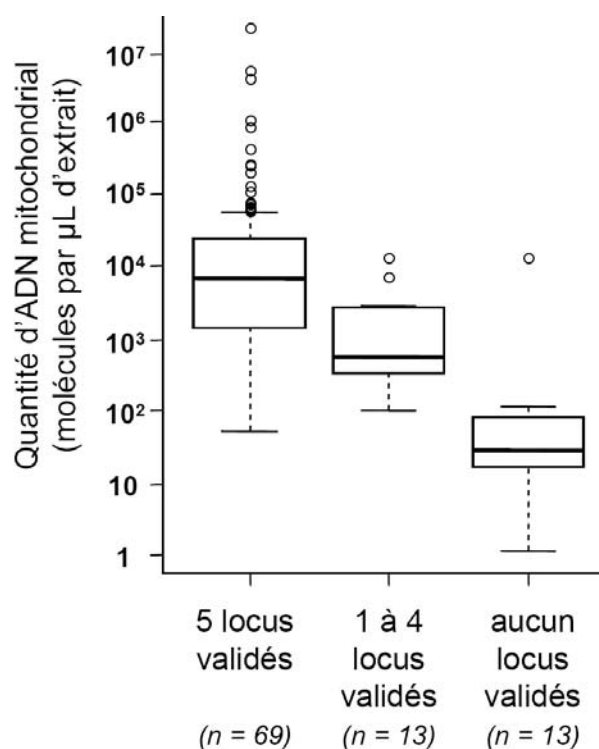
**Figure III-44 :** Ratio entre les fragments longs (121-122 pb) d'ADN mitochondrial et d'ADN nucléaire pour 10 échantillons modernes, 50 échantillons de musée (dont 22 sans ADN nucléaire détectable) et 50 échantillons archéologiques (dont 34 sans ADN nucléaire détectable). Les droites correspondant aux ratios 1 : 100 et 1 : 1000 sont indiquées. Les échelles sont logarithmiques. Les points sur l'axe des abscisses correspondent à des échantillons dépourvus d'ADNnuc.



**Figure III-45 :** Ratio entre les fragments courts (86 pb) d'ADN mitochondrial et d'ADN nucléaire pour 10 échantillons modernes (bleu), 53 échantillons de musée (dont 10 sans ADN nucléaire détectable) et 54 échantillons archéologiques (dont 29 sans ADN nucléaire détectable). Les droites correspondant aux ratios 1 : 100 et 1 : 1000 sont indiquées. Les échelles sont logarithmiques. Les points sur l'axe des abscisses correspondent à des échantillons dépourvus d'ADNuc.

Aucun résultat nucléaire n'a été obtenu pour les extraits dont la concentration en ADNmt est inférieure à 200 molécules par  $\mu\text{L}$ . La réciproque n'est pas vraie puisque de nombreux extraits dont la concentration en ADNmt est supérieure à 200 molécules par  $\mu\text{L}$  n'ont pas donné de résultats nucléaires non plus (Figures III-44, III-45 et III-46). Le seuil de 200 molécules par  $\mu\text{L}$  d'ADNmt est donc nécessaire mais pas suffisant pour espérer obtenir des résultats au niveau nucléaire. L'analyse de la quantité d'ADNmt en fonction du nombre de locus microsatellites validés montre comme attendu que les extraits pour lesquels les cinq locus ont été validés sont les plus concentrés en ADN, viennent ensuite les extraits validés sur un à quatre locus et enfin ceux pour lesquels aucun locus n'a pu être génotypé.

La détermination d'un seuil d'ADNmt pourrait servir d'outil afin de sélectionner les échantillons les mieux conservés avant de réaliser une étude nucléaire. Dans l'idéal, il est néanmoins préférable de quantifier directement l'ADN nucléaire, les variations du ratio mitochondrial / nucléaire pouvant être très importantes.



**Figure III-46 :** Quantité d'ADNmt dans les extraits anciens en fonction des résultats obtenus lors du génotypage des microsatellites. Sont distingués les extraits ayant été validés sur 5 locus, 1 à 4 ou aucun. L'échelle est logarithmique. La quantification concerne le fragment de 86 pb.

■ **Allelic dropout (Tableau III-8)**

Nous l'avons vu, l'allelic dropout rend difficile la détection des génotypes hétérozygotes dès lors que la quantité d'ADN dans les échantillons étudiés est faible.

Nous avons calculé l'allelic dropout à partir de notre jeu de données microsatellites, en nous basant sur les réplicats de PCR effectués sur les génotypes validés comme hétérozygotes ; nous nous sommes basés pour cela sur la formule de Broquet & Petit (2004). L'allelic dropout détecté est important (Tableau III-8), puisqu'il atteint en moyenne 40% (*i.e.* dans 40% des PCR positives réalisées sur un génotype hétérozygote donné, l'un des allèles n'a pas été amplifié). Une grande variation est néanmoins observée, les échantillons de muséum étant caractérisés par un taux d'allelic dropout moyen d'environ 20 à 30%, alors que le celui-ci grimpe entre 60 et 80% pour les échantillons archéologiques (le taux de 100% pour LS19 a été obtenu à partir d'un seul génotype hétérozygote et n'a donc pas de valeur statistique). Le taux d'allelic dropout observé pour les échantillons de muséum est en ligne avec les taux reportés dans les études basées sur les mêmes types d'échantillon (voir tableau III-2). L'estimation réalisée à partir des échantillons archéologiques est à notre connaissance la mieux documentée pour ce type de substrat, les études antérieures n'ayant traité qu'un nombre limité d'échantillons (voir tableau III-1).

**DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES**

Locus	Echantillons	Nombre d'individus positifs	Nombre d'individus hétérozygotes	Pourcentage d'hétérozygotes	Pourcentage d'allelic dropout
LS19	<b><u>Archéologiques</u></b>	<b>39</b>	<b>1</b>	<b>2,6</b>	<b>100 ± 0</b>
	<i>dont Jardin Hiver</i>	26	0	0	-
	<i>dont Montmajour</i>	8	0	0	-
	<b><u>Muséum</u></b>	<b>42</b>	<b>4</b>	<b>9,5</b>	<b>30,8 ± 29,4</b>
	<i>dont Italie</i>	14	0	0,0	-
	<i>dont Atlantique</i>	12	2	16,7	16,6 ± 23,5
	<i>dont Rhône</i>	7	1	14,3	70 ± 0
	<b>Total</b>	<b>81</b>	<b>5</b>	<b>6,2</b>	<b>44,6 ± 40,1</b>
LS54	<b><u>Archéologiques</u></b>	<b>35</b>	<b>6</b>	<b>17,1</b>	<b>80,7 ± 8,8</b>
	<i>dont Jardin Hiver</i>	22	6	27,3	80,7 ± 8,8
	<i>dont Montmajour</i>	8	0	0	-
	<b><u>Muséum</u></b>	<b>40</b>	<b>11</b>	<b>27,5</b>	<b>20,4 ± 32,2</b>
	<i>dont Italie</i>	14	6	42,9	5,5 ± 13,6
	<i>dont Atlantique</i>	9	1	11,1	0 ± 0
	<i>dont Rhône</i>	8	2	25,0	78,5 ± 30,3
	<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>17</b>	<b>22,7</b>	<b>41,7 ± 41,5</b>
LS68	<b><u>Archéologiques</u></b>	<b>37</b>	<b>26</b>	<b>70,3</b>	<b>58,6 ± 34,1</b>
	<i>dont Jardin Hiver</i>	24	15	62,5	70,3 ± 30,3
	<i>dont Montmajour</i>	8	8	100	37,1 ± 35,2
	<b><u>Muséum</u></b>	<b>37</b>	<b>29</b>	<b>78,4</b>	<b>26,7 ± 31,5</b>
	<i>dont Italie</i>	13	10	76,9	13,7 ± 23,7
	<i>dont Atlantique</i>	9	5	55,6	14,5 ± 14,8
	<i>dont Rhône</i>	6	5	83,3	43,8 ± 41,1
	<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>55</b>	<b>74,3</b>	<b>41,8 ± 36,2</b>
Aox23	<b><u>Archéologiques</u></b>	<b>35</b>	<b>24</b>	<b>68,6</b>	<b>58,3 ± 34,5</b>
	<i>dont Jardin Hiver</i>	22	13	59,1	60,6 ± 22,1
	<i>dont Montmajour</i>	8	8	100	45,1 ± 33,5
	<b><u>Muséum</u></b>	<b>36</b>	<b>25</b>	<b>69,4</b>	<b>21,6 ± 27,6</b>
	<i>dont Italie</i>	13	11	84,6	14,6 ± 18,8
	<i>dont Atlantique</i>	9	8	88,9	7,1 ± 10,4
	<i>dont Rhône</i>	6	2	33,3	79,9 ± 4,8
	<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>49</b>	<b>69,0</b>	<b>39,6 ± 36</b>
AoxD161	<b><u>Archéologiques</u></b>	<b>35</b>	<b>21</b>	<b>60,0</b>	<b>71,2 ± 35</b>
	<i>dont Jardin Hiver</i>	22	13	59,1	81 ± 22,3
	<i>dont Montmajour</i>	8	7	87,5	51 ± 40,4
	<b><u>Muséum</u></b>	<b>37</b>	<b>22</b>	<b>59,5</b>	<b>34,5 ± 37</b>
	<i>dont Italie</i>	13	8	61,5	34,6 ± 35,1
	<i>dont Atlantique</i>	10	7	70	4,1 ± 10,2
	<i>dont Rhône</i>	7	5	71,4	56 ± 44,2
	<b>Total</b>	<b>72</b>	<b>43</b>	<b>59,7</b>	<b>52,4 ± 40,2</b>

**Tableau III-8 :** Détection des hétérozygotes et allelic dropout sur les cinq locus microsatellites testés. Le détail est donné pour les restes archéologiques (dont les sites du Jardin d'Hiver et Montmajour) et les spécimens de musée (dont l'Italie, l'Atlantique et le Rhône).

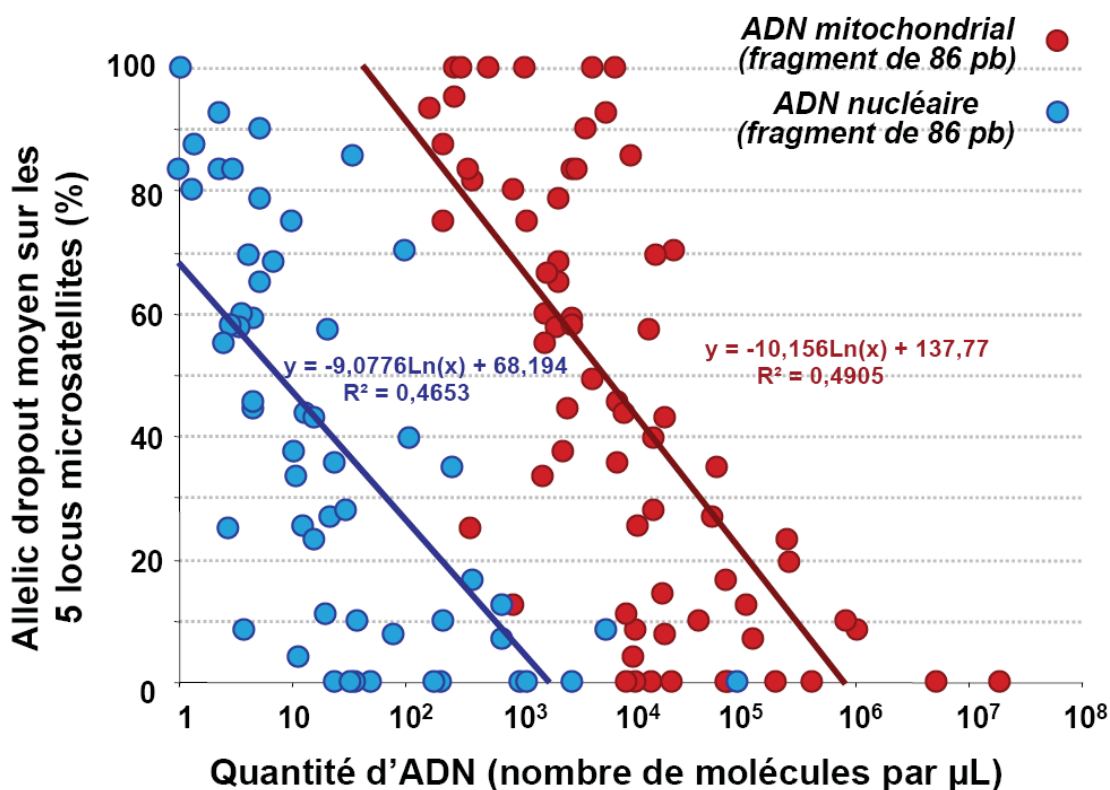
Ces valeurs élevées d'allelic dropout suggèrent la possibilité que l'hétérozygotie observée soit sous-estimée par rapport à ce qu'elle est en réalité, en particulier pour les restes archéologiques. Le déficit en hétérozygotes observé à tous les locus (Figures III-37 à III-43) semble aller dans ce sens, même si ces calculs ont été effectué en cumulant plusieurs populations (ce qui peut biaiser vers un déficit en hétérozygotes si elles sont différenciées) et si les déficits ne sont significatifs que pour LS68 et Aox23 ( $p = 0,037$  et  $p = 0,007$  respectivement).

*A contrario*, les pourcentages d'hétérozygotes détectés sur les locus Aox23 et AoxD161 sont identiques pour les échantillons archéologiques et les échantillons de muséum, alors que le taux d'allelic dropout est beaucoup plus élevé pour les échantillons archéologiques (58% contre 21% pour Aox23 et 71% contre 35% pour AoxD161). Malgré l'importance de l'allelic dropout, le nombre élevé de répétitions (Tableau III-7) nous a donc sans doute permis de détecter une grande partie des hétérozygotes. L'application de la formule de Gagneux *et al.* (1997) le confirme. Cette formule ( $P = K \times (K/2)^{n-1}$  où  $K$  est la proportion moyenne observée d'allelic dropout et  $n$  est le nombre de réplicats) estime la probabilité  $P$  d'assigner à tort un génotype comme homozygote. Avec une moyenne de sept réplicats positifs par échantillon (Tableau III-7) et un allelic dropout de 30% à 70% (Tableau III-8),  $P$  est au maximum de 8%, ce qui est un seuil relativement acceptable.

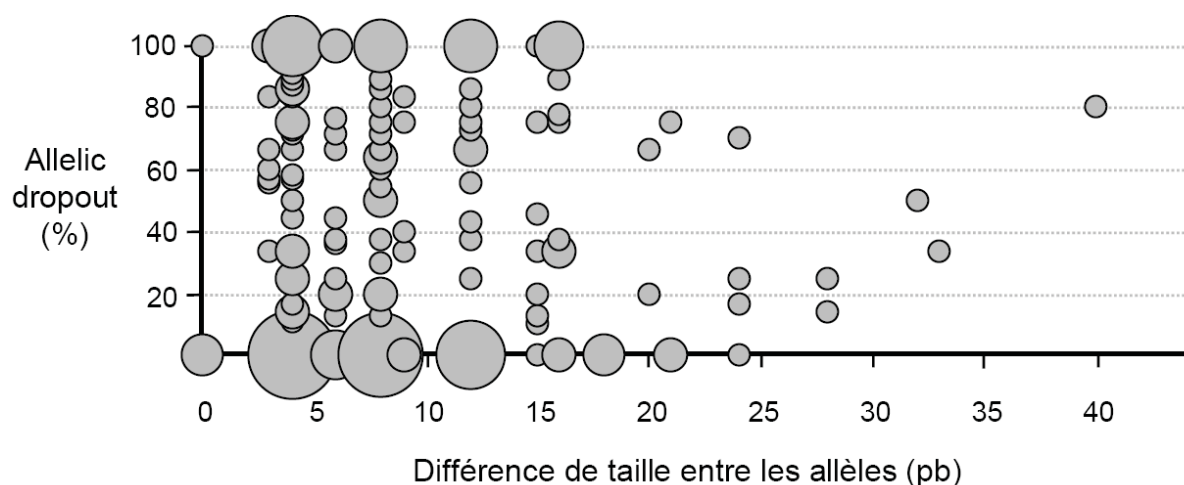
L'allelic dropout sur les locus microsatellites est corrélé à la quantité d'ADN (aussi bien nucléaire que mitochondrial ; Figure III-47) : plus il y a d'ADN, moins il y a d'allelic dropout. Cette observation était attendue puisque l'allelic dropout se produit par définition lorsque peu de molécules matrice sont présentes (Taberlet *et al.* 1996 ; Wandeler *et al.* 2003).

Le facteur quantité d'ADN est prépondérant par rapport aux autres paramètres sensés jouer sur l'allelic dropout. Par exemple, la différence de taille entre les allèles présents sur les locus hétérozygotes n'influe pas de manière évidente (Figure III-48), alors qu'une augmentation de l'allelic dropout était attendue avec l'augmentation des différences de taille. Peu de génotypes hétérozygotes ont néanmoins été identifiés au-delà d'une différence de 15 pb entre les allèles (Figure III-48). De plus, au vu des fréquences alléliques mesurées, le pourcentage observé de génotypes hétérozygotes pour lesquels la différence de taille entre allèles est supérieure à 15 pb est légèrement plus faible qu'attendu (Tableau III-9). Ces observations

suggèrent que certains des allèles les plus longs n'ont peut-être pas pu être détecté, conduisant à surestimer l'homozygotie. La non détection des allèles les plus longs serait ici plutôt le fruit d'une extinction allélique (disparition par fragmentation) que d'un allelic dropout (tirage aléatoire), aussi ce problème est-il difficilement corrigeable.



**Figure III-47 :** Allelic dropout moyen sur les microsatellites en fonction de la quantité d'ADN nucléaire (en bleu) et mitochondrial (en rouge) estimée par qPCR sur les fragments courts (86 pb). Echelle logarithmique en abscisse.



**Figure III-48 :** Intensité de l'allelic dropout en fonction de l'écart de taille entre les deux allèles identifiés pour les génotypes hétérozygotes. Les données des cinq locus sont considérées.



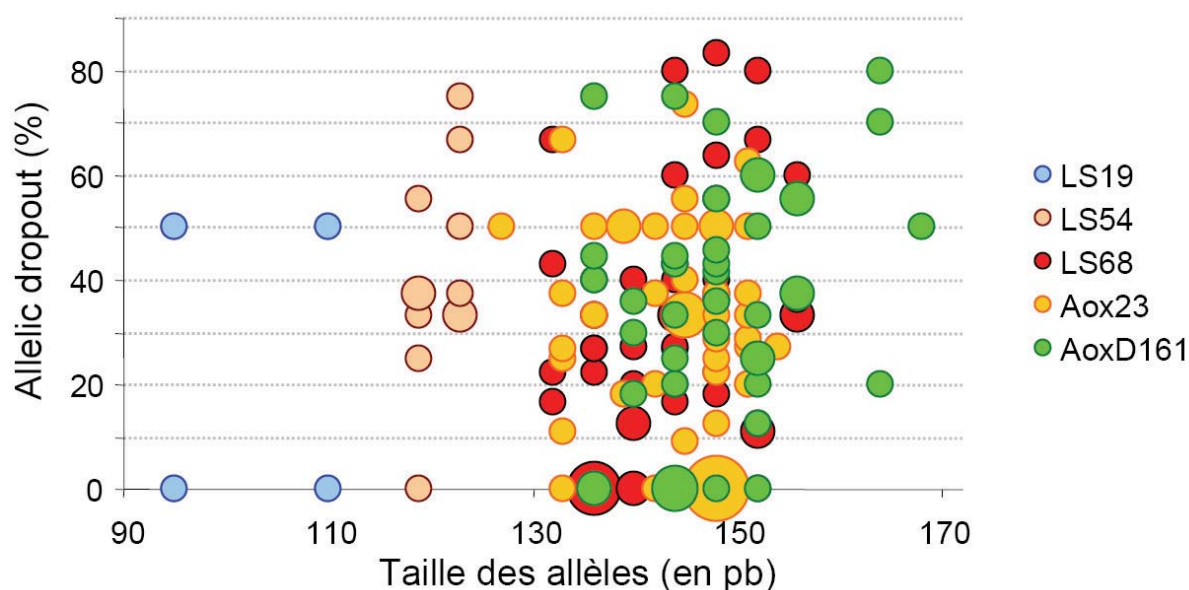
	Génotypes (%) avec écart entre les allèles >15 pb	
	Attendu	Observé
LS68	28	26,8
Aox23	15,8	9,3
AoxD161	13,2	11,1

**Tableau III-9 :** Pourcentage attendu et observé de génotypes hétérozygotes pour lesquels l'écart de taille des allèles est supérieur à 15 pb. Locus LS19 et LS54 non inclus (écart de taille faible entre les allèles).

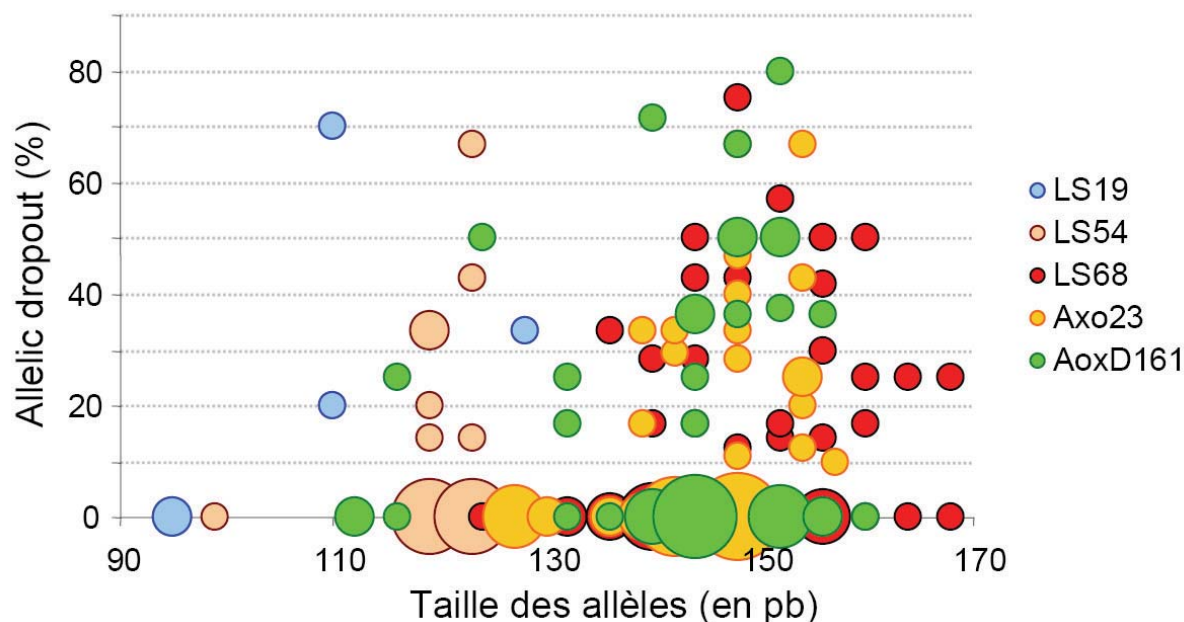
Afin de vérifier la dégradation différentielle des allèles en fonction de leur taille, nous avons calculé pour chaque génotype hétérozygote la part de l'allelic dropout propre aux deux allèles identifiés. Prenons par exemple l'individu 1 de la figure III-32 pour lequel deux allèles X et Y sont coamplifiés deux fois, l'allèle X est amplifié une fois seul et l'allèle Y est amplifié trois fois seul ; l'allelic dropout global vaudra  $(1+3)/(6) = 67\%$  et l'allelic dropout propre à chaque allèle sera respectivement  $(6-2-1)/(6) = 50\%$  pour X et  $(6-2-3)/(6) = 17\%$  pour Y.

L'allelic dropout n'est que très faiblement corrélé à la taille des allèles, que ce soit pour les échantillons archéologiques (Figure III-49) ou de musée (Figure III-50). La gamme de taille restreinte des locus sélectionnés – resserrée sur moins de 50 pb pour chacun d'entre eux – explique sans doute ce faible signal, comme dans l'étude de Flagstad *et al.* (2003) ; d'autres études basées sur des locus avec des gammes de taille d'allèles de l'ordre de 100 pb obtiennent un signal beaucoup plus fort (voir par exemple Sefc *et al.* 2003).

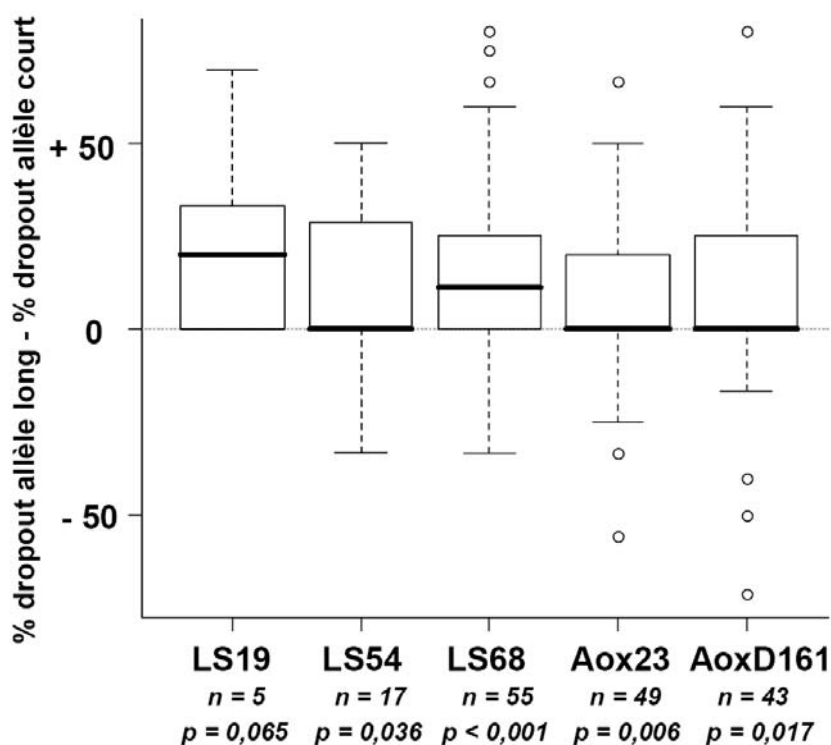
Néanmoins, l'allelic dropout propre à l'allèle long est en moyenne significativement plus élevé que l'allelic dropout propre à l'allèle court au niveau des génotypes hétérozygotes (Figure III-51), traduisant la dégradation différentielle des allèles en fonction de leur longueur (plus un allèle est long plus il est dégradé comparé à un allèle court). Ce phénomène, aussi observé par Sefc *et al.* (2003), était attendu sur des ADN dégradés.



**Figure III-49 :** Taux d'allelic dropout propre à chaque allèle en fonction de sa longueur, pour les échantillons archéologiques. Ont été inclus tous les allèles identifiés aux locus hétérozygotes (n = 158). La couleur des cercles code le locus et leur surface code le nombre d'occurrences.



**Figure III-50 :** Taux d'allelic dropout propre à chaque allèle en fonction de sa longueur, pour les échantillons de muséum. Ont été inclus tous les allèles identifiés aux locus hétérozygotes (n = 180). La couleur des cercles code le locus et leur surface code le nombre d'occurrences.



**Figure III-51 :** Comparaison de la contribution à l'allelic dropout des deux allèles composant chaque génotype hétérozygote. La part propre à l'allèle court est soustraite à la part propre à l'allèle long, donnant une statistique positive si l'allèle long est plus souvent absent que l'allèle court, et inversement. La barre en gras correspond à la médiane. Une comparaison de moyennes par paires (test de Student pairé) a été réalisée grâce au logiciel R, dont la p-value est indiquée en dessous de chaque locus.

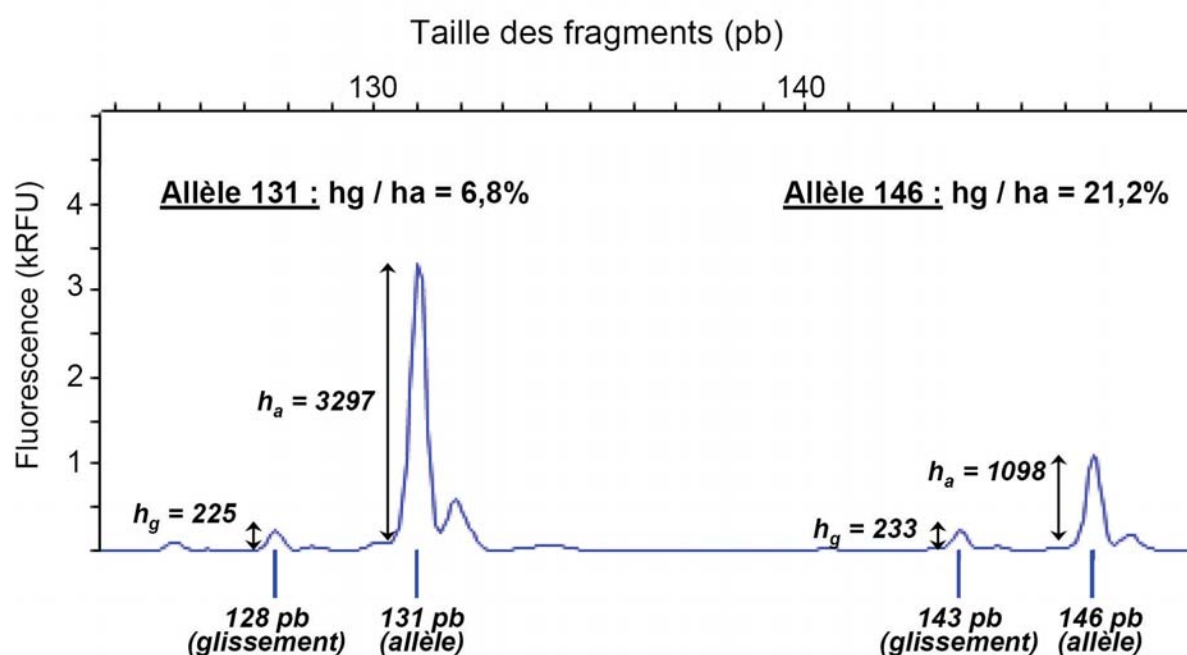
#### ■ Glissement de l'ADN polymérase

Nous avons vu que les glissements de l'ADN polymérase lors de la PCR engendrent des sous-produits (le plus souvent avec un motif de moins que les allèles authentiques). Leur présence constitue un critère d'authenticité des résultats car ils sont typiques des locus microsatellites (Pompanon *et al.* 2005) ; plus intéressant encore, chaque locus présente un patron de glissement différent, qui permet d'évaluer si tel amplicon est bien un allèle de tel locus ou non.

La proportion des sous-produits issus du glissement – relativement aux allèles authentiques – est dépendante du type et du nombre de motifs répétés ainsi que du nombre de cycles de PCR effectués (Lai & Sun 2003 ; Shinde *et al.* 2003). Afin de ne pas interférer avec la détermination des génotypes, cette proportion de glissement ne doit pas être trop élevée car un artefact de glissement trop important pourrait être assigné à tort comme un allèle (Pompanon *et al.* 2005).

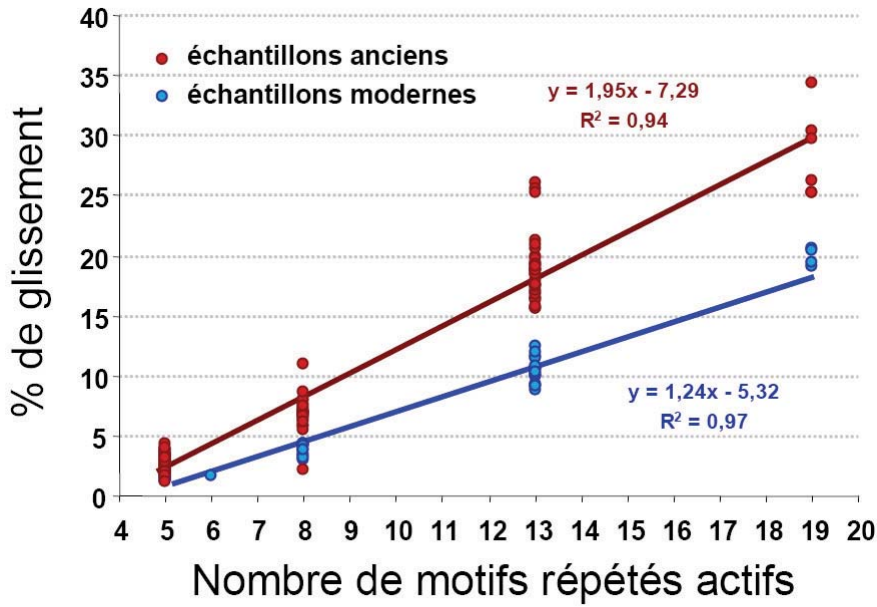
Afin d'expliciter les critères que nous avons utilisé lors de la détermination des génotypes, et afin de démontrer que les glissements ne constituent pas un biais au génotypage dans notre étude, nous avons entrepris de documenter l'importance des glissements pour chaque locus. Nous avons analysé un sous-ensemble représentatif des allèles identifiés à partir des échantillons actuels et anciens, en mesurant pour chaque allèle (i) la hauteur  $h_a$  du pic allélique et (ii) la hauteur  $h_g$  du premier pic de glissement (Figure III-52). Le rapport  $h_g / h_a$  constitue la proportion de glissement.

La hauteur des pics de fluorescence est un bon estimateur de la quantité d'ADN, et peut donc être utilisé comme un outil fiable. L'utilisation de l'aire des pics au lieu de leur hauteur conduit à des résultats similaires (données non présentées ; voir aussi Leclair *et al.* 2004). Les mesures d'intensité de fluorescence ont été réalisées grâce au logiciel Peakscanner (ABI®).

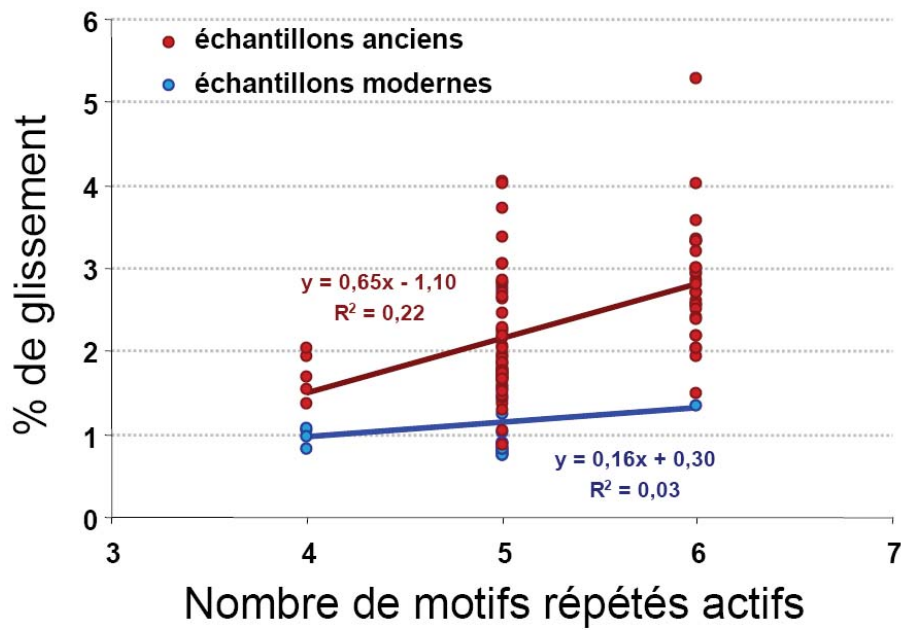


**Figure III-52 :** Mesure de la proportion de glissement à partir d'un fluorogramme. L'exemple est pris à partir d'un échantillon ancien d'hybride *A. sturio* x *A. oxyrinchus* sur le locus LS19.

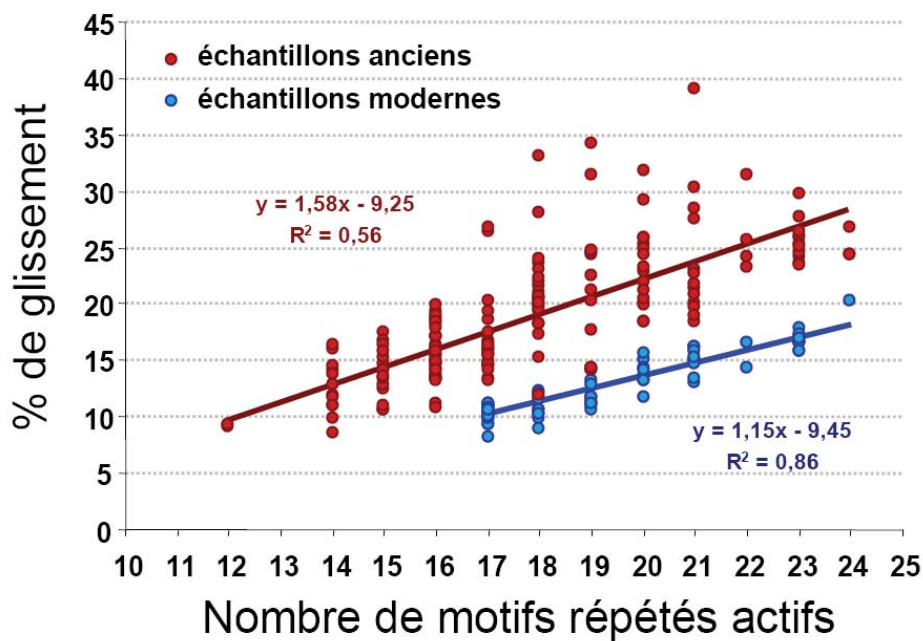
DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES



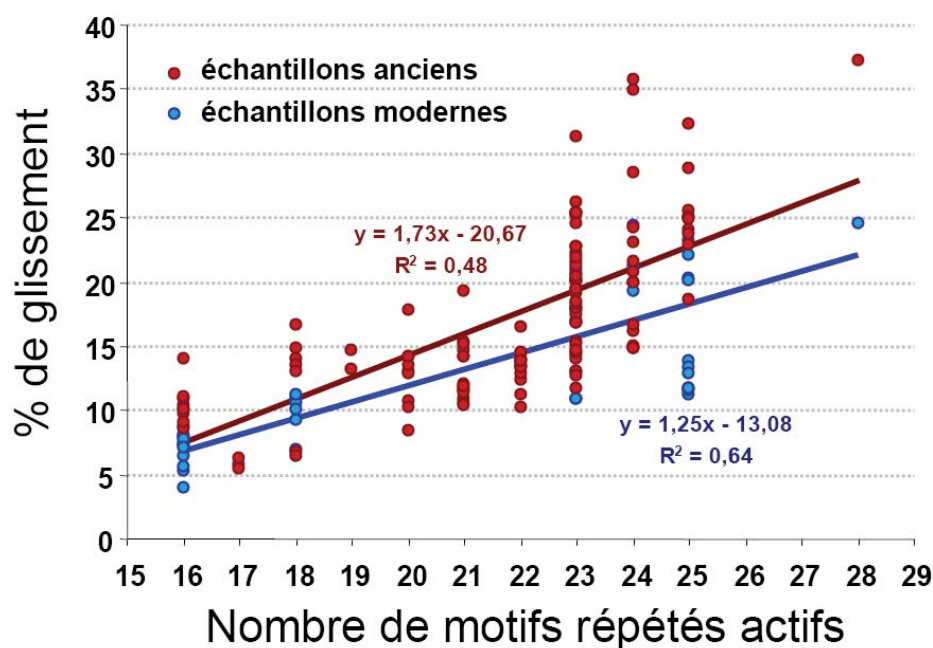
**LS19**



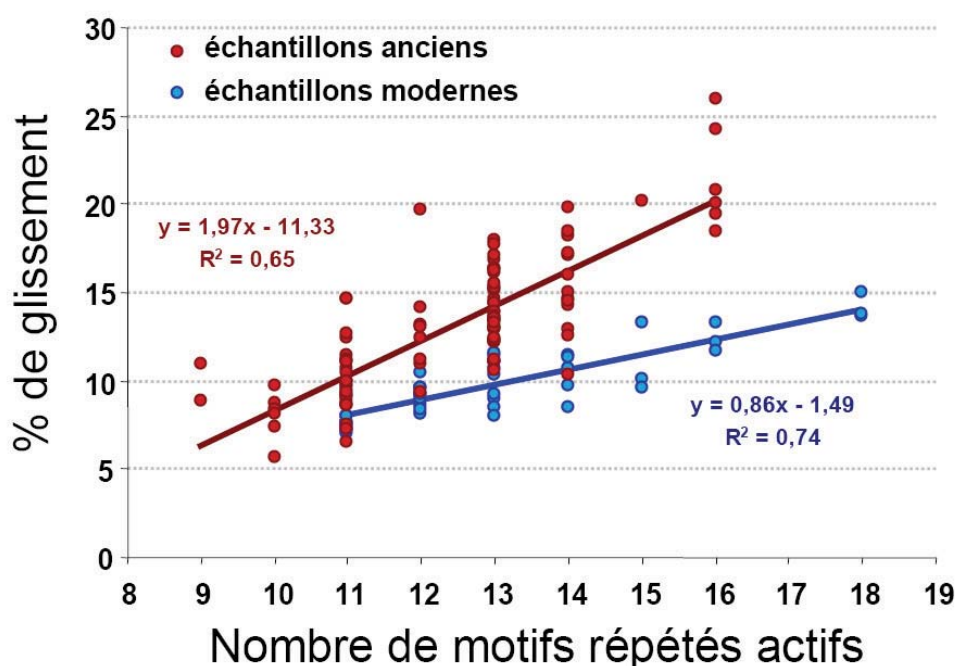
**LS54**



**LS68**



**Aox23**



**AoxD161**

**Figure III-53 :** Intensité des glissements en fonction du nombre de motifs répétés actifs sur les cinq locus microsatellites analysés, pour les échantillons modernes (en bleu) et anciens (en rouge). Le pourcentage de glissement est calculé suivant la procédure explicitée à la figure III-52. Le nombre de motifs répétés actifs correspond au nombre de motifs successifs sur lesquels des glissements peuvent avoir lieu (la présence d'un motif muté au milieu d'une zone répétée rompt la succession et limite les glissements) ; pour le locus Aox23, les zones répétées TAC et TAA ont été considérées ensemble pour simplifier. Le nombre d'individus et de mesures utilisés pour construire ces figures sont : 47 mesures sur 32 individus modernes + 117 mesures sur 50 individus anciens pour LS19, 21/18 + 82/30 pour LS54, 72/44 + 169/46 pour LS68, 44/29 + 113/35 pour Aox23 et enfin 44/34 + 97/44 pour AoxD161.

La proportion de glissement observée varie entre 0 et 30% suivant les locus, le nombre de motifs répétés et les échantillons (Figure III-53). Dans tous les cas, le taux de glissement ne constitue pas une entrave à la fiabilité du génotypage, puisque les allèles authentiques sont facilement distingués des glissements ; dans la situation où deux allèles séparés par un seul motif sont présents chez un hétérozygote, l'allèle le plus court est validé si la hauteur du pic correspondant est très supérieure à la hauteur attendu du pic de glissement de l'allèle le plus long. La sélection de locus à motifs tri- ou tétranucléotidique explique la faible intensité des glissements.

L'intensité des glissements augmente linéairement avec le nombre de motifs répétés actifs, les appariements décalés étant d'autant plus fréquents quand le nombre de motifs est élevé (Shinde *et al.* 2003). La relation de linéarité est moins évidente pour le locus Aox23, sans doute car la zone répétée est mixte (avec une zone à motifs TAC et une zone à motif TAA). Le cas du locus LS54 est un peu particulier car seulement trois allèles sont identifiés, avec un nombre de motifs répétés limité à quatre au maximum : les glissements sont donc très limités sur ce locus. L'augmentation des glissements est plus importante pour les échantillons anciens, avec un taux qui augmente en moyenne de 1,5 à 2% par motif ajouté, contre 0,8 à 1,3% pour les échantillons modernes (hors locus LS54).

Les glissements sont par ailleurs systématiquement plus importants pour les échantillons anciens par rapport aux échantillons modernes. Deux raisons expliquent cette observation : (i) le taux d'erreur de l'ADN polymérase augmente avec le nombre de cycles de PCR, or ce nombre est presque deux fois plus grand pour les échantillons anciens (60 cycles) que pour les échantillons modernes (35 cycles), (ii) le nombre de molécules de départ est plus faible pour les échantillons anciens, un seul événement de glissement a donc plus d'effet sur la proportion glissement / allèle.

### ■ Artefact de séquençage

Nous l'avons vu, le séquençage permet d'établir une correspondance entre allèle génotypé et séquence réelle. Il permet également de valider l'authentification des allèles microsatellites obtenus. Lors du séquençage, plusieurs types d'artefacts ont été décelés, dans des proportions mineures n'affectant pas la qualité des résultats (Tableau III-9).

## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : MICROSATELLITES

		Nombre d'individus positifs	Nombre de produits de PCR	Nombre de produits clonés	Nombre moyen de clones par produit	Produits de glissement (%) <sup>(a)</sup>	Autres séquences artefactuelles (%) <sup>(b)</sup>
LS19	<b>Archéologiques</b>	<b>39</b>	<b>314</b>	<b>88</b>	<b>8,3</b>	<b>2,4 ± 3,9</b>	<b>5,7</b>
	<i>dont Jardin Hiver</i>	26	194	55	7,9	1,6 ± 3,3	5,5
	<i>dont Montmajour</i>	8	80	26	9,3	4,8 ± 4,5	3,8
	<b>Muséum</b>	<b>42</b>	<b>325</b>	<b>92</b>	<b>7,4</b>	<b>5,7 ± 10,2</b>	<b>1,1</b>
	<i>dont Italie</i>	14	106	44	8,5	4,7 ± 9,7	0,0
	<i>dont Atlantique</i>	12	95	15	4,3	9,8 ± 16,3	0,0
	<i>dont Rhône</i>	7	65	18	7,3	3,6 ± 4,9	5,6
	<b>Total</b>	<b>81</b>	<b>639</b>	<b>180</b>	<b>7,9</b>	<b>4,0 ± 7,8</b>	<b>3,3</b>
LS54	<b>Archéologiques</b>	<b>35</b>	<b>270</b>	<b>43</b>	<b>9,0</b>	<b>1,2 ± 2,4</b>	<b>0,0</b>
	<i>dont Jardin Hiver</i>	22	157	31	6,9	1,3 ± 2,5	0,0
	<i>dont Montmajour</i>	8	74	9	13,6	1,5 ± 2,7	0,0
	<b>Muséum</b>	<b>40</b>	<b>287</b>	<b>49</b>	<b>10,0</b>	<b>1,9 ± 5,5</b>	<b>2,0</b>
	<i>dont Italie</i>	14	103	20	12,9	3,8 ± 10,9	0,0
	<i>dont Atlantique</i>	9	72	3	16,0	0 ± 0	0,0
	<i>dont Rhône</i>	8	57	16	6,0	0,6 ± 1,6	6,3
	<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>557</b>	<b>92</b>	<b>9,6</b>	<b>1,6 ± 4,4</b>	<b>1,1</b>
LS68	<b>Archéologiques</b>	<b>37</b>	<b>258</b>	<b>76</b>	<b>5,9</b>	<b>16,6 ± 16,7</b>	<b>0,0</b>
	<i>dont Jardin Hiver</i>	24	157	41	6,9	15,6 ± 14,3	0,0
	<i>dont Montmajour</i>	8	71	21	3,9	21,6 ± 22	0,0
	<b>Muséum</b>	<b>37</b>	<b>274</b>	<b>105</b>	<b>4,9</b>	<b>9,8 ± 11</b>	<b>0,0</b>
	<i>dont Italie</i>	13	94	27	4,7	15,3 ± 13,4	0,0
	<i>dont Atlantique</i>	9	74	33	5,3	11,1 ± 9,7	0,0
	<i>dont Rhône</i>	6	47	13	5,4	5,9 ± 6,2	0,0
	<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>532</b>	<b>181</b>	<b>5,3</b>	<b>12,6 ± 13,9</b>	<b>0,0</b>
Aox23	<b>Archéologiques</b>	<b>35</b>	<b>228</b>	<b>122</b>	<b>6,2</b>	<b>7,1 ± 9,9</b>	<b>2,5</b>
	<i>dont Jardin Hiver</i>	22	124	70	6,2	6,7 ± 9	4,3
	<i>dont Montmajour</i>	8	68	35	6,1	5,3 ± 11,6	0,0
	<b>Muséum</b>	<b>36</b>	<b>262</b>	<b>149</b>	<b>5,1</b>	<b>7,6 ± 10,8</b>	<b>0,0</b>
	<i>dont Italie</i>	13	97	56	4,3	8,3 ± 13	0,0
	<i>dont Atlantique</i>	9	65	54	4,3	5,4 ± 6,6	0,0
	<i>dont Rhône</i>	6	48	17	7,9	11,6 ± 14,5	0,0
	<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>490</b>	<b>271</b>	<b>5,6</b>	<b>7,4 ± 10,4</b>	<b>1,1</b>
AoxD161	<b>Archéologiques</b>	<b>35</b>	<b>253</b>	<b>99</b>	<b>5,9</b>	<b>11,1 ± 9,4</b>	<b>0,0</b>
	<i>dont Jardin Hiver</i>	22	140	56	6,0	11,2 ± 10,2	0,0
	<i>dont Montmajour</i>	8	76	28	5,3	12,8 ± 8	0,0
	<b>Muséum</b>	<b>37</b>	<b>272</b>	<b>88</b>	<b>6,2</b>	<b>11,3 ± 11,8</b>	<b>0,0</b>
	<i>dont Italie</i>	13	97	26	6,1	14,0 ± 15,8	0,0
	<i>dont Atlantique</i>	10	73	25	5,9	13,4 ± 11,9	0,0
	<i>dont Rhône</i>	7	51	24	5,6	8,5 ± 9,2	0,0
	<b>Total</b>	<b>72</b>	<b>525</b>	<b>187</b>	<b>6,0</b>	<b>11,2 ± 10,5</b>	<b>0,0</b>

(a) séquences avec un motif de moins que l'allèle authentique

(b) séquences aspécifiques ou issues d'événements de jumping PCR

**Tableau III-9:** Produits de PCR séquencés et artefacts observés pour les cinq locus microsatellites analysés. Le détail est donné pour les restes archéologiques (dont les sites du Jardin d'Hiver et Montmajour) et les spécimens de musée (dont l'Italie, l'Atlantique et le Rhône).

Parmi les clones séquencés, des séquences correspondant aux glissements de l'ADN polymérase ont été obtenues, dans des proportions voisines de celles



observées lors du génotypage – entre 1 et 13 % en moyenne (Tableau III-9). Le séquençage de 5 à 10 clones par produit de PCR est nécessaire pour identifier ces séquences de glissement. Là encore, c'est grâce à la sélection de locus à faible glissement que le séquençage fiable des allèles a été possible. En effet, si les glissements deviennent trop important il est impossible de séquencer les allèles de façon reproductible (Liepelt *et al.* 2001).

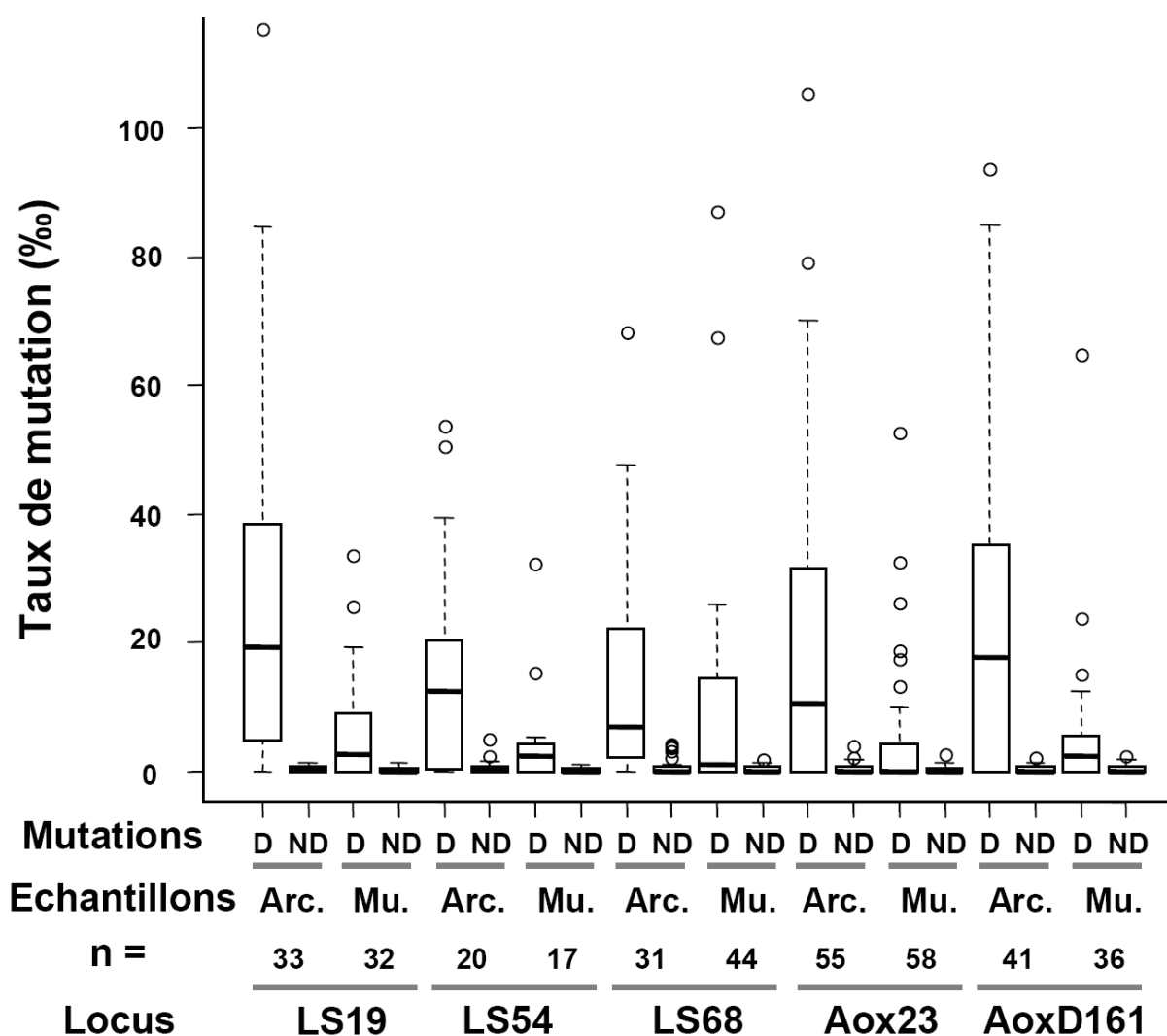
Par ailleurs, des séquences artefactuelles différentes ont été observées à des fréquences très faibles. Ces séquences sont le fruit d'amplifications aspécifiques (autre locus que celui ciblé) ou de jumping PCR. La jumping PCR – phénomène bien connu dans le domaine de la paléogénétique (Paabo *et al.* 1990 ; Gilbert *et al.* 2003) – est l'amplification de plusieurs matrices différentes produisant une molécule chimérique.

### ■ Désamination des cytosines

Le taux de désamination des cytosines sur les cinq locus microsatellites a été calculé en suivant la même procédure que pour l'ADNmt (voir la figure III-13, partie III-A-2-d). Les résultats obtenus sont en accord avec les résultats mitochondriaux (Figure III-54, à comparer à la figure III-14) : (i) les désaminations de cytosines sont plus fréquentes que l'ensemble des autres mutations artefactuelles, (ii) le taux de désamination est plus important pour les échantillons archéologiques que pour les échantillons de muséum, (iii) les résultats sont similaires pour les cinq locus microsatellites.

La désamination des cytosines apparaît néanmoins plus variable d'un échantillon à l'autre au niveau nucléaire, avec certains extraits comprenant jusqu'à 10% de leur cytosines désaminées. L'ADN nucléaire étant présent en un faible nombre de copies, la probabilité que la PCR soit amorcée à partir d'une seule molécule augmente, et si par hasard cette molécule est très désaminée elle conduit à biaiser l'estimation vers les valeurs hautes.

Ces valeurs de désaminations des cytosines constituent un autre argument en faveur de l'authenticité des résultats que nous avons obtenu.



**Figure III-54 :** Taux de désaminations des cytosines sur les cinq locus microsatellites nucléaires. Le nombre d'allèles inclus (n), le type d'échantillon (Arc. : échantillons archéologiques et Mu. : échantillons de muséum) et le type de mutation analysé (D : désaminations des cytosines CG/TA, ND : tous les autres types de mutation).

#### ■ Bilan

L'ensemble des analyses effectuées soutient l'authenticité de nos résultats. La quantité et la qualité de l'ADN amplifiable est bien sûr le facteur conditionnant la fiabilité des génotypes obtenus, et nous avons eu la chance d'étudier des échantillons relativement bien préservés. Les glissements de l'ADN polymérase et autres artéfacts d'amplification ont été reconnus et ne posent pas de problèmes quant à la qualité du jeu de données. L'allelic dropout est relativement important, mais nous avons maximisé la réplication des expérimentations afin de nous en affranchir. Une partie des données biologiques nous est probablement restée inaccessible dans le sens où certains allèles longs n'étaient probablement plus

présents dans les extraits d'ADN, totalement dégradé au cours du temps : cette extinction allélique irrémédiable a été limitée dans notre cas par le choix de locus à gamme de taille d'allèles restreinte.

### III-A-3-i Implications pour les analyses futures

#### ■ Un gros potentiel...

Nous avons réussi à constituer un jeu de données microsatellites conséquent et fiable à partir d'échantillons de musée mais aussi et surtout à partir d'échantillons archéologiques. Ces derniers ne sont pas très anciens (5 ka BP au maximum) mais notre étude ouvre une brèche en démontrant la faisabilité d'analyses auparavant considérées comme impossibles.

L'ensemble des analyses réalisées ici pourra servir de base à de futures études désireuses d'utiliser les microsatellites pour étudier la diversité génétique de populations disparues.

L'importance de la sélection des locus microsatellites adaptés à l'ADN ancien a été soulignée. Cette phase est indispensable afin d'assurer la fiabilité des données, mais elle n'a pas été suffisamment mise en avant dans les études précédentes.

Les outils nécessaires à la validation des résultats ont également été présentés, incluant (i) la quantification par qPCR, (ii) le séquençage des allèles, (iii) le suivi de l'importance des glissements, (iv) le suivi des désaminations de cytosine et autres mutations artéfactuelles. Ces outils n'ont pas été systématiquement utilisés dans la littérature.

#### ■ ... mais difficile à exploiter

Les microsatellites constituent un outil de choix, meilleur marqueur d'une évolution populationnelle que les séquences mitochondriales, mais la validation d'un jeu de données conséquent à partir d'échantillons anciens est conditionnée par de nombreux paramètres dont (i) la préservation de l'ADN des échantillons – sur laquelle il est impossible d'agir mais qu'il est impératif d'estimer avant d'entreprendre une étude à grande échelle, (ii) l'efficacité d'extraction de l'ADN – qu'il est possible d'optimiser suivant le matériel source (Schmerer *et al.* 1999), (iii) l'espèce étudiée – qui n'est le plus souvent pas une espèce modèle et pour laquelle de nouveaux outils

moléculaires seront peut-être à développer, (iv) le temps et l'argent – le nombre de contrôles, de réplication et d'analyses nécessaire étant très lourd.

Transition :

Les résultats que nous avons accumulés au niveau mitochondrial et nucléaire étant fiables – nous venons de le montrer dans les pages précédentes – ils peuvent être utilisés pour des analyses de génétique des populations sur l'esturgeon européen *A. sturio*. Ces analyses serviront de base à une discussion sur l'histoire évolutive de ce poisson menacé.

**III-B DIVERSITE DANS L'ESPACE : PHYLOGEOGRAPHIE DE L'ESPECE SUR SON  
AIRE DE REPARTITION HISTORIQUE**

***III-B-1 QU'EST-CE QUE LA PHYLOGEOGRAPHIE ?***

**III-B-1-a Une discipline dérivée de la biogéographie**

La biogéographie vise à analyser la distribution spatiale et l'abondance des organismes, de l'échelle des individus à celle des écosystèmes (Brown & Lomolino 1998). A ses débuts la discipline était purement descriptive, focalisée sur la description des aires de répartition (où ?) et sur l'identification des patrons de distribution (comment ?). Avec l'intérêt croissant pour les phénomènes évolutifs, un aspect interprétatif s'est développé, en particulier après le papier fondateur de MacArthur & Wilson (1967) sur la biogéographie insulaire. La recherche de l'origine des patrons biogéographiques devint le centre des préoccupations (pourquoi ? pourquoi pas ?), les scientifiques se basant au départ principalement sur des données géologiques, géographiques, climatiques et écologiques pour construire leurs raisonnements.

La découverte des variations génétiques interindividuelles a fourni un nouvel outil très puissant à la biogéographie. En effet, les variants génétiques présentent souvent une distribution géographique particulière, en relation avec les caractéristiques biologiques et l'histoire démographique des organismes qui les portent. L'analyse des patrons biogéographiques à la lumière des généalogies génétique constitue la phylogéographie (Avice *et al.* 1987).

**III-B-1-b Origine des patrons phylogéographiques**

La répartition géographique de la diversité génétique peut être influencée par de nombreux paramètres, à l'origine de patrons souvent complexes. Les paramètres peuvent être rangés en deux grandes classes :

1) Les paramètres environnementaux, indépendants des organismes vivants.

Il peut s'agir de barrières naturelles limitant les contacts entre différentes aires géographiques favorables : barrières physiques comme la chaîne alpine (Taberlet *et al.* 1998) ou le détroit de Gibraltar (Bargelloni *et al.* 2005), barrières physico-chimiques comme la salinité (Lowe *et al.* 2007). L'isolement lié à ces barrières conduit à la divergence des populations, et avec le temps à la spéciation allopatrique (Grant *et al.* 2000).

Il peut également s'agir de facteurs climatiques comme les glaciations ou les réchauffements, qui modifient l'aire de répartition des organismes et peuvent conduire à un isolement temporaire (le temps d'une glaciation par exemple) ; les exemples sont nombreux concernant les effets des glaciations quaternaires sur la diversité génétique des espèces (Bernatchez & Wilson 1998 ; Hewitt 2000).

2) Les paramètres biologiques, liés aux organismes vivants.

Les caractéristiques biologiques et démographiques d'un organisme – ses traits d'histoire de vie, sa propension à migrer etc. – modulent la structuration de ses populations. Un taux de migration élevé ou des tailles efficaces importantes auront ainsi par exemple tendance à prévenir la différenciation des populations (Preziosi & Fairbairn 1992).

La répartition des variants génétiques peut également être conditionnée par les interactions avec les autres organismes, telles que la compétition ou la prédation (Lees & Creed 1975 ; Garvey *et al.* 1994).

### **III-B-2 L'UNITE PHYLOGEOGRAPHIQUE DE BASE : LA POPULATION**

#### III-B-2-a Qu'est ce qu'une population d'esturgeons européen ?

##### **■ Rappel : définition**

Une population d'esturgeon européen peut se définir comme un groupe d'individus nés et se reproduisant entre eux dans le même bassin fluvial.

### ■ Sur l'importance de l'anadromie et du homing

L'anadromie de l'esturgeon européen justifie le choix du bassin fluvial comme unité biogéographique définissant les populations : la reproduction se déroule en effet dans des zones spécifiques et toujours au niveau du lit des fleuves (la distribution en mer des individus d'une population donnée peut être très vaste et peut se superposer à celle d'autres populations voisines ; la notion de population en terme d'aire marine n'a donc aucune valeur). De plus, le comportement de homing – qui conduit les esturgeons à revenir dans leur bassin natal pour se reproduire – maintient un certain isolement reproducteur entre les populations installées dans des bassins adjacents. Le degré de fidélité des esturgeons à leur bassin natal définit le niveau de différenciation entre populations ; chez l'esturgeon européen les données de capture-recapture sur le bassin girondin indiquent une fidélité relativement importante (Williot *et al.* 1997).

### ■ Sur la fonctionnalité d'une population

Une population ne peut être considérée comme valide que s'il y a reproduction : la population est alors fonctionnelle. Dans le cas où la reproduction est stoppée (à cause de la chute des effectifs par exemple), la population n'est plus fonctionnelle mais relictuelle ou résiduelle. Comme la durée de vie maximale des esturgeons est de plusieurs dizaines d'années, une population résiduelle peut subsister pendant relativement longtemps après la perte de fonctionnalité.

Dans le cas où des esturgeons sont présents dans un bassin fluvial mais ne s'y reproduisent pas et ne s'y sont jamais reproduits le terme population est impropre. Ces individus sont reliés à l'aire d'alimentation mais pas à l'aire de ponte.

Deux critères peuvent être retenus pour définir pratiquement une population fonctionnelle :

- 1) le nombre d'individus ; si plusieurs centaines ou milliers de poissons sont régulièrement observés et pêchés dans un fleuve, il est probable qu'ils appartiennent à une population fonctionnelle.
- 2) la présence de jeunes de l'année, migrant depuis leur lieu de ponte en amont du fleuve vers l'estuaire en aval ; ce critère est le seul irréfutable, puisqu'il indique la reproduction effective des poissons dans ce fleuve.

### III-B-2-b A la recherche des populations fonctionnelles historiques d'*A. sturio*

#### ■ Approche basée sur la bibliographie

Nous avons vu dans l'introduction que les données historiques permettent d'estimer l'aire de répartition passée de l'esturgeon européen (voir la figure I-10).

Cette approche est limitée pour plusieurs raisons :

- 1) son application est restreinte à l'ère industrielle, les données antérieures à 1800 étant rares et peu fiables (confusion d'espèces, imprécisions). Or les deux derniers siècles sont caractérisés par la chute des effectifs d'esturgeons, et ne constituent donc pas une période d'équilibre des populations ; difficile dans ce cas de différencier par exemple une population résiduelle d'un groupe d'individus vagabonds. Il n'est par ailleurs pas exclu que certaines populations d'esturgeons aient disparu avant 1800, la pêche à l'esturgeon existant au moins depuis l'Antiquité.
- 2) pour la majorité des bassins, les données se focalisent sur la description de rares captures d'individus adultes. Il est difficile dans ces conditions de conclure à l'existence d'une population et à sa fonctionnalité (ou de l'exclure).
- 3) la nature spécifique des esturgeons décrits n'est souvent pas précisée (ou elle est attribuée par défaut). Nous l'avons vu précédemment, cette confusion peut conduire à des erreurs : la présence de populations fonctionnelles d'esturgeons est bien documentée en mer Baltique au cours des deux derniers siècles, mais il ne s'agissait a posteriori pas de populations d'*A. sturio*.

#### ■ Approche basée sur les restes biologiques

Les spécimens conservés dans les collections d'histoire naturelle du monde entier – naturalisés ou préservés dans l'alcool – apportent des informations supplémentaires sur les populations d'esturgeons de l'ère industrielle, à condition que le lieu de capture soit indiqué et qu'il soit fiable. Comme indiqué dans l'article n°2, l'information apportée dépend du lieu de capture, qui peut être (i) en mer (population d'origine : incertaine), (ii) en estuaire (population d'origine : probablement le fleuve lié à l'estuaire, mais pas forcément) ou (iii) en fleuve (population d'origine : ce fleuve de façon quasi certaine).



Les individus conservés dans les muséums sont généralement des adultes ou des subadultes, l'objectif de ces institutions étant de présenter au public les spécimens les plus imposants. Dans quelques cas, des juvéniles sont aussi présents, qui permettent de valider la fonctionnalité de la population dont ils proviennent. Le nombre d'individus dans les collections varie par ailleurs de façon importante entre les bassins fluviaux, laissant d'importantes zones géographiques dans l'ombre (la Méditerranée orientale en particulier).

Les restes archéozoologiques permettent de remonter bien plus loin dans le passé, à des époques où la surpêche n'était pas encore généralisée. Malheureusement, ils sont dans l'ensemble assez rares, de nature fragmentaire, et quand ils sont présents ils ne concernent souvent que quelques individus (Desse-Berset 2009a ; Ludwig *et al.* 2009c). La valeur des informations qu'ils apportent – bien que partielle – est néanmoins d'une valeur inestimable. Sur quelques sites archéologiques exceptionnels – rassemblant des centaines voire des milliers d'ossements dont certains utilisables pour estimer l'âge des individus – ils permettent même d'obtenir des informations à l'échelle populationnelle (voir par exemple Desse-Berset 1994 pour le Rhône).

### ■ Approche basée sur la génétique

Lorsque les populations sont reproductivement isolées, leurs caractéristiques génétiques tendent à se différencier, que ce soit par les effets de la dérive ou de la sélection. L'utilisation de marqueurs moléculaires tels que l'ADNmt ou les microsatellites permet de détecter cette divergence, et donc potentiellement d'identifier les populations.

Les populations d'esturgeons anadromes étant relativement isolées géographiquement les unes des autres (les embouchures des fleuves assez grands pour entretenir une population viable sont souvent éloignées) et le comportement de homing limitant les échanges interpopulationnels, elles sont généralement suffisamment différenciées au niveau génétique pour être identifiables : c'est le cas par exemple pour l'esturgeon à museau court *A. brevirostrum* (Grunwald *et al.* 2002 ; Wirgin *et al.* 2005) et l'esturgeon atlantique *A. oxyrinchus* (Waldman *et al.* 1996 ;

Wirgin *et al.* 2000 ; Grunwald *et al.* 2007). L'analyse génétique d'échantillons anciens que nous avons réalisé va nous permettre d'aborder cette question chez *A. sturio*.

Les populations étant caractérisées au niveau génétique, de nombreuses méthodes d'assignation permettent d'inférer la population d'origine probable d'un individu X à partir de son génotype (Pritchard *et al.* 2000 ; Piry *et al.* 2004). Ces méthodes s'avèrent particulièrement utiles dans le cas d'individus d'origine indéterminée ou peu fiable, nous le verrons avec quelques uns de nos échantillons de musée.

### **III-B-3 ÉTUDE PHYLOGEOGRAPHIQUE D'*A. STURIO* : MODUS OPERANDI**

#### III-B-3-a Sur la fragmentation des données : échelle spatiale

Le niveau d'interprétation des patrons phylogéographiques intraspécifiques (individu, population, groupe de populations) dépend bien sûr de l'objectif poursuivi, mais aussi de la résolution phylogénétique des outils utilisés et de l'échantillonnage.

Le matériel biologique ancien est rare – sauf exceptions – et une partie est inutilisable car l'ADN est trop dégradé : pour ne nombreuses populations historiques, le nombre d'échantillons informatifs est donc faible, limitant du même coup les analyses statistiques à l'échelle populationnelle.

Dans la mesure du possible, nous présenterons les résultats par population, mais pour faciliter la discussion, nous avons défini sept régions couvrant l'ensemble de l'aire de répartition historique de l'espèce, séparées par des barrières naturelles limitant a priori les échanges inter régions (voir figure III-62). Ces sept régions correspondent à 1) La Mer Baltique, limitée par le détroit d'Oresund entre la Suède et le Danemark, 2) La façade atlantique européenne de la Mer du Nord au Pays Basque, limitée par le Gouf de Capbreton (fosse sous-marine d'environ 2 km de profondeur séparant les marges continentales française et ibérique), 3) la façade Atlantique ibérique, incluant les côtes espagnoles et portugaises jusqu'au détroit de Gibraltar, 4) La Méditerranée occidentale incluant le bassin tyrrhénien et séparée de la Méditerranée orientale par les détroits de Messine et de Sicile 5) la Mer Adriatique,

limitée au sud par le canal d'Otrante, 6) La Méditerranée Orientale, incluant le bassin Levantin et les mers Ionienne et Egée jusqu'aux détroits des Dardanelles et du Bosphore, 7) La Mer Noire.

### III-B-3-b Sur la fragmentation des données : échelle temporelle

Les échantillons inclus dans cette étude phylogéographique sont inégalement répartis dans l'espace, mais aussi dans le temps. Ils peuvent être partagés en trois catégories, du plus récent au plus ancien : (i) les échantillons modernes, (ii) les spécimens de muséum (19<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> siècles) et (iii) les restes archéologiques (800-5000 ans BP, avec un seul individu plus récent datant du 18<sup>e</sup> siècle).

L'ère industrielle étant caractérisée par le déclin massif des populations d'esturgeons en Europe, nous avons décidé d'analyser séparément les échantillons pré- et post- 18<sup>e</sup> siècle. Les échantillons modernes correspondant à la population relictuelle de Gironde, nous avons également décidé de les analyser séparément.

Les caractéristiques d'une population doivent être définies dans un cadre spatial (un bassin fluvial), mais aussi dans un cadre temporel donné. En effet, nous en avons discuté dans la partie I-C-1-c, les populations peuvent évoluer rapidement au cours du temps. Le temps de génération important des esturgeons (environ 15 ans) limite les changements temporels brusques, nous partons donc de l'hypothèse qu'une population d'esturgeons est homogène à l'échelle d'une centaine d'années.

Sur la base de cette hypothèse de travail, les échantillons modernes et les échantillons de muséum peuvent chacun être étudiés comme un groupe homogène (la période couverte étant de 200 ans maximum). La situation est plus complexe pour les échantillons archéologiques, qui sont échelonnés sur plus de 4 000 ans ; la fragmentation des échantillons en groupes couvrant chacun une période équivalente à un ou deux siècles serait peu pertinente dans le cadre de cette étude phylogéographique, puisque nous ne disposerions d'aucun chevauchement temporel entre les différentes zones géographiques. En toute connaissance des biais associés, nous avons donc décidé d'analyser tous les restes archéologiques ensemble, tout en mentionnant à chaque fois que nécessaire l'âge des échantillons.

Sans cette approximation volontaire, aucune étude phylogéographique n'est possible.

### **III-B-4 PHYLOGEOGRAPHIE MITOCHONDRIALE**

#### III-B-4-a Données disponibles

Nous avons vu à la partie III-A-1 que la région de contrôle est le marqueur mitochondrial le plus approprié pour étudier la diversité intraspécifique d'*A. sturio*. La majorité des données informatives disponibles – dans la bibliographie, mais aussi dans cette thèse – concernant le fragment Dlo-5', nous nous focaliserons sur cette portion. Nous discuterons également de l'apport de l'analyse de la région de contrôle entière réalisée dans cette thèse.

#### ■ Données bibliographiques

Le nombre de séquences mitochondriales publiées sur l'esturgeon européen n'est pas négligeable, mais beaucoup d'entre elles ont été obtenues dans le but d'établir la phylogénie des Acipensériformes (Birstein & DeSalle 1998 ; Birstein *et al.* 2002 ; Krieger *et al.* 2008) ou de discriminer les espèces (Almodovar *et al.* 2000 ; Pages *et al.* 2009 ; Koutrakis *et al.* unpublished), et ne concernent pas des régions variables du génome mitochondrial (voir partie III-A-1).

Des séquences du fragment Dlo-5' ont été obtenues sur de nombreux individus modernes du stock captif maintenu au Cemagref de Bordeaux (Ludwig & Jenneckens 2000 ; Ludwig *et al.* 2000a ; Ludwig *et al.* 2002b) ; les données présentées dans ces études sont redondantes puisqu'elles concernent les mêmes individus, nous nous focaliserons donc sur la dernière étude qui mentionne 67 individus (Ludwig *et al.* 2002b) ; parmi ces 67 individus, rien n'est précisé quant à la proportion d'individus issus du milieu naturel (capturés au début des années 1990) et d'individus provenant de la reproduction semi-artificielle de 1995 (qui sont tous frères et sœurs et donc peu pertinents).

D'autres séquences du fragment Dlo-5' ont été obtenues à partir d'échantillons anciens. Lors des études s'intéressant à la présence d'*A. oxyrinchus* en mer

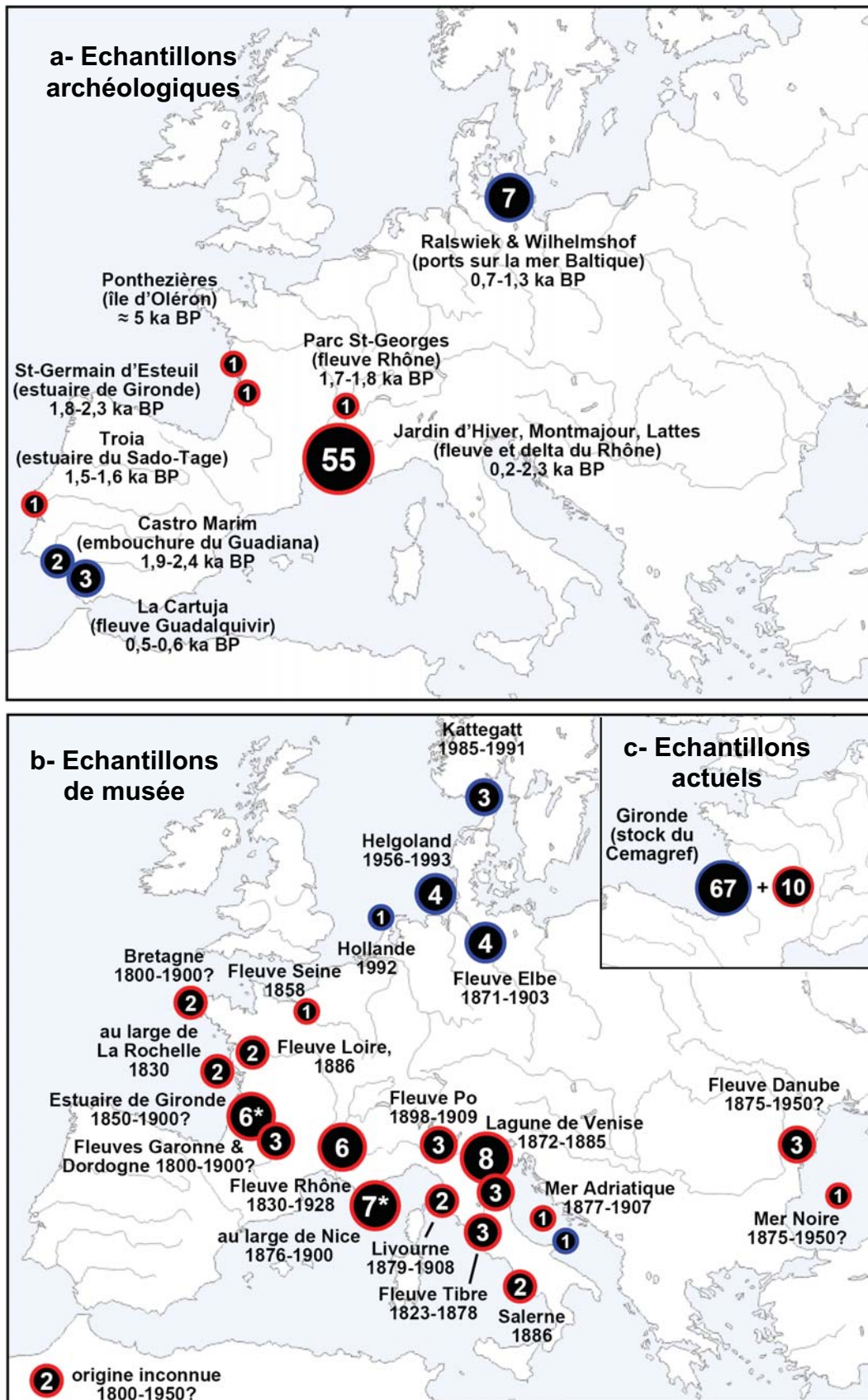
Baltique, 12 séquences d'*A. sturio* ont été publiées à partir d'autant de spécimens de muséum capturés en Mer du Nord (Ludwig *et al.* 2002b), et sept séquences d'*A. sturio* ont été identifiées à partir d'autant de restes archéologiques d'un site de la Mer Baltique – sans précision sur le nombre d'individus différents auxquels ces ossements correspondent (Ludwig *et al.* 2008). Pour comparaison avec les échantillons du nord de l'Europe, Ludwig *et al.* (2002b) ont également analysé un spécimen de musée capturé dans le Tibre et un spécimen de musée capturé en Mer Adriatique. Enfin, lors d'une étude sur l'éventuelle présence d'autres espèces qu'*A. sturio* dans la péninsule ibérique, cinq séquences ont été obtenues à partir d'autant de restes archéologiques (Ludwig *et al.* 2009c).

Les échantillons d'*A. sturio* ayant fourni des séquences du fragment Dlo-5' sont indiquées par un cercle bleu sur la figure III-55. Se reporter à cette figure également pour l'âge des différents échantillons mentionnés dans le paragraphe précédent.

### ■ Données issues de cette thèse : fragment Dlo-5'

Les publications utilisant la région Dlo-5' s'intéressaient principalement à l'hétéroplasmie chez les esturgeons (Ludwig & Jenneckens 2000 ; Ludwig *et al.* 2000a) ou encore à la discrimination des espèces (Ludwig *et al.* 2002b ; Ludwig *et al.* 2008 ; Ludwig *et al.* 2009c), mais très peu (voire pas du tout) à la phylogéographie d'*A. sturio*. La couverture géographique des échantillons utilisés dans ces études est d'ailleurs très restreinte.

L'intérêt majeur de nos échantillons est d'étendre les zones géographiques couvertes à l'ensemble de l'aire de répartition historique de l'espèce, avec en particulier la façade atlantique française, la Méditerranée occidentale, la Mer Adriatique et la Mer Noire. Les échantillons pour lesquels nous avons pu obtenir la séquence du fragment Dlo-5' sont indiqués par un cercle rouge sur la figure III-55.



**Figure III-55 :** Répartition géographique des échantillons archéologiques (a) de musée (b) et actuels (c) validés sur le fragment D1o-5' de l'ADNmt. La couleur bordant les cercles indique si les séquences sont issues de la bibliographie (bleu) ou de cette thèse (rouge). Le site archéologique (a) ou le lieu de capture (b) ainsi que l'âge et le nombre d'échantillons sont indiqués. (\*) L'origine de trois individus capturés en Gironde et de deux autres capturés au large de Nice est incertaine.

Il s'agit de 59 restes archéologiques, 57 spécimens de musée et 10 individus actuels du stock du Cemagref. Ces 10 échantillons modernes correspondent à des individus capturés dans le milieu naturel en Gironde au début des années 1990 ; il s'agit probablement d'individus déjà étudiés par Ludwig *et al.* (2002b), sans certitude cependant puisque les codes correspondants n'ont pas été publiés. A noter également que nous avons réanalysé l'échantillon du Tibre étudié par Ludwig *et al.* (2002b), qui n'a été compté qu'une fois sur la figure III-55 (il fait partie des trois esturgeons du Tibre que nous avons analysés). Les échantillons de musée d'*A. sturio* obtenus au cours de cette thèse sont inclus dans le jeu de données « article n°4 » de l'annexe 3.

### **■ Données issues de cette thèse : région de contrôle entière**

Parmi les 126 échantillons que nous avons validés sur le fragment Dlo-5' (116 anciens et 10 modernes), 44 ont été étudiés plus largement sur la région de contrôle entière (34 anciens et 10 modernes). Leur origine géographique est indiquée sur la figure III-56.



**Figure III-56 :** Répartition géographique des échantillons archéologiques (a) de musée (b) et actuels (c) validés au cours de cette thèse sur la région de contrôle entière de l'ADNmt. (\*) L'origine de l'individu capturé en Gironde et de celui capturé au large de Nice est incertaine.

### III-B-4-b Structuration génétique

#### ■ Définition des clades avec la région de contrôle entière

Nous avons d'abord construit des arbres à partir des haplotypes définis sur la région de contrôle entière (environ 900 pb), cette région étant la plus informative.



Nous avons construit des arbres racinés en utilisant l'espèce sœur *A. oxyrinchus* comme groupe externe, et des arbres non racinés.

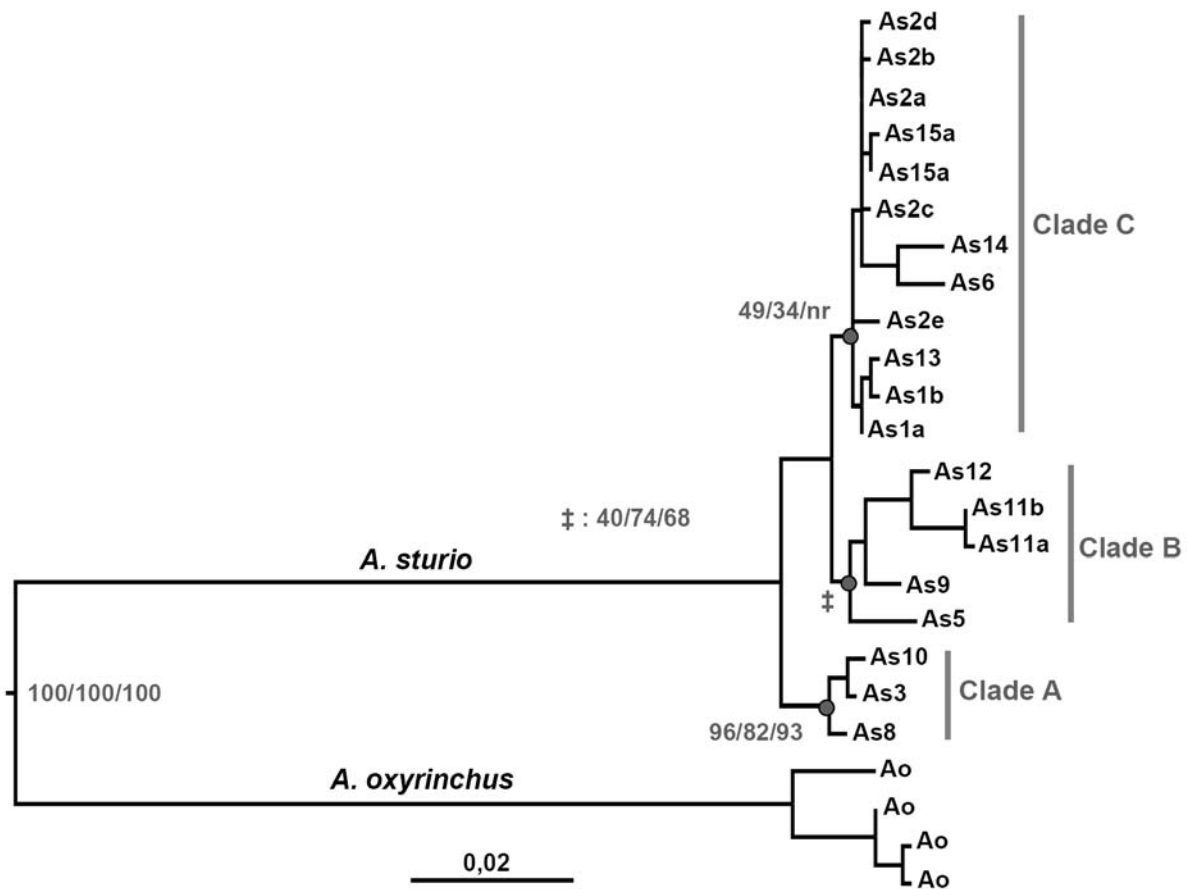
### Construction d'arbres avec *A. oxyrinchus* :

Les séquences de la région de contrôle entière d'*A. sturio* et *A. oxyrinchus* ont été alignées grâce à l'algorithme MUSCLE (Edgar 2004) implémenté dans le logiciel Seaview v.4 (Gouy *et al.* 2010).

Le modèle d'évolution le plus adapté au jeu de données a été déterminé en testant les 88 modèles implémentés dans le logiciel JModelTest 0.1.1 (Posada 2008) : les critères d'informations d'Akaike (AIC ; Akaike 1974) et bayésien (BIC ; Schwarz 1978) donnent respectivement les modèles TPM3uf+G et HKY+G comme les meilleurs.

Le modèle HKY+G a été retenu pour la construction d'arbres (car il est implémenté dans tous les logiciels d'analyse), qui a été réalisée avec trois méthodes de reconstructions phylogénétiques : (i) la méthode des distances (NJ), en utilisant l'algorithme du Bio Neighbor Joining ou BIONJ (Gascuel 1997) implémenté dans Seaview avec réalisation 10 000 bootstraps, (ii) la méthode du maximum de vraisemblance (ML) implémentée dans PHYML (Guindon & Gascuel 2003) avec réalisation de 1 000 bootstraps, (iii) la méthode bayésienne (BY) implémentée dans MrBayes v.3 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) avec réalisation de deux répétitions comportant chacun quatre chaînes de Markov courant sur 2 000 000 de générations, avec échantillonnage d'un arbre toutes les 1 000 générations (donc 2 x 2000 arbres) et un burnin de 250 (donc 2 x 1750 arbres pour la construction du consensus final).

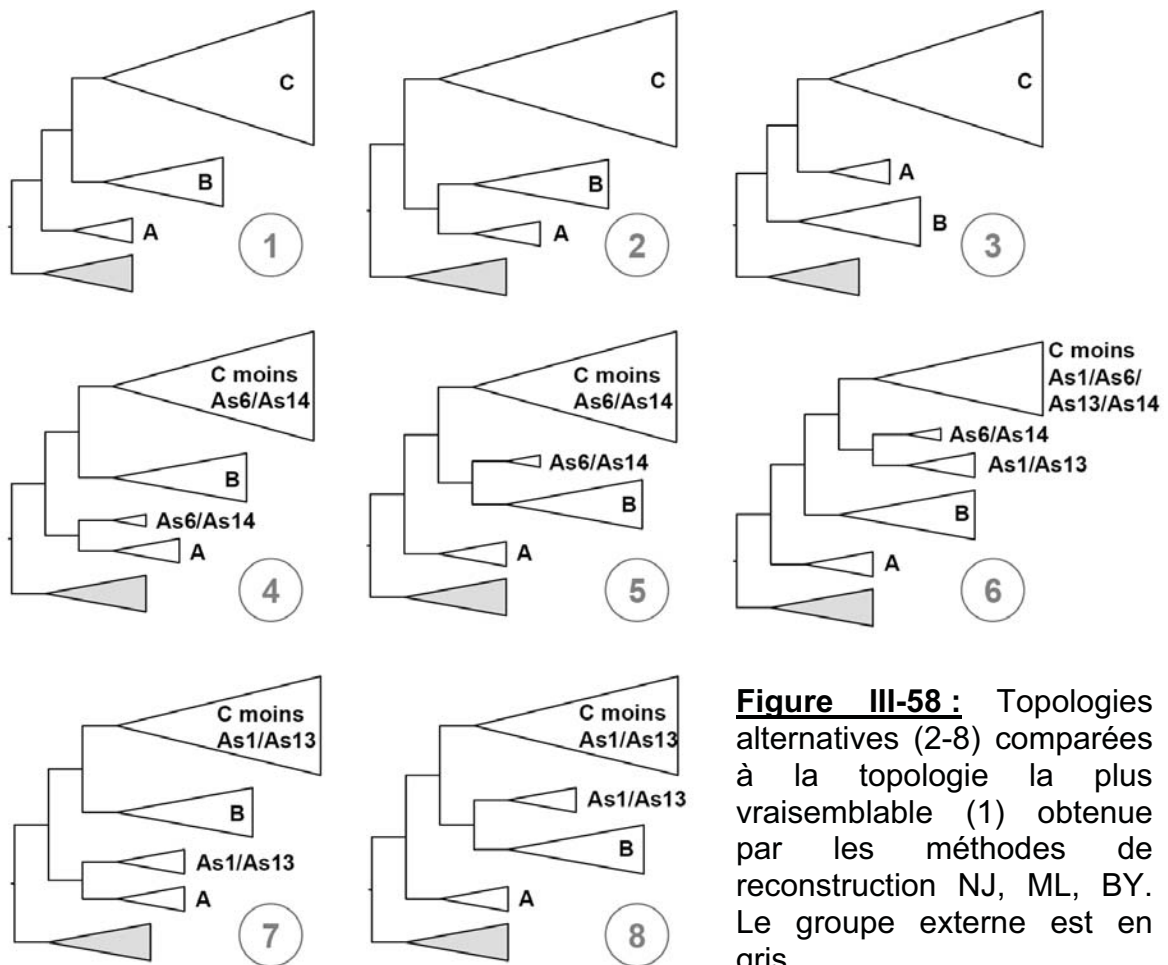
Les trois méthodes donnent des résultats globalement concordants, avec l'identification de trois clades (A, B, C) au sein de l'espèce *A. sturio* (Figure III-57). Le soutien du clade A est satisfaisant, mais les clades B et C sont moins bien soutenus, en particulier avec la méthode bayésienne dans laquelle le clade C se retrouve branché au sein du clade B (formant un mégaclade qui inclut donc B et C). Les nœuds à l'intérieur des clades sont reproductibles entre les différentes méthodes, sauf pour le clade C au sein duquel seuls les groupements As6-As14 et As1a-As1b-As13 sont obtenus de façon reproductible.



**Figure III-57 :** Arbre phylogénétique d'*A. sturio*, construit à partir des séquences de la région de contrôle entière et raciné par *A. oxyrinchus* (groupe externe). La topologie correspond à l'arbre obtenu en ML. Les supports des principaux nœuds sont indiqués avec dans l'ordre bootstraps BIONJ / bootstraps ML / probabilités postérieures BY (transformées en pourcentage).

Afin de tester la topologie de l'arbre obtenu, nous l'avons comparé à sept topologies alternatives (dans lesquelles certaines branches ont été déplacées ; figure III-58), grâce aux tests de Kishino-Hasegawa (KH) et Shimodaira-Hasegawa (SH) réalisés avec le logiciel PAUP (Swofford 2002). Les valeurs de vraisemblances obtenues avec PAUP pour les différentes topologies sont relativement proches, et les tests KH et SH ne permettent pas de rejeter les topologies alternatives (Tableau III-10). Les topologies 1, 2 et 3 de la figure III-58 sont toutes aussi vraisemblables (LnL = 2287,9) : l'ordre de branchement des clades A, B et C reste donc incertain. Les topologies 4 à 8 sont moins vraisemblables que les topologies 1 à 3 : l'existence des clades est donc mieux soutenue (mais pas de façon statistiquement significative).

## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : PHYLOGEOGRAPHIE



**Figure III-58 :** Topologies alternatives (2-8) comparées à la topologie la plus vraisemblable (1) obtenue par les méthodes de reconstruction NJ, ML, BY. Le groupe externe est en gris.

Arbre	- lnL	p (KH test)	p (SH test)
1	2287,9	-	-
2	2287,9	-	-
3	2287,9	-	-
4	2293,2	0,39	0,31
5	2293,8	0,34	0,25
6	2291,4	0,25	0,46
7	2291,7	0,33	0,47
8	2291,7	0,33	0,47

**Tableau III-10 :** Comparaison des topologies, avec pour chacune la vraisemblance et les p-values correspondant aux KH et SH test.

Les séquences d'*A. sturio* et d'*A. oxyrinchus* peuvent être alignées mais sont très divergentes, d'où la longueur importante des branches menant de la racine aux groupes internes. L'utilisation d'un groupe externe trop divergent peut biaiser (i) l'état inféré des caractères et donc modifier la topologie des groupes internes, pouvant expliquer le faible support des clades au sein de l'espèce *A. sturio* (bootstrap ou

probabilités postérieures faibles, et topologies 4 à 8 impossibles à rejeter statistiquement par les KH et SH tests) et (ii) le placement de la racine (Milinkovitch & Lyons-Weiler 1998 ; Graham *et al.* 2002), ce qui pourrait expliquer l'indétermination de l'ordre des branchement des clades A, B et C avec le groupe externe.

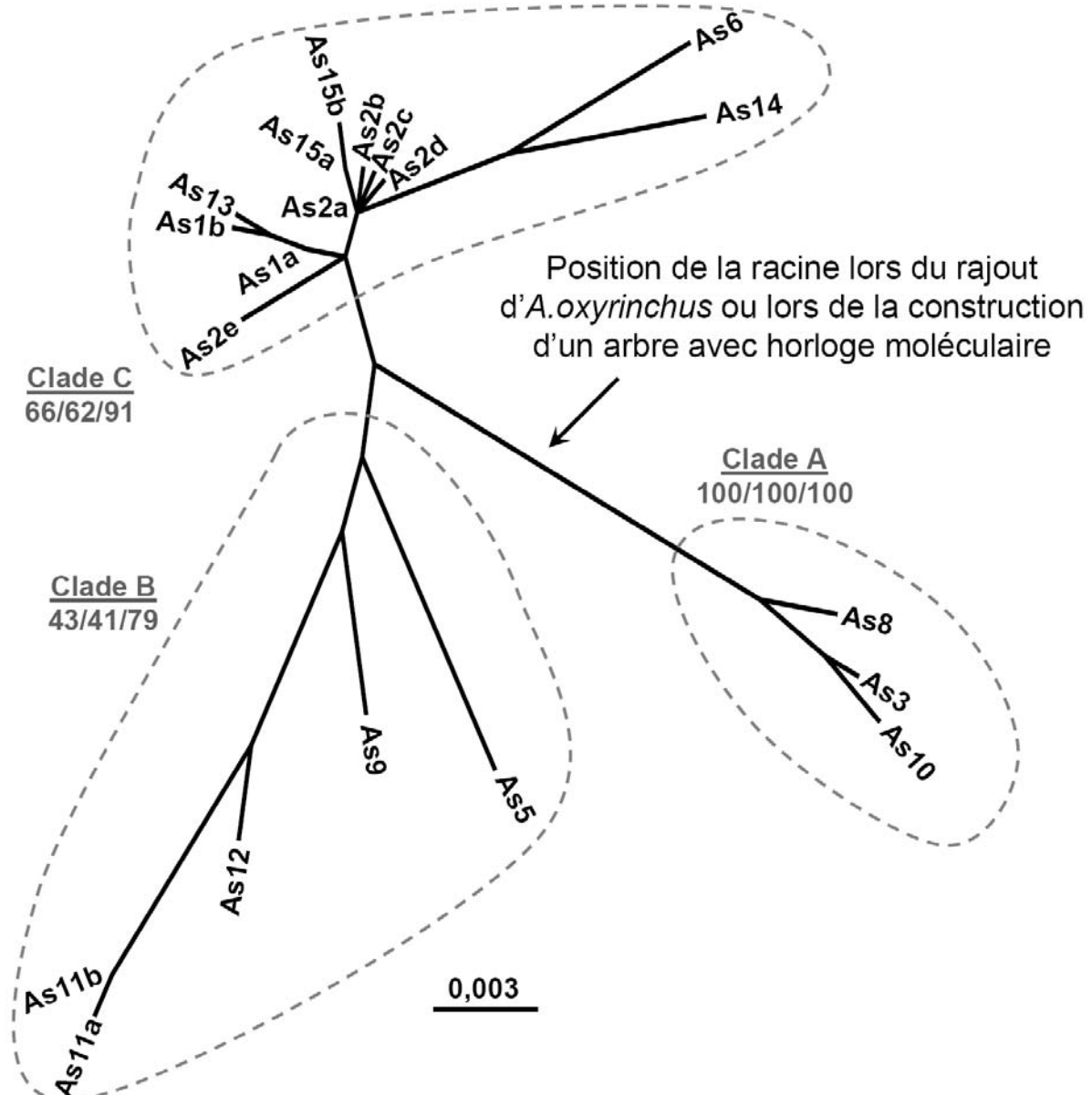
Malheureusement, *A. oxyrinchus* est l'espèce la plus proche d'*A. sturio* malgré une divergence estimée à plusieurs dizaines de millions d'années (Peng *et al.* 2007). Aucun autre groupe externe n'est disponible.

### Construction d'arbres sans *A. oxyrinchus* :

Afin de vérifier la topologie interne et le soutien des clades, nous avons également réalisé des arbres non racinés en excluant *A. oxyrinchus* de l'analyse.

Le modèle d'évolution sélectionné avec JModelTest correspond dans ce cas au modèle HKY+G (AIC et BIC concordants). Les mêmes méthodes de reconstruction phylogénétique ont été utilisées que pour les arbres racinés. Elles donnent toutes la même topologie générale (Figure III-59), identique à celle de la figure III-57, au racinement près. Le clade A est bien soutenu mais et les clades B et C le sont encore moyennement. La topologie à l'intérieur de chaque clade est insensible à la méthode de reconstruction et au racinement, sauf pour le clade C au sein duquel seuls les groupements As1a-As1b-As13 et As6-As14 sont stables.

Au vu des résultats obtenus (arbres racinés et non racinés), nous avons décidé de retenir la distinction des trois clades A, B et C, qui est reproductible avec toutes les méthodes utilisées. L'ordre de divergence de ces trois clades et la topologie à l'intérieur du clade C restent incertains.



**Figure III-59 :** Arbre phylogénétique d'*A. sturio* construit sans groupe externe à partir des séquences de la région de contrôle entière. La topologie correspond à l'arbre obtenu en ML. Les supports des clades sont indiqués avec dans l'ordre bootstraps BIONJ / bootstraps ML / probabilités postérieures BY (en %).

Construction d'arbres et datation moléculaire : modèle coalescent

Une des plus importante évolution récente en génétique des populations est l'introduction de modèles rétrospectifs basés sur la théorie de la coalescence (Kingman 1982 ; Fu & Li 1999). Ces modèles retracent la généalogie des séquences ADN et conduisent à l'identification d'ancêtres communs par fusion (coalescence) de lignées évolutives ; pour un ensemble de séquences ADN, l'analyse aboutit lorsque l'ancêtre commun le plus récent (mrca pour most recent common ancestor) est

identifié. Ces modèles permettent de reconstruire l'histoire et la généalogie des populations, mais aussi d'estimer les paramètres mutationnels de chaque lignée (Drummond *et al.* 2002). A partir de la divergence moléculaire entre les lignées, il est également possible d'établir le temps qui s'est écoulé depuis leur mrca (ou tmrca pour time since the mrca) : c'est le principe de l'horloge moléculaire (Margoliash 1963). Les modèles coalescents sont parmi les plus performants pour estimer le tmrca des lignées évolutives.

Afin d'estimer le tmrca de l'espèce *A. sturio* et des clades A-B-C, nous avons utilisé le logiciel BEAST (Drummond & Rambaut 2007), qui permet de réaliser des analyses bayésiennes des séquences moléculaires en se basant sur des modèles coalescents. L'âge des échantillons dont sont issues les séquences a été pris en compte dans l'analyse. Afin de calibrer l'âge des noeuds, nous avons fixé *a priori* à 57,9 Ma ( $\pm 10$  Ma) la date de divergence entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus* ; cette date vient d'une estimation réalisée à partir des séquences du Cyt *b* de tous les Acipensériformes (Peng *et al.* 2007) ; l'utilisation d'une date déjà estimée comme point de calibration n'est pas très satisfaisant mais les données paléontologiques permettant de dater la spéciation entre les deux espèces sont inexistantes. Le modèle coalescent à effectifs constants a été utilisé avec une horloge moléculaire relâchée (distribution log normale et taux non corrélés entre taux d'une lignée et de son ancêtre commun) pour estimer la phylogénie et l'âge des principaux noeuds à partir des séquences entières de la région de contrôle (modèle de substitution HKY + G). L'horloge moléculaire relâchée permet de prendre en compte d'éventuelles disparités dans les taux d'évolution entre lignées et se révèle plus performante que l'horloge fixée (Drummond *et al.* 2006). La longueur des chaînes de Markov permettant l'exploration de l'univers des possibles a été fixé à 50 millions (avec échantillonnage toutes les 5 000 générations, donnant 10 000 mesures) ce qui permet d'obtenir des estimations fiables des paramètres.

L'analyse avec le logiciel Tracer 1.5 (Drummond & Rambaut 2007) des 10 000 mesures réalisées (burnin de 5 millions de générations soit 1 000 mesures éliminées) indique un bon échantillonnage *a posteriori* pour tous les paramètres du modèle, en particulier les tmrca d'*A. sturio*, *A. oxyrinchus* et des clades A, B et C d'*A. sturio* (Tableau III-11). La valeur de l'estimateur ucl.d.stdev (écart-type de l'horloge moléculaire) est proche de 0 ce qui indique que l'horloge est fiable.

**DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : PHYLOGEOGRAPHIE**

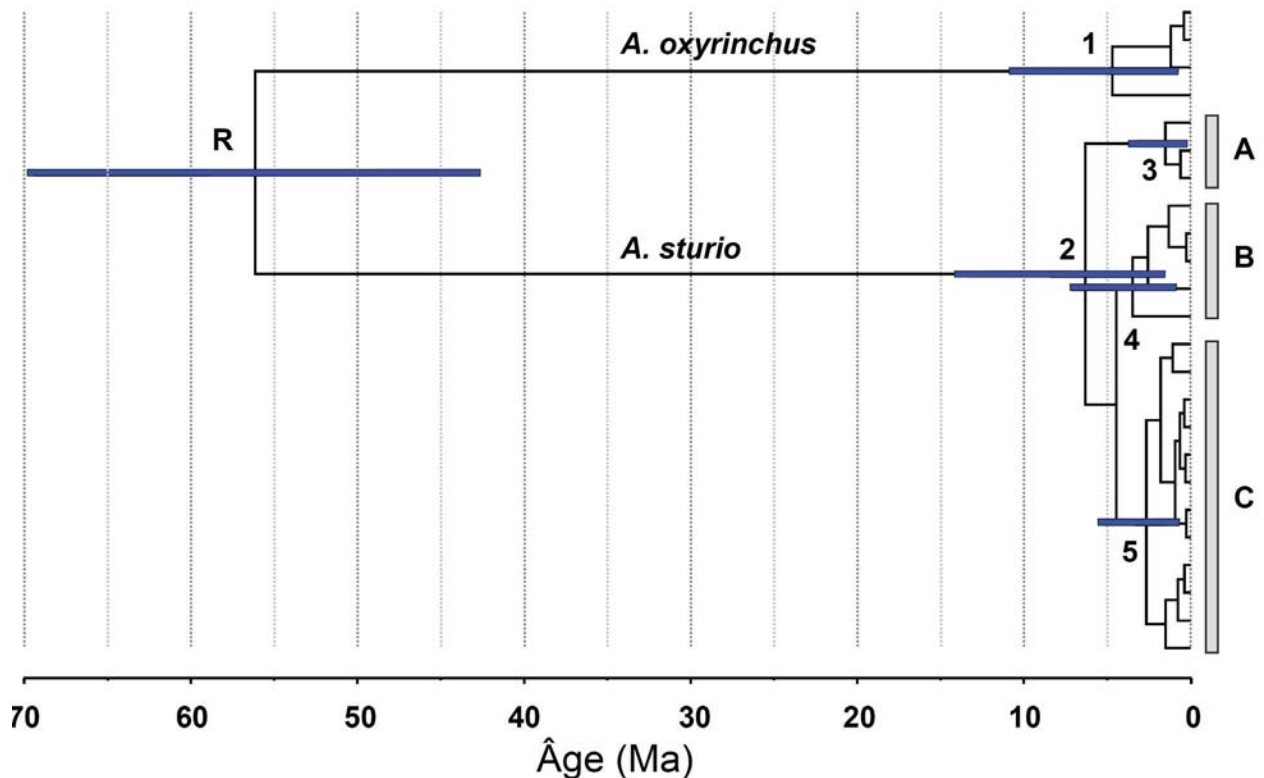
	Posterior	Prior	Vraisemblance du modèle	Âge de la racine (Ma)	tmrca <i>A. oxyrinchus</i> (Ma)	tmrca <i>A. sturio</i> (Ma)	taille efficace * Temps de génération	Kappa	Frequencies des bases
Moyenne	-2775,2	-458,3	-2316,8	56,215	4,708	6,404	1,44E+07	32,52	0,34 0,22 0,13 0,31
Ecart-type de la moyenne	0,2341	0,2389	7,77E-02	0,079	0,068	0,114	1,75E+05	0,40	0,0003 0,0002 0,0002 0,0003
Médiane	-2774,7	-457,5	-2316,7	56,248	3,826	5,249	1,29E+07	29,75	0,34 0,22 0,13 0,31
Borne inférieure 95% de confiance	-2793,6	-475,6	-2327,0	41,198	0,719	1,423	4,66E+06	14,35	0,31 0,20 0,11 0,28
Borne supérieure 95% de confiance	-2757,0	-442,9	-2306,9	69,582	11,050	14,244	2,73E+07	57,00	0,37 0,24 0,15 0,34
Taille échantillonnée efficace (ESS)	1599,8	1272,6	4478,0	8384,61	2451,98	1387,34	1558,0	1011,6	2214,8 2561,9 3137,8 2051,4

	Alpha	Taux d'évolution des branches (ucld)	Ecart-type uclid	Taux d'évolution	Coefficient de variation	Co-variance	Vraisemblance de l'arbre	Coalescent
Moyenne	0,19	3,84E-09	0,6491	4,10E-09	0,62	2,17E-02	-2316,8	-400,1
Ecart-type de la moyenne	0,002	7,03E-11	1,02E-02	4,72E-11	9,76E-03	1,77E-03	7,77E-02	0,2324
Médiane	0,18	3,45E-09	0,6151	3,70E-09	0,57	1,41E-02	-2316,7	-399,5
Borne inférieure 95% de confiance	0,09	1,19E-09	5,43E-05	1,75E-09	4,20E-05	-0,28	-2327,0	-416,4
Borne supérieure 95% de confiance	0,31	6,98E-09	1,325	7,43E-09	1,31	0,32	-2306,9	-384,0
Taille échantillonnée efficace (ESS)	1297,9	1060,4	1421,5	1259,0	1577,3	7322,6	4478,0	1278,8

**Tableau III-11 :** Statistiques de la simulation effectuée avec BEAST, moyennées sur 9000 mesures (10000 moins 1000 de burnin). Modèle utilisé : constant size, relaxed uncorrelated lognormal molecular clock, sans contrainte de topologie, prior TreeModel.RootHeight en loi normale centrée sur 57,9 Ma avec un écart-type de 10 Ma.

Les arbres correspondant aux 9 000 dernières mesures ont été moyennés pour donner l'arbre consensus présenté à la figure III-60.



**Figure III-60 :** Arbre et âges estimés à partir du modèle coalescent constant avec horloge moléculaire relâchée de BEAST. Les barres indiquent l'intervalle de confiance à 95% des estimations d'âge de certains nœuds.

L'arbre consensus est identique aux arbres obtenus précédemment, supportant une nouvelle fois l'existence des clades A - B - C, dont les tnrca estimés valent respectivement 1,58 Ma (intervalle de confiance à 95% : 0,21 - 4,05 Ma), 3,45 Ma (95% : 0,86 - 7,21 Ma) et 2,51 Ma (95% : 0,60 - 5,12 Ma).

L'âge de la racine est estimée à 56,21 Ma (95% : 41,20 - 65,58 Ma), proche de la valeur utilisée comme prior (distribution normale centrée sur une moyenne de 57,9 Ma avec un écart-type de 10 Ma).

Le tnrca d'*A. sturio* vaut 6,4 Ma (95% : 1,42 - 14,24 Ma) et celui d'*A. oxyrinchus* 4,70 Ma (95% : 0,71 - 11,05 Ma), indiquant que l'origine de la diversité génétique actuelle de ces deux espèces remontent aux environs de 5 Ma, c'est-à-dire relativement loin dans le passé. L'estimation du tnrca d'*A. sturio* est consistante car elle prend en compte l'ensemble de la diversité connue de l'espèce –



qui a été mise au jour dans cette thèse – alors que l’estimation du tmrca d’*A. oxyrinchus* est probablement sous-estimée car nous n’avons séquencé que quatre haplotypes différents sur la région de contrôle entière alors qu’une trentaine ont été identifiés sur le fragment Dlo-5’ (mais malheureusement ces haplotypes n’ont pas été étendus sur l’ensemble de la région de contrôle).

Afin de démontrer la robustesse des estimations d’âge effectuées avec BEAST, nous avons répété quatre fois les analyses à partir de la topologie la plus vraisemblable puis nous avons réalisé deux autres analyses en contraignant la topologie (la monophylie des groupes AC et AB a été respectivement forcée). Dans tous les cas, les estimations obtenues pour les tmrca des nœuds R et 1-5 de la figure III-60 sont similaires (Tableau III-12).

		tmrca (R)	tmrca (1)	tmrca (2)	tmrca (3)	tmrca (4)	tmrca (5)
Sans contraintes topologiques	répétition 1	<b>56,1</b> (40,1-69,7)	<b>4,6</b> (0,8-10,1)	<b>6,6</b> (1,4-14,6)	<b>1,6</b> (0,2-4,1)	<b>3,4</b> (0,9-7,2)	<b>2,5</b> (0,6-5,1)
	répétition 2	<b>56,1</b> (42,4-69,9)	<b>4,7</b> (0,6-11,2)	<b>6,3</b> (1,5-14,2)	<b>1,5</b> (0,2-3,7)	<b>3,5</b> (0,9-7,2)	<b>2,6</b> (0,7-5,6)
	répétition 3	<b>56,2</b> (41,1-69,6)	<b>4,7</b> (0,7-11,0)	<b>5,5</b> (1,4-14,2)	<b>1,4</b> (0,2-3,6)	<b>3,6</b> (0,9-7,6)	<b>2,6</b> (0,6-5,4)
	répétition 4	<b>56,1</b> (42,1-70,4)	<b>4,6</b> (0,6-10,0)	<b>6,6</b> (1,4-14,8)	<b>1,6</b> (0,2-4,1)	<b>3,3</b> (0,8-6,8)	<b>2,6</b> (0,7-5,3)
Avec contraintes topologiques	(AB)(C)	<b>56,1</b> (41,8-69,6)	<b>4,9</b> (0,5-11,6)	<b>6,4</b> (1,2-14,6)	<b>1,4</b> (0,2-3,6)	<b>3,7</b> (0,8-7,8)	<b>3,3</b> (0,6-7,5)
	(AC)(B)	<b>56,1</b> (42,1-70,2)	<b>5,0</b> (0,6-12,2)	<b>6,3</b> (1,3-14,6)	<b>1,5</b> (0,2-3,6)	<b>4,4</b> (1,0-10,0)	<b>2,8</b> (0,6-5,9)

**Tableau III-12 :** Estimations des tmrca associés à la racine (R) et à cinq nœuds (1 : *A. oxyrinchus*, 2 : *A. sturio*, 3-4-5 : clade A-B-C ; voir la figure X pour leur position). Sur les quatre premières répétitions (réplicats) aucune contrainte topologique n’a été appliquée, alors que la monophylie des groupes AB et AC a été respectivement contraintes dans les analyses 5 et 6 (conduisant aux topologies 2 et 3 de la figure III-58).

La modélisation avec BEAST a également permis d’estimer simultanément la taille efficace et le taux d’évolution des esturgeons *A. sturio* et *A. oxyrinchus* (Tableau III-11) :

1) L’estimateur de la taille efficace multipliée par le temps de génération ressort à 14,4 millions (95% : 4,6 - 27,3) (Tableau III-11). En considérant un temps de génération d’environ 15 ans, la taille efficace vaut 0,96 millions d’individus pour

l'ensemble des deux espèces (95% : 0,31 - 1,82). L'estimation de la taille efficace dans le cas de données interspécifique (comme ici) n'est pas très fiable : ces chiffres représentent donc de grossières approximations.

2) Le taux d'évolution estimé ressort à 0,41% par million d'années sur la région de contrôle (95% : 0,17 – 0,74) (Tableau III-11). Ce taux est inférieur à celui estimé pour la région de contrôle des Cétacées – 0,65% – qui sont les Mammifères au taux d'évolution mitochondrial le plus lent (Pesole *et al.* 1999). Il est néanmoins cohérent avec le taux d'évolution du *Cyt b*, estimé à 0,01% par millions d'années chez les Acipensériformes, et avec les observations de diversité nucléotidique réalisées à la partie III-A-2-a (la Dloop évoluant plus vite que les autres régions dont le *Cyt b*). Un rapport aussi élevé entre vitesse d'évolution de la Dloop et du *Cyt b* (environs 40) est peu fréquent mais a déjà été reporté pour d'autres espèces comme les poissons volants du Pacifique (McMillan & Palumbi 1997).

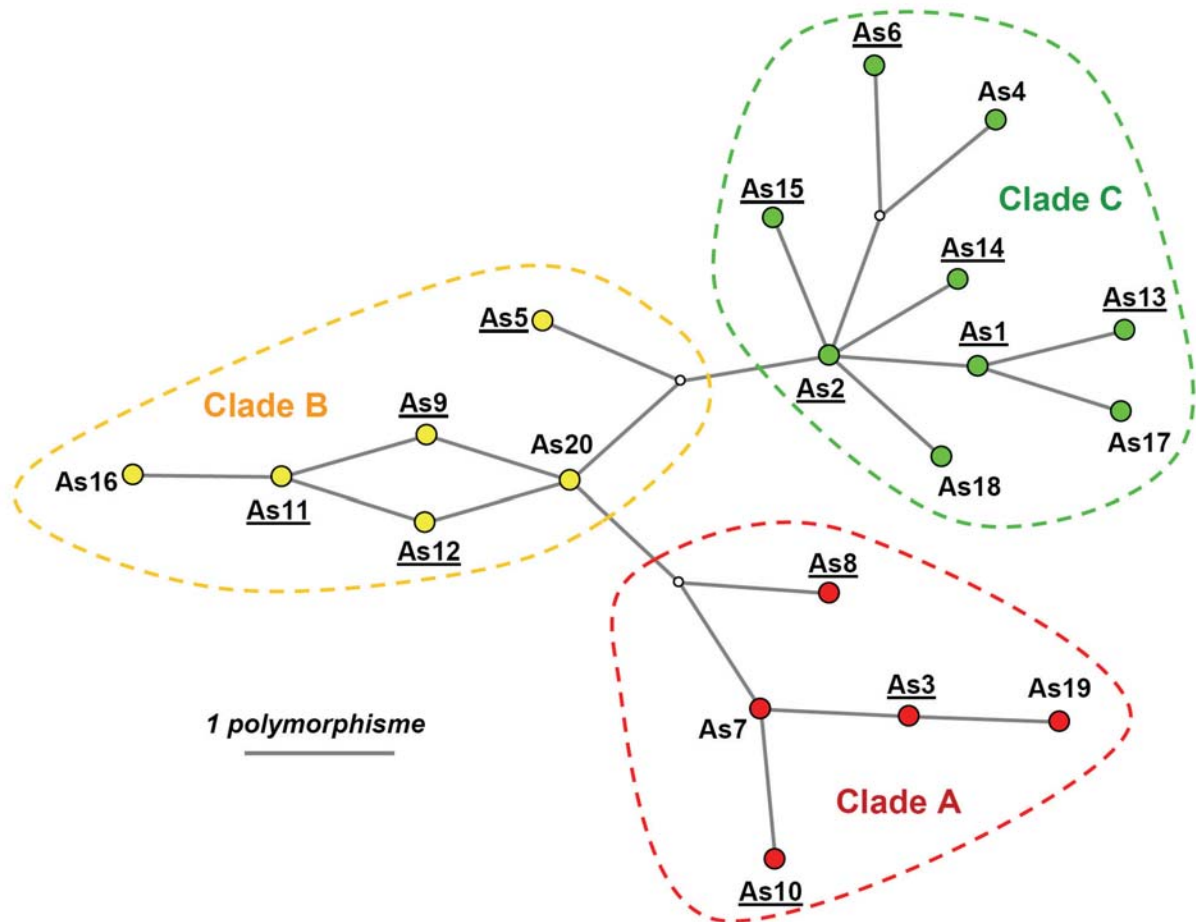
### ■ Définition des clades étendus avec le fragment Dlo-5'

Le fragment Dlo5' est trop court et comporte trop peu de sites polymorphes pour pouvoir servir de base à la construction d'une phylogénie reproductible et soutenue. Néanmoins, tous les échantillons anciens ont été validés sur ce fragment contre un tiers sur la région de contrôle entière ; afin d'inclure tous les échantillons nous avons donc exploité le fragment Dlo-5'.

Nous avons réalisé un réseau à partir des séquences des 20 haplotypes identifiés chez *A. sturio*, en utilisant l'algorithme de median-joining (Bandelt *et al.* 1999) implémenté dans le logiciel Network ([www.fluxus-technology.com](http://www.fluxus-technology.com)).

Les trois clades définis à partir de la région de contrôle entière (Figures III-57, III-59 et III-60) sont bien identifiables, même s'ils sont séparés entre eux par un seul site polymorphe (Figure III-61). Les haplotypes pour lesquels la région de contrôle entière est disponible se retrouvent dans les mêmes clades, que l'ensemble de la région de contrôle (Figures III-57, III-59 et III-60) ou seulement la portion Dlo-5' (Figure III-61) soit pris en compte. Les haplotypes pour lesquels seul le fragment Dlo-5' est disponible se positionnent au sein d'un des trois clades existants (As7 et As19

dans le clade A / As16 et As20 dans le clade B / As4, As17 et As18 dans le clade C)  
et aucun nouveau clade ne semble se créer en les rajoutant.



**Figure III-61 :** Réseau d'haplotypes mitochondriaux identifiés chez *A. sturio* sur le fragment Dlo-5'. Les haplotypes disponibles également sur la région de contrôle entière sont soulignés. Les clades sont entourés par des pointillés.

Nota bene : dans les figures suivantes, l'âge et l'origine des échantillons ne sera pas précisée à chaque fois. Se référer à la figure III-55.

### ■ Distribution géographique des clades

La répartition des échantillons dans les clades A, B et C suivant leur origine géographique est indiquée à la figure III-62.

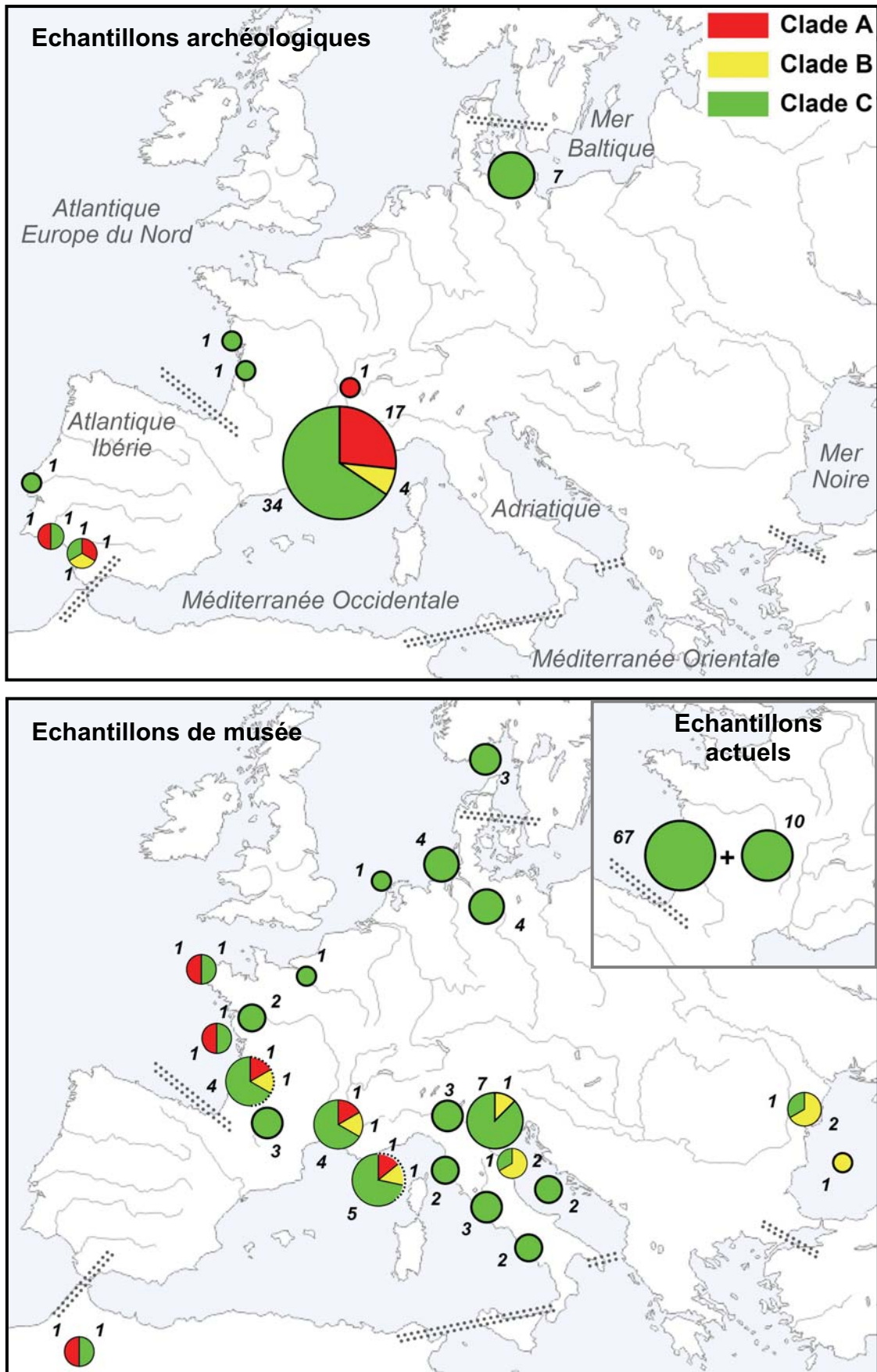
Le clade A représente environ 20% de l'ensemble des échantillons anciens inclus dans l'analyse phylogéographique. Il était présent en Méditerranée occidentale (18 individus archéologiques et deux spécimens de musée), en Ibérie atlantique (deux individus archéologiques) et sur la façade atlantique d'Europe du Nord (trois spécimens de musée). Il était absent sur la périphérie de la distribution d'*A. sturio*, i.e. à l'Est du Rhône dans la zone méditerranéenne et à l'Est de la Bretagne dans la zone atlantique. Ce clade a aujourd'hui disparu.

Le clade B était le moins répandu, représentant 10% de l'ensemble des échantillons anciens inclus dans l'analyse. Il était présent en Mer Noire (trois individus de musée), en Mer Adriatique (trois individus de musée), en Méditerranée occidentale (quatre individus archéologiques et deux individus de musée) et en Ibérie (un individu archéologique). Sa présence sur la façade atlantique d'Europe du Nord est incertaine, puisque l'origine du spécimen de musée porteur de l'haplotype As5 (qui appartient au clade B) est elle-même incertaine. Comme le clade A, le clade B a aujourd'hui disparu.

Le clade C était le plus répandu, rassemblant environ 70% des échantillons anciens inclus dans l'analyse. C'est le seul clade qui subsiste actuellement, au sein de la population relictuelle girondine. Il était omniprésent sur toute l'aire de répartition de l'espèce, de la Baltique à la Mer Noire.

Les trois clades sont donc répartis suivant un patron géographique bien défini, avec C omniprésent sur toute l'aire de répartition, B présent essentiellement en Méditerranée et A absent des périphéries de la distribution .

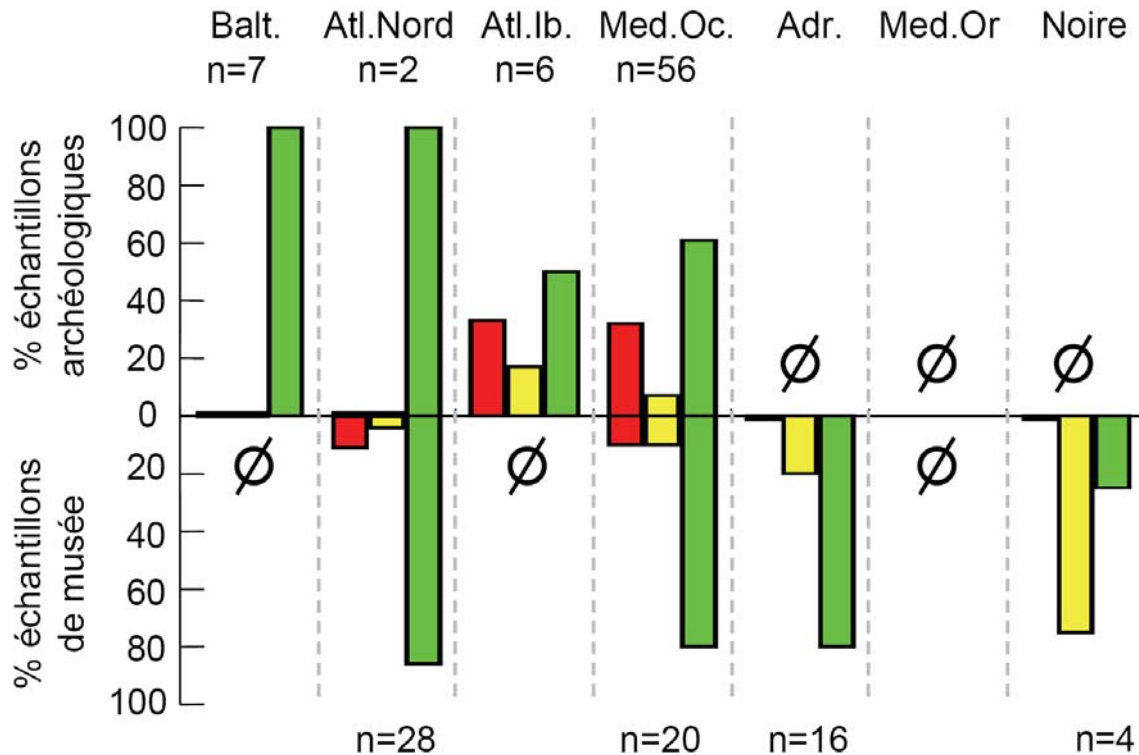
DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : PHYLOGEOGRAPHIE



**Figure III-62 :** Distribution géographique des trois clades A, B et C. Les grandes régions biogéographiques sont limitées par des traits discontinus. Les contours de cercle en pointillés indiquent des échantillons dont l'origine géographique est incertaine (trois en Gironde, trois en mer au large de Nice).

## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : PHYLOGEOGRAPHIE

La présentation des résultats sous forme d'un graphe confrontant données archéologiques et de musée confirme ces observations (Figure III-63). La rareté des échantillons dans certaines zones – voire l'absence dans certaines – conditionne le caractère définitif des observations à leur validation sur un plus grand nombre d'échantillons anciens.



**Figure III-63 :** Fréquence relative des clades A (rouge), B (jaune) et C (vert) sur les différentes régions couvrant la distribution d'*A. sturio*, pour les échantillons archéologiques (haut) et les échantillons de musée (bas).

### ■ Distribution géographique des haplotypes

La distribution des haplotypes constitutifs de chaque clade est présentée aux figures III-64 (clade A), III-65 (clade B) et III-66 (clade C). Attention, le code couleur utilisé pour la description des haplotypes ne correspond pas au code couleur des clades utilisé dans la figure III-62 ; pour chaque clade, le code est indiqué en encart dans la figure.

Concernant le clade A (Figure III-64), l'haplotype As3 est majoritaire puisqu'il est retrouvé sur 18 échantillons archéologiques et un échantillon de musée ; il est très présent sur le Rhône, mais il est aussi retrouvé dans le Guadiana en Ibérie.

L'haplotype As8 a été retrouvé sur trois spécimens de musée capturés sur la façade atlantique française, mais aucun d'entre eux ne peut être associé à une population donnée car (i) le premier a été capturé dans un fleuve breton, or ces fleuves semblent trop modestes pour avoir été le berceau d'une population, (ii) le second a été capturé en mer au large de La Rochelle, pendant sa phase de vie marine, (iii) le troisième a probablement été capturé en Gironde, mais sans certitude. L'haplotype As8 ne se retrouvant chez aucun individu dont la population d'origine est déterminée, il pourrait s'agir d'un haplotype spécifique d'une population non étudiée, comme celle de l'Adour (au sud de la Gironde) ou des populations ibériques.

Les haplotypes As7 et As10 ne sont retrouvés que sur un seul individu à chaque fois, et sont donc respectivement spécifique du Guadalquivir et du Rhône. L'haplotype As19 est quant à lui retrouvé uniquement sur un individu capturé au large de Nice, dont la population d'origine pourrait être le Rhône.

Concernant le clade B (Figure III-65), l'haplotype As12 est spécifique de la Mer Noire où il est retrouvé sur trois individus.

Les haplotypes As9 et As16 sont spécifiques du Rhône et As20 est spécifique de l'Adriatique. L'haplotype As11 est retrouvé dans le Rhône et en Adriatique, mais nous avons amplifié la région de contrôle entière sur un échantillon de chaque région et nous avons identifié un variant adriatique (As11a) et un variant méditerranéen (As11b).

L'haplotype As5 a été identifié à l'origine sur un échantillon archéologique du Guadalquivir. Nous l'avons également obtenu sur un échantillon de musée dont l'origine girondine est incertaine ; il pourrait aussi s'agir d'un échantillon originaire de la péninsule ibérique.

Concernant le clade C (Figure III-66), les haplotypes As1 et As2 sont les plus fréquents, As1 étant surtout présent sur la façade atlantique et As2 en Méditerranée.

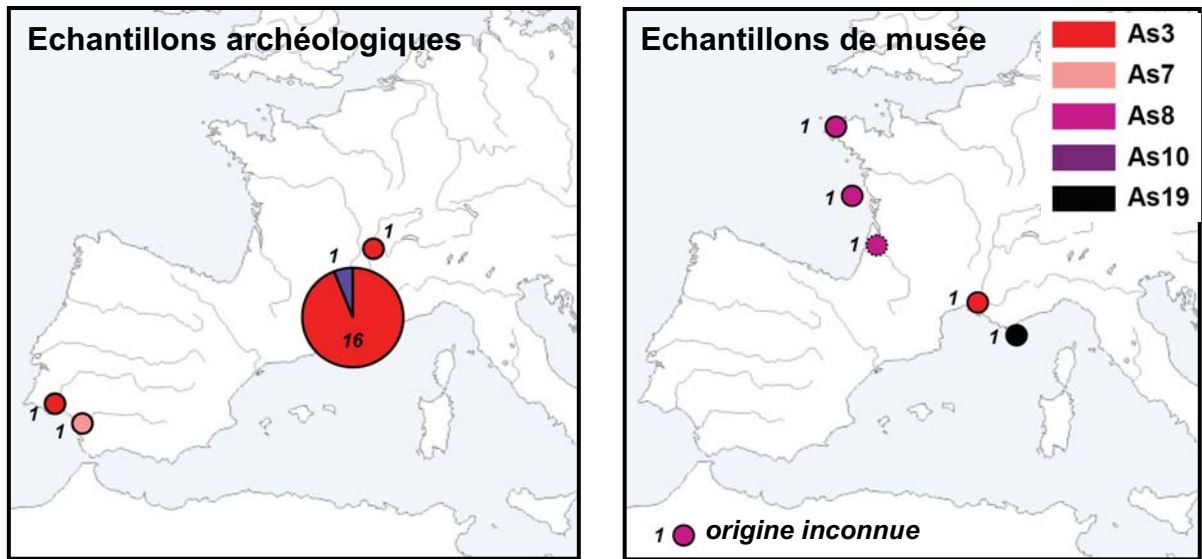
As1 est le dernier haplotype existant aujourd'hui, et il était omniprésent sur la façade atlantique au cours des deux derniers siècles. Mis à part les échantillons de l'Elbe, les autres échantillons de musée au nord de la Seine sont postérieurs aux années 1950 et pourraient en fait correspondre à des individus de Gironde capturés pendant leur vie adulte. L'haplotype As1 est quasiment restreint à la façade Atlantique puisqu'il n'est présent que sur trois spécimens méditerranéens (deux

archéologiques originaires du Rhône et un spécimen de musée capturé à Livourne) contre deux archéologiques, 22 de musées et 77 modernes sur la façade atlantique. L'amplification de la région de contrôle entière sur deux de ces trois esturgeons révèle l'existence de deux variants, l'un identifié sur le spécimen de Livourne (As1b) et l'autre sur un des échantillons rhodanien (As1a) ; seul le variant As1a est présent sur la façade atlantique, obtenu sur 10 esturgeons actuels de Gironde et quatre échantillons atlantiques anciens.

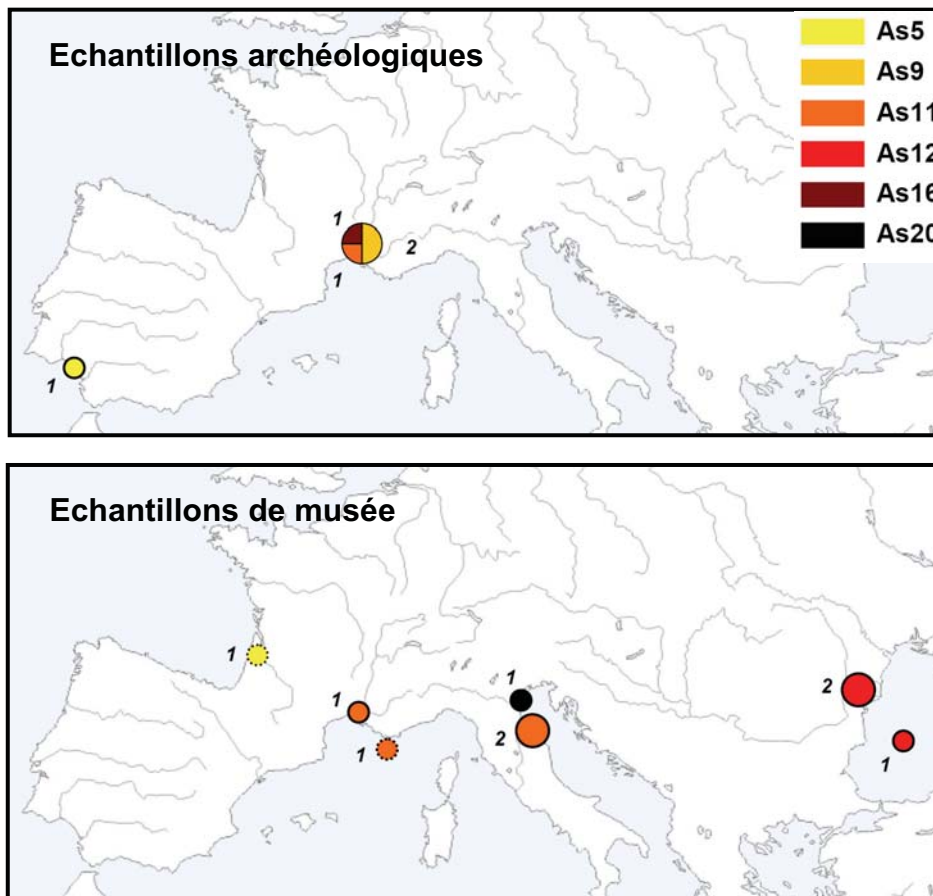
As2 est l'haplotype le plus fréquent dans la population ancienne du Rhône, détecté chez 30 individus sur 55. Il est dominant en Méditerranée occidentale aux 19-20<sup>e</sup> siècles, et présent également à cette période en mer Adriatique et en mer Noire. Sa présence est rare mais attestée sur la façade atlantique, identifié sur un spécimen de musée capturé dans la Seine, un autre capturé en Gironde, ainsi que sur sept écailles dermiques exhumées d'un site médiéval dans la région baltique. Concernant ces dernières données, Ludwig *et al.* (2008) ne précisent pas le nombre minimum d'individus présents sur le site archéologique étudié : ces écailles dermiques pourraient donc correspondre à sept individus différents, aussi bien qu'à un seul. De ce fait, il est difficile de conclure à la fixation de l'haplotype As2 en mer Baltique, surtout qu'aucun échantillon plus récent n'est disponible en raison de la domination d'*A. oxyrinchus* dans la région au moins depuis le Moyen-Âge. Une diversité importante se cache sous l'haplotype As2 du fragment Dlo-5', dans le sens où l'amplification de la région de contrôle entière de neuf individus anciens portant cet haplotype a révélé l'existence de cinq variants : l'un d'entre eux (As2a) est trouvé sur cinq individus (incluant quatre esturgeons méditerranéens et le spécimen originaire de la Seine) pendant que les quatre autres (As2b, c, d et e) sont chacun porté par un individu différent (méditerranéen ou adriatique).

Les haplotypes As14, As17 et As18 sont rares et spécifiques de la Méditerranée occidentale. Les haplotypes As4 et As6 sont rares et spécifiques de l'Atlantique ibérique. Les haplotypes As13 et As15 sont spécifiques de la Mer Adriatique, identifiés respectivement sur deux et six esturgeons différents ; à noter l'existence de deux variants de l'haplotype As15 en mer Adriatique, identifiés lors du séquençage de la région de contrôle entière (As15a et b).

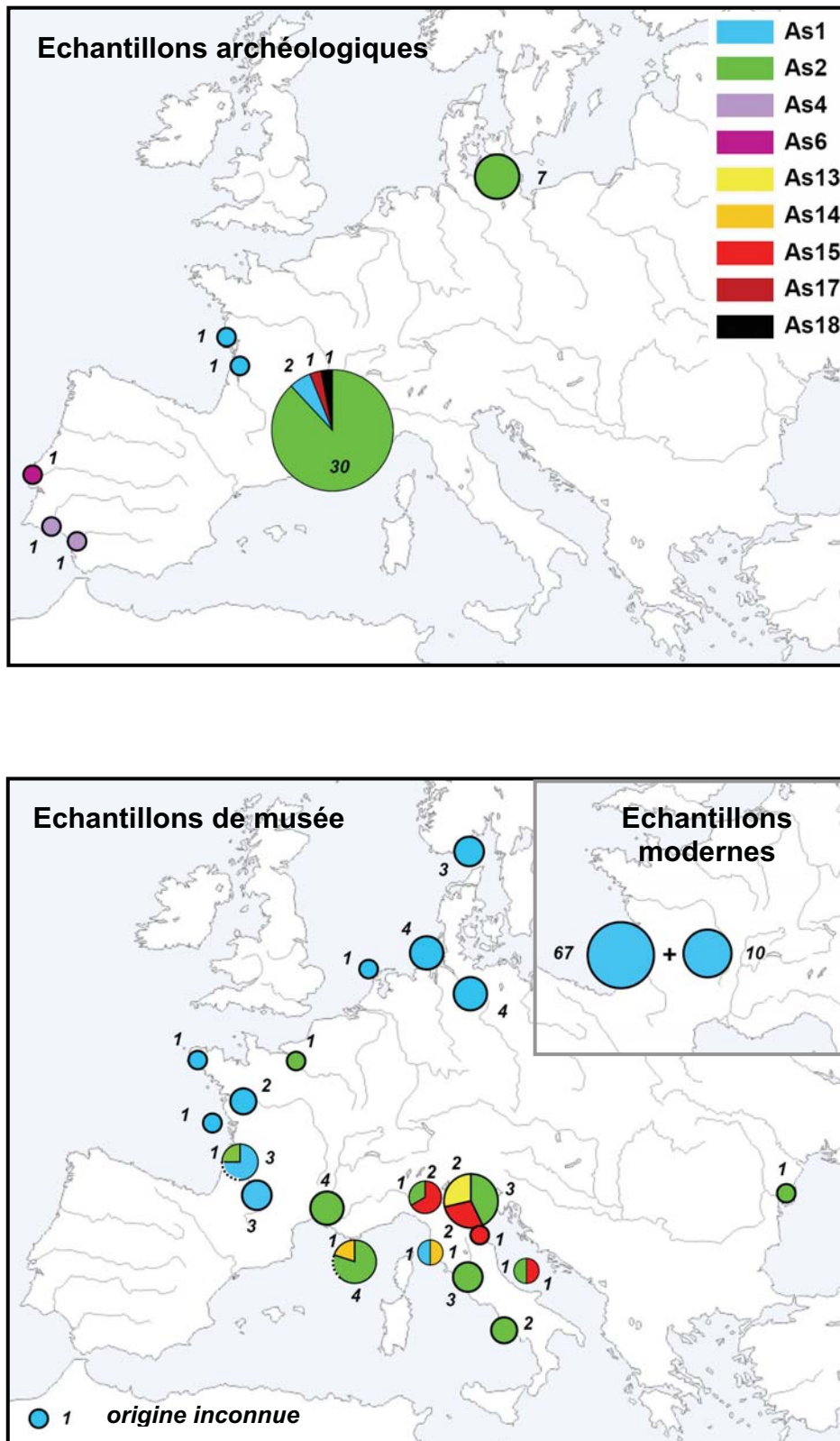




**Figure III-64 :** Distribution géographique des haplotypes du clade A. Le contour de cercle en pointillé indique un échantillon dont l'origine géographique est incertaine.



**Figure III-65 :** Distribution géographique des haplotypes du clade B. Le contour de cercle en pointillé indique un échantillon dont l'origine géographique est incertaine.



**Figure III-66 :** Distribution géographique des haplotypes du clade C. Le contour de cercle en pointillé indique un échantillon dont l'origine géographique est incertaine.

### ■ Répartition géographique de la diversité génétique

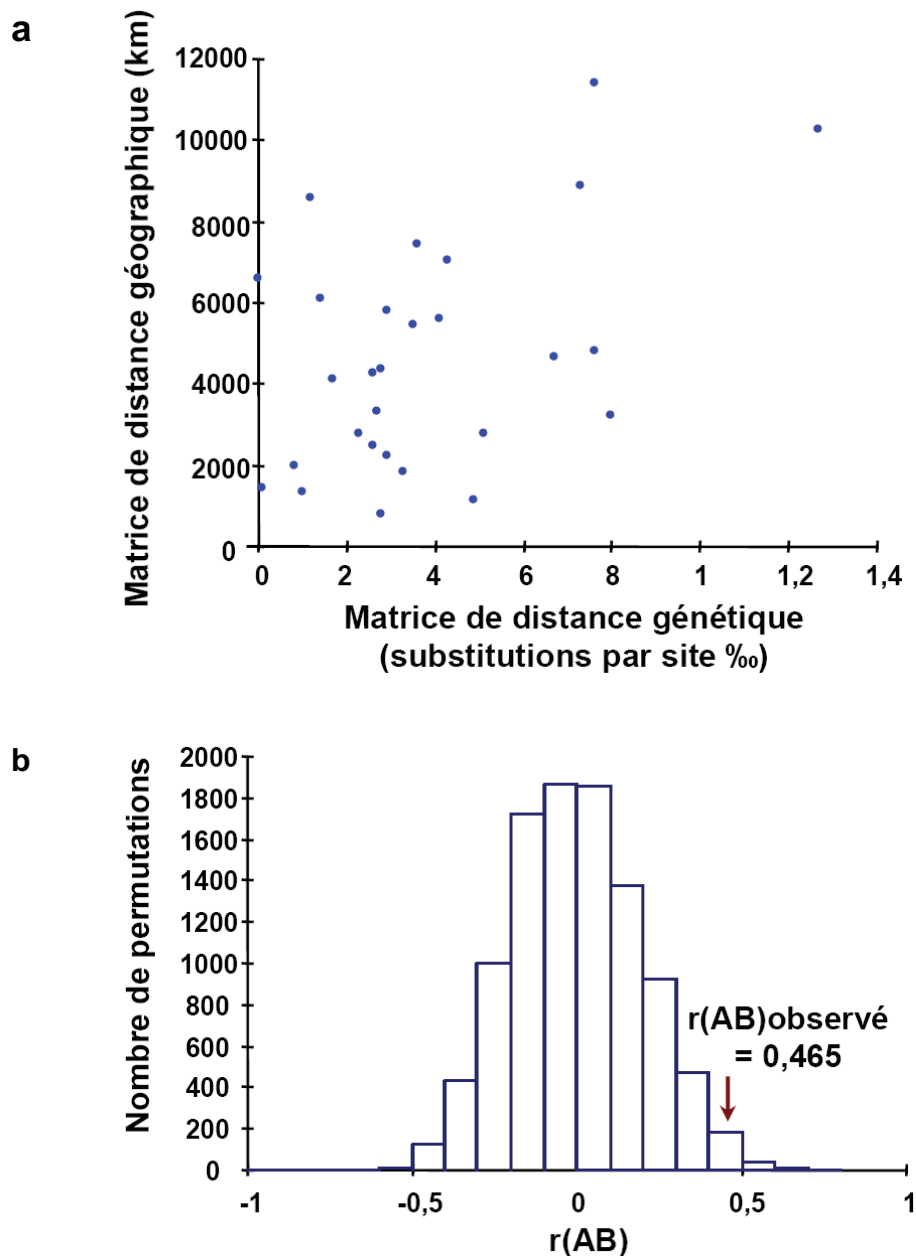
Pour les zones sur lesquelles les comparaisons temporelles sont possibles, la composition génétique entre les différentes périodes étudiées ne montre pas de changements drastiques : As1 et As2 sont ainsi restés les haplotypes majoritaires respectivement sur la façade atlantique française et sur le Rhône.

Sur la base de ces observations, nous faisons l'hypothèse qu'à l'échelle des trois derniers millénaires, les populations d'esturgeons européens sont restées relativement stables génétiquement, et que les différentes zones biogéographiques peuvent être comparées malgré les variations d'âge des échantillons.

Afin d'analyser une éventuelle différenciation génétique de l'esturgeon européen sur les grandes zones biogéographiques de sa distribution, nous avons calculé les distances génétiques entre grandes zones biogéographiques à l'aide du logiciel MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007), et nous avons testé une éventuelle corrélation avec la distance géographique à l'aide d'un test de Mantel bilatéral (avec 10 000 permutations pour le calcul de la p-value). La distance géographique a été calculée à l'aide de l'outil « trajet » du logiciel Google Earth en suivant le trait de côte de la mer Baltique à la mer Noire (seule exception : la distance entre la mer Noire et les autres zones n'inclut pas le trait de côte adriatique, les esturgeons pouvant se déplacer de la Sicile à la Grèce sans passer par la mer Adriatique).

Le test de Mantel sur la corrélation de Pearson entre les matrices de distances génétique et géographique permet de rejeter l'hypothèse nulle d'une absence de corrélation ( $p = 0,018$  ; coefficient de corrélation de Pearson entre les deux matrices  $r(AB) = 0,465$  ; voir la figure III-67).

Ce résultat suggère un isolement par la distance entre esturgeons des différentes zones biogéographiques, les populations appartenant à des zones voisines étant plus proches génétiquement que les populations appartenant à des zones éloignées. La significativité du test implique que cet isolement n'est pas récent à l'échelle évolutive. La diversité génétique d'*A. sturio* est donc structurée dans l'espace, ce qui était attendu puisque la distribution s'étend linéairement sur plus de 10 000 km (en suivant le trait de côte).

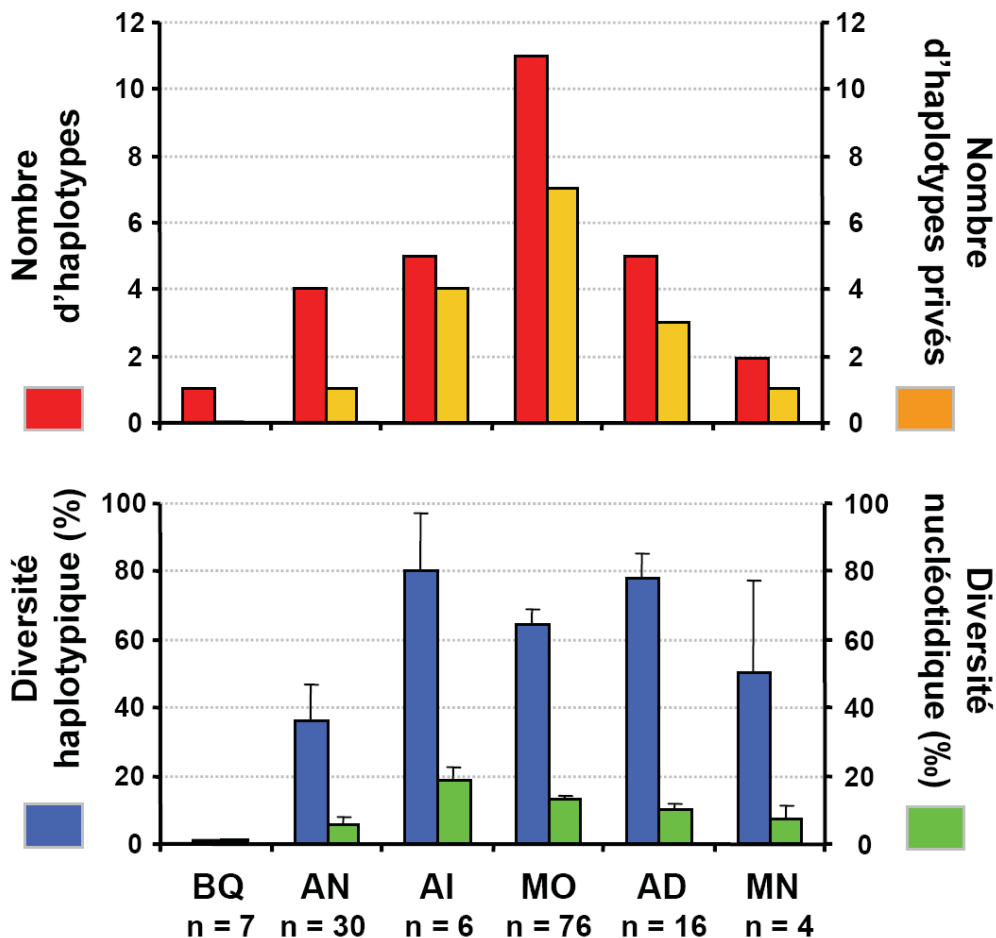


**Figure III-67 :** Test de Mantel.

a) Corrélation entre les matrices de distances.

b) Résultats des 10 000 permutations utilisées pour le calcul de la p-value.

Par ailleurs, tous échantillons anciens confondus, la diversité génétique de l'esturgeon européen apparaît bien plus importante en péninsule ibérique, en Méditerranée occidentale et en Mer Adriatique : le nombre total d'haplotypes, le nombre d'haplotypes privés (présents uniquement sur la zone), la diversité haplotypique et la diversité nucléotidique sont en effet plus élevés dans ces régions par rapport aux périphéries de la distribution (Figure III-68).



**Figure III-68 :** Statistiques descriptives de la diversité génétique d'*A. sturio* sur les grandes régions biogéographiques de sa distribution. BQ = Baltique, AN = Atlantique Europe du Nord, AI = Atlantique Ibérique, MO = Méditerranée Occidentale, AD = Adriatique, MN = Mer Noire. Les échantillons actuels de Gironde n'ont pas été pris en compte dans l'analyse.

Le nombre d'échantillons analysé est déséquilibré suivant les régions, mais ne semble pas biaiser outre mesure le tableau global ; deux fois plus d'échantillons ont par exemple été étudié sur la région Atlantique-Europe du Nord par rapport à la zone Adriatique, mais toutes les statistiques de diversité sont supérieures dans la zone Adriatique ; seulement six échantillons ont été analysés sur la zone Ibérique mais une diversité florissante a été mise en évidence, avec cinq haplotypes différents dont quatre endémiques à cette région.

### **III-B-5 PHYLOGEOGRAPHIE NUCLEAIRE**

#### III-B-5-a Données disponibles

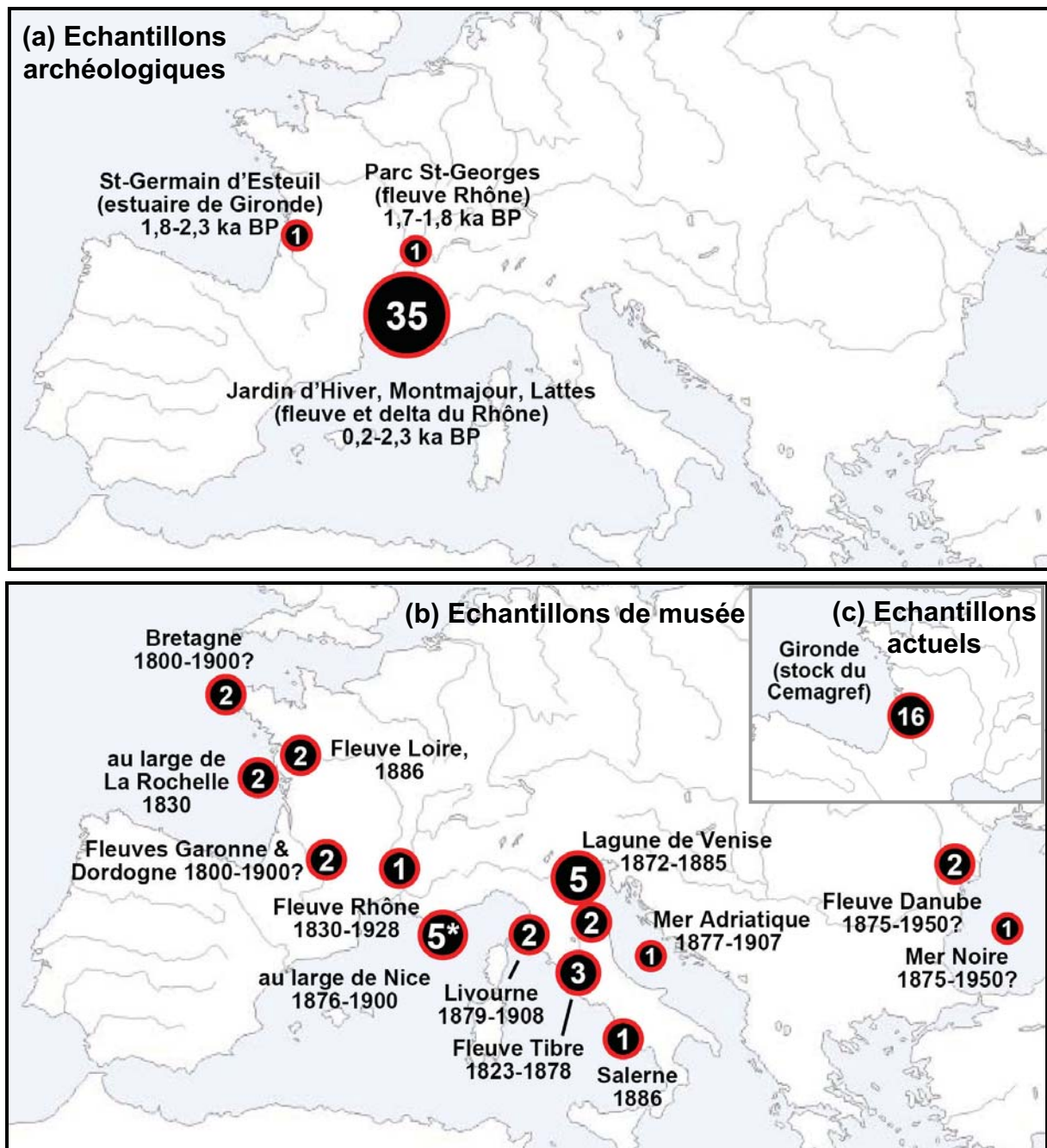
##### ■ Données bibliographiques

Très peu d'études se sont intéressées aux microsatellites chez l'esturgeon européen. La principale étude, menée par Ludwig *et al.* (2000b), s'est intéressée à des spécimens de musée pêchés en mer Baltique et en Europe du Nord : ces échantillons ont été considérés comme des *A. sturio*, alors que pour la plupart d'entre eux il s'agissait en fait d'*A. oxyrinchus* (beaucoup de ces échantillons ont été republiés par Ludwig *et al.* (2002b) en tant qu'*A. oxyrinchus*). De plus, la fiabilité des résultats n'est pas garantie dans le sens où ils n'ont pas été obtenus dans des locaux spécifiques. Enfin trois des locus étudiés sont partagés avec notre étude (LS19, LS54 et LS68), et l'analyse des allèles présentés révèle des anomalies dans l'étude de Ludwig *et al.* (2000b), comme la non détection de certains allèles ou la détection d'allèles supplémentaires ; notre étude s'appuyant sur la réplication massive des résultats et le séquençage des allèles, elle est beaucoup plus fiable que celle de Ludwig *et al.* (2000b).

En fait, la seule étude publiée analysant les microsatellites d'*A. sturio* dans une perspective phylogéographique se trouve être peu fiable et concerne *A. oxyrinchus*.

##### ■ Apport de cette thèse

Les échantillons anciens validés sur au moins deux des cinq locus microsatellites que nous avons étudié sont indiqués sur la figure III-69 ; ces échantillons correspondent au jeu de données basique établi au III-A-3-d. Les individus hybrides ou validés sur un seul locus (le plus souvent LS19) ne sont pas inclus. Dans l'échantillonnage actuel, seuls sont inclus les 16 esturgeons de Gironde correspondant à des individus capturés dans le milieu naturel au début des années 1990, les autres échantillons actuels de Gironde correspondant à des frères et sœurs.



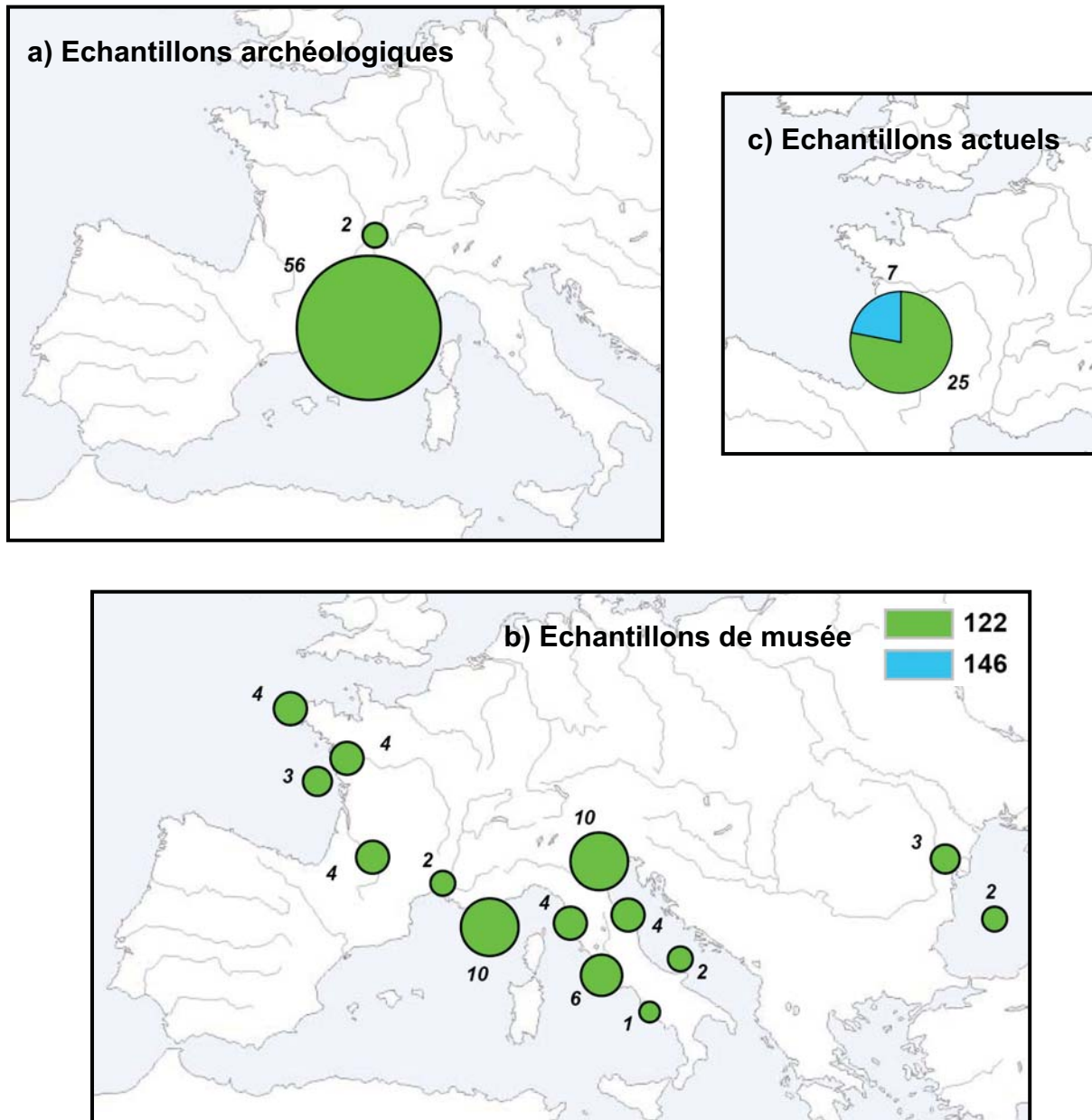
**Figure III-69 :** Répartition géographique des échantillons archéologiques (a) de musée (b) et actuels (c) validés sur au moins deux locus microsatellites. Le site archéologique (a) ou le lieu de capture (b) ainsi que l'âge et le nombre d'échantillons sont indiqués. (\*) L'origine de deux individus capturés au large de Nice est incertaine.

### III-B-5-b Disparités géographiques de la diversité génétique

#### ■ Distribution géographique des allèles : analyse par locus

Nous l'avons vu, le locus LS19 est monomorphe pour tous les échantillons anciens, seul l'allèle 122 étant détecté (Figure III-35 et III-70). Un autre allèle – l'allèle

146, également identifié chez *A. oxyrinchus* – est présent sur la population actuelle de Gironde (Figure III-70). Introgression d'*A. oxyrinchus*, allèle non détecté sur les échantillons anciens (24 nucléotides plus long) ou polymorphisme spécifique de la Gironde : telles sont les hypothèses pouvant expliquer cette observation.



**Figure III-70 :** Distribution des allèles du locus LS19 chez *A. sturio*, sur les échantillons archéologiques (a), de musée (b) et actuels (c). Le code couleur est indiqué en encart dans la figure, la taille des cercles est proportionnelle au nombre d'allèles fiables détectés, qui est par ailleurs noté en regard de chaque cercle.



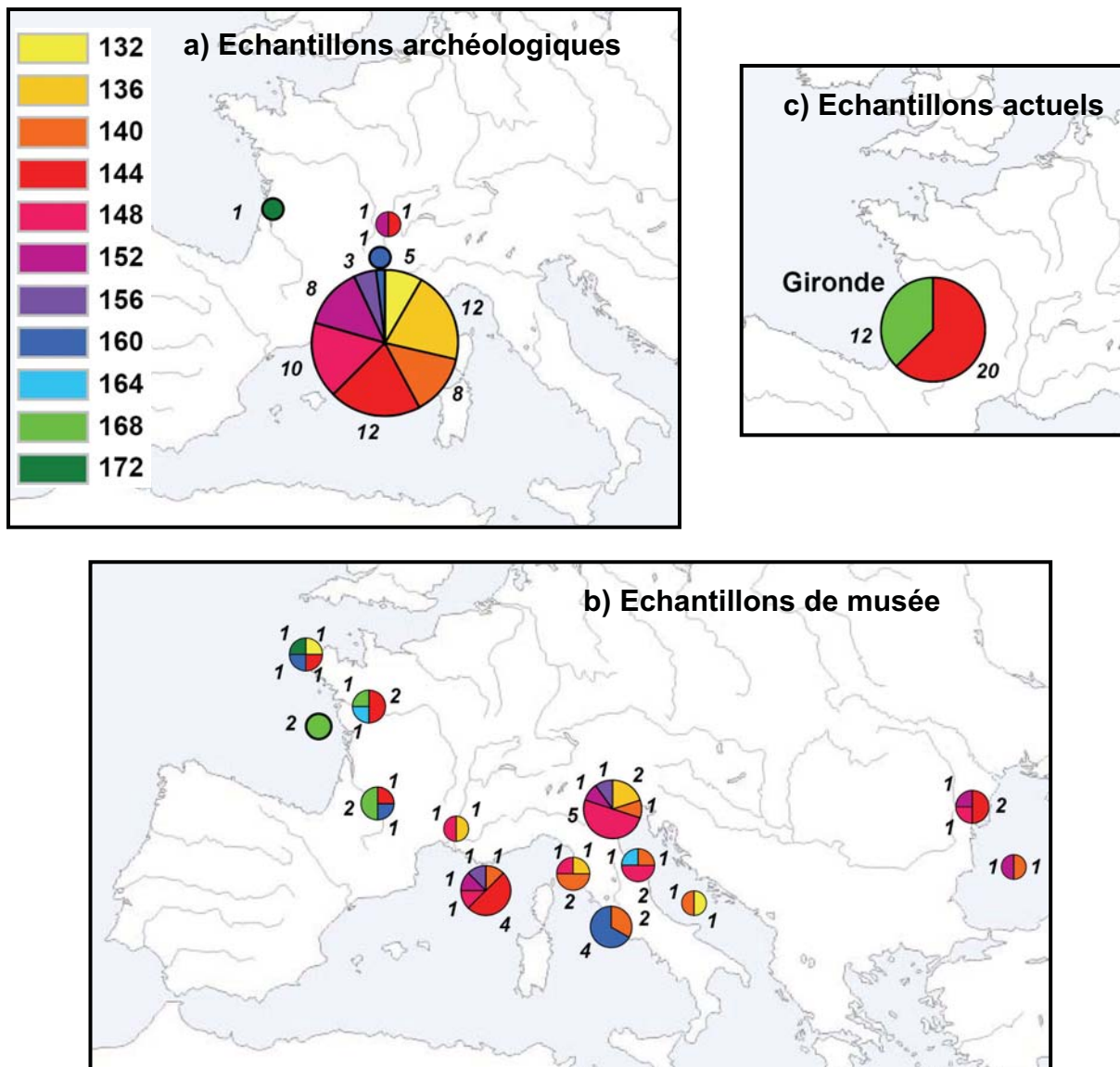


## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : PHYLOGEOGRAPHIE

Le locus LS68 est très polymorphe, avec une distribution des allèles marquée par des différences géographiques importantes (Figure III-72 et III-75).

Les allèles les plus longs 168 et 172 sont spécifiques de la façade atlantique (leur non détection parmi les 103 allèles couvrant le reste de la distribution exclut leur présence à une fréquence supérieure à 3% et ce avec une confiance de 95% ; pour comparaison leur fréquence respective est de 33% et 13% parmi les échantillons anciens de la façade Atlantique).

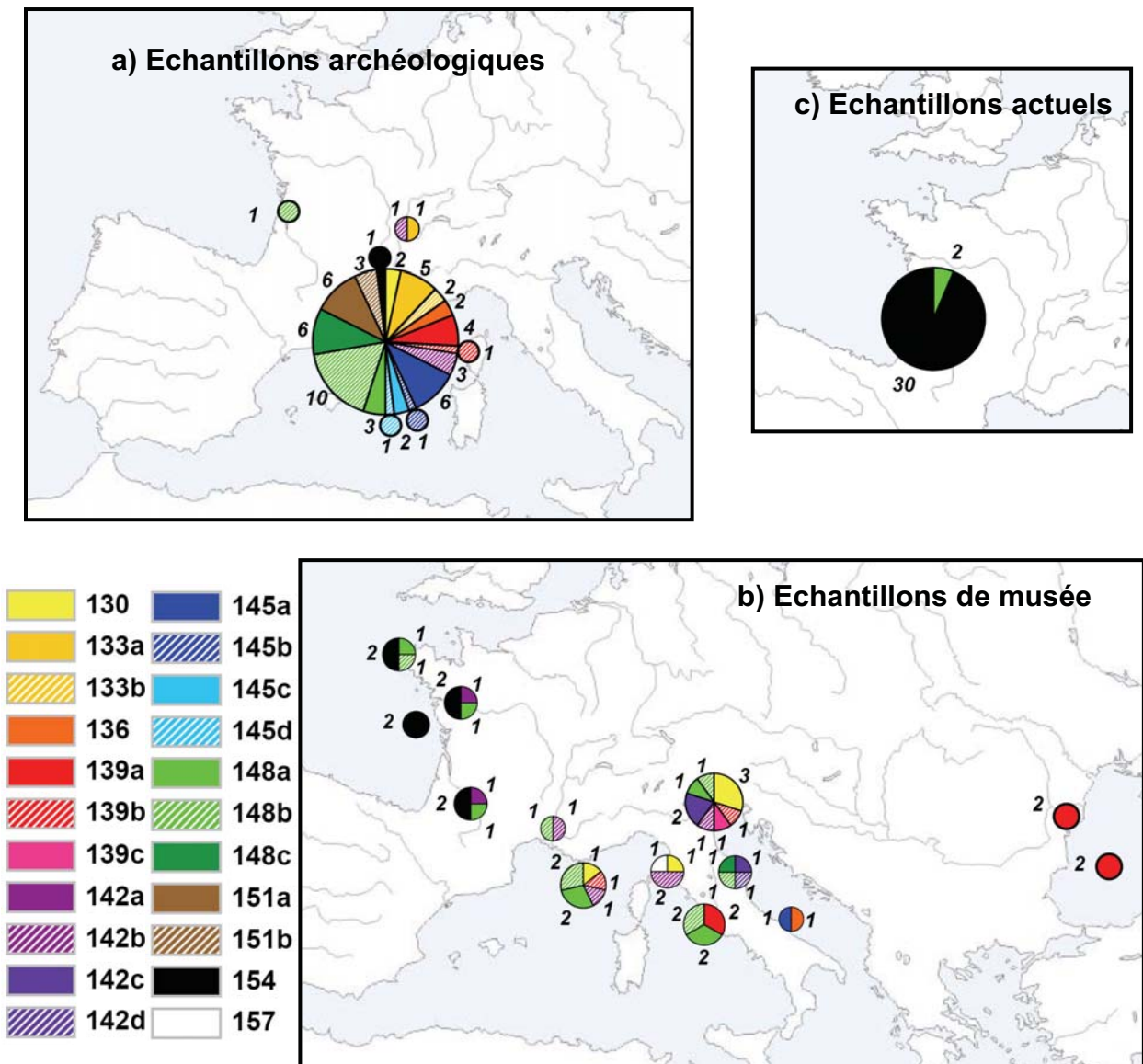
Le Tibre est le seul fleuve non atlantique où l'allèle 160 est trouvé. La population ancienne du Rhône est d'une extraordinaire variabilité, avec huit des onze allèles représentés.



**Figure III-72 :** Distribution des allèles du locus LS68 chez *A. sturio*. Pour faciliter la lisibilité de la tranche correspondant à l'allèle 160 dans le diagramme du Rhône archéologique, un petit cercle adjacent a été rajoutés.

## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : PHYLOGEOGRAPHIE

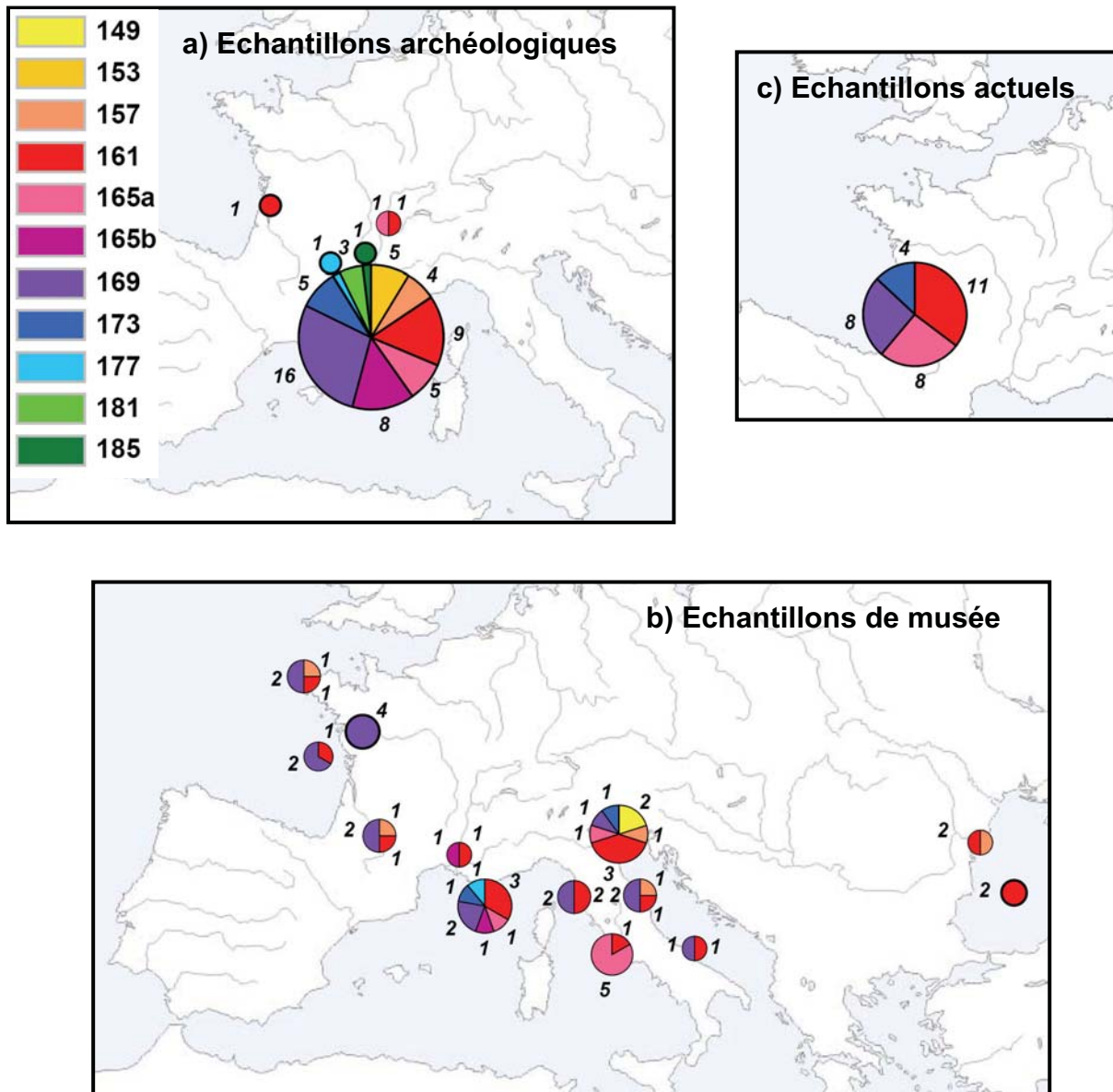
Le locus Aox23 est celui dont le patron géographique est le plus marqué, sans doute en raison de l'importance du polymorphisme allélique qui le caractérise (Figure III-73 et III-75). La façade atlantique présente un allèle 142a spécifique – fréquence d'exclusion sur le reste de la distribution : 3% – et un allèle 154 majoritaire (8 allèles parmi 15) alors qu'il est rare voire absent sur le reste de la distribution. La zone adriatique présente une diversité allélique importante avec sept allèles, dont deux spécifiques de la région (139c et 142c). L'allèle 139a semble fixé en Mer Noire (le faible échantillonnage permet seulement de conclure à une fréquence allélique supérieure à 48% dans la région). La population archéologique du Rhône présente une variabilité très importante, avec 17 allèles détectés sur les 22 existants.



**Figure III-73 :** Distribution des allèles du locus Aox23 chez *A. sturio*. Pour faciliter la lisibilité des tranches fines du diagramme du Rhône archéologique, de petits cercles adjacents ont été rajoutés.

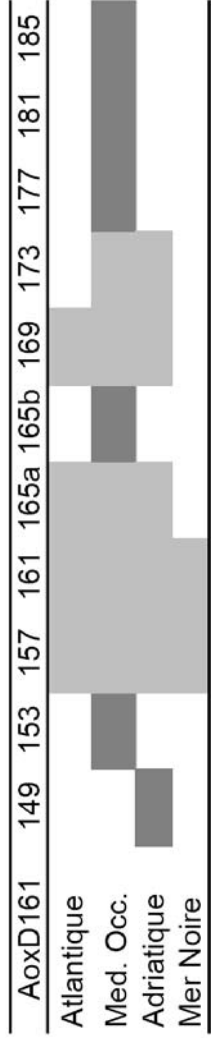
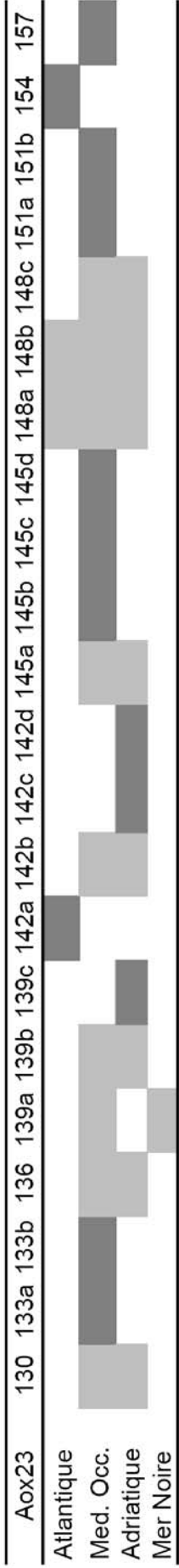
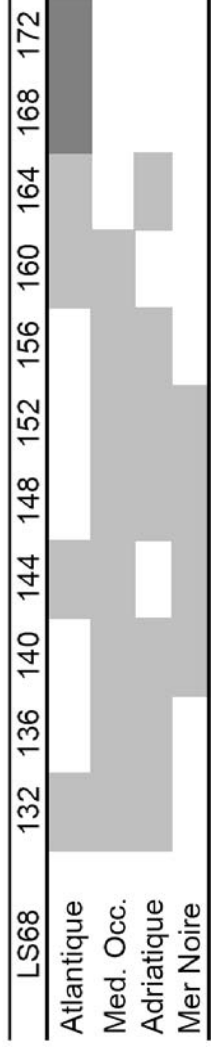
## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : PHYLOGEOGRAPHIE

Le locus AoxD161 présente une variabilité importante, également marquée par des disparités géographiques (Figure III-74 et III-75). En particulier, sur les 11 allèles identifiés à ce locus, le Rhône en présente 10, dont cinq spécifiques (153, 165b, 177, 181 et 185). L'allèle 149 n'a quant à lui été identifié que dans la zone Adriatique. L'allèle 169 est dominant sur la façade atlantique (10 allèles sur 15).



**Figure III-74 :** Distribution des allèles du locus AoxD161 chez *A. sturio* ; Pour faciliter la lisibilité des tranches fines du diagramme du Rhône archéologique, de petits cercles adjacents ont été rajoutés.

**DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : PHYLOGEOGRAPHIE**



**Figure III-75 :** Présence/absence des allèles des locus LS68, Aox23 et AoxD161 sur les différentes zones géographiques analysées (tous échantillons confondus). Les allèles présents sont en gris clair, les allèles en gris foncé sont restreints à une seule zone géographique. L'échantillonnage est faible sur la Mer Noire, ce qui explique en partie le faible nombre d'allèles identifiés dans cette région.

### ■ Distribution géographique des allèles : analyse globale

Plusieurs limites évidentes à l'analyse phylogéographique de la diversité microsatellite apparaissent. (i) Malgré tous nos efforts pour rassembler des échantillons couvrant l'ensemble de la répartition historique d'*A. sturio*, l'échantillonnage reste très partiel, la mer Baltique, la mer du Nord ou la péninsule ibérique n'étant par exemple pas couvertes. (ii) Se rajoute à cela la faible préservation de l'ADN nucléaire pour certains échantillons, réduisant d'autant l'échantillonnage efficace des allèles microsatellites et le volume de données analysables.

Malgré cela, plusieurs enseignements généraux peuvent être tirés à partir de la distribution géographique des allèles microsatellites des locus LS68, Aox23 et AoxD161 (qui sont les plus polymorphes et donc les plus informatifs) :

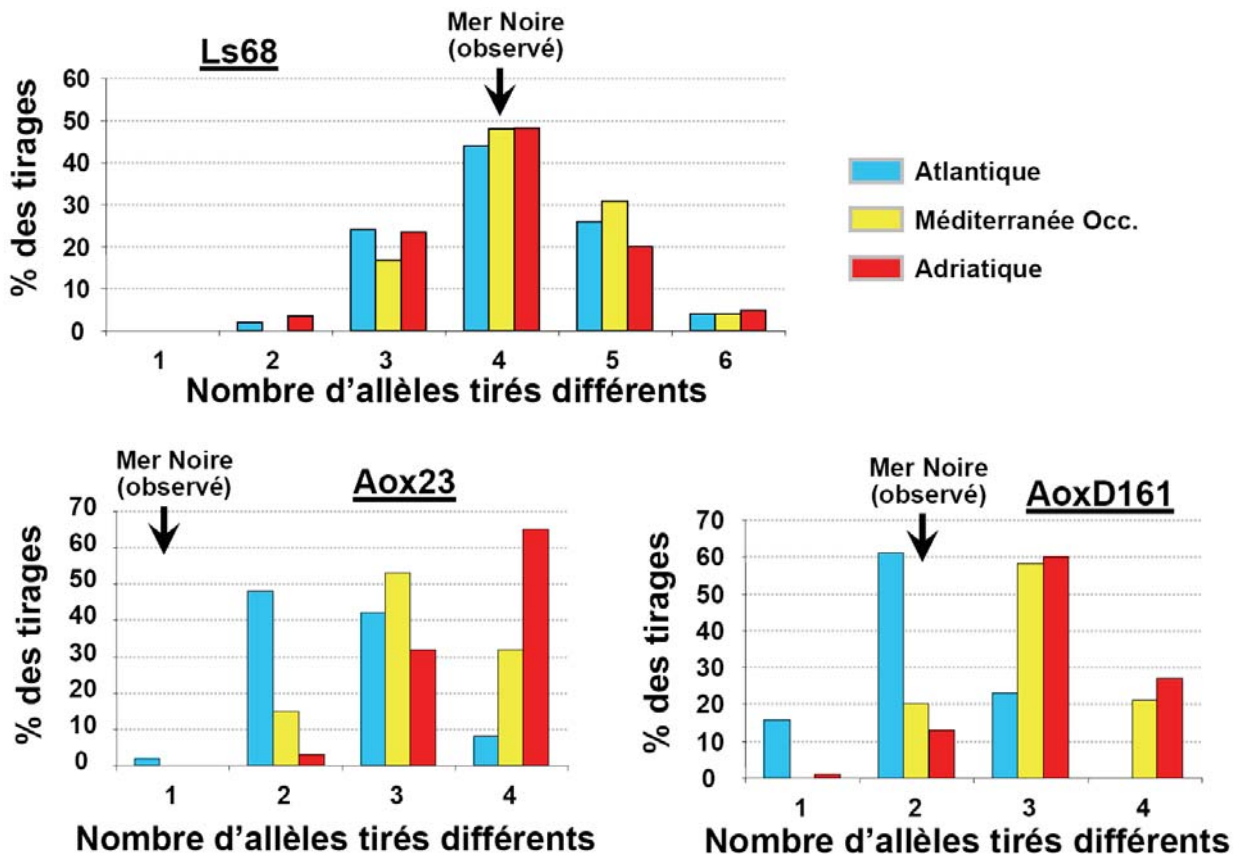
1) La diversité génétique des échantillons anciens est bien supérieure à celle des échantillons actuels de Gironde, ce qui est consistant avec la nature résiduelle de cette population.

2) La diversité génétique est plus importante dans les bassins méditerranéen et adriatique, comparés à la façade atlantique française et à la Mer Noire. Le nombre total d'allèles identifiés est plus important sur ces zones, et le nombre d'allèles privés est très important, en particulier en Méditerranée occidentale. Le cas de la Mer Noire est particulier car le nombre d'allèles identifiés est très faible sur cette région, néanmoins (i) les locus LS54 et Aox23 sont monomorphes sur la région et (ii) les simulations à échantillonnage constant sur LS68, Aox23 et AoxD161 indiquent une variabilité inférieure ou égale aux zones atlantique, adriatique et méditerranéenne aux 19 et 20<sup>e</sup> siècles (Figure III-76).

3) Dans la zone méditerranéenne, même si l'échantillonnage est faible il apparaît que le Tibre est toujours différent du Rhône (et de sa proximité immédiate i.e. Nice) : il présente des allèles absents dans le Rhône (LS68 et Aox23) ou des allèles présents dans le Rhône mais à des fréquences basses (LS54, AoxD161). Les

populations abritées par ces deux fleuves étaient donc probablement différenciées au niveau nucléaire.

4) La population archéologique du Rhône révèle une variabilité très importante, couvrant quasiment l'ensemble de la variabilité observée de l'espèce.



**Figure III-76 :** Diversité allélique en Mer Noire et biais d'échantillonnage : simulations sur les locus LS68, Aox23 et AoxD161. Les échantillons archéologiques ne sont pas considérés ici. Seuls quatre à six allèles ont été échantillonnés en Mer Noire, contre 14 à 22 sur les zones atlantique (AT), méditerranéenne occidentale (MO) et adriatique (AD). Soit X le nombre d'allèles échantillonnés en Mer Noire et Y le nombre d'allèles échantillonnés sur la zone à comparer. 100 tirages aléatoires sans remise de X allèles parmi Y ont été réalisés pour chaque zone (AT, MO, AD) et la distribution du nombre d'allèles différents tiré est indiquée pour chacun des locus LS68, Aox23 et AoxD161. La flèche noire indique le nombre d'allèles différents réellement observé en Mer Noire : si la flèche est à gauche des distributions théoriques alors la Mer Noire est moins diverse que les zones comparées, si la flèche est à droite des distributions théoriques alors la Mer Noire est plus diverse. Exemple d'interprétation pour Aox23 : quatre allèles (X) ont été échantillonnés sur la Mer Noire, tous identiques (allèle 139a) ; le tirage de quatre allèles parmi les 16 allèles échantillonnés en mer Adriatique (Y) conduit à quatre allèles différents dans 65% des cas, trois allèles différents dans 32% des cas, deux allèles différents dans 3% des cas et un seul allèle dans 0% des cas ; si l'échantillonnage sur la zone adriatique n'avait été que de 4 allèles, la probabilité d'identifier un seul allèle aurait été nulle car la diversité allélique est plus importante qu'en Mer Noire.

### III-B-5-c Structuration populationnelle et tests d'assignation

#### ■ Utilisation du logiciel STRUCTURE

Pour estimer la structuration des populations d'esturgeons et assigner les individus à ces différentes populations, nous avons entrepris d'analyser nos données avec le logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000). STRUCTURE utilise une approche bayésienne pour identifier la population d'appartenance la plus probable pour chaque individu en fonction de son génotype. X représentant le génotype des individus, Z leur population d'origine (inconnue) et P les fréquences alléliques dans toutes les populations (inconnues), la formule de Bayes donne :

$$p(Z, P / X) = (p(Z) \cdot p(P) \cdot p(X / Z, P)) / p(X)$$

or  $p(X)$  vaut 1 puisque le génotype est observé, d'où finalement :

$$p(Z, P / X) = p(Z) \cdot p(P) \cdot p(X / Z, P) \quad \textbf{(équation 1)}$$

Les informations utilisées a priori sont les suivantes :

- il y a K populations (ou groupes de populations) différentes
- chaque individu a autant de chance d'appartenir à chacun des groupes, la probabilité d'appartenance à la population Z vaut donc  $p(Z) = 1 / K$  (équiprobabilité)
- les groupes sont définis de façon aléatoire, et les fréquences alléliques de chaque groupe sont calculées à partir des génotypes des individus qui les composent ; à partir de Z (fixé) et P (calculé), la probabilité  $p(X / Z, P)$  des génotypes est calculée
- la probabilité  $p(P)$  des fréquences alléliques P est déterminée par une loi de Dirichlet uniforme.

A partir de ces informations a priori, l'équation 1 permet de calculer la probabilité  $p(Z, P / X)$  qu'un individu de génotype X appartienne au groupe Z de fréquences alléliques P. L'estimation obtenue à partir des informations a priori est très peu fiable (puisque les informations a priori sont standards), mais l'utilisation d'un algorithme MCMC (Markov Chain Monte Carlo) permet d'affiner cette estimation en utilisant l'estimation de l'étape n-1 pour obtenir une meilleure estimation à l'étape n. Lorsque la valeur estimée de  $p(Z, P / X)$  se stabilise et cesse d'évoluer au fil des étapes, l'algorithme a atteint la convergence et l'estimation peut être considérée comme fiable. A chaque itération de l'algorithme, les probabilités correspondant à



tous les individus sont estimées, et une valeur de probabilité globale des données est calculée (le logiciel fournit un estimateur  $\ln P(D)$  de cette probabilité).

Concrètement, l'expérimentateur teste différents modèles en faisant varier les informations a priori, puis retient celui qui maximise la probabilité des données (concrètement celui qui maximise  $\ln P(D)$ ). La validation définitive du modèle est conditionnée à la cohérence biologique des résultats, contrôlée sur la représentation graphique qui présente l'assignation de chaque individu à un ou plusieurs groupes sous la forme d'une barre verticale (voir Figure III-77 pour un cas concret).

### ■ Jeu de données utilisés

Les jeux de données basiques, conservatifs et très conservatifs définis au III-A-3-d (incluant tous les échantillons anciens d'*A. sturio*, *A. oxyrinchus* et hybrides) ont été utilisés, en rajoutant des échantillons modernes d'*A. sturio* (n=16, Gironde) et d'*A. oxyrinchus* (n=12, individus séquencés de l'article n°1) pour comparaison.

Dans un premier temps, les jeux de données entiers ont été testés. Nous avons ensuite refait les analyses sur les jeux de données en excluant les échantillons d'*A. oxyrinchus* et les hybrides. Dans un troisième temps, nous avons effectué les analyses uniquement sur les *A. sturio* de la zone pontique (Méditerranée, Adriatique et mer Noire).

Au total, neuf jeux de données ont donc été utilisés (basique/conservatif/très conservatif x tous/sturio/sturio-pontique).

### ■ Modèles testés

Pour chaque jeu de données, nous avons testé 40 modèles :

- nous avons fait varier K (nombre de groupes) entre 1 et 5.
- le modèle sans mélange (no admixture ou NA ; postule qu'un individu est issu d'une seule population, c'est donc la probabilité d'appartenance d'un individu à un groupe qui est estimée) et le modèle avec mélange (admixture ou A ; postule qu'un individu peut avoir un génotype issu de plusieurs populations, c'est donc le taux d'hybridation entre deux groupes ou plus qui est estimé) ont été testés (5 x 2 = 10 modèles)
- l'origine géographique des échantillons a été utilisée comme information a priori (L) ou non (NL) (10 x 2 = 20 modèles) ; cette amélioration a été implémentée dans STRUCTURE (modèle LOCPRIOR) à la suite des analyses de Hubisz *et al.* (2009).

- le modèle à fréquences alléliques non corrélées (FI ; les fréquences alléliques des différentes populations sont indépendantes) et le modèle à fréquence allélique corrélée (FC ; les fréquences alléliques des différentes populations sont considérées comme dérivant d'une même population ancestrale, avec un facteur de dérive spécifique pour chaque population) ont également été testés ( $20 \times 2 = 40$  modèles) ; ce dernier est une amélioration apportée à STRUCTURE suite aux travaux de Falush *et al.* (2003).

### ■ Résultats : jeu de données entier

Nous avons testé les 40 modèles sur les neuf jeux de données en utilisant une période de burnin de 20 000 générations suivies de 80 000 générations de mesure. Evanno *et al.* (2005) mentionnent que 10 000 générations de burnin suivies par 10 000 générations de mesure permettent d'obtenir une convergence et que l'augmentation du nombre de générations (jusqu'à  $10^6$  générations) n'améliore pas la performance de l'algorithme. Les valeurs que nous avons utilisées sont donc largement suffisantes.

Les résultats correspondant aux jeux de données basique, conservatif et très conservatif entiers (incluant tous les *A. sturio* et tous les *A. oxyrinchus* étudiés) sont présentés au tableau III-13 :

- à paramètres par ailleurs égaux, les valeurs de  $\ln P(D)$  sont supérieures pour les modèles FC par rapport aux modèles FI, ce qui était attendu car les modèles à fréquences alléliques corrélées sont plus efficaces que les modèles à fréquences alléliques indépendantes (Falush *et al.* 2003). Ces modèles FC ont également tendance à surestimer K (Falush *et al.* 2003), ce qui pourrait expliquer pourquoi certains d'entre eux conduisent à une probabilité maximale pour K = 4 groupes (alors que la majorité des modèles donne K = 3 populations).
- à paramètres par ailleurs égaux, les valeurs de  $\ln P(D)$  sont supérieures pour les modèles L par rapport aux modèles NL, ce qui était une nouvelle fois attendu car l'utilisation de l'origine géographique des échantillons comme information a priori améliore la performance des modèles lorsque les jeux de données sont peu informatifs (Hubisz *et al.* 2009)
- à paramètres par ailleurs égaux, les valeurs de  $\ln P(D)$  sont équivalentes entre modèles A et NA, le paramètre avec ou sans mélange n'est donc pas influant.

**DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : PHYLOGEOGRAPHIE**

n = 101

Modèle	NA + L + FI	A + L + FI	NA + NL + FI	A + NL + FI	NA + L + FC	A + L + FC	NA + NL + FC	A + NL + FC
K=1	-1769.4	-1769.2	-1769.3	-1769.3	-1770.0	-1768.7	-1768.5	-1769.2
K=2	-1489.8	-1488.4	-1488.6	-1494.8	-1449.8	-1448.7	-1451.6	-1456.4
K=3	-1443.3	-1446.7	-1461.8	-1472.5	-1349.3	-1350.8	-1374.6	-1359.4
K=4	-1444.8	-1450.3	-1481.3	-1507.3	-1370.9	-1361.8	-1321.9	-1338.0
K=5	-1446.4	-1458.5	-1505.2	-1520.1	-1464.8	-1389.4	-1359.2	-1348.4
Groupes :	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm

**Basique**

n = 94

Modèle	NA + L + FI	A + L + FI	NA + NL + FI	A + NL + FI	NA + L + FC	A + L + FC	NA + NL + FC	A + NL + FC
K=1	-1673.1	-1673.0	-1673.1	-1673.0	-1672.8	-1673.3	-1673.3	-1673.4
K=2	-1403.5	-1402.6	-1401.5	-1406.9	-1364.5	-1363.5	-1366.7	-1372.0
K=3	-1359.3	-1361.0	-1375.9	-1386.3	-1266.0	-1264.8	-1268.7	-1276.1
K=4	-1360.3	-1365.3	-1393.2	-1413.3	-1255.0	-1281.6	-1244.1	-1258.9
K=5	-1363.5	-1370.0	-1418.7	-1424.7	-1324.2	-1279.6	-1249.7	-1358.6
Groupes :	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm+Sx	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm

**Conservatif**

n = 91

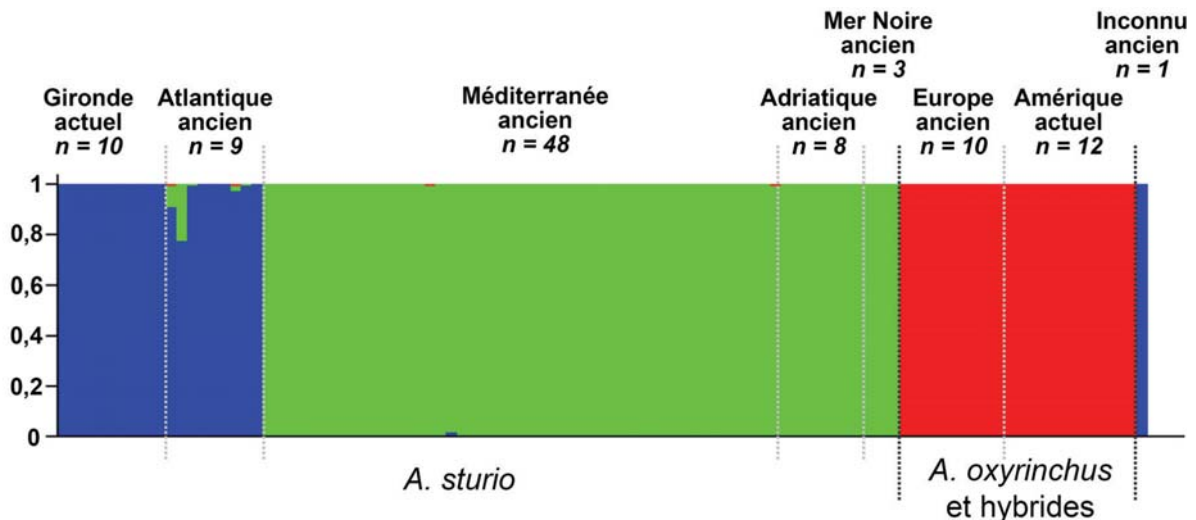
Modèle	NA + L + FI	A + L + FI	NA + NL + FI	A + NL + FI	NA + L + FC	A + L + FC	NA + NL + FC	A + NL + FC
K=1	-1638.7	-1638.7	-1638.6	-1638.7	-1639.8	-1870.3	-1638.8	-1639.4
K=2	-1373.2	-1372.0	-1370.8	-1375.0	-1335.7	-1333.8	-1335.6	-1340.2
K=3	-1328.2	-1332.5	-1343.4	-1352.9	-1252.7	-1235.6	-1238.3	-1245.0
K=4	-1333.6	-1340.7	-1353.4	-1379.0	-1273.1	-1250.4	-1211.7	-1226.9
K=5	-1332.2	-1341.3	-1381.5	-1398.2	-1259.6	-1246.7	-1213.2	-1242.7
Groupes :	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm	O+Sa+Sm+Sx

**Très conservatif**

**Tableau III-13 :** Probabilités postérieures des données microsattelites (lnP(D)), obtenues avec le logiciel structure sur les jeux de données basique, conservatif et très conservatif entiers. 40 modèles par jeu de données ont été testés : K = nombre de populations, A / NA = mélange ou non (admixture or not), L / NL = origine géographique prise en compte ou non (locprior ou non), FI / FC = fréquences alléliques indépendantes ou corrélées. Pour chaque groupe de paramètres, la valeur de K la plus probable est grisée et les groupes observés sur la représentation graphique correspondantes sont indiqués en dessous (O = *A. oxyrinchus*, Sa = *A. sturio* atlantique, Sm = *A. sturio* méditerranée+adriatique+mer Noire, Sx = *A. sturio* autre groupe). Les cases en gris clair indiquent un modèle probable non soutenu par la représentation graphique des résultats.

Le modèle à K = 3 groupes est généralement le plus probable, les groupes identifiés correspondant à (i) *A. oxyrinchus*, (ii) *A. sturio* zone atlantique et (iii) *A. sturio* zone méditerranééo-pontique (incluant Méditerranée, Adriatique et mer Noire) (Figure III-77). La séparation des deux espèces était attendue, et la séparation des populations atlantiques par rapport aux populations méditerranééo-pontiques d'*A. sturio* est cohérente avec les observations réalisées sur la répartition géographique des allèles microsatellites. A noter que les résultats obtenus sont identiques entre les jeux de données basiques, conservatif et très conservatif, mettant en évidence la robustesse du signal.

Dans quelques cas, le modèle à K = 4 populations apparaît comme le plus probable (lnP(D) maximal), mais l'observation de la représentation graphique des résultats n'indique pas de quatrième population tranchée (voire une discussion à ce sujet plus loin). Les modèles surestimant K sont par ailleurs tous basés sur la corrélation des fréquences alléliques, or les modèles FC sont connus pour avoir tendance à surestimer K (Falush *et al.* 2003).



**Figure III-77 :** Exemple de résultat obtenu sur le jeu de données entier avec le modèle A + L + FC et K = 3. Chaque barre verticale (non visible mais de l'épaisseur de la dernière barre bleue à droite) correspond à un individu, dont la couleur dépend des probabilités d'assignation à chacun des trois groupes (bleu, vert et rouge pour les groupes 1, 2 et 3). L'origine et l'espèce de chacun des échantillons est précisée au-dessus et en dessous du graphe.

Au final, le modèle le plus pertinent est donc le modèle A + L + FC avec K = 3 groupes (représentation graphique à la figure III-77 ; données brutes au tableau III-14).

## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : PHYLOGEOGRAPHIE

**Tableau III-14** : Probabilité d'assignement des 101 individus, modèle A + L + FC avec K = 3. Le pourcentage de données manquantes est également indiqué.

	Echantillons	(%Missing)	Probabilités groupes 1-2-3		
1	ST133	(0)	0.000	0.000	1.000
2	ST134	(0)	0.000	0.000	1.000
3	ST139	(0)	0.000	0.000	1.000
4	ST141	(0)	0.000	0.000	1.000
5	ST143	(0)	0.000	0.000	1.000
6	ST145	(0)	0.000	0.000	1.000
7	ST146	(0)	0.000	0.000	1.000
8	ST147	(0)	0.000	0.000	1.000
9	ST148	(0)	0.000	0.000	1.000
10	ST149	(0)	0.000	0.000	1.000
11	CH1010	(60)	0.003	0.088	0.909
12	CH1299	(0)	0.000	0.228	0.772
13	CH1309	(0)	0.000	0.002	0.998
14	CH1317	(0)	0.000	0.000	1.000
15	CH1319	(0)	0.000	0.000	1.000
16	CH1291	(0)	0.000	0.000	1.000
17	CH1293	(80)	0.004	0.021	0.975
18	CH1301	(0)	0.000	0.001	0.999
19	CH1303	(0)	0.000	0.000	1.000
20	CH1240	(0)	0.000	1.000	0.000
21	CH1235	(0)	0.000	1.000	0.000
22	CH480	(0)	0.000	1.000	0.000
23	CH481	(20)	0.000	1.000	0.000
24	CH482	(40)	0.000	1.000	0.000
25	CH483	(10)	0.000	1.000	0.000
26	CH826a	(0)	0.000	1.000	0.000
28	CH832	(50)	0.000	1.000	0.000
29	CH833	(0)	0.000	1.000	0.000
30	CH1018	(10)	0.000	1.000	0.000
31	CH1019	(0)	0.000	1.000	0.000
32	CH1021	(0)	0.000	1.000	0.000
33	CH1023	(0)	0.000	1.000	0.000
34	CH1025	(0)	0.000	1.000	0.000
35	CH1026	(80)	0.001	0.999	0.000
36	CH1028	(0)	0.000	1.000	0.000
37	CH1032	(60)	0.000	0.980	0.020
38	CH1033	(60)	0.000	1.000	0.000
39	CH1116	(60)	0.000	1.000	0.000
40	CH1196	(60)	0.000	0.999	0.000
41	CH1199	(0)	0.000	1.000	0.000
42	CH1200	(0)	0.000	1.000	0.000
43	CH1201	(0)	0.000	1.000	0.000
44	CH1202	(0)	0.000	1.000	0.000
45	CH1203	(0)	0.000	1.000	0.000
46	CH1204	(10)	0.000	1.000	0.000
47	CH1205	(80)	0.000	0.995	0.004
48	CH1012	(0)	0.000	1.000	0.000
49	CH1189	(0)	0.000	1.000	0.000
50	CH1190	(0)	0.000	1.000	0.000
51	CH1191	(0)	0.000	1.000	0.000
52	CH1192	(0)	0.000	1.000	0.000
53	CH1193	(0)	0.000	1.000	0.000
54	CH1194	(0)	0.000	1.000	0.000
55	CH1195	(0)	0.000	1.000	0.000
56	CH551	(0)	0.000	1.000	0.000
57	CH985	(0)	0.000	1.000	0.000
58	CH548	(20)	0.000	1.000	0.000
59	CH978	(0)	0.000	0.994	0.006
60	CH982	(30)	0.000	1.000	0.000

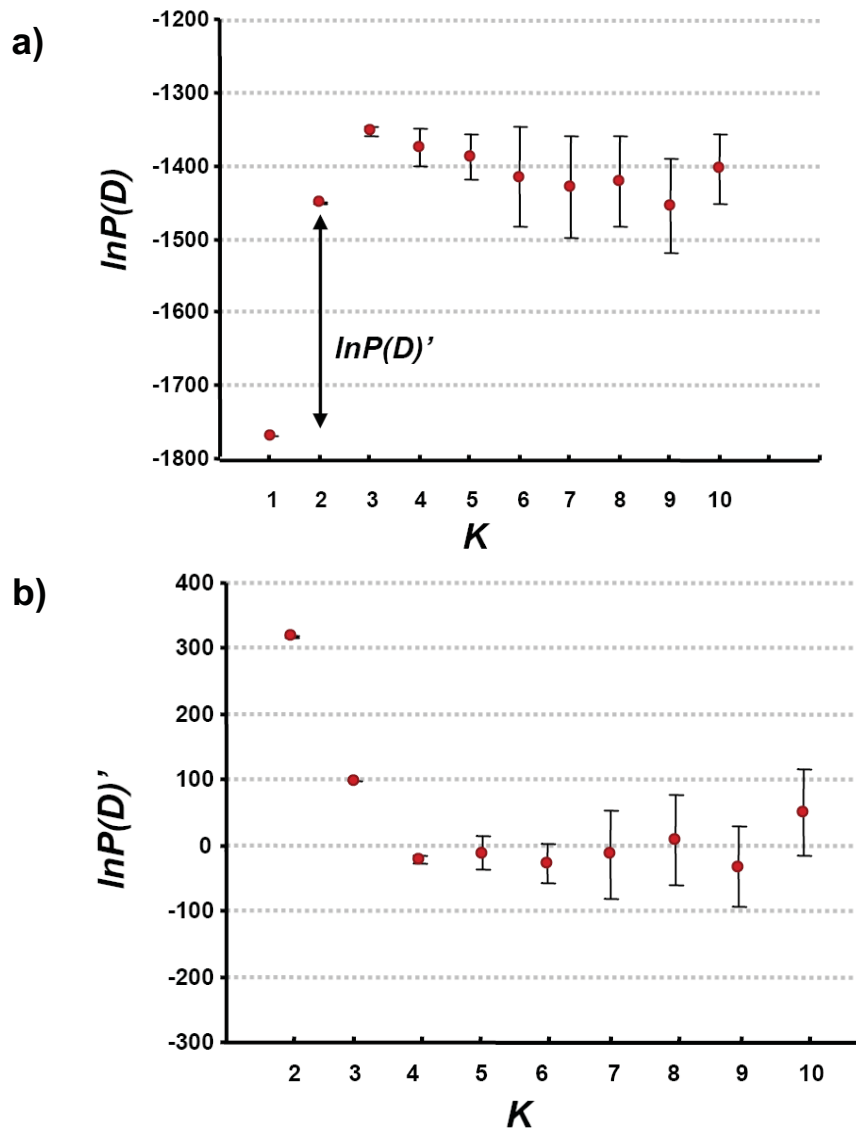
## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : PHYLOGEOGRAPHIE

61	CH822	(10)	0.000	1.000	0.000
62	CH1295	(0)	0.000	1.000	0.000
63	CH1133	(0)	0.000	1.000	0.000
64	CH1135	(0)	0.000	1.000	0.000
65	CH1151	(0)	0.000	1.000	0.000
66	CH1153	(0)	0.000	1.000	0.000
67	CH1147	(80)	0.006	0.988	0.006
68	CH1155	(0)	0.000	0.997	0.003
69	CH1137	(0)	0.000	1.000	0.000
70	CH1139	(0)	0.000	1.000	0.000
71	CH1141	(0)	0.000	1.000	0.000
72	CH1143	(0)	0.000	1.000	0.000
73	CH1163	(0)	0.000	1.000	0.000
74	CH1173	(0)	0.000	1.000	0.000
75	CH1323	(0)	0.000	1.000	0.000
76	CH813	(60)	0.000	0.997	0.003
77	CH815	(0)	0.000	1.000	0.000
78	CH1129	(0)	0.000	1.000	0.000
79	CH1305	(0)	1.000	0.000	0.000
80	CH1307	(0)	1.000	0.000	0.000
81	CH1289	(0)	1.000	0.000	0.000
82	CH1313	(0)	1.000	0.000	0.000
83	CH1315	(0)	1.000	0.000	0.000
84	CH1311	(0)	1.000	0.000	0.000
85	CH1009	(0)	1.000	0.000	0.000
86	CH1011	(30)	1.000	0.000	0.000
87	CH553	(0)	0.998	0.002	0.000
88	CH1234	(0)	1.000	0.000	0.000
89	ST026	(0)	1.000	0.000	0.000
90	ST037	(0)	1.000	0.000	0.000
91	ST039	(0)	1.000	0.000	0.000
92	ST042	(0)	1.000	0.000	0.000
93	ST044	(0)	1.000	0.000	0.000
94	ST049	(0)	1.000	0.000	0.000
95	ST050	(0)	1.000	0.000	0.000
96	ST053	(0)	1.000	0.000	0.000
97	ST055	(0)	1.000	0.000	0.000
98	ST059	(0)	1.000	0.000	0.000
99	ST060	(0)	1.000	0.000	0.000
100	ST064	(0)	1.000	0.000	0.000
101	CH976	(40)	0.000	0.000	1.000

A noter que nous avons inclus dans l'analyse l'individu CH976 (spécimen du musée de Nice) dont l'origine géographique était inconnue a priori. Au vu de son génotype microsatellite, cet individu est assigné au groupe 3 (Figure III-77 et Tableau III-14), correspondant aux populations atlantiques d'*A. sturio* : ce spécimen a donc très probablement été pêché sur la façade atlantique.

Afin de valider des résultats obtenus à partir du modèle A + L + FC, nous les avons répliqués 10 fois dans les mêmes conditions en faisant varier K entre 1 et 10. Les résultats obtenus sont très reproductibles jusqu'à K = 3 (variance très faible) puis deviennent plus irréguliers ensuite, soulignant l'absence de soutien solide des

modèles à partir de  $K = 4$ . De plus, l'application de la méthode d'Evanno *et al.* (2005) basée sur la pente de la courbe  $\ln P(D) = f(K)$  indique une rupture entre  $K = 3$  et  $K = 4$ , ce qui soutien encore le choix du modèle à  $K = 3$  populations. L'analyse des résultats correspondant aux réplifications du modèle A + L + FC sur le jeu de données conservatif est présentée à la figure III-78 ; des résultats similaires ont été obtenus sur les jeux de données basique et très conservatif (données non présentées).



**Figure III-78 :** Détection de la valeur de  $K$  à partir de la méthode utilisée par Evanno *et al.* (2005). a) Probabilité postérieure des données (estimateur  $\ln P(D)$ ), moyennée sur 10 répétitions indépendantes pour chaque valeur de  $K$  entre 1 et 10 ; les barres d'erreurs indiquent les écart-types. b) Taux de variation de la probabilité postérieure calculé par  $\ln P(D)'_K = \ln P(D)_K - \ln P(D)_{K-1}$

### ■ Résultats : sous-ensembles du jeu de données entier

La capacité de l'algorithme à détecter la structure dans un jeu de données dépend de celui-ci. Lorsque plusieurs niveaux de structures existent, l'algorithme a tendance à ne détecter que le niveau le plus marqué (Evanno *et al.* 2005).

Afin de détecter d'éventuelles structurations génétiques plus fines, nous avons donc appliqué la même procédure que décrite ci-dessus en excluant du jeu de données *A. oxyrinchus* et les hybrides *A. sturio* x *A. oxyrinchus*. Dans ce cas, le modèle A + L + FC est encore le plus pertinent, et quelle que soit la qualité du jeu de données (basique, conservatif, très conservatif) la valeur de K la plus probable vaut 2, correspondant encore une fois à la différenciation des populations atlantiques et méditerranéo-pontiques d'*A. sturio* (les résultats correspondent graphiquement à ceux de la figure III-77 sans le groupe rouge).

L'application des mêmes analyses en excluant en plus les populations atlantiques d'*A. sturio* ne permet pas non plus de détecter une quelconque structuration des populations méditerranéo-pontiques : le modèle le plus probable est en effet A + L + FC avec K = 1 (les résultats correspondent graphiquement à ceux de la figure III-77 sans les groupes rouge et bleu).

### ■ Discussion des résultats

La qualité de notre jeu de données microsatellite s'est avérée suffisante pour que STRUCTURE puisse détecter la structuration nucléaire marquée entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus* – dont nous avons discuté dans la partie II-B, et également mise en évidence par Ludwig *et al.* (2008).

Plus intéressant pour l'étude intraspécifique d'*A. sturio*, nous avons également pu établir la différenciation nucléaire des populations atlantiques et méditerranéo-pontiques. Cette différenciation est indépendante de la réduction historique des effectifs de la population de Gironde depuis deux siècles, puisque les échantillons anciens sont eux aussi différenciés : il ne s'agit donc pas d'un artefact lié à la dérive génétique récente de la population girondine.



Malgré de multiples tests, nous n'avons pas détecté de structure plus fine à l'échelle de la région méditerranéo-pontique. Cette absence de structure peut s'expliquer biologiquement : les populations de la région n'étaient peut-être tout simplement pas différenciées. Cette hypothèse d'homogénéité nucléaire sur toute la région méditerranéo-pontique est néanmoins peu probable au vu des indices apportés par l'analyse de la répartition géographique des allèles microsatellites et des haplotypes mitochondriaux, qui suggèrent l'existence d'une différenciation plus fine à l'intérieur cette région (voir parties III-B-4-b et III-B-5-b).

L'absence de structure intra-sturio sur la région méditerranéo-pontique est plus probablement le signe d'un manque d'informativité de notre jeu de données : en effet, nous disposons finalement de peu d'échantillons sur la zone adriatique (15) et en Mer Noire (4), limitant les capacités de l'algorithme à détecter des structures génétiques fines (les fréquences alléliques estimées à partir de faibles effectifs sont de grossières approximations des fréquences réelles, il est donc difficile voire impossible que l'algorithme puisse identifier des populations dans cette situation). La preuve de cette limitation est l'absence de structuration détectée sur *A. oxyrinchus*, alors que les 12 échantillons étudiés proviennent en fait de trois populations américaines différenciées (St-John, Delaware et Shark) (Ludwig *et al.* 2008). A noter néanmoins que sur certaines simulations, le modèle  $K = 4$  identifie un quatrième groupe biologiquement envisageable, rassemblant les échantillons du Tibre et de la mer Noire (les groupes nommés Sx sur le tableau III-13 correspondent à cette situation) : ce groupe est peut-être un artefact lié au modèle FC, mais il pourrait également s'agir du regroupement de deux populations différentes sur la base de leur différences respectives avec les autres populations méditerranéennes (un peu comme un artefact de longues branches qui aurait tendance à regrouper les populations les plus divergentes ensemble sur un arbre phylogénétique). Un échantillonnage plus exhaustif dans la région méditerranéo-pontique et l'étude d'un plus grand nombre de marqueurs microsatellites sont les seules solutions qui permettront de mettre en évidence une structuration nucléaire plus fine au sein de l'espèce *A. sturio*.

***III-B-6 DISCUSSION DES DONNEES PHYLOGEOGRAPHIQUES***

III-B-6-a Structuration géographique de la diversité génétique au niveau des grandes zones biogéographiques

■ Cœur et périphéries de la distribution (Figure III-79)

La diversité génétique mitochondriale est bien plus importante au coeur de la distribution (Ibérie, Méditerranée, Adriatique) par rapport à ses marges (Atlantique-Europe du Nord, Mer Noire).

Le même patron de diversité a été observé sur les microsatellites, malgré un volume de données restreint en raison de la moins bonne préservation de l'ADN nucléaire par rapport à l'ADNmt.



**Figure III-79 :** Diversité génétique d'*A. sturio* sur son aire de répartition historique : représentation quantitative. Le gradient de rouge marque schématiquement le gradient de diversité.

Ce patron de diversité est indicatif d'une certaine stabilité temporelle des populations du cœur de la distribution. Les populations périphériques se sont elles probablement constituées plus récemment par effet fondateur, échantillonnant un sous-ensemble de la diversité génétique présente au cœur de la distribution. Une hypothèse envisageable est la colonisation de la marge nord-ouest (Atlantique-Europe du Nord) à partir des populations ibériques atlantiques, et d'une colonisation de la marge sud-est (Mer Noire) à partir des populations de Méditerranée orientale. La validation de ce scénario nécessite une meilleure connaissance génétique des populations sources potentielles, les populations ibériques étant relativement mal connues et les populations de Méditerranée orientale totalement inconnues. Néanmoins de tels événements de colonisation ont été reportés pour de nombreuses espèces marines (Bernatchez & Wilson 1998).

### ■ Différences interrégions (Figure III-80)

Si la diversité génétique n'est pas quantitativement répartie de façon homogène sur l'aire de répartition historique de l'espèce, elle ne l'est pas non plus qualitativement.

En effet, nous avons vu dans les parties précédentes que les différentes zones biogéographiques étaient caractérisées par une composition génétique spécifique, aussi bien au niveau mitochondrial que nucléaire. La distinction est d'autant plus marquée que les zones considérées sont éloignées, suggérant un isolement par la distance et donc des échanges restreints entre les zones.

### Zone atlantique vs méditerranéo-pontique

La distinction la plus marquée a été identifiée entre la zone atlantique et la zone méditerranéo-pontique, en particulier sur les microsatellites. Le détroit de Gibraltar (ou plutôt le front Almeria – Oran) constitue une barrière naturelle à l'origine de la différenciation des populations atlantiques et méditerranéennes chez de nombreuses espèces marines, aussi bien des plantes (Alberto *et al.* 2008) que des animaux et en particulier les poissons (Naciri *et al.* 1999; Bremer *et al.* 2005; Larmuseau *et al.* 2009).

Les espèces ayant connu des expansions récentes de leurs populations ou caractérisées par d'importants taux de migrations ne présentent généralement pas de différenciation Atlantique-Méditerranée (Stamatis *et al.* 2004; Bargelloni *et al.*

2005), ce qui est cohérent avec une stabilité historique des populations d'esturgeons européens et de faibles échanges entre Atlantique et Méditerranée.

### Au sein de la zone atlantique

La différenciation au sein de la zone atlantique est difficile à estimer au vu du faible volume de données génétique disponible en dehors de la façade atlantique française. Le cas de la mer Baltique est à part, car *A. oxyrinchus* a probablement remplacé *A. sturio* dans la région au cours du dernier millénaire (voir partie II-C-2), expliquant l'absence d'échantillons récents. La question du remplacement total ou partiel d'*A. sturio* par *A. oxyrinchus* plus au sud (jusqu'à la Loire et éventuellement la Gironde) a été discuté dans la partie II-C-2.

Les populations au nord de la Gironde apparaissent moins variables au niveau mitochondrial, comparées aux populations ibériques : l'ancienne population baltique semble monomorphe, et les populations de la frontière espagnole à la mer du Nord ne sont pas beaucoup plus diverses, alors que les quelques échantillons espagnols analysés montrent une diversité élevée.

Comme discuté à la partie II-C-2, il est probable que la faible diversité observée à partir du golfe de Gascogne soit la conséquence d'une recolonisation post-glaciaire récente. Les populations sources à partir desquelles la recolonisation pourrait avoir eu lieu ne sont pas clairement identifiées, mais il s'agit selon toute vraisemblance des populations espagnoles (et peut-être de la Gironde si une population a subsisté dans ce bassin au cours de la dernière glaciation).

Une étude génétique approfondie des populations ibériques est nécessaire afin de valider cette hypothèse. Une telle étude permettrait également de valider la réalité de la séparation des populations atlantique et méditerranéo-pontiques. En effet, la différenciation marquée observée sur les microsatellites entre les populations méditerranéennes et les populations atlantiques françaises pourrait tout à fait être le résultat d'une drève génétique liée à la recolonisation post-glaciaire récente des fleuves septentrionaux de la façade atlantique (la drève ayant pour effet de différencier rapidement des populations qui ne le sont pas au départ ; voir par exemple Hoeck *et al.* 2010; Whiteley *et al.* 2010).

### Au sein de la zone méditerranéo-pontique

Une différenciation génétique existe au sein de la zone méditerranéo-pontique entre la Méditerranée occidentale, l'Adriatique et la Mer Noire.

La Mer Noire semble bien différenciée des deux autres régions analysées (haplotype majoritaire endémique au niveau mitochondrial, allèles microsatellites rares ailleurs) mais le volume de données génétiques disponibles pour cette région est trop faible pour que la différenciation soit statistiquement significative (expliquant l'absence de différenciation détectée sur les microsatellites avec le logiciel STRUCTURE, voir figure III-77). La faible diversité génétique (mitochondriale et nucléaire) et la différenciation par rapport aux autres régions pontiques pourrait être le résultat d'une colonisation récente de la Mer Noire à partir des populations méditerranéennes, par effet fondateur après l'établissement du contact entre la mer méditerranée et la mer Noire il y a environ 10 ka (Aksu *et al.* 2002).

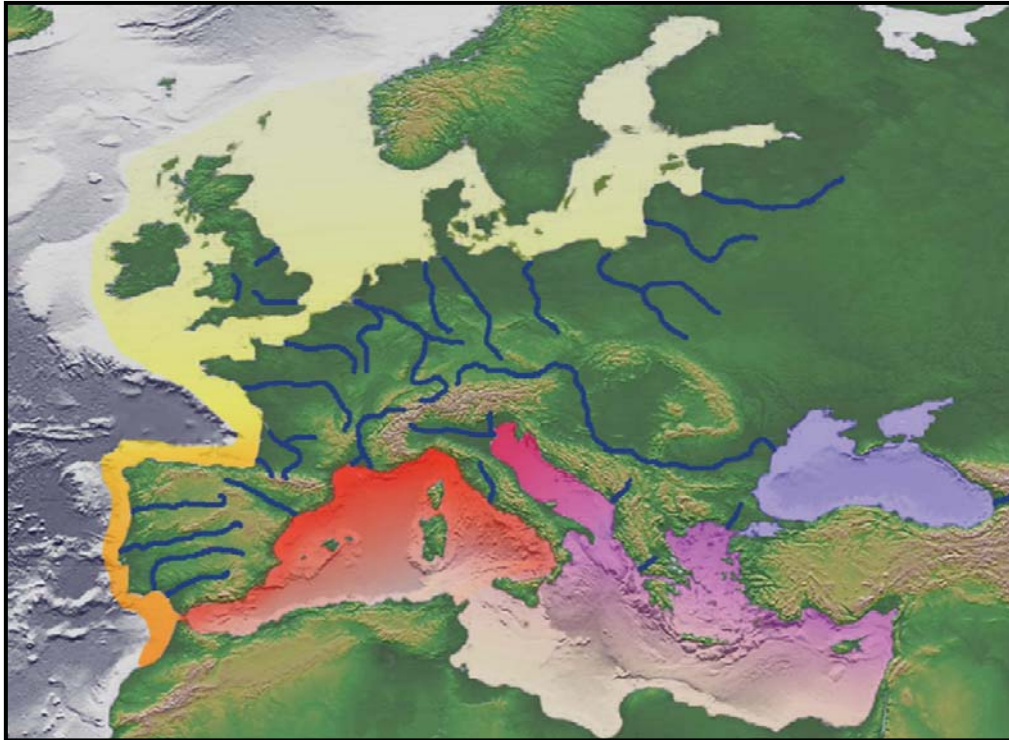
Tester cette hypothèse nécessite l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons de la Mer Noire, mais aussi et surtout de la Méditerranée orientale ; la similitude ou non des caractéristiques génétiques des esturgeons de la mer Egée (population du fleuve Evros par exemple) et de la mer Noire permettrait ainsi de trancher entre une colonisation récente de la mer Noire et une occupation plus ancienne. L'analyse d'échantillons de Méditerranée orientale permettrait également de tester l'hypothèse d'une différenciation génétique entre les zones occidentales et orientales de la Méditerranée. La difficulté principale est de trouver de tels échantillons, car le nombre de populations d'esturgeons en Méditerranée orientale était sans doute faible (Economidis *et al.* 2000) voir nul (Lassalle *et al.* 2010).

La différenciation entre Méditerranée occidentale et Adriatique est matérialisée par l'absence du clade mitochondrial A en Adriatique, par l'identification d'un nombre important d'haplotypes mitochondriaux et d'allèles microsatellites endémiques sur chacune des régions, et par des fréquences haplotypiques et alléliques différentes entre les deux régions (Figures III-64 à III-66 et III-72 à III-74).

L'esturgeon européen n'est pas une exception, les populations de Vertébrés marins étant fréquemment différenciées au sein de la zone méditerranéenne, les principales distinctions concernant Méditerranée occidentale / orientale, mer Méditerranée / mer Adriatique, et mer Méditerranée / mer Egée (voir par exemple

Borsa *et al.* 1997; Zardoya *et al.* 2004; Domingues *et al.* 2005; Rolland *et al.* 2007; Natoli *et al.* 2008; Maggio *et al.* 2009; Coll *et al.* 2010; Vinas *et al.* 2010).

Au vu des informations qualitatives que nous venons de voir, la représentation de la figure III-79 peut être modifiée pour tenir compte de nos hypothèses paléobiogéographiques : le résultat est présenté à la figure III-80.



**Figure III-80 :** Diversité génétique hypothétique d'*A. sturio* sur son aire de répartition historique : représentation quantitative et qualitative. Les couleurs différentes marquent schématiquement les différences de composition génétique, et l'intensité de la coloration marque le niveau de diversité.

### III-B-6-b Structuration géographique de la diversité génétique au niveau populationnel

#### ■ Une population, des populations : dimension spatiale

Chaque région biogéographique couvre un ensemble de bassins fluviaux dont certains étaient occupés par une population d'esturgeons européens, d'autres non (voir la figure I-10 pour une vision d'ensemble des populations historiques). Les

différentes régions considérées ne sont pas équivalentes en terme de nombre de populations et trois types de cas peuvent être distingués :

**1)** certaines régions – atlantique ibérique, atlantique + mer du Nord – comportaient un nombre important de populations. Les informations génétiques disponibles sont issues d'un sous-ensemble de ces populations, il serait donc nécessaire d'ajouter des échantillons correspondant aux populations manquantes afin d'avoir une vision plus représentative de ces régions (par exemple ajouter des individus de l'Adour et du Rhin pour la zone atlantique).

**2)** d'autres régions – Méditerranée occidentale, Adriatique – comportaient un faible nombre de populations, avec un ou deux bassins majeurs représentant sans doute l'écrasante majorité des effectifs. Nous avons échantillonné le Rhône et le Tibre en Méditerranée occidentale, le Pô et l'Adige en Adriatique : il est donc vraisemblable que la diversité modale de ces régions ait été bien appréhendée. L'ajout d'échantillons de l'Ebre en Espagne et de la Buna en Adriatique permettrait toutefois de décrire plus précisément la diversité intrarégionale.

**3)** enfin les régions restantes – Méditerranée orientale, mer Noire, mer Baltique – comportaient un faible nombre de populations, dont les effectifs étaient sans doute faibles. L'esturgeon européen était l'espèce d'esturgeon la plus rare en mer Noire (Bacalbasa-Dobrovici & Holcik 2000), et il n'est pas garanti que des populations fonctionnelles aient existé de façon permanente en Méditerranée orientale (Lassalle *et al.* 2010). Enfin, sa présence récente en mer Baltique n'est pas attestée (présence concurrente d'*A. oxyrinchus* ; Ludwig *et al.* 2002b). Tout échantillon est bon à prendre afin de mieux caractériser la présence d'*A. sturio* dans ces régions, les spécimens de musée que nous avons analysés en provenance de la Mer Noire ont une importance toute particulière.

### ■ Une population, des populations : dimension temporelle

Une population d'esturgeons présente à l'instant t dans un bassin donné peut disparaître ou être remplacée par une autre population à l'instant t+1. Les évènements climatiques, géologiques et la compétition intra- ou interspécifique peuvent être à l'origine de telles variations.

Hormis pour le remplacement de la population baltique par *A. oxyrinchus*, aucune donnée ne permet de postuler que de tels phénomènes ont eu lieu sur les populations d'esturgeons européens au cours des trois derniers millénaires. Si de tels remplacements ont eu lieu au niveau intraspécifique, ils se sont de toute façon probablement réalisés localement, l'installation d'une nouvelle population se faisant selon toute vraisemblance à partir des populations voisines les plus proches. Ainsi, si la composition génétique à l'échelle de la population peut avoir changé au cours des trois derniers millénaires, elle a peu varié à l'échelle de la région biogéographique.

### ■ Informations populationnelles

Mis à part pour le Rhône (dont la situation sera discutée à la partie III-C), le nombre d'échantillons analysé par bassin fluvial est faible. Les interprétations au niveau populationnel sont donc limitées, mais il est tout de même possible de tirer certaines informations sur :

1) la présence / absence d'une population d'esturgeons dans un fleuve ou une zone donnée. La composition génétique particulière des esturgeons du Tibre par exemple soutient la présence d'une population dans ce bassin. L'identification de séquences d'ADN spécifique d'*A. sturio* dans le Danube et en mer Noire confirme la présence de l'espèce sous forme de peuplements fonctionnels dans cette zone. La découverte de deux *A. sturio* et deux *A. oxyrinchus* en Loire permet d'envisager l'existence de populations d'esturgeons dans ce bassin, qui est considéré par Lassalle *et al.* (2010) comme transitoire ; la présence historique d'esturgeons en Loire est par ailleurs attestée par l'exhumation d'ossements datant du Moyen-Âge au château d'Angers (Museum d'Histoire Naturelle 2010).

2) la différenciation des populations d'esturgeons à l'échelle régionale. Les échantillons des 19<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> siècles du Tibre sont génétiquement différents de ceux du Rhône ; cette différenciation est à confirmer par l'étude d'un plus grand nombre d'échantillons. La fidélité des esturgeons à leur fleuve natal explique probablement cette différenciation.



### III-B-6-c Origine de la diversité génétique et facteurs ayant influencé sa répartition

#### ■ L'origine de la diversité est ancienne

D'après les estimations réalisées à partir de la région de contrôle, l'origine de la diversité génétique mitochondriale actuelle de l'esturgeon européen remonte entre 1,5 et 15 Ma, avec une valeur probable aux environs de 6 Ma (Tableau III-12). Ce chiffre est vraisemblablement surestimé en raison de la divergence précoce d'*A. oxyrinchus* par rapport à *A. sturio*, mais il permet d'apprécier l'échelle de temps à laquelle les changements génétiques profonds se sont déroulés. Le faible taux d'évolution observé sur la région de contrôle (0,4% par Ma) explique la détection possible d'évènements évolutifs anciens.

La période de diversification au sein d'*A. sturio* correspond approximativement à la crise Messinienne, caractérisée par la dessiccation de la mer Méditerranée à la fin du Miocène entre 5,96 et 5,33 Ma (Hsu *et al.* 1973; Krijgsman *et al.* 1999). Cet assèchement temporaire, lié à la fermeture des connections avec l'océan atlantique (Duggen *et al.* 2003), a profondément modifié l'écosystème marin méditerranéen. Dans un premier temps (5,96 à 5,59 Ma) la connection à l'océan Atlantique s'est réduite sans être coupée, provoquant une augmentation de la salinité défavorable aux espèces non résistantes (Rouchy & Caruso 2006), accompagnée d'un dépôt massif d'évaporites. Dans un second temps (5,59 à 5,33 Ma), la relation avec l'océan Atlantique a été rompu entraînant l'assèchement presque total de la Méditerranée, qui se serait alors transformée en un réseau de lac d'eaux plus ou moins douces (« lago mare ») alimenté par la convergence des fleuves majeurs que sont l'Ebre, le Rhône, le Pô et le Nil (Krijgsman *et al.* 1999) : les espèces purement marines ont alors probablement toutes disparues, alors que les espèces dulçaquicoles ont pu migrer facilement au sein du bassin méditerranéen (Tsigenopoulos *et al.* 2003). Avec l'ouverture du détroit de Gibraltar (vers 5,33 Ma), les eaux atlantiques ont pu à nouveau s'engouffrer en Méditerranée, dont le remplissage s'est probablement déroulé en quelques mois ou quelques années seulement (Blanc 2002; Garcia-Castellanos *et al.* 2009) : les espèces marines ont alors pu réinvestir la région à partir de l'océan atlantique, alors que les espèces d'eau douce ont été fragmentées par la brusque hausse du niveau marin.

Concernant l'esturgeon européen, deux hypothèses sont envisageables :

- 1) soit les populations méditerranéennes ont disparues durant la crise messinienne, l'espèce ne devant sa survie qu'à l'existence de populations sur la façade atlantique. Dans ce cas, la recolonisation de la Méditerranée à la fin de la crise se serait produite à partir de ces populations atlantiques, par un effet fondateur à grande échelle, suivie d'une diversification importante ;
- 2) soit les populations méditerranéennes ont survécu au sein du réseau de lacs plus ou moins saumâtres. Les distances entre les embouchures des fleuves étant réduites, les échanges entre populations auraient alors été favorisés.

Dans les deux cas, la crise messinienne a été accompagnée d'évènements démographiques majeurs, dont la trace génétique profonde est encore visible aujourd'hui.

### ■ Impact des phénomènes récents sur la répartition de la diversité génétique

#### Les glaciations quaternaires : climat et eustatisme

Le Pléistocène (2,59-0,01 Ma BP) est caractérisé par une succession de périodes glaciaires froides et de périodes interglaciaires plus chaudes (Petit *et al.* 1999; Ehlers & Gibbard 2007). Durant les périodes glaciaires, le permafrost et les calottes de glace s'étendaient sur la portion septentrionale des continents américains et eurasiatiques et une partie du plateau continental était émergée du fait de la baisse du niveau marin (VanAndel & Tzedakis 1996).

Les périodes glaciaires ont eu un impact majeur sur les espèces animales, entraînant des modifications importantes de leur distribution, accompagnées de migrations et de variations démographiques significatives (Hofreiter & Stewart 2009). La répartition actuelle de la diversité génétique est ainsi marquée par les variations climatiques du Pléistocène pour beaucoup d'espèces terrestres (Hewitt 1996; Taberlet *et al.* 1998) et aquatiques (Bernatchez & Wilson 1998). Chaque évènement climatique estompant les conséquences du précédent, l'empreinte la plus visible dans les populations actuelles correspond souvent à celle du dernier maximum glaciaire (LGM ; 30-25 ka BP) (Hofreiter *et al.* 2004).

Lors du LGM, les températures de surface en Europe étaient beaucoup plus froides qu'actuellement, avec une saisonnalité très marquée (Denton *et al.* 2005; Clark *et al.* 2009). Le permafrost atteignait 45-50°N, des calottes de glace couvraient le bouclier scandinave, les îles britanniques et les massifs montagneux, la banquise atteignait probablement la Bretagne et la plupart de fleuves européens étaient gelés pendant l'hiver (Renssen & Vandenberghe 2003; Toucanne *et al.* 2009). De plus, le niveau marin était inférieur de 120 m comparé à l'actuel (Lambeck & Chappell 2001; Clark *et al.* 2009), avec pour conséquences une émergence de la mer Baltique, de la mer du Nord et d'une partie de la mer Adriatique (VanAndel & Tzedakis 1996), ainsi que la déconnexion de la mer Noire et de la mer Méditerranée (Major *et al.* 2006).

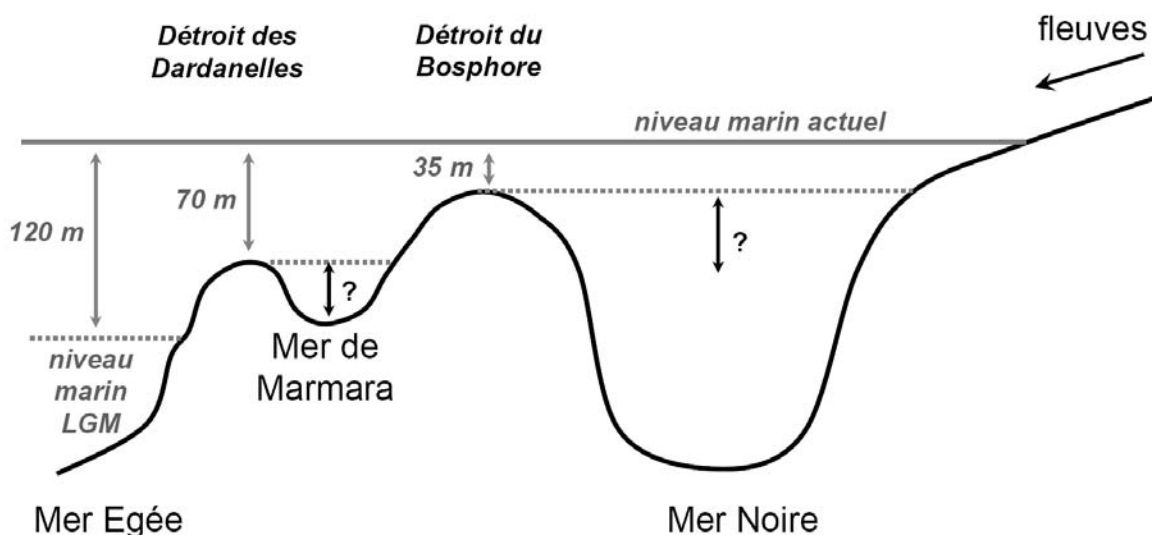
Ces conditions ont profondément affecté les esturgeons :

1) la zone atlantique - Europe du Nord se résumait à quelques fleuves (Adour, Gironde-Garonne-Dordogne, Loire et fleuve Manche ; Toucanne *et al.* 2009), gelés l'hiver et sans doute trop froids le reste de l'année pour permettre la reproduction des esturgeons. Le fleuve le plus septentrional au sein duquel les esturgeons ont survécu pourrait être un des fleuves ibériques, ou peut-être l'Adour ou la Gironde. Lors de la déglaciation, c'est à partir de ces populations survivantes que les fleuves gelés pendant le LGM ont été recolonisés. La faible diversité génétique observée au nord de la péninsule ibérique et à partir de la Gironde soutient cette hypothèse.

La recolonisation des régions gelées durant le LGM s'est probablement déroulée progressivement avec le réchauffement du climat et la remontée du niveau marin. Elle a vraisemblablement débutée après 18 ka BP et la fin de la décharge massive des eaux de fonte glaciaires par l'intermédiaire du fleuve Manche et du paléo-Elbe (Toucanne *et al.* 2010). Le fleuve Manche drainait les eaux de la Seine, de la Tamise et du Rhin (plus les eaux de l'Elbe quand celui-ci ne se déversait pas vers le nord, ce qui est arrivé périodiquement durant la déglaciation) ; avec la remontée du niveau marin, ses anciens affluents devenus fleuves sont venus arroser la mer du Nord, dont l'immersion s'est terminée vers 10-8 ka BP (Streif 2004). L'histoire de la Baltique se résume quant à elle en trois grandes phases : immense lac glaciaire recevant les eaux de fonte du glacier scandinave (18-12 ka), la région s'est ensuite transformée en un réseau complexes de bassins plus ou moins connectés (12-8 ka), avant de devenir la mer actuelle suite à la submersion du détroit

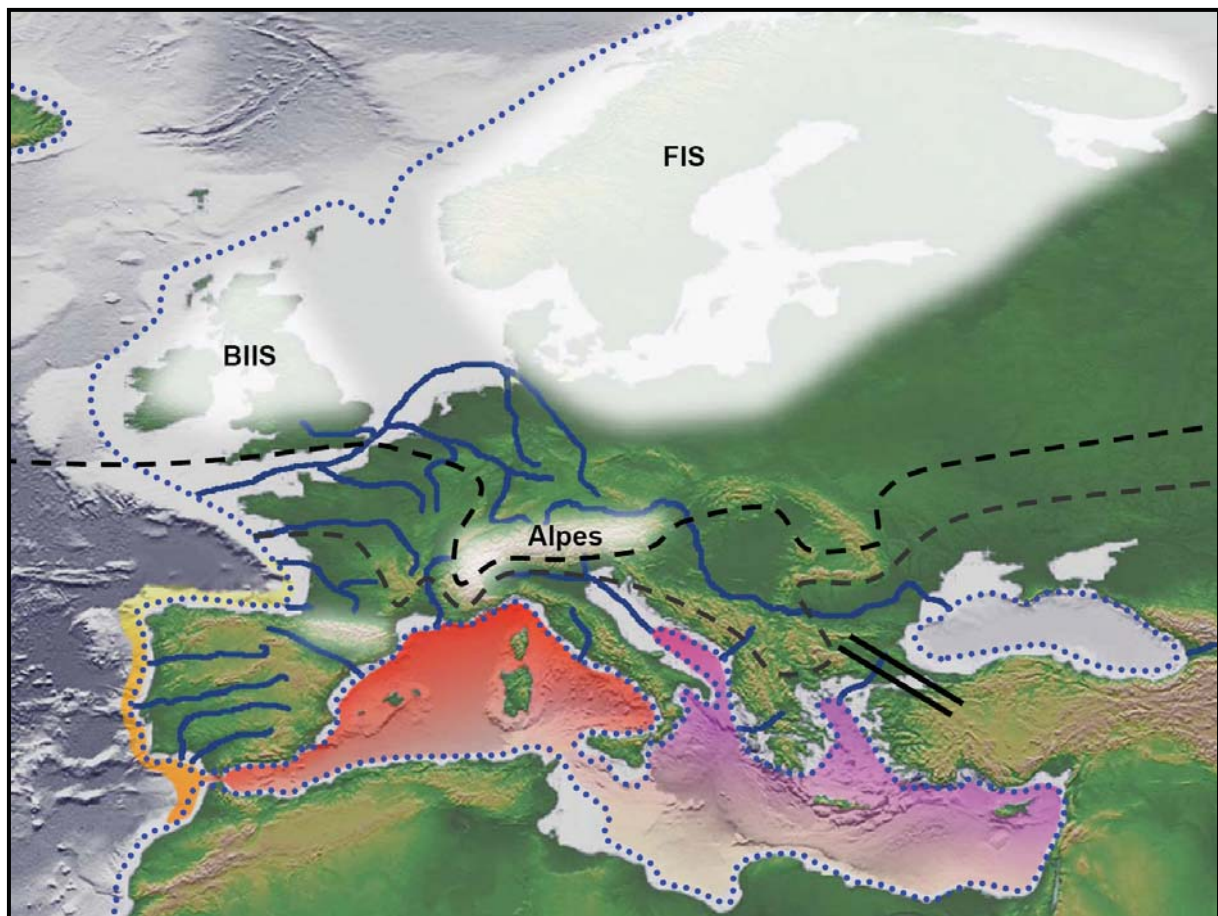
d'Oresund par les eaux océaniques vers 8 ka (Bjorck 1995). La colonisation de la mer du Nord par les esturgeons a donc chronologiquement précédée celle de la Baltique.

2) l'abaissement du niveau de la mer de 120 m par rapport au niveau actuel durant le LGM a conduit à une réduction de la largeur des détroits méditerranéens (Gibraltar, Sicile, Otrante) et à l'émersion des détroits séparant la mer Noire et la mer Méditerranée (Dardanelles, Bosphore ; figure III-81). Les échanges entre les régions ont donc été limités durant la dernière glaciation, renforçant la différenciation génétique. La subsistance d'esturgeons européens en mer Noire pendant la glaciation est envisageable, car elle était connectée à la Méditerranée durant l'interglaciaire précédent. Dans le cas où l'esturgeon européen n'était pas présent en mer Noire à la fin du LGM (soit parce qu'il n'y était pas lors de la fermeture des détroits, soit parce qu'il a disparu localement pendant la phase lacustre de la mer Noire qui a accompagnée le LGM), il a pu coloniser la zone lors de la réouverture des détroits qui s'est produite lors de la remontée du niveau marin il y a environ 10 ka BP (Ryan *et al.* 1997; Major *et al.* 2006; Lericolais *et al.* 2009). La colonisation se serait alors opérée à partir des populations de la mer Egée.



**Figure III-81 :** Relation entre la mer Noire et la mer Méditerranée. Le niveau marin lors du LGM (pointillés gris) était 120 m plus bas qu'aujourd'hui (trait plein gris), entraînant une émigration des détroits. La mer Noire et la mer de Marmara étant alors coupées du système océanique, elles sont devenues des lacs d'eau douce, dont le niveau dépendait des apports des fleuves bordiers.

3) l'abaissement du niveau marin durant le LGM a également conduit à une réduction de l'étendue du plateau continental immergé, et à une transition plus rapide entre la côte et les grandes profondeurs. Or les esturgeons – lors de leur phase marine – se nourrissent uniquement sur le plateau continental, à des profondeurs relativement faibles ne dépassant pas 100 m. Les aires favorables à l'alimentation des adultes ont donc diminué pendant le LGM, ce qui a pu conduire à une diminution des effectifs.



**Figure III-82 :** Répartition probable des esturgeons européens lors du dernier maximum glaciaire (30-25 ka BP). Les glaciers sont indiqués par une chape blanche (FIS : calotte scandinave, BIIS : calotte des îles britanniques), la limite sud du permafrost continu par des tirets noirs et la limite sud du permafrost discontinu par des tirets gris. Le trait de côte est marqué par des tirets bleus et le tracé des fleuves a été prolongé sur le plateau continental émergé. Les couleurs et leur intensité marquent de la même façon que dans la figure III-80 les aspects qualitatifs et quantitatifs de la diversité génétique supposée de l'époque.

### Compétition interspécifique

Nous en avons discuté à la partie II-C-2, les interactions entre *A. oxyrinchus* et *A. sturio* ont probablement influencé la répartition historique des deux espèces en Europe du Nord (répartition dont les modalités spatio-temporelles ne sont d'ailleurs pas encore totalement élucidées). L'arrivée d'*A. oxyrinchus* en Europe étant vraisemblablement concomitante de la déglaciation, et les deux espèces ayant des caractéristiques écologiques relativement proches, les deux espèces sont sans doute entrées en compétition pour la colonisation des habitats libérés des glaces. *A. oxyrinchus* aurait été favorisé par sa plus grande tolérance aux conditions climatiques froides, *A. sturio* étant quant à lui favorisé par la proximité de populations importantes établies plus au sud (permettant un flux migratoire constant, même si probablement faible). La compétition interspécifique avec *A. oxyrinchus* a pu (i) prévenir la colonisation de certains fleuves par *A. sturio*, (ii) conduire au remplacement local d'*A. sturio* par *A. oxyrinchus* et/ou (iii) à la limitation des effectifs des populations d'*A. sturio* en compétition avec *A. oxyrinchus*.

De nouvelles données archéologiques permettront certainement très prochainement de clarifier les relations entre les deux espèces en mer du Nord et en France.

En mer Noire, *A. sturio* était l'espèce la moins fréquente parmi six (les cinq autres étant *A. ruthenus*, *A. gueldenstaedtii*, *A. stellatus*, *A. nudiventris* et *H. huso*). Si *A. sturio* est arrivé en mer Noire lors de l'ouverture des détroits il y a 8 ka, son installation permanente dans la région a vraisemblablement été conditionnée par l'utilisation d'une niche écologique inexploitée ou partiellement exploitée par les autres espèces.

### Anthropisation

Le facteur qui a eu le plus d'impact sur la répartition actuelle de la diversité génétique de l'esturgeon européen est bien entendu l'Homme. Par ses actions, il a entraîné la disparition de toutes les populations sauf celle de Gironde. Plus de 75% de la diversité nucléaire et plus de 95% de la diversité mitochondriale de l'espèce ont ainsi été érodé par sa faute en quelques siècles.

L'impact humain est tellement important qu'il a effacé quasiment toutes les traces génétiques des événements évolutifs antérieurs, qui sont désormais principalement accessibles par le biais de la paléogénétique.

### ■ Bilan

Pour résumer, la diversité génétique qui était présente sur l'aire de répartition historique de l'esturgeon européen a une origine ancienne. Cette diversité a été remodelée par des événements récents – par exemple les glaciations Pléistocènes – et a été quasiment totalement perdue sous l'action anthropique.

### III-B-6-d Comparaison avec *A. oxyrinchus* en Amérique

#### ■ Répartition de la diversité génétique chez *A. oxyrinchus*

Les populations américaines d'*A. oxyrinchus* étant encore relativement nombreuses, la diversité génétique de l'espèce est relativement mieux connue que pour *A. sturio* (Figure III-83).



**Figure III-83 :** Répartition de la diversité génétique d'*A. oxyrinchus* sur son aire de répartition actuelle. La couleur rouge marque *A. o. oxyrinchus*, la couleur violette *A. o. desotoi*. Construit à partir des données de Waldman *et al.* (2002) et Grunwald *et al.* (2007).

Les populations septentrionales occupant les fleuves gelés durant la dernière glaciation – du Saint-Laurent à l'Hudson – sont génétiquement peu diverses. L'haplotype mitochondrial majoritaire chez *A. oxyrinchus* se retrouve fixé dans ces populations nordiques (Wirgin *et al.* 2000), et la diversité microsatellite y est faible (Wirgin *et al.* 2002). La recolonisation post-glaciaire de ces fleuves se serait déroulée

par effet fondateur il y a environ 10-12 ka BP. Le cas de l'Hudson est un peu particulier dans le sens où la diversité génétique n'y est pas aussi faible que dans le Saint-Laurent, le Saint-John ou la Kennebec (Wirgin *et al.* 2000; Wirgin *et al.* 2002).

Les autres populations de la façade atlantique montrent une diversité génétique importante, croissante vers le sud. Le nombre d'haplotypes mitochondriaux différent atteint 18 dans le fleuve Savannah en Caroline du Sud (Grunwald *et al.* 2007).

Les populations du Golfe du Mexique sont géographiquement séparées des populations atlantiques par la pointe de Floride. Elles sont génétiquement différenciées puisqu'elles appartiennent à la sous-espèce *A. oxyrinchus desotoi* (Waldman *et al.* 2002 ; voir la figure 2 de l'article n°2).

### ■ Parallèle avec *A. sturio*

La marge nord de la distribution des deux espèces – populations canadiennes d'*A. oxyrinchus*, populations nord européennes d'*A. sturio* – présente une faible diversité génétique, probablement en liaison avec la recolonisation post-glaciaire. La population la plus septentrionale ayant survécu à la dernière glaciation pourrait être l'Hudson pour *A. oxyrinchus* et la Gironde pour *A. sturio*.

La diversité génétique est maximale au cœur de la distribution pour les deux espèces, de la Floride à New York pour *A. oxyrinchus*, et de l'Ibérie à l'Adriatique pour *A. sturio*. Au sein de ce cœur, différentes zones – où la diversité est qualitativement variable – se différencient pour chacune des deux espèces.

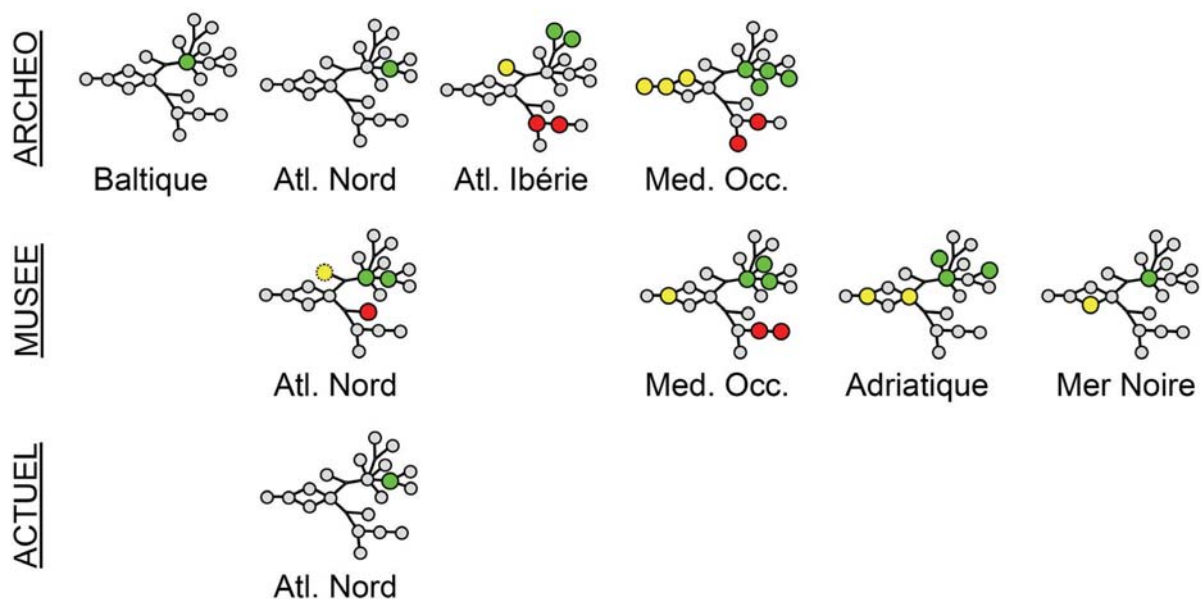
Enfin, un bassin plus ou moins isolé – le Golfe du Mexique pour *A. oxyrinchus*, la mer Noire pour *A. sturio* – est présent à la marge de la distribution. Cette zone présente une spécificité marquée pour *A. oxyrinchus* (sous-espèce *A. o. desotoi*), beaucoup moins pour *A. sturio*, suggérant un isolement ancien dans le premier cas, et plus récent dans le second.



### III-C SUIVI DANS LE TEMPS DE LA POPULATION RHODANIENNE

Nous l'avons vu, les échantillons d'*A. sturio* analysés au niveau génétique ne sont pas répartis de façon homogène dans le temps et l'espace.

Seules les zones atlantique - Europe du Nord et Méditerranée occidentale peuvent faire l'objet de comparaison temporelle (Figure III-84). Les contributions des bassins Gironde-Garonne-Dordogne et Rhône au sein de ces zones sont les plus importantes, nous allons donc nous intéresser à ces deux populations. Le nombre d'échantillons anciens étant beaucoup plus faible pour la Gironde, nous allons nous focaliser sur le cas du Rhône.



**Figure III-84 :** Disponibilité spatio-temporelle des résultats mitochondriaux sur *A. sturio*. Visualisation sur le réseau de la figure III-61 (mêmes couleurs, même orientation) des haplotypes présents dans chaque région pour les échantillons archéologiques, les échantillons de musée et les échantillons actuels. Les haplotypes grisés sont absents pour la période et la zone considérée.

### ***III-C-1 DONNEES HISTORIQUES SUR LA POPULATION DU RHONE***

#### III-C-1-a Jadis une population florissante

##### ■ Références historiques

La présence de l'esturgeon dans le Rhône est rapportée dans des textes du Moyen-Âge. Signe de sa valeur, les premiers esturgeons pêchés au printemps (lors de la migration de reproduction vers l'amont) devaient être remis en titre de redevance aux comtes de Provence (Vial 1904 ; Brosse *et al.* 2009b) ou aux abbayes locales, dont celle de Montmajour (De Marin de Carranrais 1877).

L'esturgeon était commun à cette époque : Cloquet (1819b) fait en effet référence à la charte d'Estiennette, comtesse de Provence, qui en 1063 mentionne la présence sur le Rhône de bateaux spécialement dédiés à la pêche à l'esturgeon.

##### ■ Données archéologiques

Des milliers d'ossements d'esturgeon datant du 6<sup>e</sup> au 2<sup>e</sup> siècle avant notre ère ont été exhumés sur le site du *Jardin d'Hiver* à Arles (au bord du Rhône, à 50 km de l'embouchure). Ces restes correspondent probablement à plusieurs centaines d'individus pêchés dans le Rhône, indiquant une population conséquente et une pêche importante dès l'Antiquité. L'analyse morphométrique de 70 pièces osseuses uniques montre que la moitié des esturgeons pêchés étaient adultes et qu'un tiers d'entre eux avait probablement plus de 25 ans, suggérant l'absence de surpêche (Desse-Berset 1994).

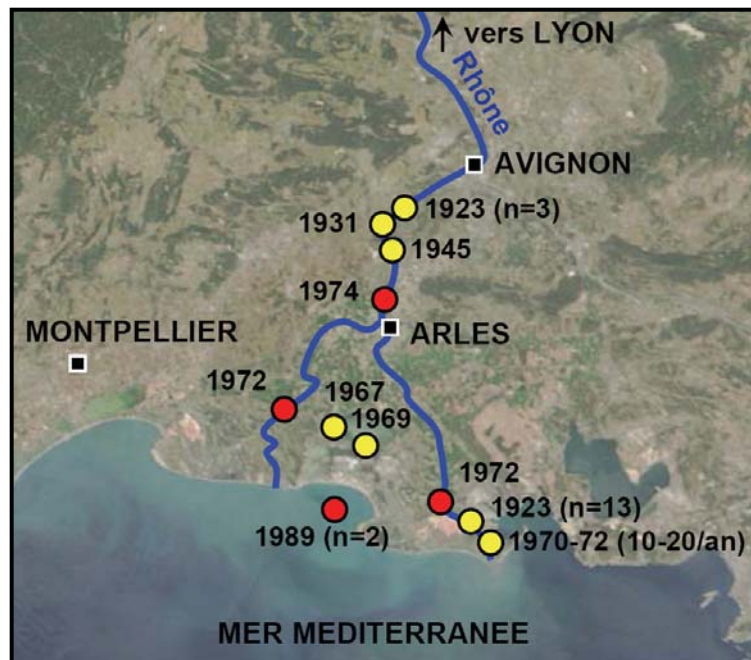
#### III-C-1-b Une extinction rapide

##### ■ De la baisse des captures à l'extinction

Au 19<sup>e</sup> siècle, plusieurs centaines d'esturgeons étaient encore capturés annuellement dans le Rhône au printemps. Ce chiffre est tombé à une centaine d'individus en 1876, puis à une dizaine par an au début du 20<sup>e</sup> siècle (Guénaux 1923 cité dans Desse-Berset, 1994). Les captures sont ensuite devenues irrégulières jusqu'à l'extinction de la population : les derniers juvéniles ont été observés dans le

Rhône au début des années 1970 et le dernier adulte en 1974 (Figure III-85). Deux esturgeons adultes ont également été capturés en 1989 au large du delta du Rhône.

La dernière reproduction s'est donc probablement déroulée à la fin des années 1960 ou au début des années 1970. A partir de là, la population a perdu sa fonctionnalité et s'est éteinte.



**Figure III-85 :** Relevé des dernières captures d'esturgeons du Rhône (modifié d'après Tabardel 1994 ; Brosse *et al.* 2009). Les points rouges marquent les captures d'adultes, les points jaunes les captures de juvéniles et subadultes.

### ■ Causes de l'extinction

Comme pour les autres populations d'esturgeons européens, la diminution des effectifs dans le Rhône est principalement liée (i) à la surpêche et (ii) à la destruction de l'habitat (Gessner 2000).

Nous l'avons vu, la pêche à l'esturgeon sur le Rhône était déjà importante dans l'Antiquité et au Moyen-Âge. Avec l'industrialisation et l'absence de régulation des pêches, la pression sur les esturgeons s'est faite de plus en plus forte à partir du 19<sup>e</sup> siècle, conduisant au déclin.

Parallèlement à cette industrialisation de la pêche, le Rhône a subi une anthropisation intense. A partir de la fin du 18<sup>e</sup> siècle, des travaux ont été entrepris afin de stabiliser le cours du fleuve et de permettre sa navigabilité (Blanchard 1920), et l'aménagement s'est généralisé à partir de la fin du 19<sup>e</sup> et au 20<sup>e</sup> siècle. Le premier aménagement hydroélectrique en aval des Alpes est réalisé à Cusset en 1899 (quelques kilomètres en amont de Lyon); une vingtaine d'autres aménagements sont construits au cours du 20<sup>e</sup> siècle sous l'impulsion de la Compagnie Nationale du Rhône, conduisant à la canalisation du fleuve en 21 paliers successifs (Bouchet 1980). Les barrages limitant la remontée des poissons et modifiant le régime du fleuve (diminution des courants et du transport de sédiments), ils ont conduit à une réduction des aires favorables à la reproduction des esturgeons. A noter que le premier aménagement rencontré en partant de l'embouchure est celui de Vallabrègues; situé entre Avignon et Arles à environ 70 km de la mer, cet aménagement a été achevé en 1970, période correspondant aux dernières reproductions d'esturgeons dans le Rhône.

L'industrie et l'agriculture ont également participé à la réduction de l'habitat favorable aux esturgeons. Les frayères des esturgeons correspondent en effet généralement à des zones où le substrat est granuleux et où le courant est compris entre 0,5 et 2 m.s<sup>-1</sup> (Jego *et al.* 2002): plusieurs millions de m<sup>3</sup> de graviers ont été extraits du Rhône annuellement depuis le début du 20<sup>e</sup> siècle, détruisant probablement la majorité des frayères. De plus, l'irrigation et l'industrie prélèvent chaque année d'importants volumes d'eau, réduisant le débit du fleuve dans sa partie aval. Enfin, la pollution engendrée par l'utilisation des engrais, des pesticides et par l'industrie chimique n'a sans doute pas non plus été favorable aux esturgeons.

### **III-C-2 ECHANTILLONS BIOLOGIQUES DISPONIBLES SUR LE RHONE**

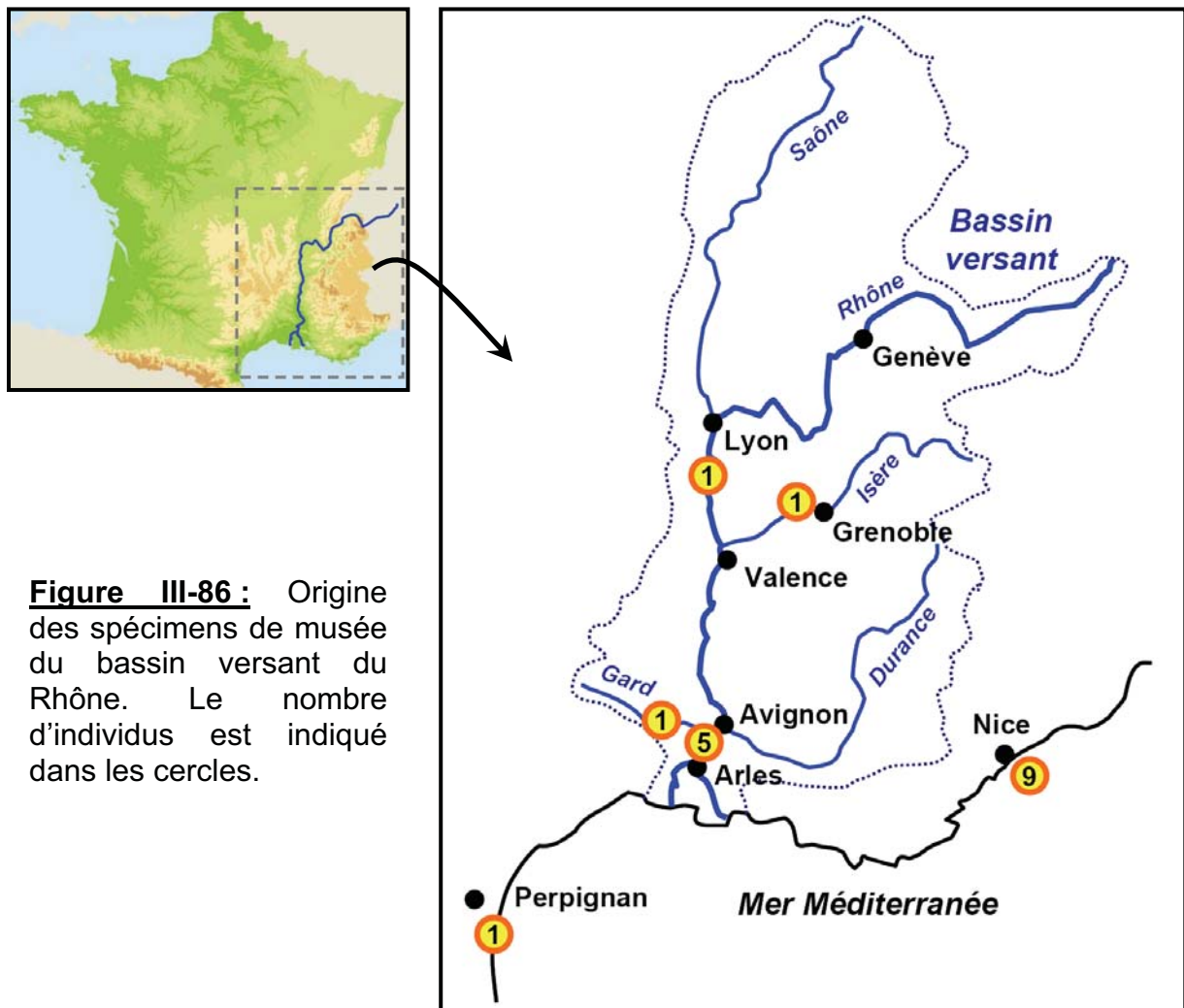
#### III-C-2-a Spécimens de muséum, naturalisés ou alcoolisés

##### ■ Liste des spécimens

18 esturgeons des 19<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> siècles ont été échantillonnés dans les collections zoologiques des muséums d'histoire naturelle: huit spécimens ont été capturés dans le Rhône et ses affluents, et dix en mer Méditerranée à moins de

200 km de l'embouchure du fleuve (Figure III-86). La liste correspond au dataset de l'article n°5 (portion concernant les échantillons de musée) dans l'annexe 3.

La recherche de spécimens rhodaniens a été exhaustive (Brosse *et al.* 2009b ; cette thèse) : nous avons probablement échantillonné la majorité sinon la totalité des individus conservés dans les collections zoologiques disponibles.



### ■ Précisions sur le lieu de capture

Les individus capturés dans le Rhône ou ses affluents appartiennent avec certitude à la population rhodanienne.

Ceux capturés en mer appartiennent probablement à cette population mais pourraient également provenir de populations voisines telles que celles de l'Ebre ou du Tibre. Lors des analyses à suivre, nous avons postulé qu'ils provenaient de la population du Rhône.

### III-C-2-b Restes archéologiques

#### ■ Quatre sites archéologiques différents

##### Site du Jardin d'Hiver, ville d'Arles

Le site archéologique du *Jardin d'Hiver* correspond à la ville préromaine d'Arles, créée par les Phocéens ou les Massaliotes (Heijmans & Sintès 1994). Le site est situé sur les bords du Rhône (Figure III-87), et son occupation couvre un peu plus de trois siècles, de 525 jusqu'à 175 av. J.-C. Le quartier fut ensuite probablement abandonné jusqu'à la colonisation romaine vers 45 av. J.-C. (Arcelin *et al.* 1999).

Plus de 2 500 restes osseux d'esturgeons ont été exhumés du site du Jardin d'Hiver, couvrant l'ensemble de la période d'occupation préromaine. Leur analyse archéozoologique a permis de mettre en évidence une population d'esturgeons relativement équilibrée et soumise à une pêche peu sélective (Desse-Berset 1994). Les pièces retrouvées (os des nageoires et plaques dermiques essentiellement) indiquent une préparation locale, les esturgeons ont donc très probablement été pêchés à proximité, dans le Rhône.

Les analyses génétiques ont été réalisées sur 41 ossements d'esturgeons correspondant à 41 individus différents, sélectionnés sur des critères archéozoologiques et stratigraphiques par Nathalie Desse-Berset (Université de Nice Sophia-Antipolis, France)

##### Site de Lattara, ville de Lattes

Le site archéologique de *Lattara* correspond à un comptoir Etrusque ou Massaliote situé dans la plaine deltaïque du Lez, fleuve côtier mineur débouchant sur la mer Méditerranée à une cinquantaine de kilomètres à l'ouest du Rhône (Figure III-87). L'occupation du site s'étend du 6<sup>e</sup> siècle av. J.-C. au 2<sup>e</sup> siècle ap. J.-C. (Py & Garcia 1993).

De nombreux restes de poissons ont été exhumés sur le site, témoignant d'une pêche en milieu lagunaire jusqu'au début du 1<sup>er</sup> siècle av. J.-C. puis d'une pêche plutôt maritime ensuite (Sternberg 1998). Les restes d'esturgeons sont peu représentés sur le site (une quinzaine d'écailles environ) et correspondent donc

probablement à une pêche accidentelle dans le Lez, la lagune ou la mer Méditerranée proche.

Les analyses génétiques ont portées sur cinq restes d'esturgeons correspondant à cinq individus différents, sélectionnés sur des critères archéozoologiques et stratigraphiques par Gaël Piquès (Université Montpellier 3, France).

### Site du Parc Saint-Georges, ville de Lyon

Le site archéologique du Parc Saint-Georges à Lyon correspond au comblement d'un ancien bras de la Saône pendant la période romaine, au cours du 3<sup>e</sup> siècle ap. J.-C. (Figure III-87). La présence d'un port à cet endroit est attestée par la découverte de nombreuses amphores et de bateaux à fond plat (Gaël Piquès, communication personnelle).

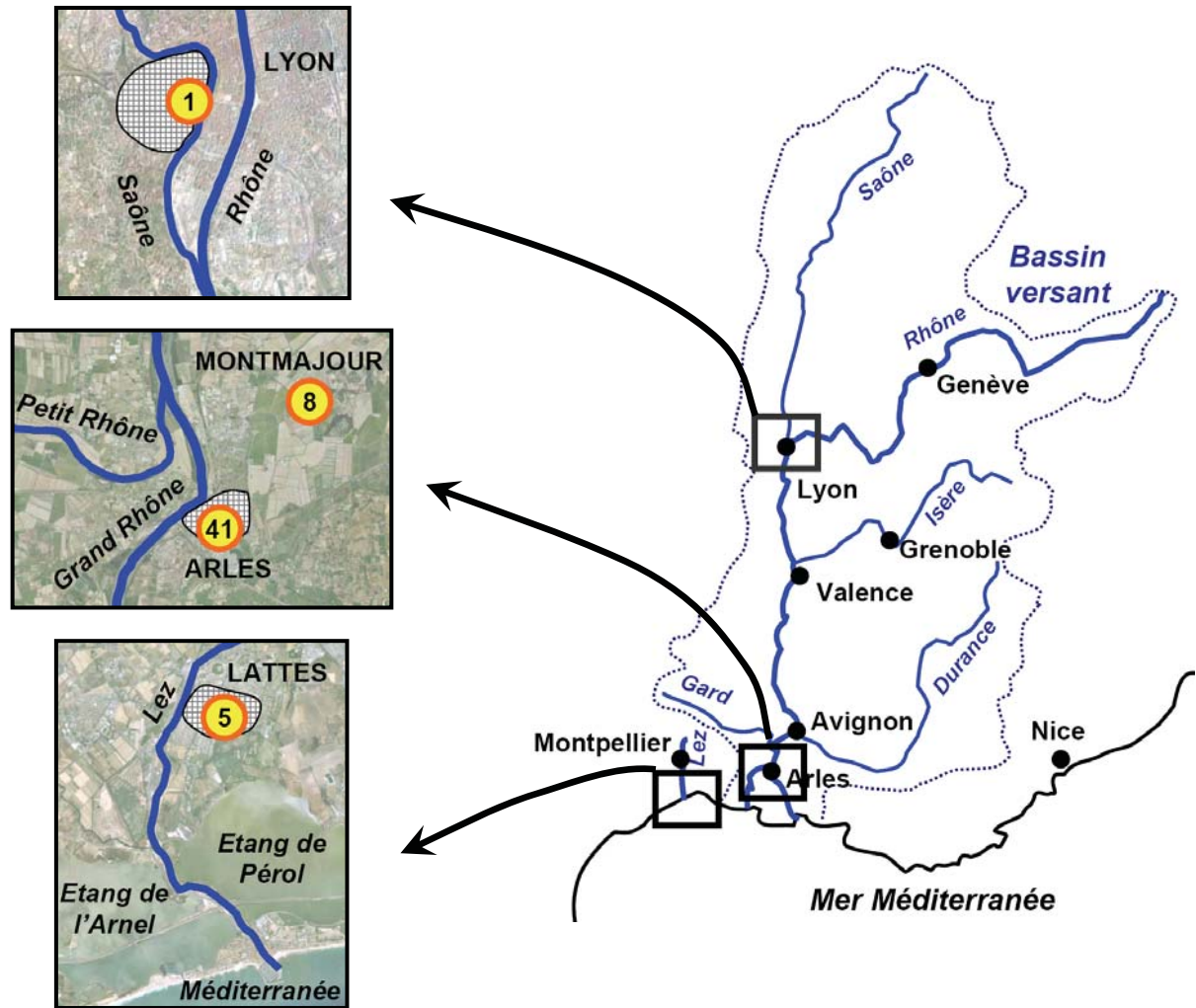
14 fragments d'aiguillon pectoral d'esturgeon ont été découverts sur ce site, provenant probablement de la même pièce et correspondant donc à un seul individu. Un seul fragment a été utilisé pour les analyses génétiques. L'origine de cet esturgeon est incertaine : il pourrait s'agir d'un poisson pêché localement dans la Saône ou le Rhône, ou bien d'un reste importé (par exemple une salaison) provenant de la partie aval du Rhône.

### Site de Montmajour, ville d'Arles

Le site archéologique de Montmajour est associé à l'abbaye du même nom, située à proximité de la ville d'Arles (Figure III-87).

Huit échantillons correspondant à huit individus différents ont été sélectionnés sur des critères archéozoologiques et stratigraphiques par Nathalie Desse-Berset. Ces échantillons datent du 4<sup>e</sup> au 18<sup>e</sup> siècle de notre ère et correspondent probablement aux restes d'esturgeons préparés localement par les moines. Il est possible que ces esturgeons correspondent à ceux donnés par les pêcheurs en redevance (De Marin de Carranrais 1877)

La liste des échantillons archéologiques disponibles sur le Rhône correspond au jeu de données de l'article n°5 (portion concernant les échantillons archéologiques) dans l'annexe 3.



**Figure III-87 :** Origine des restes archéologiques du bassin versant du Rhône. Les sites du *Parc Saint-Georges* (Lyon), de *Montmajour*, du *Jardin d'Hiver* (Arles) et de *Lattara* (Lattes) sont replacés dans leur contexte géographique (à gauche) ; les zones quadrillées correspondent aux cités antiques, les cercles à l'emplacement des sites archéologiques et au nombre d'échantillons d'esturgeons étudiés.

### III-C-3 RESULTATS PALEOGENETIQUES ET DISCUSSION

#### III-C-3-a Apports des données mitochondriales

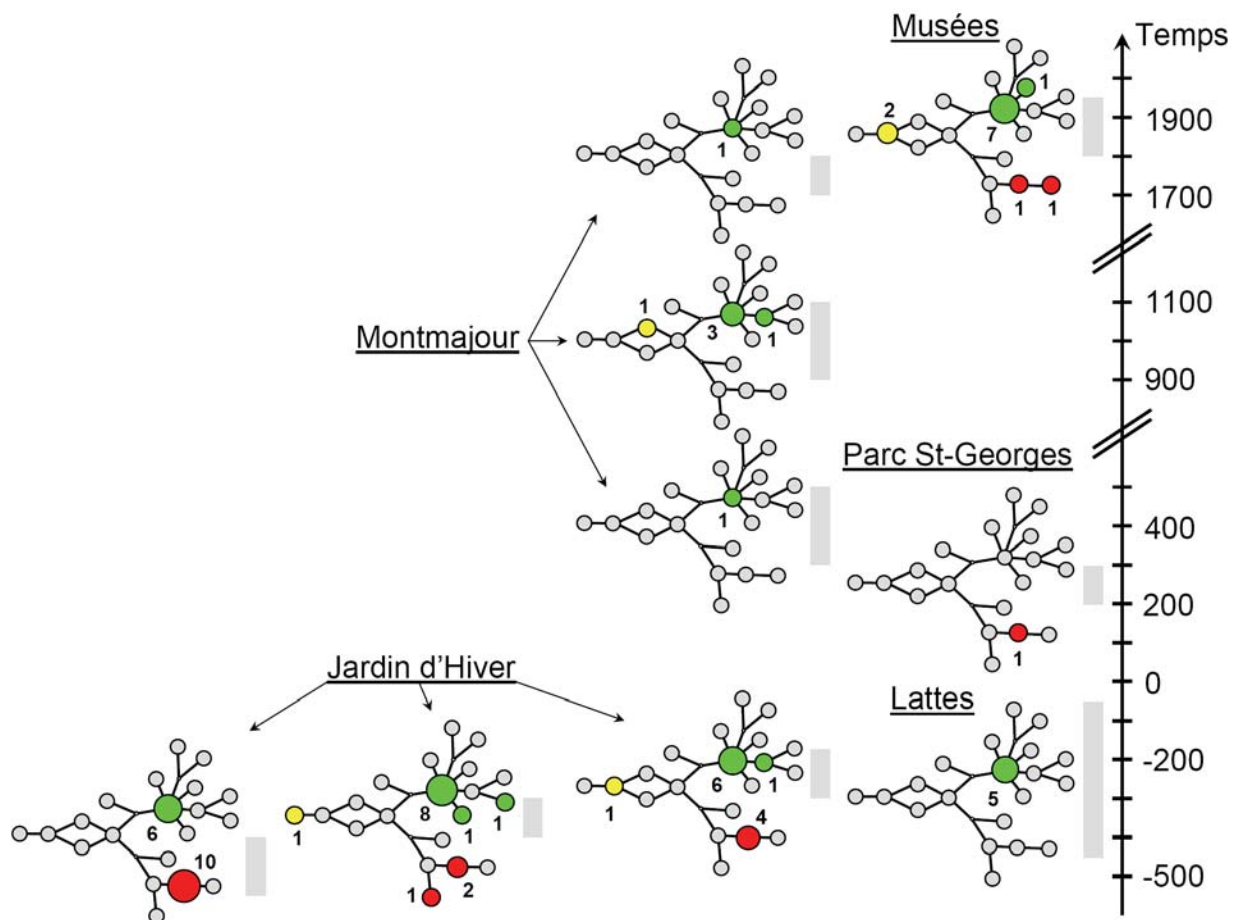
##### ■ Description de la diversité

La diversité mitochondriale de la population rhodanienne a peu évolué au cours des 2500 dernières années (Figure III-88) :



## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : ETUDE DIACHRONIQUE

- les trois haplogroupes sont présents sur toute la période (avec dans l'ordre d'importance C, A et B), ce qui est caractéristique du hotspot de diversité de l'espèce en Méditerranée occidentale.
- les haplotypes As2 et As3 sont les plus fréquents, portés respectivement par 39 et 18 individus sur 67 (soit 58% et 27%). As2 reste l'haplotype majoritaire sur toute la période. As3 semble quant à lui plus fréquent avant le début de notre ère (16 individus sur 47 soit 34%) qu'après (2 individus sur 20 soit 10%). Les autres haplotypes ne sont pas retrouvés régulièrement au cours du temps, du fait de leur faible fréquence.

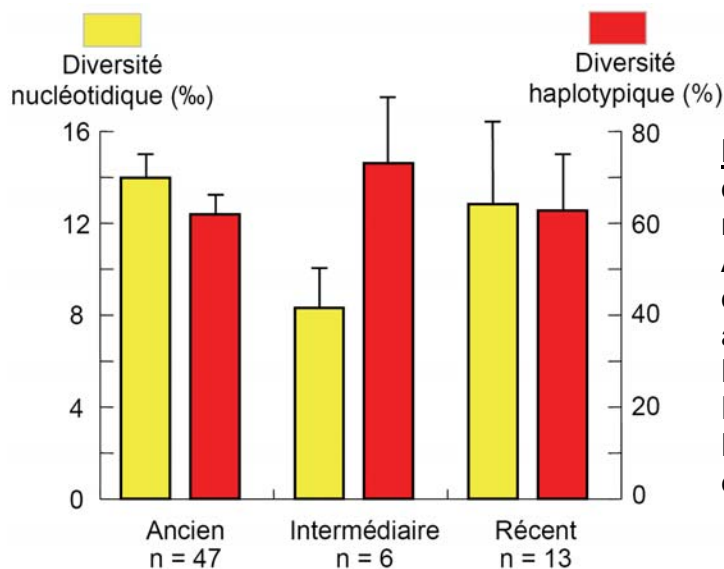


**Figure III-88 :** Répartition temporelle des haplotypes mitochondriaux de la population rhodanienne. Le réseau est identique à celui de la figure III-61. Les haplotypes présents sont colorés et le nombre d'occurrence est indiqué. La barre grisée marque la période de mort des spécimens.

Les diversités haplotypiques et nucléotidiques de la population du Rhône n'ont pas non plus connu de variations importantes au cours des 2500 dernières années (Figure III-89). Contrairement à ce que nous pouvions attendre, la diversité génétique

## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : ETUDE DIACHRONIQUE

mitochondriale de la population rhodanienne n'a donc pas subi d'érosion évidente, malgré la chute des effectifs. En particulier, les échantillons les plus récents – qui précèdent l'extinction de la population de moins de trois siècles – ne sont pas moins divers que les échantillons d'âge intermédiaire ou ancien. Il est probable que le temps de génération élevé de l'esturgeon européen explique la rétention importante de diversité dans la population rhodanienne. L'arrivée dans la population rhodanienne d'individus provenant d'autres populations n'est pas exclue non plus.



**Figure III-89 :** Evolution de la diversité génétique mitochondriale rhodanienne au cours du temps. Ancien : tous les restes du Jardin d'Hiver et de Lattes, -550 à -150 av. J.-C. Intermédiaire : restes de Montmajour du 10<sup>e</sup> au 12<sup>e</sup> siècle. Récent : échantillon de Montmajour du 18<sup>e</sup> siècle et échantillons de musée.

### ■ Modélisation de l'évolution démographique dans le Rhône

Afin de comparer la vraisemblance des hypothèses de constance démographique et de chute démographique, nous avons effectué une simulation à l'aide du logiciel Beast (Drummond & Rambaut 2007). Le modèle nul est l'absence de variations démographiques de la population d'esturgeons du Rhône au cours des 2 500 dernières années. Le modèle alternatif implique des variations démographiques (a priori une chute des effectifs).

Le jeu de données que nous avons utilisé regroupe toutes les séquences du fragment D10-5' disponibles sur le Rhône (voir résultats de la Figure III-88 et dataset XX de l'Annexe II). L'âge des séquences a été pris en compte afin de tester les hypothèses démographiques.

Lors des analyses, nous nous sommes heurtés à deux problèmes majeurs :

1) le jeu de données étant basé sur le fragment Dlo-5' uniquement, il est beaucoup moins informatif que celui que nous avons utilisé précédemment qui utilisait les informations de la région de contrôle entière (voir partie III-B-4-b). Le séquençage de la région de contrôle entière pour tous les échantillons du Rhône eut été nécessaire afin d'obtenir les meilleures estimations possibles, mais ce travail eut été long et coûteux pour un résultat incertain. De plus, certains échantillons pour lesquels l'ADN est relativement mal préservé n'auraient pas pu être analysé sur l'ensemble de la région de contrôle, le matériel étant disponible en quantité limitante.

2) le jeu de données ne comporte que des séquences d'*A. sturio*, puisque l'objectif est d'estimer les paramètres démographiques de la population rhodanienne. Sans groupe externe, le logiciel estime le taux d'évolution à partir de l'âge des séquences. Les séquences dont nous disposons étant récentes, la conséquence est une surestimation importante du taux d'évolution. La différence observée entre le taux d'évolution à court terme et le taux d'évolution à long terme est appelée « dépendance au temps des horloges moléculaires » (Ho *et al.* 2005 ; Ho *et al.* 2007). Dans notre cas, le taux d'évolution à long terme estimé à la partie III-B-4-b est de 0,4% par site par million d'année ; les premières analyses réalisées à partir du jeu de données sur le Rhône conduisaient à des estimations de l'ordre de 35% par site par million d'année (soit un taux d'évolution 100 fois plus rapide).

Hypothèses a priori :

- afin de limiter le biais lié à la dépendance au temps, nous avons contraint le taux d'évolution a priori entre 0,1 et 10% par site par million d'années. Nous avons laissé une gamme de variation afin de tenir compte de hétérogénéité du taux d'évolution le long de la région de contrôle (la portion Dlo-5' n'évoluant pas forcément au même taux que l'ensemble de la région de contrôle).
- nous avons également considéré que l'horloge moléculaire est fixe et qu'il n'y a donc pas de différences de taux d'évolution le long des branches.
- les séquences du Rhône couvrant une bonne partie de la diversité de l'espèce *A. sturio*, nous avons contraint l'âge de la racine entre 100 ka et 20 Ma, avec une valeur de départ de 6 Ma proche des estimations réalisées à la partie III-B-4-b.

## DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : ETUDE DIACHRONIQUE

- la taille efficace de la population ne pouvant être infinie, nous avons également choisi de borner la recherche de la meilleure estimation dans l'intervalle 100 à 10 000 000, ce qui n'est pas une contrainte très lourde.

### ■ Modélisation : résultats préliminaires

#### Modèle « effectif constant »

Dans un premier temps, nous avons réalisé une simulation en postulant une taille efficace de la population rhodanienne constante au cours du temps (mais en laissant au logiciel le soin d'estimer cette valeur) : le modèle « constant size » de Beast a été utilisé. A l'issue de 50 millions de générations MCMC – avec échantillonnage toutes les 5 000 générations, pour un total de 10 000 valeurs échantillonnées – les résultats analysés avec le logiciel Tracer (Drummond & Rambaut 2007) indiquent un échantillonnage suffisant des paramètres du modèle, dont les estimations sont figurées dans le Tableau III-15. Ces résultats sont préliminaires dans le sens où la paramétrisation du modèle est encore perfectible.

	Posterior	Prior	Vraisemblance du modèle	Âge de la racine (Ma)	Taille efficace * Temps de génération	Taux d'évolution
Moyenne	-1324,5	-962,2	-362,2	1,5	841 700	5,2E-08
Ecart-type de la moyenne	7,3	7,4	0,09	0,1	69 400	4,0E-09
Médiane	-1316,1	-953,2	-361,9	0,5	355 000	3,0E-08
Borne inférieure 95% de confiance	-1496,1	-1131,5	-372,5	0,1	16 900	8,0E-10
Borne supérieure 95% de confiance	-1186,4	-822,7	-353,2	6,3	3 584 000	1,7E-07
Taille échantillonnée efficace (ESS)	156,4	156,4	3050,0	316,2	265,5	212,7

**Tableau III-15** : Estimation des paramètres du modèle « taille constante » avec Beast.

Les estimations des paramètres sont peu précises, comme en témoignent les intervalles de confiance à 95%.

L'âge de la racine ressort à 1,5 Ma (95% de confiance : 0,1 - 6,3 Ma), soit moins que l'âge de l'origine de la diversité mitochondriale chez *A. sturio* estimé précédemment (partie III-B-4-b). Cette différence est à mettre en relation avec le taux d'évolution qui est ici estimé à 5,2% par site par million d'année (95% : 0,08 - 17%), contre 0,4% précédemment (partie III-B-4-b).

La taille efficace de la population multipliée par le temps de génération ressort à 840 000 (95% : 17 000 - 3 600 000) ; en considérant un temps de génération de 15 ans pour l'esturgeon européen, la taille efficace de la population rhodanienne est estimée à 56 000 reproducteurs (95% : 1 100 - 240 000). En postulant que la taille réelle de la population est 10 fois supérieure à la taille efficace (Frankham 1995b ; Frankham *et al.* 2002), cela donne une population d'environ 560 000 esturgeons dans le Rhône (95% : 11 000 – 2 400 000). Comme mentionné précédemment, cette estimation est peu précise. Elle repose en effet sur un jeu de données limité et sur l'hypothèse d'une taille constante depuis au moins 2 500 ans, alors que nous savons que la taille a décliné au moins au cours des 19<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> siècles jusqu'à l'extinction.

### Modèle « effectif variable »

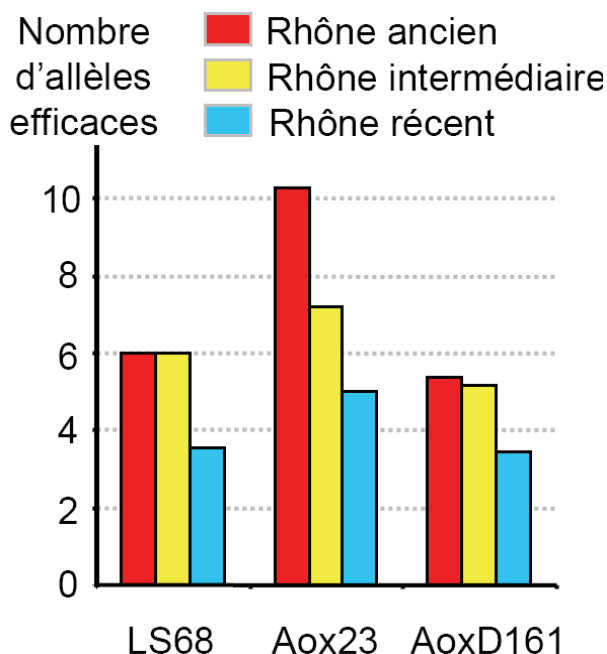
Dans un second temps, nous avons réalisé une simulation en postulant des variations démographiques au cours du temps (là encore, en laissant au logiciel le soin de déterminer ces variations) : le modèle « bayesian skyline » linéaire de Beast a été utilisé. Là encore, à l'issue des 50 millions de générations MCMC les résultats indiquent un bon échantillonnage des paramètres du modèle, avec une vraisemblance ( $-363,1 \pm 10$ ) néanmoins légèrement inférieure à celle du modèle à effectif constant. Afin de déterminer si le modèle avec variations démographiques est mieux adapté à la population rhodanienne que le modèle avec population constante, nous avons calculé le facteur bayésien à partir des vraisemblances marginales des deux modèles. L'estimation obtenue à partir de 1 000 bootstrap grâce au logiciel Tracer vaut 1,1 ce qui ne permet pas de rejeter le modèle constant. Sur la seule base des informations génétiques mitochondriales, il est impossible de conclure à une baisse des effectifs de la population du Rhône entre 500 av. J.-C. et le 20<sup>e</sup> siècle.

III-C-3-b Apports des données nucléaires

■ Description de la diversité

Les échantillons les plus anciens sont très divers et portent de nombreux allèles. Les allèles présents sur les échantillons récents constituent un sous-ensemble des allèles présents sur les échantillons anciens, signe d'une certaine perte de diversité (Figure III-90). La diversité nucléaire semble donc avoir été plus sensible à la baisse des effectifs que la diversité mitochondriale, ce qui était attendu pour un marqueur présentant un bien plus grand nombre d'allèles rares.

Le calcul du nombre d'allèles efficace par locus ( $=1/(f_0^2 + \dots + f_k^2)$  où  $f_k$  est la fréquence du kième allèle) permet de mieux caractériser la perte de diversité allélique au cours du temps, les variations de taille des échantillons étant prises en compte (Figure III-91). En effet, pour les trois locus les plus informatifs, le nombre efficace d'allèles diminue entre les échantillons les plus anciens et les plus récents. La valeur passe de 6 à 3,5 pour LS68, de 10,5 à 5 pour Aox23 et de 5,5 à 3,5 pour AoxD161 soit une diminution de 48 à 63%. Cette réduction de la diversité allélique résulte probablement de la baisse des effectifs de la population du Rhône peu avant son extinction.



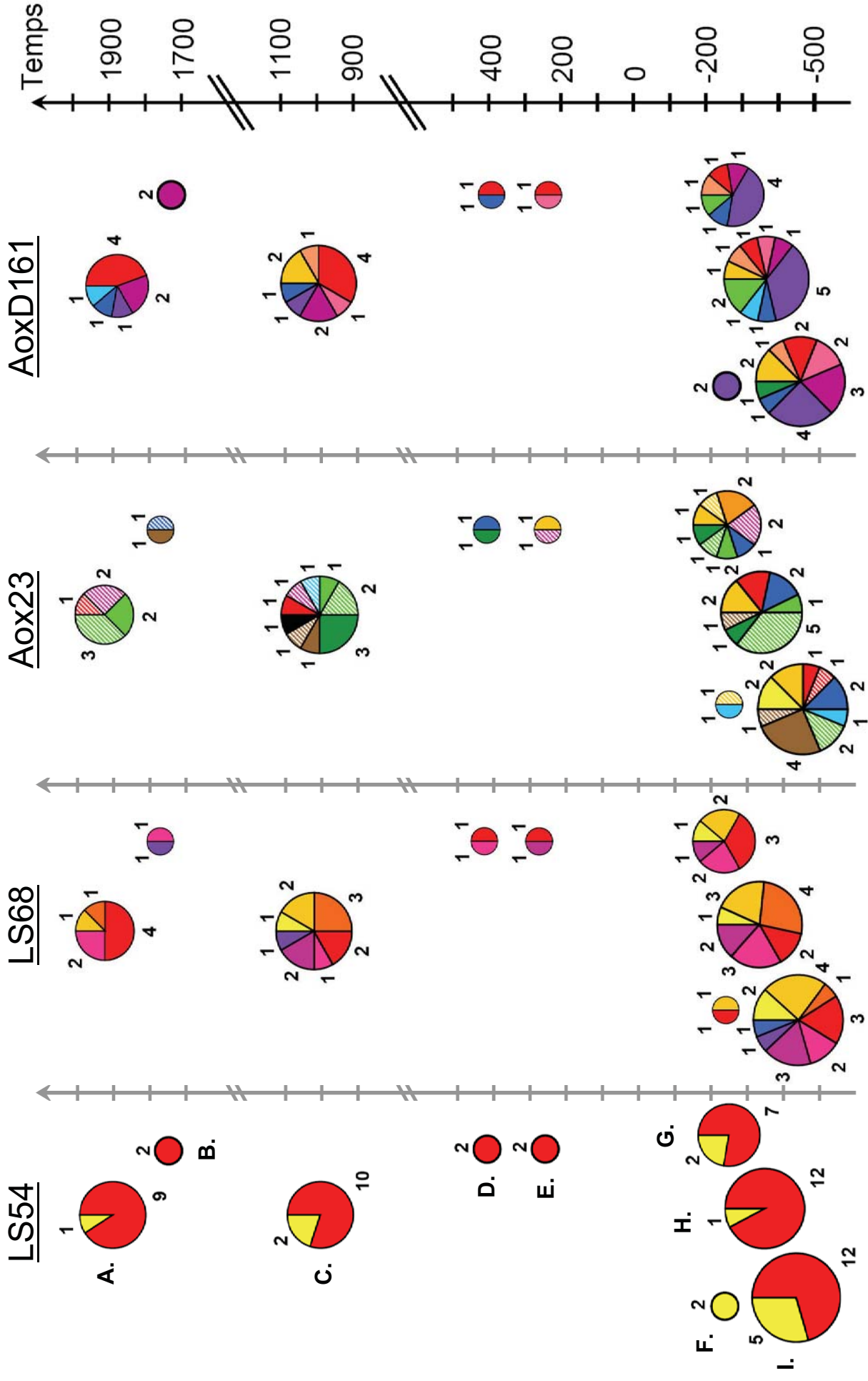
**Figure III-91 :** Evolution du nombre d'allèles efficace au cours du temps pour les locus LS68, Aox23 et AoxD161.

*Rhône ancien* (n=47) = tous les restes du Jardin d'Hiver et de Lattes, - 550 à -150 av. J.-C.

*Rhône intermédiaire* (n=6) = échantillons de Montmajour du 10<sup>e</sup> au 12<sup>e</sup> siècle.

*Rhône récent* (n=13) = échantillon de Montmajour du 18<sup>e</sup> siècle et échantillons de musée.

DIVERSITE INTRASPECIFIQUE CHEZ *A. STURIO* : ETUDE DIACHRONIQUE



**Figure III-90 (page précédente)** : Répartition temporelle des allèles microsatellites de la population rhodanienne, pour les locus LS54, LS68, Aox23 et AoxD161. Le code couleur par locus est identique à celui des figures III-71, III-72, III-73 et III-74. La correspondance entre camembert et échantillon est similaire pour les quatre locus, et est explicitée pour le locus LS54. A : Musée, B : Montmajour 18<sup>e</sup> siècle, C : Montmajour 10-12<sup>e</sup> siècles, D : Montmajour 4-6<sup>e</sup> siècles, E : Parc Saint-Georges, F : Lattes, G : Jardin d'Hiver récent (< 300 av. J.-C.), H : Jardin d'Hiver intermédiaire (300 - 400 av.J.-C.), I : Jardin d'Hiver ancien (> 400 av. J.-C.).

### ■ Modélisation

Il est pour l'instant impossible de modéliser la démographie des populations à partir de données microsatellites avec Beast.

Néanmoins, nous avons testé la structuration des génotypes de la population du Rhône avec le logiciel STRUCTURE. Nous avons réalisé le même type d'analyse qu'à la partie III-B-5-c en utilisant uniquement les échantillons du Rhône (dataset de l'article n°5 dans l'annexe 3), et aucune structuration n'a encore une fois été détectée. La perte de diversité observée entre Rhône ancien et Rhône récent consistant principalement en un sous échantillonnage des allèles (Figure III-90), il n'est pas étonnant que les échantillons ne soient pas différenciés génétiquement.

## **III-C-4 Discussion**

### III-C-4-a La population ancienne du Rhône : une population d'esturgeon équilibrée

Les informations obtenues à partir des échantillons rhodaniens les plus anciens (Lattes + Jardin d'Hiver) permettent de caractériser au niveau génétique une population d'esturgeon européen en bonne santé.

### ■ Une variabilité génétique importante

La population ancienne du Rhône montre une variabilité génétique florissante, aussi bien au niveau mitochondrial que nucléaire (Figures III-88 et III-90). La diversité génétique recensée sur le Rhône ancien couvre d'ailleurs une grande partie de la diversité observée sur l'ensemble de l'espèce *A. sturio* (voir figures III-64 à III-66 et III-72 à III-74).



Le Rhône abritait donc une population génétiquement très diverse, au cœur de la distribution et représentative de l'espèce.

### ■ Une taille efficace importante

L'estimation de la taille efficace de la population du Rhône à partir des données mitochondriales est de 56 000 reproducteurs (95% : 1 100 - 240 000). Malgré l'importance de l'intervalle de confiance, ce chiffre ne paraît pas aberrant, puisque par exemple 7 000 esturgeons mûres étaient pêchés annuellement dans l'Elbe entre 1860 et 1885 (Gessner 2000).

Cette estimation repose sur un modèle à effectif constant, lissant les éventuelles variations ayant eu lieu au cours de l'histoire de la population. Cette estimation est donc adaptée uniquement à l'histoire ancienne de la population rhodanienne, antérieure à la chute des effectifs qui a précédé l'extinction. Les 400 à 500 prises printanières sur le Rhône à la fin du 19<sup>e</sup> siècle suggèrent d'ailleurs que la réduction des effectifs était déjà bien entamée à cette période (si la population avait compté 50 000 géniteurs à cette époque, il est probable au vu de l'intensité de la pêche à la fin du 19<sup>e</sup> que le nombre de captures auraient été plus important).

### III-C-4-b Suivi temporel de la population du Rhône

La population du Rhône est la première population d'esturgeons analysée génétiquement sur plus de 2000 ans, d'une période où elle était encore florissante jusqu'à son extinction. Les informations obtenues permettent de relativiser l'importance des données génétiques dans l'estimation de l'état démographique des populations d'esturgeons.

### ■ Une perte récente de diversité génétique pas si évidente

La population du Rhône s'est éteinte dans les années 1970, elle a donc forcément connu une réduction drastique de ses effectifs depuis le Moyen-Âge (passage de plusieurs dizaines de milliers de reproducteurs à aucun). Nous l'avons vu à la partie I-C, les variations démographiques laissent généralement des traces au niveau génétique. Nous nous attendons donc à détecter une baisse de diversité génétique importante entre la période industrielle et les périodes antérieures.

La perte de diversité génétique sur le Rhône est détectable au niveau nucléaire (réduction de la diversité allélique ; figure III-91), mais n'est pas suffisante pour qu'une différenciation soit perceptible (absence de structuration avec STRUCTURE). Au niveau mitochondrial, la perte de diversité n'est pas détectable (stabilité des diversité haplotypiques et nucléotidiques ; figure III-89) et les modélisations réalisées avec BEAST ne permettent pas de rejeter l'hypothèse nulle d'une constance temporelle.

### ■ Hypothèses explicatives

L'échantillonnage est déséquilibré, le nombre d'échantillons « récents » (18<sup>e</sup>-20<sup>e</sup> siècles) étant bien inférieur au nombre d'échantillons « anciens » (antérieurs au 18<sup>e</sup> siècle). La caractérisation des stades précédant l'extinction n'est donc pas extrêmement précise, ce qui a pu limiter la détection d'une éventuelle réduction de diversité génétique. L'échantillonnage des esturgeons du Rhône conservés dans les musées ayant été relativement exhaustif, ce point est difficilement perfectible.

Alternativement, les effets démographiques conduisant habituellement à une réduction de la diversité génétique ont pu être atténués par les caractéristiques biologiques de l'espèce :

1) Dans le cas d'une population sur le déclin, l'arrivée de migrants provenant de populations voisines – même en très faible nombre, pourvu qu'ils se reproduisent – peut contribuer à maintenir une diversité génétique élevée (Ruzzante *et al.* 2001 ; Consuegra *et al.* 2005). Il n'est ainsi pas exclu que la rétention de diversité génétique dans la population du Rhône avant son extinction soit liée à l'arrivée de poissons venant de l'Ebre, du Tibre ou d'autres populations inconnues plus proches.

2) Une durée de génération élevée pouvait également ralentir ou masquer temporairement la perte de diversité génétique et la consanguinité associées à une baisse démographique (Amos & Balmford 2001 ; Kuo & Janzen 2004 ; Goossens *et al.* 2005 ; Hailer *et al.* 2006). Chez les poissons, cet aspect a été documenté sur le Chevalier cuivré dont la durée de génération est identique à celle de l'esturgeon européen : cette espèce endémique du Canada est en effet caractérisée par une diversité génétique élevée malgré une taille efficace très faible (les effectifs actuels ne dépasseraient pas les 500 individus ; Lippe *et al.* 2006). Il est important de souligner que l'absence de réduction de la diversité génétique ne signifie pas pour

autant que la dérive génétique n'opère pas : ses effets mettent simplement plus de temps à apparaître, et ils mettront également plus de temps à s'estomper (Kuo & Janzen 2004).

### III-C-4-c Comparaison avec la population de Gironde

La description de la population rhodanienne est importante pour la conservation de l'espèce, car elle permet de contraster l'état actuel de la population girondine. La population girondine est un cas d'étude intéressant car il s'agit de la dernière population subsistante d'*A. sturio*. Une meilleure connaissance de son histoire évolutive permet de s'interroger sur l'origine de la faible diversité génétique observée actuellement, en particulier sur la part relative de la dernière glaciation et de l'impact anthropique.

#### ■ La population rhodanienne, plus diverse que la population girondine

La population du Rhône, quelle que soit la période considérée, est génétiquement plus diverse que la population de Gironde, au niveau mitochondrial et nucléaire (Tableau III-16). Le contexte biogéographique explique probablement une partie de cette différence, puisque le Rhône était au cœur génétique de la distribution historique de l'espèce, alors que la Gironde était plutôt à la marge (voir partie III-B-6).

**Tableau III-16 :** Comparaison génétique du Rhône ancien (Lattes + Jardin d'Hiver), du Rhône récent (musée + Montmajour 18<sup>e</sup> siècle) et de la Gironde actuelle. Pour les microsatellites, la somme des allèles sur les cinq locus a été effectuée.

	Rhône ancien n = 47	Rhône récent n = 13	Gironde actuelle n = 16
Haplotypes mitochondriaux	8	6	1
Allèles microsatellites	35	19	12

#### ■ Evolution de la diversité de la population girondine au cours du temps

La diversité génétique actuelle de la population de Gironde est très faible, aussi bien au niveau mitochondrial que nucléaire. Cette diversité réduite peut être

interprétée comme la conséquence de l'histoire post-glaciaire de la population (voir partie III-B-6) combinée à la réduction très récente des effectifs liée aux activités anthropiques.

La contribution relative de ces deux facteurs est difficile à estimer, mais la comparaison des échantillons des 19<sup>e</sup>-20<sup>e</sup> siècles et des échantillons actuels de Gironde (voir figures III-64 à III-66 et III-72 à III-74) indique (i) une diversité déjà faible au cours des deux derniers siècles et (ii) une diversité encore plus faible actuellement. Ces observations confirment que la réduction des effectifs de la population girondine s'est effectuée sur un terrain génétique déjà pauvre, expliquant le contraste important avec la population rhodanienne. Pour utiliser un parallèle avec les populations américaines d'*A. oxyrinchus*, les populations de Gironde et du Rhône des 19<sup>e</sup>-20<sup>e</sup> siècles équivalent respectivement aux populations du Saint-Laurent et de la Savannah actuels, et la population de Gironde actuelle équivaut à la population du Saint-Laurent qui aurait subi une réduction drastique de ses effectifs.

## CHAPITRE 4

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de cette thèse, nous avons analysé par les méthodes paléogénétiques plus d'une centaine de restes d'esturgeons provenant de toute l'Europe. La distribution et les relations entre espèces d'esturgeons ont été abordées, puis nous nous sommes particulièrement focalisés sur l'esturgeon européen *A. sturio*, dont les caractéristiques génétiques ont été précisées dans l'espace (sur son aire de répartition historique) et le temps (depuis plus de 2000 ans jusqu'à nos jours). Ces analyses, hormis leur apport fondamental indéniable, pourront également être utilisées pour la conservation des espèces d'esturgeons, et bien sûr en particulier pour l'esturgeon européen.

### IV-A BILAN

#### **IV-A-1 APPORT MAJEUR DE LA PALEOGENETIQUE**

Le déclin des esturgeons en Europe était déjà marqué il y a près d'un siècle (Roule 1922), mais la prise de conscience a été trop tardive et quasiment toutes les populations ont disparues. La paléogénétique est une approche pertinente pour déterminer le statut spécifique de restes biologiques anciens, ce qui nous a permis de préciser la distribution historique des espèces d'esturgeons dans les différents bassins européens (partie II). La paléogénétique est également le meilleur moyen pour étudier dans sa globalité une espèce au bord de l'extinction comme l'esturgeon européen, ce qui nous a permis de mieux connaître son histoire évolutive et ses caractéristiques génétiques (partie III).

Cette opportunité unique de retrouver la diversité ancienne de l'espèce est essentielle pour relativiser la valeur et la réussite de toute opération de maintien de la population girondine ou de réintroduction ailleurs. En effet, les niveaux de diversité historiques constituent les meilleurs « standards », puisqu'ils caractérisent les populations avant leur déclin (ou du moins avant que celui-ci ne devienne critique). Les informations apportées par l'étude de restes anciens permettront donc d'envisager la conservation de l'espèce sous un nouvel angle, comme elles ont permis d'adapter la gestion des stocks et la conservation de nombreuses espèces de poissons (Nielsen & Hansen 2008).

### **IV-A-2 DES OUTILS POUR MIEUX CONNAITRE LA GENETIQUE DES ESTURGEONS**

#### IV-A-2-a Sur l'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial des esturgeons est relativement conservé, malgré une origine Jurassique de la famille des Acipenséridés. Toutes les régions de ce génome n'évoluent pas au même rythme mais la plupart permettent une discrimination interspécifique, en particulier d'*A. sturio*, *A. oxyrinchus* et *A. naccarii*. La région qui est la plus variable au niveau interspécifique est aussi la plus variable en intraspécifique : il s'agit comme chez la plupart des Vertébrés de la région de contrôle.

L'analyse de la région de contrôle chez *A. sturio* – en particulier grâce aux méthodes paléogénétiques sur des spécimens originaires de l'ensemble de la distribution historique – nous a permis de mettre en évidence l'existence de polymorphismes intraspécifiques inconnus auparavant (partie III-A-2). La région de contrôle dans son intégralité est par ailleurs beaucoup plus informative que le fragment qui avait été étudié lors des études précédentes, ce qui a permis la réalisation d'analyses plus poussées.

Nous avons ainsi estimé le taux d'évolution de la région de contrôle du clade des esturgeons atlantiques (*A. sturio* + *A. oxyrinchus*), qui ressort à environ 0,4% (95% : 0,1 - 0,7) par site par million d'années (partie III-B-4). La région de contrôle étant la portion la plus variable de l'ADNmt, le taux d'évolution moyen de l'ADNmt est encore plus faible. Cette estimation conforte l'idée d'une évolution très lente chez les esturgeons (Krieger & Fuerst 2002) et explique probablement la faible différenciation entre des espèces ayant pourtant divergé il y a plusieurs dizaines de millions d'années.

#### IV-A-2-b Sur l'ADN nucléaire

L'évolution très lente des esturgeons se ressent également au niveau nucléaire, puisque de nombreux locus microsatellites sont conservés au sein de la famille des Acipenséridés. Nous avons exploité cette propriété pour développer une

série de locus microsatellites permettant la discrimination nucléaire d'*A. sturio*, *A. oxyrinchus* et *A. naccarii* (article n°1). Les régions flanquantes et les motifs microsatellites sont en effet globalement conservés mais ils incluent tout de même un certain nombre de polymorphismes exploitables.

Ces mêmes marqueurs microsatellites ont également été utilisés pour sonder le polymorphisme intraspécifique chez *A. sturio*. L'application des microsatellites aux substrats ADN dégradés est coûteuse en temps et en argent, car la génération d'un jeu de données fiable nécessite de prendre en compte et de vérifier une somme de paramètres conséquente (partie III-A-3). La taille de l'échantillonnage et la préservation de l'ADN conditionnent la pertinence biologique des résultats et l'intérêt de telles analyses. Dans le cas de l'esturgeon européen, nous avons réussi à établir un jeu de données consistant permettant d'apporter des informations nucléaires inédites, complémentaires de celles apportées par l'ADNmt.

### **IV-A-3 MIEUX CONNAITRE L'ESTURGEON EUROPEEN...**

#### IV-A-3-a Caractériser les populations anciennes

Grâce à l'analyse complémentaire de l'ADNmt et des microsatellites nucléaires, nous avons pu apporter des informations supplémentaires sur la distribution des espèces d'esturgeons en Europe et sur leurs relations. La présence de populations fonctionnelles d'*A. naccarii* en dehors de la mer Adriatique a été réfuté, et aucune hybridation avec *A. sturio* n'a été détectée. La présence d'*A. oxyrinchus* et son hybridation avec *A. sturio* en France ont été documentés.

La paléogénétique nous a également permis de lever le voile sur une partie de l'histoire évolutive d'*A. sturio*, qui présentait une diversité génétique importante en Ibérie, en Méditerranée occidentale et en Adriatique. Les marges atlantiques et pontiques présentaient elles une diversité plus faible probablement en liaison avec une colonisation récente. Les événements géologiques et climatiques comme la crise messinienne ou les glaciations Pléistocènes ont certainement contribué à façonner la diversité génétique qui caractérisait l'espèce, mais celle-ci a été détruite par l'Homme en un claquement de doigt à l'échelle des temps géologiques. En effet,



respectivement moins de 25 et de 5% des diversités nucléaires et mitochondriale historiques subsistent actuellement, au sein de la population girondine elle-même menacée.

L'analyse génétique de la population antique du Rhône nous a également permis d'établir les caractéristiques d'une population d'esturgeon européen équilibrée du cœur de la distribution : forte diversité génétique, forte population et stabilité temporelle (partie III-C). Cette bonne santé tranche bien sûr avec la situation actuelle des populations d'esturgeons mondiales, qui est catastrophique.

### IV-A-3-b Relativiser le statut de la dernière population survivante

L'apport de données anciennes permet également de relativiser le statut de cette dernière population d'esturgeons européens. En effet, avant le déclin de l'espèce, la population de Gironde était une population démographiquement importante mais génétiquement marginale comparée aux populations ibériques, méditerranéenne ou adriatiques (partie III-B). Si la population actuelle de Gironde est génétiquement représentative de l'espèce *A. sturio* en 2010 (puisque'elle constitue la dernière population survivante), elle n'est pas du tout représentative de l'espèce *A. sturio* qui vivait encore au 19<sup>e</sup> siècle, ni même de la population girondine qui vivait à cette époque. Nous avons en effet vu que la diversité résiduelle en Gironde est un sous-ensemble de la diversité qui existait au cours des deux derniers siècles, antérieurement à la chute brutale des effectifs. La présence de l'allèle 146 du locus microsatellite LS19 dans la population girondine actuelle (et dans aucune autre population historique d'*A. sturio* ; partie III-B-5-b ; figure III-70) pourrait constituer la trace d'une introgression par *A. oxyrinchus* (qui possède également cet allèle). La population actuelle de Gironde pourrait donc être en partie introgressée suite à un évènement d'hybridation avec *A. oxyrinchus*.

L'analyse paléogénétique d'individus ibériques, méditerranéens ou adriatiques est donc nécessaire pour tirer des conclusions générales au niveau de l'espèce historique *A. sturio*. L'exemple de l'hétéroplasmie est une bonne illustration de ce biais girondin, puisque l'hétéroplasmie est absente de la population de Gironde alors qu'elle était présente en Méditerranée (partie III-A-1)

### **IV-A-4 ...POUR MIEUX LE PROTEGER.**

#### IV-A-4-a Sur le risque d'hybridation

L'hybridation confirmée avec l'esturgeon atlantique rend l'esturgeon européen vulnérable à l'extinction par hybridation (Rhymer & Simberloff 1996). En effet, *A. oxyrinchus* est en cours de réintroduction dans les fleuves de la mer Baltique et ses capacités de migration longue distance rendent possible l'éventualité d'un croisement avec les derniers *A. sturio* sauvages de Gironde. Les effectifs girondins sont tellement bas qu'un seul évènement d'hybridation pourrait compromettre l'intégrité de la population et donc de l'espèce. Cette menace planera tant que les effectifs de la population girondine n'auront pas retrouvé un niveau suffisant.

Cette menace s'est peut-être déjà concrétisée dans le passé, si la présence de l'allèle 146 du locus LS19 est considérée comme une trace d'introgession antérieure. La présence historique d'*A. oxyrinchus* dans la Seine et la Loire (article n°2), donc géographiquement proche de la Gironde, pourrait avoir occasionné des évènements d'hybridation entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus* en Gironde au cours des siècles précédents.

#### IV-B-4-b Sur la diversité génétique

Le suivi temporel de la population du Rhône – de l'Antiquité à l'extinction – nous a permis de constater que la perte de diversité génétique accompagnant la baisse des effectifs n'était pas forcément très marquée, probablement en raison de la maturité tardive des esturgeons et de leur longévité (partie III-3). La faible diversité actuelle de la population de Gironde s'explique d'ailleurs seulement en partie par la chute démographique du siècle dernier, la diversité génétique préexistante étant en effet déjà faible.

Ces observations sont plutôt encourageantes puisqu'elles signifient qu'une population d'esturgeons peut survivre malgré une faible diversité génétique (ce que les populations canadiennes d'*A. oxyrinchus* illustraient déjà), et que la perte de diversité génétique et l'augmentation de la consanguinité opèrent chez les

esturgeons à un rythme généralement plus lent que chez les autres espèces. L'esturgeon européen pourra donc probablement survivre en captivité sans conséquences génétiques majeures pendant plusieurs dizaines d'années, laissant le temps aux stocks naturels de se reconstituer. L'adaptation génétique à la captivité est probablement un problème plus important à prendre en compte que la perte de diversité. Afin de favoriser la rétention maximale de diversité, un programme de croisements contrôlés de la population captive serait nécessaire, mais dans la réalité le choix des parents dépend de la maturation simultanée d'un mâle et d'une femelle (phénomène pour l'instant plus ou moins aléatoire).

Une autre conséquence de ces observations peut être utile en terme de conservation pour tous les esturgeons en général. Le temps de génération élevé pouvant masquer temporairement les effets de la dérive génétique, une réduction drastique d'effectifs ne laisse pas forcément de trace génétique instantanément. Le biologiste de la conservation devra donc plutôt se fier aux relevés démographiques effectués sur le terrain plutôt qu'aux données génétiques afin d'estimer la « santé » d'une population d'esturgeons.

Nous avons vu qu'à l'échelle de l'espèce, une partie importante de la diversité génétique a été perdue. Cette perte de diversité peut être considérée comme une perte de potentiel adaptatif, préjudiciable à la survie de l'espèce à long terme et à sa capacité à recoloniser un fleuve où il serait réintroduit. Nous avons également vu que des poissons adultes pouvaient être pêchés plusieurs années voire plusieurs décennies après l'arrêt des reproductions naturelles. Dans l'éventualité où des poissons isolés seraient encore capturés vivants dans des zones d'où l'esturgeon est présumé disparu, il serait très important de conserver ces spécimens en captivité et de les utiliser pour des reproductions artificielles. Cette démarche paraît néanmoins utopique (voir l'exemple de l'esturgeon pêché au Pays de Galle ; Anonyme 2004), puisqu'elle repose sur la capture putative d'individus isolés, sur leur transport en vie jusqu'au Cemagref de Bordeaux et sur la maîtrise parfaite de la reproduction artificielle.

### IV-B-4-c Sur la capacité de recolonisation spontanée

Un autre facteur encourageant pour le futur de l'espèce est sa capacité à coloniser de nouveaux habitats. Il apparaît en effet que malgré un instinct de homing important, des individus vagabonds sont susceptibles de former une nouvelle population dans un bassin vierge. La recolonisation post-glaciaire des fleuves d'Europe du Nord en est la preuve (parties II-C-2 et III-B). Il est néanmoins probable qu'une population source importante soit nécessaire afin d'alimenter les bassins vierges en migrants fondateurs, ce qui n'est pas le cas de la population actuelle de Gironde, mais ce qui pourrait le devenir si le programme de soutien entrepris par le Cemagref aboutit aux résultats escomptés.

### IV-B-4-d Sur les réintroductions

Les reproductions artificielles de l'esturgeon européen réalisées ces dernières années au Cemagref de Bordeaux laissent envisager la possible réintroduction de l'espèce dans les fleuves européens.

La pertinence de la réintroduction dans un bassin fluvial donné dépend de plusieurs facteurs : (i) le bassin devait autrefois être occupé par une population d'esturgeons européens *A. sturio* (ce qui permet de sélectionner les bassins qui sont a priori favorables à l'esturgeon), (ii) les caractéristiques hydrologiques et écologiques du bassin doivent encore être adaptés à l'esturgeon européen (si un barrage vient d'être construit à 15 km de l'embouchure et aucune frayère potentielle n'est plus disponible, la réintroduction n'est pas envisageable ; la pollution doit également être ramenée à un seuil acceptable), (iii) les caractéristiques hydrologiques et écologiques du bassin devront encore être favorables à l'esturgeon européen dans un futur proche (voir la discussion sur le changement climatique au paragraphe suivant), (iv) la compétition et les risques d'hybridation avec les autres espèces d'esturgeons doivent être limités (en particulier avec *A. oxyrinchus*) (iv) le soutien politique et financier doit être au rendez-vous.

### ■ Réintroduction en Europe du Sud

La réintroduction de l'esturgeon européen dans les fleuves du cœur de la distribution historique (Ibérie, Méditerranée occidentale, Adriatique) pourrait être pénalisée par le changement climatique, qui va probablement conduire à un déplacement vers le nord de l'optimum écologique de nombreuses espèces, et en particulier de l'esturgeon européen (Lassalle *et al.* 2010). Cependant, l'espèce a certainement survécu en Méditerranée pendant plusieurs millions d'années (partie III-B), traversant des périodes où le climat était plus chaud qu'actuellement ; sa plasticité vis-à-vis du climat est donc probablement plus importante qu'elle n'y paraît.

Une population d'esturgeon européen a par exemple occupé le fleuve Guadalquivir jusque dans les années 1970, alors que les températures moyennes de l'air à Séville sont comprises entre 21 et 26°C entre Mars et Mai (à la période de la reproduction) ; les températures à Avignon à la même saison sont comprises entre 16 et 23°C, donc même en considérant un réchauffement de plusieurs degrés, le Rhône (ou le Pô) resteraient climatiquement habitable par l'esturgeon européen.

Un bémol toutefois, la plasticité vis-à-vis du climat pourrait résider en partie dans le polymorphisme génétique, qui a été presque totalement perdu. Il n'est donc pas garanti que les esturgeons de Gironde puissent s'adapter à des conditions plus chaudes.

L'intérêt majeur d'une réintroduction de l'esturgeon européen en Méditerranée réside dans la sécurisation de l'espèce vis-à-vis des aléas (accidents, pollutions...). Le retour de l'esturgeon dans un fleuve comme le Rhône aurait également une portée symbolique forte. Les études écologiques préliminaires démontrant la faisabilité du projet (Brosse *et al.* 2009a), il « ne manque plus » qu'une volonté politique et des poissons à relâcher.

### ■ Réintroduction en Europe du Nord

Les bassins d'Europe du nord offrent l'avantage de caractéristiques hydrologiques et climatiques favorables dans le cadre du réchauffement à venir (Lassalle *et al.* 2010). La réintroduction de l'esturgeon dans ces bassins serait donc climatiquement assurée à l'échelle de quelques siècles.

De plus, la réintroduction dans des fleuves proches de la Gironde aurait pour effet de rétablir un continuum de populations pouvant potentiellement échanger des individus. Cela permettrait également de créer une zone tampon entre *A. oxyrinchus* (en cours de réinstallation dans la Baltique) et *A. sturio*, ce qui protégerait la population girondine.

Néanmoins, des hybridations pourraient avoir lieu entre certains *A. oxyrinchus* provenant de la Baltique et les *A. sturio* réintroduit en Europe du Nord. Ces hybridations ne seraient pas aberrantes puisqu'elles rétabliraient probablement la situation qui existait aux 19<sup>e</sup>-20<sup>e</sup> siècle dans la région. Elles fragiliseraient cependant le statut spécifique de l'espèce *A. sturio*, surtout si l'introgression progresse ensuite vers le sud jusqu'à la Gironde.

### IV-B PERSPECTIVES

#### **IV-B-1 Phylogéographie**

##### IV-B-1-a Sur l'esturgeon européen

Des analyses génétiques complémentaires seront nécessaires pour répondre aux questions suivantes, qui découlent de la partie III-B-6-a :

- (i) à partir de quelles populations la colonisation post-glaciaire de la façade atlantique européenne a-t-elle été réalisée ? Gironde, populations ibériques ?
- (ii) les populations de la mer Noire sont-elles le fruit d'une colonisation récente depuis la mer Egée ou bien étaient-elles présentes avant la connexion entre la Méditerranée et la mer Noire il y a environ 10 ka BP ?

##### IV-B-1-b Sur l'esturgeon atlantique

Le timing spatio-temporel de l'arrivée en Europe d'*A. oxyrinchus* devra être confirmé et précisé par de nouvelles analyses. En particulier, la proportion des deux espèces *A. sturio* et *A. oxyrinchus* sur la façade atlantique française et en mer du Nord depuis la fin de la dernière glaciation jusqu'à nos jours reste à décrire.

L'importance de l'hybridation entre *A. oxyrinchus* et *A. sturio* est également à documenter de façon plus exhaustive, puisqu'elle a des conséquences lourdes en terme de conservation de l'esturgeon européen.

### IV-B-1-c Sur l'esturgeon adriatique

Les populations d'esturgeons du nord de la mer Adriatique gagneraient à être mieux connues. En particulier l'étude des deux espèces sympatriques *A. sturio* et *A. naccarii* dans le Pô permettrait de documenter leur coexistence au sein d'un même bassin.

L'étude paléogénétique de restes d'*A. naccarii* du Pô permettrait également de quantifier la perte de diversité génétique qu'a connue cette population – la dernière de l'espèce – au cours des derniers siècles.

## **IV-B-2 Génomique**

### IV-B-2-a Analyse fine de l'hybridation entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus*

Nous avons décrit l'hybridation entre les deux espèces à partir de seulement trois marqueurs nucléaires diagnostiques. La description fine de cette hybridation nécessite une étude à l'échelle du génome nucléaire entier, et passe par l'établissement de cartes génétiques ou même par la comparaison des génomes complets d'un individu *A. oxyrinchus* pur, d'un individu *A. sturio* pur et d'hybrides. Pour cela, les nouvelles techniques de séquençage massif seraient une solution radicale.

### IV-B-2-b Statut de la population de Gironde

La pertinence de telles analyses génomiques passe par le choix d'un individu *A. sturio* pur. Les individus des populations méditerranéennes et adriatiques semblent les plus appropriés car la probabilité d'un contact génétique récent entre *A. sturio* et *A. oxyrinchus* dans ces régions est bien plus faible que sur la façade

atlantique, où *A. oxyrinchus* était présent. Ces populations ayant disparu, un des esturgeon ancien dont l'ADN est le mieux préservé (par exemple CH1323) pourra être utilisé comme source de matériel pour l'analyse génomique d'une souche d'*A. sturio* pure.

La comparaison triangulaire entre un *A. oxyrinchus* pur (individu américain), un *A. sturio* pur (individu ancien méditerranéen ou adriatique) et un *A. sturio* actuel de Gironde permettra finalement de clarifier le statut de la population girondine : *A. sturio* pur ou *A. sturio* introgressé par *A. oxyrinchus*.



## BIBLIOGRAPHIE

- Akaike H (1974) New Look at Statistical-Model Identification. *Ieee Transactions on Automatic Control* **AC19**, 716-723.
- Aksu AE, Hiscott RN, Kaminski MA, Mudie PJ, Gillespie H, Abrajano T, Yasar D (2002) Last glacial-Holocene paleoceanography of the Black Sea and Marmara Sea: stable isotopic foraminiferal and coccolith evidence. *Marine Geology* **190**, 119-149.
- Alberto F, Massa S, Manent P, Diaz-Almela E, Arnaud-Haond S, Duarte CM, Serrao EA (2008) Genetic differentiation and secondary contact zone in the seagrass *Cymodocea nodosa* across the Mediterranean-Atlantic transition region. *Journal of Biogeography* **35**, 1279-1294.
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 613-622.
- Allendorf FW, Luikart G (2006) *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell, Malden, Massachusetts.
- Allentoft ME, Schuster SC, Holdaway RN, Hale ML, McLay E, Oskam C, Gilbert MTP, Spencer P, Willerslev E, Bunce M (2009) Identification of microsatellites from an extinct moa species using high-throughput (454) sequence data. *Biotechniques* **46**, 195-200.
- Almodovar A, Machordom A, Suarez J (2000) Preliminary results from characterization of the Iberian Peninsula sturgeon based on analysis of the mtDNA cytochrome b. *Boletin Instituto Espanol De Oceanografia* **16**, 17-27.
- Amos W, Balmford A (2001) When does conservation genetics matter? *Heredity* **87**, 257-265.
- Anderson TM, vonHoldt BM, Candille SI, Musiani M, Greco C, Stahler DR, Smith DW, Padhukasahasram B, Randi E, Leonard JA, Bustamante CD, Ostrander EA, Tang H, Wayne RK, Barsh GS (2009) Molecular and Evolutionary History of Melanism in North American Gray Wolves. *Science* **323**, 1339-1343.
- Angulo E, Courchamp F (2009) Rare Species Are Valued Big Time. *Plos One* **4**.
- Angulo E, Deves AL, Saint Jalmes M, Courchamp F (2009) Fatal attraction: rare species in the spotlight. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **276**, 1331-1337.
- Anonyme (2004a) Eight foot missing fish arrives. In: *Archives du Muséum d'Histoire Naturelle de Londres*, [http://www.nhm.ac.uk/about-us/news/2004/june/news\\_5303.html](http://www.nhm.ac.uk/about-us/news/2004/june/news_5303.html).
- Anonyme (2004b) A Historic Catch. *Science* **305**, 38.
- Antipa G (1909) Fauna ichtiologica a României. *Publicatiunile Fondul Vasilie Adamanchi, Academia Româna, Bucuresti* **16**, 1-294.
- Antoniu-Murgoci A (1946) Sur l'hybridation chez les esturgeons et description de deux formes nouvelles. *Acad. Roum. Bul. Sec. Sci.* **29**, 308-313.
- Arcelin P, Arnaud-Fassetta G, Heijmans M, Valentin F (1999) Le Rhône à Arles. Données archéologiques et sédimentologiques. *Gallia* **56**, 121-129.
- Arlati G, Bronzi P, Colombo G, Giovannini G (1988) Induzione della riproduzione nello storione italiano (*Acipenser naccarii*) allevato in cattività. *Rivista Italiana Acquacoltura*, 94-96.
- Arndt GM, Gessner J, Anders E, Spratte S, Filipiak J, Debus L, Skora K (2000) Predominance of exotic and introduced species among sturgeons captured from the Baltic and North Seas and their watersheds, 1981-1999. *Boletin Instituto Espanol De Oceanografia* **16**, 29-36.
- Arndt GM, Gessner J, Bartel R (2006) Characteristics and availability of spawning habitat for Baltic sturgeon in the Odra River and its tributaries. *Journal of Applied Ichthyology* **22**, 172-181.
- Artyukhin E, Vecsei P (1999) On the status of Atlantic sturgeon: conspecificity of European *Acipenser sturio* and North American *Acipenser oxyrinchus*. *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie* **15**, 35-37C.

- Artyukhin EN (2006) Morphological phylogeny of the order Acipenseriformes. *Journal of Applied Ichthyology* **22**, 66-69.
- Austin JJ, Melville J (2006) Incorporating historical museum specimens into molecular systematic and conservation genetics research. *Molecular Ecology Notes* **6**, 1089-1092.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific Phylogeography - the Mitochondrial-DNA Bridge between Population-Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 489-522.
- Babik W (2010) Methods for MHC genotyping in non-model vertebrates. *Molecular Ecology Resources* **10**, 237-251.
- Bacalbasa-Dobrovici N, Holcik J (2000) Distribution of *Acipenser sturio* L., 1758 in the Black Sea and its watershed. *Boletín Instituto Español De Oceanografía* **16**, 37-41.
- Bain MB (1997) Atlantic and shortnose sturgeons of the Hudson River: Common and divergent life history attributes. *Environmental Biology of Fishes* **48**, 347-358.
- Baker AJ, Daugherty CH, Colbourne R, McLennan JL (1995) Flightless Brown Kiwis of New-Zealand Possess Extremely Subdivided Population-Structure and Cryptic Species Like Small Mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 8254-8258.
- Baker CS, Lukoschek V, Lavery S, Dalebout ML, Yong-Un M, Endo T, Funahashi N (2006) Incomplete reporting of whale, dolphin and porpoise 'bycatch' revealed by molecular monitoring of Korean markets. *Animal Conservation* **9**, 474-482.
- Baker CS, Cooke JG, Lavery S, Dalebout ML, Ma YU, Funahashi N, Carraher C, Brownell RL (2007) Estimating the number of whales entering trade using DNA profiling and capture-recapture analysis of market products. *Molecular Ecology* **16**, 2617-2626.
- Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* **13**, 729-744.
- Banarescu P (1964) Pisces-Osteichthyes. Fauna Republicii Populare Romîne 13, Editura Academiei Republicii Populare Romîne, Bucuresti. 962 pp.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 37-48.
- Bargelloni L, Alarcon JA, Alvarez MC, Penzo E, Magoulas A, Palma J, Patarnello T (2005) The Atlantic-Mediterranean transition: Discordant genetic patterns in two seabream species, *Diplodus puntazzo* (Cetti) and *Diplodus sargus* (L.). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **36**, 523-535.
- Barnes I, Matheus P, Shapiro B, Jensen D, Cooper A (2002) Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian brown bears. *Science* **295**, 2267-2270.
- Barnett R, Yamaguchi N, Barnes I, Cooper A (2006a) Lost populations and preserving genetic diversity in the lion *Panthera leo*: Implications for its ex situ conservation. *Conservation Genetics* **7**, 507-514.
- Barnett R, Yamaguchi N, Barnes I, Cooper A (2006b) The origin, current diversity and future conservation of the modern lion (*Panthera leo*). *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273**, 2119-2125.
- Barnett R, Shapiro B, Barnes I, Ho SYW, Burger J, Yamaguchi N, Higham TFG, Wheeler HT, Rosendahl W, Sher AV, Sotnikova M, Kuznetsova T, Baryshnikov GF, Martin LD, Harington CR, Burns JA, Cooper A (2009) Phylogeography of lions (*Panthera leo* ssp.) reveals three distinct taxa and a late Pleistocene reduction in genetic diversity. *Molecular Ecology* **18**, 1668-1677.
- Barrett RDH, Schluter D (2008) Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution* **23**, 38-44.
- Barsh GS, Anderson TM, Vonholdt BM, Candille SI, Musiani M, Stahler DR, Leonard JA, Padhukasahasram B, Randi E, Bustamante CD, Ostrander EA, Tang H, Wayne RK (2009) How the Gray Wolf Got Its Color Response. *Science* **325**, 34-34.

- Bellemain E, Taberlet P (2004) Improved noninvasive genotyping method: application to brown bear (*Ursus arctos*) faeces. *Molecular Ecology Notes* **4**, 519-522.
- Bellinger MR, Johnson JA, Toepfer J, Dunn P (2003) Loss of genetic variation in Greater Prairie Chickens following a population bottleneck in Wisconsin, USA. *Conservation Biology* **17**, 717-724.
- Bemis WE, Findeis EK, Grande L (1997) An overview of Acipenseriformes. *Environmental Biology of Fishes* **48**, 25-72.
- Bemis WE, Kynard B (1997) Sturgeon rivers: An introduction to Acipenseriform biogeography and life history. *Environmental Biology of Fishes* **48**, 167-184.
- Berg LS (1948) The freshwater fishes of the USSR and adjacent countries, Vol. 1, Part 1. Akademia Nauk USSR, Moscow & Leningrad (in Russian, English translation published by Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem. 505 pp.).
- Bernatchez L, Wilson CC (1998) Comparative phylogeography of nearctic and palearctic fishes. *Molecular Ecology* **7**, 431-452.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* **22**, 148-155.
- Biebach I, Keller LF (2009) A strong genetic footprint of the re-introduction history of Alpine ibex (*Capra ibex ibex*). *Molecular Ecology* **18**, 5046-5058.
- Billard R, Lecointre G (2001) Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **10**, 355-392.
- Binladen J, Wiuf C, Gilbert MTP, Bunce M, Barnett R, Larson G, Greenwood AD, Haile J, Ho SYW, Hansen AJ, Willerslev E (2006) Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes. *Genetics* **172**, 733-741.
- Birdlife International (2008a) *Apteryx mantelli*. In: *IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2*. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>.
- Birdlife International (2008b) *Apteryx haastii*. In: *IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2*. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>.
- Birdlife International (2008c) *Apteryx australis*. In: *IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2*. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>.
- Birky CW (2001) The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: Laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics* **35**, 125-148.
- Birstein V, Doukakis P, DeSalle R (2000) Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: forensic and evolutionary implications. *Conservation Genetics* **1**, 81-88.
- Birstein VJ, Vasiliev VP (1987) Tetraploid-Octoploid Relationships and Karyological Evolution in the Order Acipenseriformes (Pisces) - Karyotypes, Nucleoli, and Nucleolus-Organizer Regions in 4 Acipenserid Species. *Genetica* **72**, 3-12.
- Birstein VJ (1993) Sturgeons and Paddlefishes - Threatened fishes in need of conservation. *Conservation Biology* **7**, 773-787.
- Birstein VJ, Hanner R, DeSalle R (1997a) Phylogeny of the Acipenseriformes: Cytogenetic and molecular approaches. *Environmental Biology of Fishes* **48**, 127-156.
- Birstein VJ, Bemis WE, Waldman JR (1997b) The threatened status of Acipenseriform species: A summary. *Environmental Biology of Fishes* **48**, 427-435.
- Birstein VJ, Betts J, DeSalle R (1998) Molecular identification of *Acipenser sturio* specimens: A warning note for recovery plans. *Biological Conservation* **84**, 97-101.
- Birstein VJ, DeSalle R (1998) Molecular phylogeny of Acipenserinae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **9**, 141-155.

- Birstein VJ, Doukakis P, DeSalle R (1999) Molecular phylogeny of Acipenserinae and black caviar species identification. *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie* **15**, 12-16.
- Birstein VJ, Doukakis P, DeSalle R (2002) Molecular phylogeny of Acipenseridae: Nonmonophyly of Scaphirhynchinae. *Copeia*, 287-301.
- Bjorck S (1995) A Review of the History of the Baltic Sea, 13.0-8.0 Ka Bp. *Quaternary International* **27**, 19-40.
- Blanc PL (2002) The opening of the Plio-Quaternary Gibraltar Strait: assessing the size of a cataclysm. *Geodinamica Acta* **15**, 303-317.
- Blanchard R (1920) L'aménagement du Rhône. *Annales de Géographie* **29**, 36-41.
- Boakes EH, Wang J, Amos W (2007) An investigation of inbreeding depression and purging in captive pedigreed populations. *Heredity* **98**, 172-182.
- Boecklen WJ, Howard DJ (1997) Genetic analysis of hybrid zones: Numbers of markers and power of resolution. *Ecology* **78**, 2611-2616.
- Bogenhagen D, Clayton DA (1978) Mechanism of Mitochondrial-DNA Replication in Mouse L-Cells - Kinetics of Synthesis and Turnover of Initiation Sequence. *Journal of Molecular Biology* **119**, 49-68.
- Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* **27**, 1767-1780.
- Borsa P, Blanquer A, Berrebi P (1997) Genetic structure of the flounders *Platichthys flesus* and *P. stellatus* at different geographic scales. *Marine Biology* **129**, 233-246.
- Bouchet M (1980) Le Rhône, la C.N.R. et les autres. *Revue de géographie de Lyon* **55**, 241-262.
- Bouzat JL, Lewin HA, Paige KN (1998) The ghost of genetic diversity past: Historical DNA analysis of the greater prairie chicken. *American Naturalist* **152**, 1-6.
- Bremer JRA, Vinas J, Mejuto J, Ely B, Pla C (2005) Comparative phylogeography of Atlantic bluefin tuna and swordfish: the combined effects of vicariance, secondary contact, introgression, and population expansion on the regional phylogenies of two highly migratory pelagic fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **36**, 169-187.
- Briggs AW, Stenzel U, Johnson PLF, Green RE, Kelso J, Prufner K, Meyer M, Krause J, Ronan MT, Lachmann M, Pääbo S (2007) Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 14616-14621.
- Bronzi P, Congiu L, Rossi R, Zerunian S, Arlati G (2009) *Acipenser naccarii*. In: *IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. www.iucnredlist.org*.
- Broquet T, Petit E (2004) Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics. *Molecular Ecology* **13**, 3601-3608.
- Brosse L (2003) Caractérisation des habitats des juvéniles d'esturgeon européen, *Acipenser sturio*, dans l'estuaire de la Gironde : Relations trophiques, hiérarchisation et vulnérabilité des habitats., PhD Thesis, University of Toulouse, France. 258 p.
- Brosse L, Berrebi P, Desse-Berset N, Lepage M (2009a) Sturgeon Recovery Plan in the Rhone River (France): Preliminary Results on Species Determination and Habitat Suitability. In: *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons* (eds. Carmona R, Domezain A, GarciaGallego M, et al.), pp. 403-421.
- Brosse L, Desse-Berset N, Berrebi P, Lepage M, Menella J-Y (2009b) Étude de la faisabilité de la réintroduction de l'esturgeon dans le bassin du Rhône. (ed. 1 Rdép).
- Brotherton P, Endicott P, Sanchez JJ, Beaumont M, Barnett R, Austin J, Cooper A (2007) Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C > U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions. *Nucleic Acids Research* **35**, 5717-5728.
- Brown GG, Gadaleta G, Pepe G, Saccone C, Sbisà E (1986) Structural Conservation and Variation in the D-Loop-Containing Region of Vertebrate Mitochondrial-DNA. *Journal of Molecular Biology* **192**, 503-511.

- Brown JH, Lomolino MV (1998) *Biogeography (2nd Edition)* Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Brown JR, Beckenbach AT, Smith MJ (1992) Mitochondrial-DNA length variation and heteroplasmy in populations of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Genetics* **132**, 221-228.
- Brown JR, Beckenbach K, Beckenbach AT, Smith MJ (1996) Length variation, heteroplasmy and sequence divergence in the mitochondrial DNA of four species of sturgeon (*Acipenser*). *Genetics* **142**, 525-535.
- Brown JW, de Groot PJV, Birt TP, Seutin G, Boag PT, Friesen VL (2007) Appraisal of the consequences of the DDT-induced bottleneck on the level and geographic distribution of neutral genetic variation in Canadian peregrine falcons, *Falco peregrinus*. *Molecular Ecology* **16**, 327-343.
- Brownstein MJ, Carpten JD, Smith JR (1996) Modulation of non-templated nucleotide addition by tag DNA polymerase: Primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques* **20**, 1004-8.
- Buroker NE, Brown JR, Gilbert TA, Ohara PJ, Beckenbach AT, Thomas WK, Smith MJ (1990) Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial-DNA - An illegitimate elongation model. *Genetics* **124**, 157-163.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* **55**, 611-622.
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RI, Mulley JC, Sutherland GR (1993) Incidence and Origin of Null Alleles in the (Ac)N Microsatellite Markers. *American Journal of Human Genetics* **52**, 922-927.
- Calvignac S, Hughes S, Tougaard C, Michaux J, Thevenot M, Philippe M, Hamdine W, Hänni C (2008) Ancient DNA evidence for the loss of a highly divergent brown bear clade during historical times. *Molecular Ecology* **17**, 1962-1970.
- Calvignac S, Hughes S, Hänni C (2009) Genetic diversity of endangered brown bear (*Ursus arctos*) populations at the crossroads of Europe, Asia and Africa. *Diversity and Distributions* **15**, 742-750.
- Campbell KL, Roberts JEE, Watson LN, Stetefeld J, Sloan AM, Signore AV, Howatt JW, Tame JRH, Rohland N, Shen TJ, Austin JJ, Hofreiter M, Ho C, Weber RE, Cooper A (2010) Substitutions in woolly mammoth hemoglobin confer biochemical properties adaptive for cold tolerance. *Nature Genetics* **42**, 536-U591.
- Campos PF, Willerslev E, Sher A, Orlando L, Axelsson E, Tikhonov A, Aaris-Sorensen K, Greenwood AD, Kahlke RD, Kosintsev P, Krakhmalnaya T, Kuznetsova T, Lemey P, MacPhee R, Norris CA, Shepherd K, Suchard MA, Zazula GD, Shapiro B, Gilbert MTP (2010) Ancient DNA analyses exclude humans as the driving force behind late Pleistocene musk ox (*Ovibos moschatus*) population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 5675-5680.
- Cano RJ, Poinar HN, Pieniazek NJ, Acra A, Poinar GO (1993) Amplification And Sequencing Of Dna From A 120-135-Million-Year-Old Weevil. *Nature* **363**, 536-538.
- Cappellini E, Gilbert MTP, Geuna F, Fiorentino G, Hall A, Thomas-Oates J, Ashton PD, Ashford DA, Arthur P, Campos PF, Kool J, Willerslev E, Collins MJ (2010) A multidisciplinary study of archaeological grape seeds. *Naturwissenschaften* **97**, 205-217.
- Carlsson J (2008) Effects of Microsatellite Null Alleles on Assignment Testing. *Journal of Heredity* **99**, 616-623.
- Casas-Marce M, Revilla E, Godoy A (2010) Searching for DNA in museum specimens: a comparison of sources in a mammal species. *Molecular Ecology Resources* **10**, 502-507.
- Chakraborty R, Kimmel M, Stivers DN, Davison LJ, Deka R (1997) Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 1041-1046.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT (1988) Deletion Screening of the Duchenne Muscular-Dystrophy Locus Via Multiplex DNA Amplification. *Nucleic Acids Research* **16**, 11141-11156.

- Chan YL, Anderson CNK, Hadly EA (2006) Bayesian estimation of the timing and severity of a population bottleneck from ancient DNA. *Plos Genetics* **2**, 451-460.
- Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 621-631.
- Choudhury A, Dick TA (1998) The historical biogeography of sturgeons (Osteichthyes : Acipenseridae): a synthesis of phylogenetics, palaeontology and palaeogeography. *Journal of Biogeography* **25**, 623-640.
- CITES (1997) Proposition 10.65 d'amendement des annexes I et II de la CITES, 10e session de la Conférence des Parties, Harare (Zimbabwe), 9-20 Juin 1997.
- Clark PU, Dyke AS, Shakun JD, Carlson AE, Clark J, Wohlfarth B, Mitrovica JX, Hostetler SW, McCabe AM (2009) The Last Glacial Maximum. *Science* **325**, 710-714.
- Classen TEA (1944) Estudio bio-estadístico del Esturiòn o sollo del Guadalquivir. *Minist. Mar. Inst. Espanol Oceanograf. Madrid*, 112 p.
- Clayton DA (1991) Replication and Transcription of Vertebrate Mitochondrial-DNA. *Annual Review of Cell Biology* **7**, 453-478.
- Cloquet H (1819a) *Dictionnaire des Sciences Naturelles... Suivi d'une biographie des plus célèbres naturalistes. Tome VII. p. 165-184.* Sous la direction de F. Cuvier.
- Cloquet H (1819b) *Dictionnaire des Sciences Naturelles... Suivi d'une biographie des plus célèbres naturalistes. Tome VI. p. 371-396.* Sous la direction de F. Cuvier.
- Coble MD, Loreille OM, Wadhams MJ, Edson SM, Maynard K, Meyer CE, Niederstatter H, Berger C, Berger B, Falsetti AB, Gill P, Parson W, Finelli LN (2009) Mystery Solved: The Identification of the Two Missing Romanov Children Using DNA Analysis. *Plos One* **4**.
- Coll M, Piroddi C, Steenbeek J, Kaschner K, Lasram FB, Aguzzi J, Ballesteros E, Bianchi CN, Corbera J, Dailianis T, Danovaro R, Estrada M, Froglia C, Galil BS, Gasol JM, Gertwagen R, Gil J, Guilhaumon F, Kesner-Reyes K, Kitsos MS, Koukouras A, Lampadariou N, Laxamana E, de la Cuadra C, Lotze HK, Martin D, Mouillot D, Oro D, Raicevich S, Rius-Barile J, Saiz-Salinas JI, San Vicente C, Somot S, Templado J, Turon X, Vafidis D, Villanueva R, Voultziadou E (2010) The Biodiversity of the Mediterranean Sea: Estimates, Patterns, and Threats. *Plos One* **5**.
- Consuegra S, Verspoor E, Knox D, de Leaniz CG (2005) Asymmetric gene flow and the evolutionary maintenance of genetic diversity in small, peripheral Atlantic salmon populations. *Conservation Genetics* **6**, 823-842.
- Cooper A, Mourerchauvire C, Chambers GK, Vonhaeseler A, Wilson AC, Pääbo S (1992) Independent Origins of New-Zealand Moas and Kiwis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 8741-8744.
- Cooper A, Poinar HN (2000) Ancient DNA: Do it right or not at ALL. *Science* **289**, 1139-1139.
- Cooper A, Lalueza-Fox C, Anderson S, Rambaut A, Austin J, Ward R (2001) Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. *Nature* **409**, 704-707.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.
- Coughlan J, McGinnity P, O'Farrell B, Dillane E, Diserud O, de Eyto E, Farrell K, Whelan K, Stet RJM, Cross TF (2006) Temporal variation in an immune response gene (MHC I) in anadromous *Salmo trutta* in an Irish river before and during aquaculture activities. *Ices Journal of Marine Science* **63**, 1248-1255.
- Courchamp F, Angulo E, Rivalan P, Hall RJ, Signoret L, Bull L, Meinard Y (2006) Rarity value and species extinction: The anthropogenic Allee effect. *Plos Biology* **4**, 2405-2410.
- Couvet D (2002) Deleterious effects of restricted gene flow in fragmented populations. *Conservation Biology* **16**, 369-376.
- Culver M, Johnson WE, Pecon-Slattery J, O'Brien SJ (2000) Genomic ancestry of the American puma (*Puma concolor*). *Journal of Heredity* **91**, 186-197.
- D'Ancona U (1924) Dati per la biologia degli storioni nelle acque italiane. *Monit. Zool. ital.* **35**, 6-7.

- Dawid IB, Blackler AW (1972) Maternal and Cytoplasmic Inheritance of Mitochondrial-DNA in *Xenopus*. *Developmental Biology* **29**, 152-&.
- De la Herran R, Robles F, Martinez-Espin E, Lorente JA, Rejon CR, Garrido-Ramos MA, Rejon MR (2004) Genetic identification of western Mediterranean sturgeons and its implication for conservation. *Conservation Genetics* **5**, 545-551.
- De Marin de Carranrais F (1877) *L'Abbaye de Montmajour: Etude historique d'après les manuscrits de D. Chantelou et autres documents inédits*.
- Deagle BE, Tollit DJ, Jarman SN, Hindell MA, Trites AW, Gales NJ (2005) Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. *Molecular Ecology* **14**, 1831-1842.
- Deagle BE, Eveson JP, Jarman SN (2006) Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples - a case study on DNA in faeces. *Frontiers in Zoology*, 11.
- Debruyne R, Chu G, King CE, Bos K, Kuch M, Schwarz C, Szpak P, Grocke DR, Matheus P, Zazula G, Guthrie D, Froese D, Buigues B, de Marliave C, Flemming C, Poinar D, Fisher D, Southon J, Tikhonov AN, MacPhee RDE, Poinar HN (2008) Out of America: Ancient DNA evidence for a new world origin of late quaternary woolly mammoths. *Current Biology* **18**, 1320-1326.
- Debus L (1999) Meristic and morphological features of the Baltic sturgeon (*Acipenser sturio* L.). *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie* **15**, 38-45.
- Denton GH, Alley RB, Comer GC, Broecker WS (2005) The role of seasonality in abrupt climate change. *Quaternary Science Reviews* **24**, 1159-1182.
- DeSalle R, Birstein VJ (1996) PCR identification of black caviar. *Nature* **381**, 197-198.
- Desse-Berset N (1994) Sturgeons of the Rhône during Protohistory in Arles (6th-2nd century BC). *Proceedings of the 7th meeting of the ICAZ, Annales du Musée Royal de l'Afrique Centrale, Sciences Zoologiques*, 81-90.
- Desse-Berset N, Desse J (2000) Salsamenta, garum et autres préparations de poissons : ce que disent les os. *Mélanges de l'Ecole Française de Rome, MEFRA*. **112**, 73-97.
- Desse-Berset N (2009a) First archaeozoological identification of Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus* Mitchill 1815) in France. *Comptes Rendus Palevol* **8**, 717-724.
- Desse-Berset N (2009b) La pêche dans l'économie de subsistance des sites de Ponthezières et de La Perroche (Île d'Oléron, Néolithique final). In: *Des premiers paysans aux premiers métallurgistes sur la façade atlantique de la France (3500-2000 av. J.-C.), sous la direction de Luc Laporte*. (ed. Chauvinoises CAdP), pp. 586-611.
- Desse-Berset N, Williot P (sous presse). Emerging questions from the discovery of the long term presence of *Acipenser oxyrinchus* in France. *Journal of Applied Ichthyology*.
- Dingerkus G, Howell WM (1976) Karyotypic Analysis and Evidence of Tetraploidy in North-American Paddlefish, *Polyodon-Spathula*. *Science* **194**, 842-844.
- Doda JN, Wright CT, Clayton DA (1981) Elongation of Displacement-Loop Strands in Human and Mouse Mitochondrial-DNA Is Arrested near Specific Template Sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **78**, 6116-6120.
- Domingues VS, Bucciarelli G, Almada VC, Bernardi G (2005) Historical colonization and demography of the Mediterranean damselfish, *Chromis chromis*. *Molecular Ecology* **14**, 4051-4063.
- Doukakis P, Birstein VJ, DeSalle R, Ludwig AN, Ludwig A, Machordom A, Almodovar A, Elvira B (2000) Failure to confirm previous identification of two putative museum specimens of the Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio*, as the Adriatic sturgeon, *A-naccarii*. *Marine Biology* **136**, 373-377.
- Doukakis P, Birstein VJ, De Salle R (2005) Intraspecific structure within three caviar-producing sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*, *A. stellatus*, and *Huso huso*) based on mitochondrial DNA analysis. *Journal of Applied Ichthyology* **21**, 457-460.

- Douki T, Laporte G, Cadet J (2003) Inter-strand photoproducts are produced in high yield within A-DNA exposed to UVC radiation. *Nucleic Acids Research* **31**, 3134-3142.
- Drummond AJ, Nicholls GK, Rodrigo AG, Solomon W (2002) Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics* **161**, 1307-1320.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* **22**, 1185-1192.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *Plos Biology* **4**, 699-710.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**.
- Duggen S, Hoernle K, van den Bogaard P, Rupke L, Morgan JP (2003) Deep roots of the Messinian salinity crisis. *Nature* **422**, 602-606.
- Dunn RR (2005) Modern insect extinctions, the neglected majority. *Conservation Biology* **19**, 1030-1036.
- Economidis PS (1973) Catalogue de Poissons de la Grèce. *Hellenic Oceanology and Limnology* **11**, 421-598.
- Economidis PS, Koutrakis ET, Bobori DC (2000) Distribution and conservation of *Acipenser sturio* L., 1758 and related species in Greek waters. *Boletín Instituto Español De Oceanografía* **16**, 81-88.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**, 1792-1797.
- Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT (1991) DNA Typing and Genetic-Mapping with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats. *American Journal of Human Genetics* **49**, 746-756.
- Edwards CJ, Connellan J, Wallace PF, Park SDE, McCormick FM, Olsaker I, Eythorsdottir E, MacHugh DE, Bailey JF, Bradley DG (2003) Feasibility and utility of microsatellite markers in archaeological cattle remains from a Viking Age settlement in Dublin. *Animal Genetics* **34**, 410-416.
- Edwards MC, Gibbs RA (1994) Multiplex Pcr - Advantages, Development, and Applications. *Pcr- Methods and Applications* **3**, S65-S75.
- Eglinton G, Logan GA (1991) Molecular Preservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **333**, 315-328.
- Ehlers J, Gibbard PL (2004) Quaternary Glaciations - Extent and Chronology, Part I: Europe. *Developments in Quaternary Science*, vol. 2a. Elsevier, Amsterdam.
- Ehlers J, Gibbard PL (2007) The extent and chronology of cenozoic global glaciation. *Quaternary International* **164-65**, 6-20.
- Ellstrand NC, Prentice HC, Hancock JF (1999) Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology and Systematics* **30**, 539-563.
- Elvira B, Almodovar A (1993) Notice about the survival of sturgeon (*Acipenser sturio* L., 1758) in the Guadalquivir estuary (S.W. Spain). *Archiv für Hydrobiologie* **129**, 253-255.
- Elvira B, Almodovar A (1999) A morphological study of native sturgeon *Acipenser sturio* in Spain, and recent records of exotic siberian sturgeon. *Journal of Applied Ichthyology* **15**, 278-279.
- Elvira B, Almodovar A (2000a) Morphology and taxonomy of the Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio* from Spain. *Folia Zoologica* **49**, 221-230.
- Elvira B, Almodovar A (2000b) Further observations on the morphological characters of *Acipenser sturio* L., 1758 from the Iberian Peninsula: A comparison with North and Adriatic Sea populations. *Boletín Instituto Español De Oceanografía* **16**, 89-97.



- Espeland M, Irestedt M, Johanson KA, Akerlund M, Bergh JE, Kallersjo M (2010) Dichlorvos exposure impedes extraction and amplification of DNA from insects in museum collections. *Frontiers in Zoology* **7**.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.
- Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM (2007) DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annual Review of Biochemistry* **76**, 679-699.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**, 1567-1587.
- Felsenstein J (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**, 164-166.
- Fernandez-Pasquier V (2000) Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 in the Guadalquivir River, Spain: A further contribution to its recent population dynamics and present decline. *Boletín Instituto Español De Oceanografía* **16**, 109-116.
- Fernandez H, Hughes S, Vigne JD, Helmer D, Hodgins G, Miquel C, Hänni C, Luikart G, Taberlet P (2006) Divergent mtDNA lineages of goats in an Early Neolithic site, far from the initial domestication areas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 15375-15379.
- Findeis EK (1997) Osteology and phylogenetic interrelationships of sturgeons (Acipenseridae). *Environmental Biology of Fishes* **48**, 73-126.
- Finkeldey R, Leinemann L, Gailing O (2010) Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**, 1251-1258.
- Flagstad O, Walker CW, Vila C, Sundqvist AK, Fernholm B, Hufthammer AK, Wiig O, Koyola I, Ellegren H (2003) Two centuries of the Scandinavian wolf population: patterns of genetic variability and migration during an era of dramatic decline. *Molecular Ecology* **12**, 869-880.
- Flajshans M, Vajcova V (2000) Odd ploidy levels in sturgeons suggest a backcross of interspecific hexaploid sturgeon hybrids to evolutionarily tetraploid and/or octaploid parental species. *Folia Zoologica* **49**, 133-138.
- Fleming IA, Hindar K, Mjølnerod IB, Jonsson B, Balstad T, Lamberg A (2000) Lifetime success and interactions of farm salmon invading a native population. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **267**, 1517-1523.
- Fontana F, Colombo G (1974) The chromosomes of Italian sturgeons. *Cellular and Molecular Life Sciences* **30**, 739-742.
- Fontana F (1994) Chromosomal nucleolar organizer regions in 4 sturgeon species as markers of karyotype evolution in Acipenseriformes (Pisces) *Genome* **37**, 888-892.
- Fontana F, Lanfredi M, Chicca M, Congiu L, Tagliavini J, Rossi R (1999) Fluorescent in situ hybridization with rDNA probes on chromosomes of *Acipenser ruthenus* and *Acipenser naccarii* (Osteichthyes Acipenseriformes). *Genome* **42**, 1008-1012.
- Fontana F, Tagliavini J, Congiu L (2001) Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancements and perspectives. *Genetica* **111**, 359-373.
- Fontana F (2002) A cytogenetic approach to the study of taxonomy and evolution in sturgeons. *Journal of Applied Ichthyology* **18**, 226-233.
- Fontana F, Lanfredi M, Congiu L, Leis M, Chicca M, Rossi R (2003) Chromosomal mapping of 18S-28S and 5S rRNA genes by two-colour fluorescent in situ hybridization in six sturgeon species. *Genome* **46**, 473-477.
- Fontana F, Congiu L, Mudrak VA, Quattro JM, Smith TIJ, Ware K, Doroshov SI (2008) Evidence of hexaploid karyotype in shortnose sturgeon. *Genome* **51**, 113-119.
- Forlani A, Fontana F, Congiu L (2008) Isolation of microsatellite loci from the endemic and endangered Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Conservation Genetics* **9**, 461-463.
- Frankham R (1995a) Conservation genetics. *Annual Review of Genetics* **29**, 305-327.

- Frankham R (1995b) Effective Population-Size Adult-Population Size Ratios in Wildlife - a Review. *Genetical Research* **66**, 95-107.
- Frankham R, Ralls K (1998) Conservation biology - Inbreeding leads to extinction. *Nature* **392**, 441-442.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics* Cambridge University Press, Cambridge UK.
- Frankham R (2008) Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology* **17**, 325-333.
- Fraser DJ, Bernatchez L (2001) Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology* **10**, 2741-2752.
- Fu YX, Li WH (1999) Coalescing into the 21st century: An overview and prospects of coalescent theory. *Theoretical Population Biology* **56**, 1-10.
- Gagneux P, Boesch C, Woodruff DS (1997) Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology* **6**, 861-868.
- Galtier N, Nabholz B, Glemin S, Hurst GDD (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* **18**, 4541-4550.
- Garcia-Castellanos D, Estrada F, Jimenez-Munt I, Gorini C, Fernandez M, Verges J, De Vicente R (2009) Catastrophic flood of the Mediterranean after the Messinian salinity crisis. *Nature* **462**, 778-U796.
- Gardiner BG (1984) Sturgeons as living fossils. In: *Living Fossils* (eds. Elderedge N, Stanley SM), pp. 148-152. Springer Verlag, New York.
- Garrido-Ramos MA, Soriguer MC, DelaHerran R, Jamilena M, Rejon CR, Domezain A, Hernando JA, Rejon MR (1997) Morphometric and genetic analysis as proof of the existence of two sturgeon species in the Guadalquivir river. *Marine Biology* **129**, 33-39.
- Garrido-Ramos MA, Robles F, de la Herran R, Martinez-Espin E, Lorente JA, Ruiz-Rejon C, Ruiz-Rejon M (2009) Analysis of Mitochondrial and Nuclear DNA Markers in Old Museum Sturgeons Yield Insights About the Species Existing in Western Europe: *A. sturio*, *A. naccarii* and *A. oxyrinchus*. In: *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons* (eds. Carmona R, Domezain A, GarciaGallego M, et al.), pp. 25-49.
- GarridoRamos MA, Soriguer MC, delaHerran R, Jamilena M, Rejon CR, Domezain A, Hernando JA, Rejon MR (1997) Morphometric and genetic analysis as proof of the existence of two sturgeon species in the Guadalquivir river. *Marine Biology* **129**, 33-39.
- Garvey JE, Stein RA, Thomas HM (1994) Assessing How Fish Predation and Interspecific Prey Competition Influence a Crayfish Assemblage. *Ecology* **75**, 532-547.
- Gascuel O (1997) BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 685-695.
- Gault A, Meinard Y, Courchamp F (2008) Consumers' taste for rarity drives sturgeons to extinction. *Conservation Letters* **1**, 199-207.
- Gebhard W, Zachau HG (1983) Simple DNA-Sequences and Dispersed Repetitive Elements in the Vicinity of Mouse Immunoglobulin-K Light Chain Genes. *Journal of Molecular Biology* **170**, 567-573.
- Gerloff U, Schlotterer C, Rassmann K, Rambold I, Hohmann G, Fruth B, Tautz D (1995) Amplification of Hypervariable Simple Sequence Repeats (Microsatellites) from Excremental DNA of Wild Living Bonobos (*Pan-Paniscus*). *Molecular Ecology* **4**, 515-518.
- Gervais H, Boulart R (1876) *Poissons d'eau douce, Tome 1er*, Rothschild J., Paris.
- Gessner J (2000) Reasons for the decline of *Acipenser sturio* L., 1758 in central Europe, and attempts at its restoration. *Boletin Instituto Espanol De Oceanografia* **16**, 117-126.
- Gessner J, Arndt GM (2006) Modification of gill nets to minimize by-catch of sturgeons. *Journal of Applied Ichthyology* **22**, 166-171.

- Gessner J, Arndt GM, Tiedemann R, Bartel R, Kirschbaum F (2006) Remediation measures for the Baltic sturgeon: status review and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology* **22**, 23-31.
- Gessner J, Horvath A, Arndt GM, Urbanyi B, Anders E, Hegyi A, Wuertz S (2009) Intercontinental transfer of adult *Acipenser oxyrinchus*- impact assessment of aviation transport conditions on blood parameters. *Journal of Applied Ichthyology* **25**, 365-371.
- Gibbard PL (1988) The History of the Great Northwest European Rivers During the Past 3 Million Years. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **318**, 559-602.
- Gilbert MTP, Hansen AJ, Willerslev E, Rudbeck L, Barnes I, Lynnerup N, Cooper A (2003) Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage. *American Journal of Human Genetics* **72**, 48-61.
- Gilbert MTP, Bandelt HJ, Hofreiter M, Barnes I (2005) Assessing ancient DNA studies. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 541-544.
- Gilbert MTP, Binladen J, Miller W, Wiuf C, Willerslev E, Poinar H, Carlson JE, Leebens-Mack JH, Schuster SC (2007) Recharacterization of ancient DNA miscoding lesions: insights in the era of sequencing-by-synthesis. *Nucleic Acids Research* **35**, 1-10.
- Gilbert MTP, Drautz DI, Lesk AM, Ho SYW, Qi J, Ratan A, Hsu CH, Sher A, Dalen L, Gotherstrom A, Tomsho LP, Rendulic S, Packard M, Campos PF, Kuznetsova TV, Shidlovskiy F, Tikhonov A, Willerslev E, Iacumin P, Buigues B, Ericson PGP, Germonpre M, Kosintsev P, Nikolaev V, Nowak-Kemp M, Knight JR, Irzyk GP, Perbost CS, Fredrikson KM, Harkins TT, Sheridan S, Miller W, Schuster SC (2008a) Intraspecific phylogenetic analysis of Siberian woolly mammoths using complete mitochondrial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 8327-8332.
- Gilbert MTP, Poinar H, Fiedel S, King C, Devault A, Bos K, Kuch M, Debruyne R (2008b) DNA from pre-Clovis human coprolites in Oregon, North America (320, pg 786, 2008). *Science* **325**, 148-148.
- Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J (2000) An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Science International* **112**, 17-40.
- Glavin T (2007) *The Sixth Extinction: Journeys Among the Lost and Left Behind*. Thomas Dunne Books, New York.
- Goldstein PZ, Desalle R (2003) Calibrating phylogenetic species formation in a threatened insect using DNA from historical specimens. *Molecular Ecology* **12**, 1993-1998.
- Golenberg EM, Giannasi DE, Clegg MT, Smiley CJ, Durbin M, Henderson D, Zurawski G (1990) Chloroplast DNA-Sequence from a Miocene Magnolia Species. *Nature* **344**, 656-658.
- Gonthier P (2009) European sturgeon ... A come back? *Cahiers Agricultures* **18**, 195-198.
- Goossens B, Chikhi L, Jalil MF, Ancrenaz M, Lackman-Ancrenaz I, Mohamed M, Andau P, Bruford MW (2005) Patterns of genetic diversity and migration in increasingly fragmented and declining orang-utan (*Pongo pygmaeus*) populations from Sabah, Malaysia. *Molecular Ecology* **14**, 441-456.
- Gottelli D, Sillerozubiri C, Applebaum GD, Roy MS, Girman DJ, Garciamoreno J, Ostrander EA, Wayne RK (1994) Molecular-Genetics of the Most Endangered Canid - the Ethiopian Wolf *Canis-Simensis*. *Molecular Ecology* **3**, 301-312.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010) SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution* **27**, 221-224.
- Graham SW, Olmstead RG, Barrett SCH (2002) Rooting phylogenetic trees with distant outgroups: A case study from the commelinoid monocots. *Molecular Biology And Evolution* **19**, 1769-1781.
- Grande L, Jin F, Yabumoto Y, Bemis WE (2002) *Protopsephurus liui*, a well-preserved primitive paddlefish (*Acipenseriformes* : *polyodontidae*) from the lower cretaceous of China. *Journal of Vertebrate Paleontology* **22**, 209-237.

- Grande L, Hilton EJ (2006) An exquisitely preserved skeleton representing a primitive sturgeon from the Upper Cretaceous Judith River Formation of Montana (Acipenseriformes : Acipenseridae : n. gen. and sp). *Journal of Paleontology* **80**, 1-39.
- Grant PR, Grant BR (1992) Hybridization of Bird Species. *Science* **256**, 193-197.
- Grant PR, Grant BR, Petren K (2000) The allopatric phase of speciation: the sharp-beaked ground finch (*Geospiza difficilis*) on the Galapagos islands. *Biological Journal of the Linnean Society* **69**, 287-317.
- Greaves DR, Patient RK (1985) (AT)<sub>n</sub> Is an Interspersed Repeat in the *Xenopus* Genome. *Embo Journal* **4**, 2617-2626.
- Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, Patterson N, Li H, Zhai WW, Fritz MHY, Hansen NF, Durand EY, Malaspina AS, Jensen JD, Marques-Bonet T, Alkan C, Prufer K, Meyer M, Burbano HA, Good JM, Schultz R, Aximu-Petri A, Butthof A, Hober B, Hoffner B, Siegemund M, Weihmann A, Nusbaum C, Lander ES, Russ C, Novod N, Affourtit J, Egholm M, Verna C, Rudan P, Brajkovic D, Kucan Z, Gusic I, Doronichev VB, Golovanova LV, Lalueza-Fox C, de la Rasilla M, Fortea J, Rosas A, Schmitz RW, Johnson PLF, Eichler EE, Falush D, Birney E, Mullikin JC, Slatkin M, Nielsen R, Kelso J, Lachmann M, Reich D, Pääbo S (2010) A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science* **328**, 710-722.
- Greenwood AD, Lee F, Capelli C, DeSalle R, Tikhonov A, Marx PA, MacPhee RDE (2001) Evolution of endogenous retrovirus-like elements of the woolly mammoth (*Mammuthus primigenius*) and its relatives. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 840-847.
- Griffith B, Scott JM, Carpenter JW, Reed C (1989) Translocation as a Species Conservation Tool - Status and Strategy. *Science* **245**, 477-480.
- Groombridge JJ, Dawson DA, Burke T, Prys-Jones R, Brooke MD, Shah N (2009) Evaluating the demographic history of the Seychelles kestrel (*Falco araea*): Genetic evidence for recovery from a population bottleneck following minimal conservation management. *Biological Conservation* **142**, 2250-2257.
- Gross MR (1987) The evolution of diadromy in fishes. *American Fisheries Society Symposium* **1**, 14-25.
- Grunwald C, Stabile J, Waldman JR, Gross R, Wirgin I (2002) Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences. *Molecular Ecology* **11**, 1885-1898.
- Grunwald C, Maceda L, Waldman J, Stabile J, Wirgin I (2007) Conservation of Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*: delineation of stock structure and distinct population segments. *Conservation Genetics*.
- Guénaux G (1923) *Les poissons d'eau douce dans leurs rapports avec la pêche et la pisciculture*. Librairie J.-B. Baillière et fils, Paris.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**, 696-704.
- Gutierrez G, Marin A (1998) The most ancient DNA recovered from an amber-preserved specimen may not be as ancient as it seems. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 926-929.
- Haddrath O, Baker AJ (2001) Complete mitochondrial DNA genome sequences of extinct birds: ratite phylogenetics and the vicariance biogeography hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268**, 939-945.
- Hadly EA (1996) Influence of late-Holocene climate on northern Rocky Mountain mammals. *Quaternary Research* **46**, 298-310.
- Hadly EA, Kohn MH, Leonard JA, Wayne RK (1998) A genetic record of population isolation in pocket gophers during Holocene climatic change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 6893-6896.
- Hadly EA, Ramakrishnan U, Chan YL, van Tuinen M, O'Keefe K, Spaeth PA, Conroy CJ (2004) Genetic response to climatic change: Insights from ancient DNA and phylogenetics. *Plos Biology* **2**, 1600-1609.

- Hagelberg E, Sykes B, Hedges R (1989) Ancient Bone DNA Amplified. *Nature* **342**, 485-485.
- Hagelberg E, Thomas MG, Cook CE, Sher AV, Baryshnikov GF, Lister AM (1994) DNA from Ancient Mammoth Bones. *Nature* **370**, 333-334.
- Haile J, Holdaway R, Oliver K, Bunce M, Gilbert MTP, Nielsen R, Munch K, Ho SYW, Shapiro B, Willerslev E (2007) Ancient DNA chronology within sediment deposits: Are paleobiological reconstructions possible and is DNA leaching a factor? *Molecular Biology and Evolution* **24**, 982-989.
- Hailer F, Helander B, Folkestad AO, Ganusevich SA, Garstad S, Hauff P, Koren C, Nygard T, Volke V, Vila C, Ellegren H (2006) Bottlenecked but long-lived. high genetic diversity retained in white-tailed eagles upon recovery from population decline. *Biology Letters* **2**, 316-319.
- Hall LM, Willcox MS, Jones DS (1997) Association of enzyme inhibition with methods of museum skin preparation. *Biotechniques* **22**, 928-&.
- Halpern BS, Walbridge S, Selkoe KA, Kappel CV, Micheli F, D'Agrosa C, Bruno JF, Casey KS, Ebert C, Fox HE, Fujita R, Heinemann D, Lenihan HS, Madin EMP, Perry MT, Selig ER, Spalding M, Steneck R, Watson R (2008) A global map of human impact on marine ecosystems. *Science* **319**, 948-952.
- Hamada H, Kakunaga T (1982) Potential Z-DNA Forming Sequences Are Highly Dispersed in the Human Genome. *Nature* **298**, 396-398.
- Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T (1982) A Novel Repeated Element with Z-DNA-Forming Potential Is Widely Found in Evolutionarily Diverse Eukaryotic Genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **79**, 6465-6469.
- Handt O, Hoss M, Krings M, Pääbo S (1994) Ancient DNA - Methodological Challenges. *Experientia* **50**, 524-529.
- Hänni C, Laudet V, Sakka M, Begue A, Stehelin D (1990) Amplification of Mitochondrial-DNA Fragments from Ancient Human Teeth and Bones. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* **310**, 365-370.
- Hänni C, Laudet V, Stehelin D, Taberlet P (1994) Tracking the Origins of the Cave Bear (*Ursus-Spelaeus*) by Mitochondrial-DNA Sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 12336-12340.
- Hänni C, Brousseau T, Laudet V, Stehelin D (1995) Isopropanol Precipitation Removes Pcr Inhibitors from Ancient Bone Extracts. *Nucleic Acids Research* **23**, 881-882.
- Hansen MM (2002) Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (*Salmo trutta*) populations: an approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Molecular Ecology* **11**, 1003-1015.
- Hansen MM, Ruzzante DE, Nielsen EE, Bekkevold D, Mensberg KLD (2002) Long-term effective population sizes, temporal stability of genetic composition and potential for local adaptation in anadromous brown trout (*Salmo trutta*) populations. *Molecular Ecology* **11**, 2523-2535.
- Hansson MC, Foley BP (2008) Ancient DNA fragments inside Classical Greek amphoras reveal cargo of 2400-year-old shipwreck. *Journal of Archaeological Science* **35**, 1169-1176.
- Harper GL, Maclean N, Goulson D (2006) Analysis of museum specimens suggests extreme genetic drift in the adonis blue butterfly (*Polyommatus bellargus*). *Biological Journal of the Linnean Society* **88**, 447-452.
- Harris MP, Rohner N, Schwarz H, Perathoner S, Konstantinidis P, Nusslein-Volhard C (2008) Zebrafish *eda* and *edar* Mutants Reveal Conserved and Ancestral Roles of Ectodysplasin Signaling in Vertebrates. *Plos Genetics* **4**.
- Hauge XY, Litt M (1993) A Study of the Origin of Shadow Bands Seen When Typing Dinucleotide Repeat Polymorphisms by the Pcr. *Human Molecular Genetics* **2**, 411-415.

- Hauser L, Adcock GJ, Smith PJ, Ramirez JHB, Carvalho GR (2002) Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11742-11747.
- Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, Khairat R, Fathalla D, Hasan N, Ahmed A, Elleithy H, Ball M, Gaballah F, Wasef S, Fateen M, Amer H, Gostner P, Selim A, Zink A, Pusch CM (2010) Ancestry and Pathology in King Tutankhamun's Family. *Jama-Journal of the American Medical Association* **303**, 638-647.
- Heath DD, Busch C, Kelly J, Atagi DY (2002) Temporal change in genetic structure and effective population size in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Ecology* **11**, 197-214.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 14812-14817.
- Hedmark E, Ellegren H (2006) A test of the multiplex pre-amplification approach in microsatellite genotyping of wolverine faecal DNA. *Conservation Genetics* **7**, 289-293.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**, 986-994.
- Heijmans M, Sintès C (1994) L'évolution de la topographie de l'Arles antique. Un état de la question. *Gallia* **51**, 135-170.
- Henderson-Arzapalo A, King TL (2002) Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) population delineation and broodstock management. *Molecular Ecology Notes* **2**, 437-439.
- Hernando JA, Domezain A, Zabala C, Cabrera R, Domezain J, Soriguer MC (2009) The Regression of Sturgeons in Southern Europe. In: *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons* (eds. Carmona R, Domezain A, GarciaGallego M, et al.), pp. 3-23. Springer, Dordrecht.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907-913.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**, 247-276.
- Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC (1984) DNA-Sequences from the Quagga, an Extinct Member of the Horse Family. *Nature* **312**, 282-284.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA-Sequences. *Bio-Technology* **10**, 413-417.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic Pcr Analysis - Real-Time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Bio-Technology* **11**, 1026-1030.
- Hilton EJ, Grande L (2006) Review of the fossil record of sturgeons, family Acipenseridae (Actinopterygii : Acipenseriformes), from North America. *Journal of Paleontology* **80**, 672-683.
- Ho SYW, Phillips MJ, Cooper A, Drummond AJ (2005) Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Molecular Biology and Evolution* **22**, 1561-1568.
- Ho SYW, Shapiro B, Phillips MJ, Cooper A, Drummond AJ (2007) Evidence for time dependency of molecular rate estimates. *Systematic Biology* **56**, 515-522.
- Hoeck PEA, Bollmer JL, Parker PG, Keller LF (2010) Differentiation with drift: a spatio-temporal genetic analysis of Galapagos mockingbird populations (*Mimus* spp.). *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **365**, 1127-1138.
- Hoegg S, Brinkmann H, Taylor JS, Meyer A (2004) Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *Journal of Molecular Evolution* **59**, 190-203.

- Hoelzel AR, Hancock JM, Dover GA (1991) Evolution of the Cetacean Mitochondrial D-Loop Region. *Molecular Biology and Evolution* **8**, 475-493.
- Hoelzel AR, Fleischer RC, Campagna C, Le Boeuf BJ, Alvord G (2002) Impact of a population bottleneck on symmetry and genetic diversity in the northern elephant seal. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 567-575.
- Hoffman EA, Schueler FW, Blouin MS (2004) Effective population sizes and temporal stability of genetic structure in *Rana pipiens*, the northern leopard frog. *Evolution* **58**, 2536-2545.
- Hofreiter M, Poinar HN, Spaulding WG, Bauer K, Martin PS, Possnert G, Pääbo S (2000) A molecular analysis of ground sloth diet through the last glaciation. *Molecular Ecology* **9**, 1975-1984.
- Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S (2001a) Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics* **2**, 353-359.
- Hofreiter M, Jaenicke V, Serre D, von Haeseler A, Pääbo S (2001b) DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Research* **29**, 4793-4799.
- Hofreiter M, Serre D, Rohland N, Rabeder G, Nagel D, Conard N, Munzel S, Pääbo S (2004) Lack of phylogeography in European mammals before the last glaciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 12963-12968.
- Hofreiter M, Muenzel S, Conard NJ, Pollack J, Slatkin M, Weiss G, Pääbo S (2007) Sudden replacement of cave bear mitochondrial DNA in the late Pleistocene. *Current Biology* **17**, R122-R123.
- Hofreiter M (2009) Gene data for endangered species have limitations. *Nature* **459**, 774-774.
- Hofreiter M, Stewart J (2009) Ecological Change, Range Fluctuations and Population Dynamics during the Pleistocene. *Current Biology* **19**, R584-R594.
- Holcik J (1989) The freshwater fishes of Europe. Vol.1, Part II: General introduction to fishes, Acipenseriformes., p. 469. AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Holcik J, Kinzelbach R, Sokolov LI, Vasil'ev VP (1989) *Acipenser sturio* Linnaeus, 1758. In: *The freshwater fishes of Europe. Vol.1, Part II: General introduction to fishes, Acipenseriformes.* (ed. Holcik J), pp. 367-394. AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Holzmann TE, Lytwyn VP, Waisberg LG (1988) Rainy River Sturgeon - an Ojibway Resource in the Fur Trade Economy. *Canadian Geographer-Geographie Canadien* **32**, 194-205.
- Horai S, Hayasaka K (1990) Intraspecific Nucleotide-Sequence Differences in the Major Noncoding Region of Human Mitochondrial-DNA. *American Journal of Human Genetics* **46**, 828-842.
- Hoss M, Kohn M, Pääbo S, Knauer F, Schroder W (1992) Excrement Analysis by Pcr. *Nature* **359**, 199-199.
- Hoss M, Pääbo S, Vereshchagin NK (1994) Mammoth DNA-Sequences. *Nature* **370**, 333-333.
- Hoss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Pääbo S (1996) DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research* **24**, 1304-1307.
- Hsu KJ, Ryan WBF, Cita MB (1973) Late Miocene Desiccation of Mediterranean. *Nature* **242**, 240-244.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* **9**, 1322-1332.
- Hunter P (2006) Ancient DNA research goes nuclear - A new technique to extract sequence data from nuclear DNA may reveal exciting new insights into evolution and phylogeny. *Embo Reports* **7**, 136-139.
- Hurley IA, Mueller RL, Dunn KA, Schmidt EJ, Friedman M, Ho RK, Prince VE, Yang ZH, Thomas MG, Coates MI (2007) A new time-scale for ray-finned fish evolution. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **274**, 489-498.
- Hutchings JA (2000) Collapse and recovery of marine fishes. *Nature* **406**, 882-885.

- Hutchinson WF, van Oosterhout C, Rogers SI, Carvalho GR (2003) Temporal analysis of archived samples indicates marked genetic changes in declining North Sea cod (*Gadus morhua*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **270**, 2125-2132.
- Hutchison CA, Newbold JE, Potter SS, Edgell MH (1974) Maternal Inheritance of Mammalian Mitochondrial-DNA. *Nature* **251**, 536-538.
- Inoue H, Kimura A, Tuji T (2002) Degradation profile of mRNA in a dead rat body: basic semi-quantification study. *Forensic Science International* **130**, 127-132.
- Inoue JG, Miya M, Tsukamoto K, Nishida M (2003) Basal actinopterygian relationships: a mitogenomic perspective on the phylogeny of the "ancient fish". *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**, 110-120.
- Ironside JE, Filatov DA (2005) Extreme population structure and high interspecific divergence of the *Silene* Y chromosome. *Genetics* **171**, 705-713.
- Isarin RFB, Renssen H (1999) Reconstructing and modelling Late Weichselian climates: the Younger Dryas in Europe as a case study. *Earth-Science Reviews* **48**, 1-38.
- IUCN (1998) *Guidelines for re-introductions*. IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, United Kingdom.
- IUCN (2008) *Oryx dammah*. In: *IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2*. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- IUCN (2010a) International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species. Version 2010.1. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- IUCN (2010b) *Corvus hawaiiensis*. In: *IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2*. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM, Weedn VW, Parsons TJ (1996) Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nature Genetics* **12**, 417-420.
- Jacobsen F, Nesje M, Bachmann L, Lifjeld JT (2008) Significant genetic admixture after reintroduction of peregrine falcon (*Falco peregrinus*) in Southern Scandinavia. *Conservation Genetics* **9**, 581-591.
- Jahnichen H, Kohlmann K, Rennert B (1999) Juvenile growth of *Acipenser ruthenus* and 4 different sturgeon hybrids. *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie* **15**, 248-249.
- Jaillon O, Aury JM, Brunet F, Petit JL, Stange-Thomann N, Mauceli E, Bouneau L, Fischer C, Ozouf-Costaz C, Bernot A, Nicaud S, Jaffe D, Fisher S, Lutfalla G, Dossat C, Segurens B, Dasilva C, Salanoubat M, Levy M, Boudet N, Castellano S, Anthonard R, Jubin C, Castelli V, Katinka M, Vacherie B, Biemont C, Skalli Z, Cattolico L, Poulain J, de Berardinis V, Cruaud C, Duprat S, Brottier P, Coutanceau JP, Gouzy J, Parra G, Lardier G, Chapple C, McKernan KJ, McEwan P, Bosak S, Kellis M, Volff JN, Guigo R, Zody MC, Mesirov J, Lindblad-Toh K, Birren B, Nusbaum C, Kahn D, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Schachter V, Quetier F, Saurin W, Scarpelli C, Wincker P, Lander ES, Weissenbach J, Crollius HR (2004) Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* **431**, 946-957.
- Jego S, Gazeau C, Jatteau P, Elie P, Rochard E (2002) Spawning grounds available for the European sturgeon *Acipenser sturio* L. 1758 in the Garonne-Dordogne basin. Methods used, present status and prospects (in french). *Bulletin Français de Pêche et Pisciculture* **365/366**, 487-505.
- Johnson JA, Bellinger MR, Toepfer JE, Dunn P (2004) Temporal changes in allele frequencies and low effective population size in greater prairie-chickens. *Molecular Ecology* **13**, 2617-2630.
- Kalinowski ST (2002) How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity* **88**, 62-65.
- Keller LF, Waller DM (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 230-241.



- Kierulff MCM, Rylands AB, DeOliveira MM (2008) *Leontopithecus rosalia*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Kimpton CP, Gill P, Walton A, Urquhart A, Millican ES, Adams M (1993) Automated DNA Profiling Employing Multiplex Amplification of Short Tandem Repeat Loci. *Pcr-Methods and Applications* **3**, 13-22.
- King CE, Debryne R, Kuch M, Schwarz C, Poinar HN (2009) A quantitative approach to detect and overcome PCR inhibition in ancient DNA extracts. *Biotechniques* **47**, 941-949.
- King TL, Burke T (1999) Special issue on gene conservation: Identification and management of genetic diversity. *Molecular Ecology* **8**, S1-S3.
- King TL, Lubinski BA, Spidle AP (2001) Microsatellite DNA variation in Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) and cross-species amplification in the Acipenseridae. *Conservation Genetics* **2** 103–119.
- Kingman JFC (1982) On the genealogy of large populations. *Journal Of Applied Probability* **19**, 27-43.
- Koblmüller S, Nord M, Wayne RK, Leonard JA (2009) Origin and status of the Great Lakes wolf. *Molecular Ecology* **18**, 2313-2326.
- Koskinen MT, Hirvonen H, Landry PA, Primmer CR (2004) The benefits of increasing the number of microsatellites utilized in genetic population studies: an empirical perspective. *Hereditas* **141**, 61-67.
- Kottelat M, Gessner J, Freyhof J (2009a) *Acipenser gueldenstaedtii*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Kottelat M, Gessner J, Freyhof J (2009b) *Acipenser ruthenus*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Kottelat M, Gessner J, Williot P, Rochard E, Freyhof J (2009c) *Acipenser sturio*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Kottelat M, Gessner J, Chebanov M, Freyhof J (2009d) *Huso huso*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Koutrakis E, Sapounidis A, Favre-Krey L, Krey G, Economidis PS (unpublished) Sturgeons in the river Evros (NE Aegean Sea, Greece): reappearance of *Acipenser sturio* Linnaeus, 1758.
- Kozhin NI (1964) Osetrovye SSSR i ikh vosproizvodstvo (Sturgeons of the USSR and their restoration). *Trudy VNIRO* **52**, 21-58.
- Krajewski C, Driskell AC, Baverstock PR, Braun MJ (1992) Phylogenetic-Relationships of the Thylacine (Mammalia, Thylacinidae) among Dasyuroid Marsupials - Evidence from Cytochrome-B DNA-Sequences. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **250**, 19-27.
- Krause J, Dear PH, Pollack JL, Slatkin M, Spriggs H, Barnes I, Lister AM, Ebersberger I, Pääbo S, Hofreiter M (2006) Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. *Nature* **439**, 724-727.
- Krause J, Lalueza-Fox C, Orlando L, Enard W, Green RE, Burbano HA, Hublin JJ, Hänni C, Fortea J, de la Rasilla M, Bertranpetit J, Rosas A, Pääbo S (2007) The derived FOXP2 variant of modern humans was shared with neandertals. *Current Biology* **17**, 1908-1912.
- Krause J, Unger T, Nocon A, Malaspinas AS, Kolokotronis SO, Stiller M, Soibelzon L, Spriggs H, Dear PH, Briggs AW, Bray SCE, O'Brien SJ, Rabeder G, Matheus P, Cooper A, Slatkin M, Pääbo S, Hofreiter M (2008) Mitochondrial genomes reveal an explosive radiation of extinct and extant bears near the Miocene-Pliocene boundary. *BMC Evolutionary Biology* **8**.
- Krieger J, Fuerst PA (2002) Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order Acipenseriformes. *Molecular Biology and Evolution* **19**, 891-897.
- Krieger J, Hett AK, Fuerst PA, Birstein VJ, Ludwig A (2006) Unusual intraindividual variation of the nuclear 18S rRNA gene is widespread within the Acipenseridae. *Journal of Heredity* **97**, 218-225.

- Krieger J, Hett AK, Fuerst PA, Artyukhin E, Ludwig A (2008) The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited. *Journal of Applied Ichthyology* **24**, 36-45.
- Krijgsman W, Hilgen FJ, Raffi I, Sierro FJ, Wilson DS (1999) Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature* **400**, 652-655.
- Kuo CH, Janzen FJ (2004) Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural population of ornate box turtles (*Terrapene ornata*). *Conservation Genetics* **5**, 425-437.
- Kynard B (1997) Life history, latitudinal patterns, and status of the shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*. *Environmental Biology of Fishes* **48**, 319-334.
- Lai YL, Sun FZ (2003) The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 2123-2131.
- Lambeck K, Chappell J (2001) Sea level change through the last glacial cycle. *Science* **292**, 679-686.
- Lambert DM, Millar CD (2006) Evolutionary biology - Ancient genomics is born. *Nature* **444**, 275-276.
- Lambert DM, Shepherd LD, Huynen L, Beans-Picon G, Walter GH, Millar CD (2009) The Molecular Ecology of the Extinct New Zealand Huia. *Plos One* **4**.
- Lampa S, Gruber B, Henle K, Hoehn M (2008) An optimisation approach to increase DNA amplification success of otter faeces. *Conservation Genetics* **9**, 201-210.
- Lanfredi M, Congiu L, Garrido-Ramos MA, de la Herran R, Leis M, Chicca M, Rossi R, Tagliavini J, Rejon CR, Rejon MR, Fontana F (2001) Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species. *Chromosome Research* **9**, 47-52.
- Larmuseau MHD, Van Houdt JKJ, Guelinckx J, Hellems B, Volckaert FAM (2009) Distributional and demographic consequences of Pleistocene climate fluctuations for a marine demersal fish in the north-eastern Atlantic. *Journal of Biogeography* **36**, 1138-1151.
- Larson G, Albarella U, Dobney K, Rowley-Conwy P, Schibler J, Tresset A, Vigne JD, Edwards CJ, Schlumbaum A, Dinu A, Balacsescu A, Dolman G, Tagliacozzo A, Manaseryan N, Miracle P, Van Wijngaarden-Bakker L, Masseti M, Bradley DG, Cooper A (2007) Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 15276-15281.
- Lassalle G, Crouzet P, Gessner J, Rochard E (2010) Global warming impacts and conservation responses for the critically endangered European Atlantic sturgeon. *Biological Conservation*.
- Lê HLV, Lecointre G, Perasso R (1993) A 28S rRNA-based phylogeny of the gnathostomes: First steps in the analysis of conflict and congruence with morphologically based cladograms. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2**, 31-51.
- Leakey R, Lewin R (1995) *The Sixth Extinction: Biodiversity and Its Survival*. Doubleday, New York.
- Leclair B, Fregeau CJ, Bowen KL, Fournay RM (2004) Systematic analysis of stutter percentages and allele peak height and peak area ratios at heterozygous STR loci for forensic casework and database samples. *Journal of Forensic Sciences* **49**, 968-980.
- Lee AT, Cerami A (1987) The Formation of Reactive Intermediate(S) of Glucose-6-Phosphate and Lysine Capable of Rapidly Reacting with DNA. *Mutation Research* **179**, 151-158.
- Lee DS, Gilbert CR, Hocutt CH, Jenkins RE, McAllister DE, Stauffer JR (1980) Atlas of North American freshwater fishes. North Carolina State Museum of Natural History, Raleigh.
- Lee WJ, Conroy J, Howell WH, Kocher TD (1995) Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution* **41**, 54-66.
- Lees DR, Creed ER (1975) Industrial Melanism in Biston-Betularia - Role of Selective Predation. *Journal of Animal Ecology* **44**, 67-8.
- Lehmann T, Hawley WA, Collins FH (1996) An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. *Genetics* **144**, 1155-1163.
- Leider SA, Hulett PL, Loch JJ, Chilcote MW (1990) Electrophoretic Comparison of the Reproductive Success of Naturally Spawning Transplanted and Wild Steelhead Trout through the Returning Adult Stage. *Aquaculture* **88**, 239-252.

- Leonard JA, Wayne RK, Cooper A (2000) Population genetics of Ice age brown bears. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 1651-1654.
- Leonard JA, Vila C, Fox-Dobbs K, Koch PL, Wayne RK, Van Valkenburgh B (2007) Megafaunal extinctions and the disappearance of a specialized wolf ecomorph. *Current Biology* **17**, 1146-1150.
- Lepage M, Rochard E (1993) Threatened fishes of the world: *Acipenser sturio* Linnaeus, 1758 (*Acipenseridae*). *Environmental Biology of Fishes* **43**, 28.
- Lepage M, Taverny C, Piefort S, Dumont P, Rochard E, Brosse L (2005) Juvenile sturgeon (*Acipenser sturio*) habitat utilization in the Gironde estuary as determined by acoustic telemetry. *Proceedings of the Fifth Conference on Fish Telemetry held in Europe. Ustica, Italy, 9-13 June 2003. Rome, FAO/COISPA. 2005. 295p.*
- Lericolais G, Bulois C, Gillet H, Guichard F (2009) High frequency sea level fluctuations recorded in the Black Sea since the LGM. *Global and Planetary Change* **66**, 65-75.
- Letaconnoux R (1961) Fréquence et distribution des captures d'esturgeons (*Acipenser sturio* Linne, 1758) dans le golfe de Gascogne. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **25**, 253-261.
- Levinson G, Gutman GA (1987) High-Frequencies of Short Frameshifts in Poly-Ca/Tg Tandem Repeats Borne by Bacteriophage-M13 in Escherichia-Coli K-12. *Nucleic Acids Research* **15**, 5323-5338.
- Lia VV, Confalonieri VA, Ratto N, Hernandez JAC, Alzogaray AMM, Poggio L, Brown TA (2007) Microsatellite typing of ancient maize: insights into the history of agriculture in southern South America. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **274**, 545-554.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451-1452.
- Liepelt S, Kuhlenkamp V, Anzidei M, Vendramin GG, Ziegenhagen B (2001) Pitfalls in determining size homoplasy of microsatellite loci. *Molecular Ecology Notes* **1**, 332-335.
- Lindahl T, Andersson A (1972) Rate of Chain Breakage at Apurinic Sites in Double-Stranded Deoxyribonucleic Acid. *Biochemistry* **11**, 3618-&.
- Lindahl T, Nyberg B (1972) Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid. *Biochemistry* **11**, 3610-&.
- Lindahl T (1993) Instability and Decay of the Primary Structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715.
- Linné C (1758) *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species,...* 10e édition, Stockholm.
- Lippe C, Dumont P, Bernatchez L (2006) High genetic diversity and no inbreeding in the endangered copper redhorse, *Moxostoma hubbsi* (Catostomidae, Pisces): the positive sides of a long generation time. *Molecular Ecology* **15**, 1769-1780.
- Litt M, Luty JA (1989) A Hypervariable Microsatellite Revealed by Invitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac-Muscle Actin Gene. *American Journal of Human Genetics* **44**, 397-401.
- Litt M, Hauge X, Sharma V (1993) Shadow Bands Seen When Typing Polymorphic Dinucleotide Repeats - Some Causes and Cures. *Biotechniques* **15**, 280-284.
- Loreille O, Orlando L, Patou-Mathis M, et al. (2001) Ancient DNA analysis reveals divergence of the cave bear, *Ursus spelaeus*, and brown bear, *Ursus arctos*, lineages. *Current Biology* **11**, 200-203.
- Lowe CD, Kemp SJ, Diaz-Avalos C, Montagnes DJS (2007) How does salinity tolerance influence the distributions of *Brachionus plicatilis* sibling species? *Marine Biology* **150**, 377-386.
- Lowe WH, Allendorf FW (2010) What can genetics tell us about population connectivity? *Molecular Ecology* **19**, 3038-3051.

- Lozier JD, Cameron SA (2009) Comparative genetic analyses of historical and contemporary collections highlight contrasting demographic histories for the bumble bees *Bombus pensylvanicus* and *B. impatiens* in Illinois. *Molecular Ecology* **18**, 1875-1886.
- Ludwig A, Kirschbaum F (1998) Comparison of mitochondrial DNA sequences between the European and the Adriatic sturgeon. *Journal of Fish Biology* **52**, 1289-1291.
- Ludwig A, Jenneckens I (2000) A PCR test for mitochondrial heteroplasmy in sturgeon. *Animal Genetics* **31**, 153-154.
- Ludwig A, May B, Debus L, Jenneckens I (2000a) Heteroplasmy in the mtDNA control region of sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics* **156**, 1933-1947.
- Ludwig AN, Jenneckens I, Debus L, Ludwig A, Becker J, Kirschbaum F (2000b) Genetic analyses of archival specimens of the Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758. *Boletín Instituto Español De Oceanografía* **16**, 181-190.
- Ludwig A, Belfiore NM, Pitra C, Svirsky V, Jenneckens I (2001) Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics* **158**, 1203-1215.
- Ludwig A, Debus L, Jenneckens I (2002a) A molecular approach to control the international trade in black caviar. *International Review of Hydrobiology* **87**, 661-674.
- Ludwig A, Debus L, Lieckfeldt D, Wirgin I, Benecke N, Jenneckens I, Williot P, Waldman JR, Pitra C (2002b) When the American sea sturgeon swam east - A colder Baltic Sea greeted this fish from across the Atlantic Ocean in the Middle Ages. *Nature* **419**, 447-448.
- Ludwig A, Congiu L, Pitra C, Fickel J, Gessner J, Fontana F, Patarnello T, Zane L (2003) Nonconcordant evolutionary history of maternal and paternal lineages in Adriatic sturgeon. *Molecular Ecology* **12**, 3253-3264.
- Ludwig A, Gessner J (2007) What makes the difference? - Sea sturgeon on both sides of the Atlantic Ocean. *Anadromous Sturgeons: Habitats, Threats, and Management. American Fisheries Society Symposium* **56**, 285-300.
- Ludwig A (2008) Identification of *Acipenseriformes* species in trade. *Journal of Applied Ichthyology* **24**, 2-19.
- Ludwig A, Arndt U, Lippold S, Benecke N, Debus L, King TL, Matsumura S (2008) Tracing the first steps of American sturgeon pioneers in Europe. *BMC Evolutionary Biology* **8**.
- Ludwig A, Pruvost M, Reissmann M, Benecke N, Brockmann GA, Castanos P, Cieslak M, Lippold S, Llorente L, Malaspinas AS, Slatkin M, Hofreiter M (2009a) Coat Color Variation at the Beginning of Horse Domestication. *Science* **324**, 485-485.
- Ludwig A, Makowiecki D, Benecke N (2009b) Further evidence of trans-Atlantic colonization of Western Europe by American Atlantic sturgeons. *Archaeofauna* **18**, 185-192.
- Ludwig A, Arndt U, Debus L, Rosello E, Morales A (2009c) Ancient mitochondrial DNA analyses of Iberian sturgeons. *Journal of Applied Ichthyology* **25**, 5-9.
- Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* **89**, 238-247.
- Lydolph MC, Jacobsen J, Arctander P, Gilbert MTP, Gilichinsky DA, Hansen AJ, Willerslev E, Lange L (2005) Beringian paleoecology inferred from permafrost-preserved fungal DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 1012-1017.
- MacArthur RH, Wilson EO (1967) *The Theory of Island Biogeography* Princeton Univ. Press, Princeton, N. J.
- Macrobe (vers 430 ap. J-C) Saturnales, Livre Second, Chapitre XII. In: *Oeuvres de Macrobe, Tome 1* (ed. Didot F), Paris. Traduit du latin par De Rosoy C. Edition de 1827.
- Maggio T, Lo Brutto S, Garoia F, Tinti F, Arculeo M (2009) Microsatellite analysis of red mullet *Mullus barbatus* (Perciformes, Mullidae) reveals the isolation of the Adriatic Basin in the Mediterranean Sea. *Ices Journal of Marine Science* **66**, 1883-1891.

- Magnin E (1959) Répartition actuelle des Acipenséridés. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **23**, 277-285.
- Magnin E (1962) Recherches sur la systématique et la biologie des Acipenséridés. *Annales de la station centrale d'hydrobiologie appliquée* **9**, 7-242.
- Magnin E, Beaulieu G (1963) Etude morphométrique comparée de l'*Acipenser oxyrinchus* Mitchill du Saint-Laurent et de l'*Acipenser sturio* Linné de la Gironde. *Le Naturaliste Canadien* **90**, 5-38.
- Magnin E (1964) Validité d'une distinction spécifique entre les deux Acipenséridés : *Acipenser sturio* L. d'Europe et *Acipenser oxyrinchus* d'Amérique du Nord. *Le Naturaliste Canadien* **16**, 3-20.
- Magnuson VL, Ally DS, Nylund SJ, Karanjawala ZE, Rayman JB, Knapp JI, Lowe AL, Ghosh S, Collins FS (1996) Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by Taq DNA polymerase: Implications for PCR-based genotyping and cloning. *Biotechniques* **21**, 700-709.
- Major CO, Goldstein SL, Ryan WBF, Lericolais G, Piotrowski AM, Hajdas I (2006) The co-evolution of Black Sea level and composition through the last deglaciation and its paleoclimatic significance. *Quaternary Science Reviews* **25**, 2031-2047.
- Manen JF, Bouby L, Dalnoki O, Marinval P, Turgay M, Schlumbaum A (2003) Microsatellites from archaeological *Vitis vinifera* seeds allow a tentative assignment of the geographical origin of ancient cultivars. *Journal of Archaeological Science* **30**, 721-729.
- Margoliash E (1963) Primary Structure and Evolution of Cytochrome C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **50**, 672-&.
- Marota I, Rollo F (2002) Molecular paleontology. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**, 97-111.
- Marsch GP (1864) *Man and nature: or, physical geography as modified by human action*. D. Lowenthal, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Martinez-Cruz B, Godoy JA, Negro JJ (2007) Population fragmentation leads to spatial and temporal genetic structure in the endangered Spanish imperial eagle. *Molecular Ecology* **16**, 477-486.
- Martinez-Espin E, Martinez-Gonzalez LJ, Alvarez JC, Roby RK, Lorente JA (2009) Forensic Strategies Used for DNA Extraction of Ancient and Degraded Museum Sturgeon Specimens. In: *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons* (eds. Carmona R, Domezain A, GarciaGallego M, et al.), pp. 85-96. Springer, Dordrecht.
- Martinsen GD, Whitham TG, Turek RJ, Keim P (2001) Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution* **55**, 1325-1335.
- Matisoo-Smith E, Roberts K, Welikala N, Tannock G, Chester P, Feek D, Flenley J (2008) Recovery of DNA and pollen from New Zealand lake sediments. *Quaternary International* **184**, 139-149.
- May B, Krueger CC, Kincaid HL (1997) Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**, 1542-1547.
- Mayr E (1963) *Animal Species and Evolution* Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- McDowall RM (1992) Diadromy - Origins and Definitions of Terminology. *Copeia*, 248-251.
- McDowall RM (1993) A Recent Marine Ancestry for Diadromous Fishes - Sometimes Yes, but Mostly No. *Environmental Biology of Fishes* **37**, 329-335.
- McDowall RM (1997) The evolution of diadromy in fishes (revisited) and its place in phylogenetic analysis. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **7**, 443-462.
- McGinnity P, Prodohl P, Ferguson K, Hynes R, O'Maoileidigh N, Baker N, Cotter D, O'Hea B, Cooke D, Rogan G, Taggart J, Cross T (2003) Fitness reduction and potential extinction of wild populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*, as a result of interactions with escaped farm salmon. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **270**, 2443-2450.

- McKenzie DJ, Cataldi E, Di Marco P, Mandich A, Romano P, Ansferri S, Bronzi P, Cataudella S (1999) Some aspects of osmotic and ionic regulation in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii*. II: Morpho-physiological adjustments to hyperosmotic environments. *Journal of Applied Ichthyology* **15**, 61-66.
- McKenzie DJ, Cataldi E, Romano P, Taylor EW, Cataudella S, Bronzi P (2001) Effects of acclimation to brackish water on tolerance of salinity challenge by young-of-the-year Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **58**, 1113-1121.
- McMillan WO, Palumbi SR (1997) Rapid rate of control-region evolution in Pacific butterflyfishes (Chaetodontidae). *Journal of Molecular Evolution* **45**, 473-484.
- McQuown E, Gall GAE, May B (2002) Characterization and inheritance of six microsatellite loci in lake sturgeon. *Transactions of the American Fisheries Society* **131**, 299-307.
- McQuown E, Krueger CC, Kincaid HL, Gall GAE, May B (2003) Genetic comparison of lake sturgeon populations: Differentiation based on allelic frequencies at seven microsatellite loci. *Journal of Great Lakes Research* **29**, 3-13.
- McQuown EC, Sloss BL, Sheehan RJ, Rodzen J, Tranah GJ, May B (2000) Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon: New primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser*. *Transactions of the American Fisheries Society* **129**, 1380-1388.
- Meine C, Soule M, Noss RF (2006) "A mission-driven discipline": the growth of conservation biology. *Conservation Biology* **20**, 631-651.
- Meldgaard T, Nielsen EE, Loeschcke V (2003) Fragmentation by weirs in a riverine system: A study of genetic variation in time and space among populations of European grayling (*Thymallus thymallus*) in a Danish river system. *Conservation Genetics* **4**, 735-747.
- Milinkovitch MC, Lyons-Weiler J (1998) Finding optimal ingroup topologies and convexities when the choice of outgroups is not obvious. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **9**, 348-357.
- Miller CR, Waits LP (2003) The history of effective population size and genetic diversity in the Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*): Implications for conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4334-4339.
- Miller CR, Waits LP, Joyce P (2006) Phylogeography and mitochondrial diversity of extirpated brown bear (*Ursus arctos*) populations in the contiguous United States and Mexico. *Molecular Ecology* **15**, 4477-4485.
- Miller LM, Kapuscinski AR (1997) Historical analysis of genetic variation reveals low effective population size in a northern pike (*Esox lucius*) population. *Genetics* **147**, 1249-1258.
- Miller W, Drautz DI, Ratan A, Pusey B, Qi J, Lesk AM, Tomsho LP, Packard MD, Zhao FQ, Sher A, Tikhonov A, Raney B, Patterson N, Lindblad-Toh K, Lander ES, Knight JR, Irzyk GP, Fredrikson KM, Harkins TT, Sheridan S, Pringle T, Schuster SC (2008) Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature* **456**, 387-U351.
- Mills LS, Allendorf FW (1996) The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology* **10**, 1509-1518.
- Mizuki I, Yamasaki M, Kakutani T, Isagi Y (2010) Negligible impact of deer-induced habitat degradation on the genetic diversity of extant *Bombus diversus* populations in comparison with museum specimens. *Journal of Insect Conservation* **14**, 191-198.
- Moran P, Baker J (2002) Polymerase chain reaction inhibition in historical fish scale mounting cards. *Transactions of the American Fisheries Society* **131**, 109-119.
- Morin PA, Chambers KE, Boesch C, Vigilant L (2001) Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology* **10**, 1835-1844.
- Moritz C (1994) Defining Evolutionarily-Significant-Units for Conservation. *Trends in Ecology & Evolution* **9**, 373-375.
- Moriyama EN, Powell JR (1997) Synonymous substitution rates in *Drosophila*: Mitochondrial versus nuclear genes. *Journal of Molecular Evolution* **45**, 378-391.

- Munoz-Fuentes V, Darimont CT, Wayne RK, Paquet PC, Leonard JA (2009) Ecological factors drive differentiation in wolves from British Columbia. *Journal Of Biogeography* **36**, 1516-1531.
- Museum d'Histoire Naturelle (2010) Inventaire national du Patrimoine naturel, <http://inpn.mnhn.fr>.
- Myers GS (1949) Usage of Anadromous, Catadromous and Allied Terms for Migratory Fishes. *Copeia*, 89-97.
- Naciri M, Lemaire C, Borsa P, Bonhomme F (1999) Genetic study of the Atlantic/Mediterranean transition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal Of Heredity* **90**, 591-596.
- Natoli A, Canadas A, Vaquero C, Politi E, Fernandez-Navarro P, Hoelzel AR (2008) Conservation genetics of the short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) in the Mediterranean Sea and in the eastern North Atlantic Ocean. *Conservation Genetics* **9**, 1479-1487.
- Navidi W, Arnheim N, Waterman MS (1992) A Multiple-Tubes Approach for Accurate Genotyping of Very Small DNA Samples by Using Pcr - Statistical Considerations. *American Journal of Human Genetics* **50**, 347-359.
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) Bottleneck Effect and Genetic-Variability in Populations. *Evolution* **29**, 1-10.
- Nei M, Li WH (1979) Mathematical-Model for Studying Genetic-Variation in Terms of Restriction Endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 5269-5273.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York.
- Nelson GJ (1969) Gill arches and the phylogeny of fishes : with notes on the classification of vertebrates. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **141**.
- Nichols C, Herman J, Gaggiotti OE, Dobney KM, Parsons K, Hoelzel AR (2007) Genetic isolation of a now extinct population of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **274**, 1611-1616.
- Nielsen EE, Hansen MM, Loeschcke V (1999) Analysis of DNA from old scale samples: technical aspects, applications and perspectives for conservation. *Hereditas* **130**, 265-276.
- Nielsen EE, Hansen MM (2008) Waking the dead: the value of population genetic analyses of historical samples. *Fish and Fisheries* **9**, 450-461.
- Ninua NS (1976) Atlanticeskij osetr reki rioni (L'esturgeon Atlantique du fleuve Rioni). Metsnireba, Tbilissi, 123 pp.
- Nystrom V, Angerbjorn A, Dalen L (2006) Genetic consequences of a demographic bottleneck in the Scandinavian arctic fox. *Oikos* **114**, 84-94.
- O'Grady JJ, Brook BW, Reed DH, Ballou JD, Tonkyn DW, Frankham R (2006) Realistic levels of inbreeding depression strongly affect extinction risk in wild populations. *Biological Conservation* **133**, 42-51.
- Odelberg SJ, White R (1993) A Method for Accurate Amplification of Polymorphic Ca-Repeat Sequences. *Pcr-Methods and Applications* **3**, 7-12.
- Ohno S, Muramoto J, Stenius C, Christia.L, Kittrell WA, Atkin NB (1969) Microchromosomes in Holocephalian Chondrosteian and Holostean Fishes. *Chromosoma* **26**, 35-8.
- Ohno S (1970) *Evolution by gene duplication* Springer, New York.
- Olejniczak M, Krzyzosiak WJ (2006) Genotyping of simple sequence repeats - factors implicated in shadow band generation revisited. *Electrophoresis* **27**, 3724-3734.
- Ong TL, Stabile J, Wirgin I, Waldman JR (1996) Genetic divergence between *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* and *A-o-desotoi* as assessed by mitochondrial DNA sequencing analysis. *Copeia*, 464-469.
- Oniga R (1999) Etimologia e struttura morfologica di *Acipenser* (abstract). In: *De lingua Latina novae quaestiones : Actes du Xe Colloque International de Linguistique Latine* (ed. Moussy C), Paris-Sèvres.

- Orlando L, Bonjean D, Bocherens H, Thenot A, Argant A, Otte M, Hänni C (2002) Ancient DNA and the population genetics of cave bears (*Ursus spelaeus*) through space and time. *Molecular Biology and Evolution* **19**, 1920-1933.
- Orlando L, Calvignac S, Schnebelen C, Douady CJ, Godfrey LR, Hänni C (2008) DNA from extinct giant lemurs links archaeolemurids to extant indriids. *BMC Evolutionary Biology* **8**.
- Orlic M, Gacic M, Laviolette PE (1992) The Currents and Circulation of the Adriatic Sea. *Oceanologica Acta* **15**, 109-124.
- Ovide (vers 17 ap. J-C) Les Halieutiques. In: *Ovide, Oeuvres complètes* (ed. Nisard M), Paris. Traduit du latin par Beudement MT. Edition de 1850.
- Pääbo S (1985a) Preservation of DNA in Ancient Egyptian Mummies. *Journal of Archaeological Science* **12**, 411-417.
- Pääbo S (1985b) Molecular-Cloning of Ancient Egyptian Mummy DNA. *Nature* **314**, 644-645.
- Pääbo S (1989) Ancient DNA - Extraction, Characterization, Molecular-Cloning, and Enzymatic Amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 1939-1943.
- Pääbo S, Irwin DM, Wilson AC (1990) DNA Damage Promotes Jumping between Templates During Enzymatic Amplification. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 4718-4721.
- Pääbo S, Wilson AC (1991) Miocene DNA sequences - a dream come true? *Current Biology* **1**, 45-46.
- Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M (2004) Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics* **38**, 645-679.
- Paaver T (1996) A common or Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio*, was caught in the Estonian waters of the Baltic Sea. *The Sturgeon Quarterly* **4**, 7.
- Paccagnella B (1948) Osservazioni sulla biologia degli storioni del Bacino Padano. *Archiv. Oceanogr. Limnol. Venezia* **1-2**, 14 p. 11 pl.
- Paetkau D, Strobeck C (1995) The Molecular-Basis and Evolutionary History of a Microsatellite Null Allele in Bears. *Molecular Ecology* **4**, 519-520.
- Pages M, Desse-Berset N, Tougard C, Brosse L, Hänni C, Berrebi P (2009) Historical presence of the sturgeon *Acipenser sturio* in the Rhone basin determined by the analysis of ancient DNA cytochrome b sequences. *Conservation Genetics* **10**, 217-224.
- Pampoulie C, Danielsdottir AK (2008) Resolving species identification problems in the genus *Sebastes* using nuclear genetic markers. *Fisheries Research* **93**, 54-63.
- Parrish DL, Behnke RJ, Gephard SR, McCormick SD, Reeves GH (1998) Why aren't there more Atlantic salmon (*Salmo salar*)? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**, 281-287.
- Parsons KM (2001) Reliable microsatellite genotyping of dolphin DNA from faeces. *Molecular Ecology Notes* **1**, 341-344.
- Pemberton JM, Slate J, Bancroft DR, Barrett JA (1995) Nonamplifying Alleles at Microsatellite Loci - a Caution for Parentage and Population Studies. *Molecular Ecology* **4**, 249-252.
- Peng ZG, Ludwig A, Wang DQ, Diogo R, Wei QW, He SP (2007) Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces : Acipenseriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **42**, 854-862.
- Perrine JD, Pollinger JP, Sacks BN, Barrett RH, Wayne RK (2007) Genetic evidence for the persistence of the critically endangered Sierra Nevada red fox in California. *Conservation Genetics* **8**, 1083-1095.
- Perry WL, Lodge DM, Feder JL (2002) Importance of hybridization between indigenous and nonindigenous freshwater species: An overlooked threat to North American biodiversity. *Systematic Biology* **51**, 255-275.



- Pertoldi C, Hansen MM, Loeschcke V, Madsen AB, Jacobsen L, Baagoe H (2001) Genetic consequences of population decline in the European otter (*Lutra lutra*): an assessment of microsatellite DNA variation in Danish otters from 1883 to 1993. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **268**, 1775-1781.
- Pertoldi C, Norup AM, Madsen AB, Baagoe HJ, Randi E, Loeschcke V (2006) No evidence of past bottlenecks in two Danish mustelids: results of craniometric and genetic studies in time and space. *Biological Journal of the Linnean Society* **88**, 541-553.
- Pertoldi C, Barker SF, Madsen AB, Jorgensen H, Randi E, Munoz J, Baagoe HJ, Loeschcke V (2008) Spatio-temporal population genetics of the Danish pine marten (*Martes martes*). *Biological Journal of the Linnean Society* **93**, 457-464.
- Pesole G, Gissi C, De Chirico A, Saccone C (1999) Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution* **48**, 427-434.
- Peterson DL, Vecsei P, Jennings CA (2007) Ecology and biology of the lake sturgeon: a synthesis of current knowledge of a threatened North American Acipenseridae. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **17**, 59-76.
- Petit JR, Jouzel J, Raynaud D, Barkov NI, Barnola JM, Basile I, Bender M, Chappellaz J, Davis M, Delaygue G, Delmotte M, Kotlyakov VM, Legrand M, Lipenkov VY, Lorius C, Pepin L, Ritz C, Saltzman E, Stievenard M (1999) Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* **399**, 429-436.
- Piggott MP, Bellemain E, Taberlet P, Taylor AC (2004) A multiplex pre-amplification method that significantly improves microsatellite amplification and error rates for faecal DNA in limiting conditions. *Conservation Genetics* **5**, 417-420.
- Pikitch EK, Doukakis P, Lauck L, Chakrabarty P, Erickson DL (2005) Status, trends and management of sturgeon and paddlefish fisheries. *Fish and Fisheries* **6**, 233-265.
- Pimm SL, Raven P (2000) Biodiversity - Extinction by numbers. *Nature* **403**, 843-845.
- Pinsky ML, Newsome SD, Dickerson BR, Fang Y, Van Tuinen M, Kennett DJ, Ream RR, Hadly EA (2010) Dispersal provided resilience to range collapse in a marine mammal: insights from the past to inform conservation biology. *Molecular Ecology* **19**, 2418-2429.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* **95**, 536-539.
- Poetsch M, Seefeldt S, Maschke M, Lignitz E (2001) Analysis of microsatellite polymorphism in red deer, roe deer, and fallow deer - possible employment in forensic applications. *Forensic Science International* **116**, 1-8.
- Poinar H, Kuch M, McDonald G, Martin P, Pääbo S (2003) Nuclear gene sequences from a late Pleistocene sloth coprolite. *Current Biology* **12**, 1150-1152.
- Poinar HN, Hoss M, Bada JL, Pääbo S (1996) Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* **272**, 864-866.
- Poinar HN (1998) Preservation of DNA in the fossil record. In: *Nitrogen-Containing Macromolecules in the Bio- and Geosphere*, pp. 132-146.
- Poinar HN, Hofreiter M, Spaulding WG, Martin PS, Stankiewicz BA, Bland H, Evershed RP, Possnert G, Pääbo S (1998) Molecular coproscopy: Dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science* **281**, 402-406.
- Poinar HN, Kuch M, Sobolik KD, Barnes I, Stankiewicz AB, Kuder T, Spaulding WG, Bryant VM, Cooper A, Pääbo S (2001) A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native Americans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4317-4322.
- Poinar HN (2003) The top 10 list: criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples. *Progress in Forensic Genetics* **9** **1239**, 575-579.
- Poinar HN, Schwarz C, Qi J, Shapiro B, MacPhee RDE, Buigues B, Tikhonov A, Huson DH, Tomsho LP, Auch A, Rampp M, Miller W, Schuster SC (2006) Metagenomics to paleogenomics: Large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science* **311**, 392-394.

- Pollock DD, Bergman A, Feldman MW, Goldstein DB (1998) Microsatellite behavior with range constraints: Parameter estimation and improved distances for use in phylogenetic reconstruction. *Theoretical Population Biology* **53**, 256-271.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* **6**, 847-859.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 1253-1256.
- Preziosi RF, Fairbairn DJ (1992) Genetic Population-Structure and Levels of Gene Flow in the Stream Dwelling Waterstrider, *Aquarius (=Gerris) Remigis* (Hemiptera, Gerridae). *Evolution* **46**, 430-444.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Prost S, Smirnov N, Fedorov VB, Sommer RS, Stiller M, Nagel D, Knapp M, Hofreiter M (2010) Influence of Climate Warming on Arctic Mammals? New Insights from Ancient DNA Studies of the Collared Lemming *Dicrostonyx torquatus*. *Plos One* **5**.
- Py M, Garcia D (1993) Bilan des recherches archéologiques sur la ville portuaire de Lattara (Lattes, Hérault). *Gallia* **50**, 1-93.
- Rabelais F (1534) *Oeuvres de François Rabelais contenant la vie de Gargantua et celle de Pantagruel* (edition 1854), Jacob PL (ed), Paris.
- Ralls K, Ballou J, Templeton A (1988) Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in Mammals. *Conservation Biology* **2**, 185-193.
- Ramakrishnan U, Hadly EA, Mountain JL (2005) Detecting past population bottlenecks using temporal genetic data. *Molecular Ecology* **14**, 2915-2922.
- Ramakrishnan U, Hadly EA (2009) Using phylochronology to reveal cryptic population histories: review and synthesis of 29 ancient DNA studies. *Molecular Ecology* **18**, 1310-1330.
- Ramos MD, Lalueza C, Girbau E, Perezperez A, Quevedo S, Turbon D, Estivill X (1995) Amplifying Dinucleotide Microsatellite Loci from Bone and Tooth Samples of up to 5000 Years of Age - More Inconsistency Than Usefulness. *Human Genetics* **96**, 205-212.
- Rasmussen M, Li YR, Lindgreen S, Pedersen JS, Albrechtsen A, Moltke I, Metspalu M, Metspalu E, Kivisild T, Gupta R, Bertalan M, Nielsen K, Gilbert MTP, Wang Y, Raghavan M, Campos PF, Kamp HM, Wilson AS, Gledhill A, Tridico S, Bunce M, Lorenzen ED, Binladen J, Guo XS, Zhao J, Zhang XQ, Zhang H, Li Z, Chen MF, Orlando L, Kristiansen K, Bak M, Tommerup N, Bendixen C, Pierre TL, Gronnow B, Meldgaard M, Andreasen C, Fedorova SA, Osipova LP, Higham TFG, Ramsey CB, Hansen TVO, Nielsen FC, Crawford MH, Brunak S, Sicheritz-Ponten T, Vilems R, Nielsen R, Krogh A, Wang J, Willerslev E (2010) Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature* **463**, 757-762.
- Raymakers C (2002) International trade in sturgeon and paddlefish species - the effect of CITES listing. *International Review of Hydrobiology* **87**, 525-537.
- Raymakers C (2006) CITES, the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: its role in the conservation of Acipenseriformes. *Journal of Applied Ichthyology* **22**, 53-65.
- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Reding DM, Freed LA, Cann RL, Fleischer RC (2010) Spatial and temporal patterns of genetic diversity in an endangered Hawaiian honeycreeper, the Hawaii Akepa (*Loxops coccineus coccineus*). *Conservation Genetics* **11**, 225-240.
- Regnier C, Fontaine B, Bouchet P (2009) Not Knowing, Not Recording, Not Listing: Numerous Unnoticed Mollusk Extinctions. *Conservation Biology* **23**, 1214-1221.
- Rehbein H, Molkentin J, Schubring R, Lieckfeldt D, Ludwig A (2008) Development of advanced analytical tools to determine the origin of caviar. *Journal of Applied Ichthyology* **24**, 65-70.

- Renssen H, Vandenberghe J (2003) Investigation of the relationship between permafrost distribution in NW Europe and extensive winter sea-ice cover in the North Atlantic Ocean during the cold phases of the Last Glaciation. *Quaternary Science Reviews* **22**, 209-223.
- Reusch TBH, Schaschl H, Wegner KM (2004) Recent duplication and inter-locus gene conversion in major histocompatibility class II genes in a teleost, the three-spined stickleback. *Immunogenetics* **56**, 427-437.
- Reusch TBH, Langefors A (2005) Inter- and intralocus recombination drive MHC class IIB gene diversification in a teleost, the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Molecular Evolution* **61**, 531-U545.
- Reynolds JD, Dulvy NK, Goodwin NB, Hutchings JA (2005) Biology of extinction risk in marine fishes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **272**, 2337-2344.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 83-109.
- Riccioni G, Landi M, Ferrara G, Milano I, Cariani A, Zane L, Sella M, Barbujani G, Tinti F (2010) Spatio-temporal population structuring and genetic diversity retention in depleted Atlantic Bluefin tuna of the Mediterranean Sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 2102-2107.
- Rincon PA (2000a) Big fish, small fish: still the same species. Lack of morphometric evidence of the existence of two sturgeon species in the Guadalquivir river. *Marine Biology* **136**, 715-723.
- Rincon PA (2000b) Putative morphometric evidence of the presence of *Acipenser naccarii* Bonaparte, 1836 in Iberian rivers, or why ontogenetic allometry needs adequate treatment. *Boletín Instituto Español De Oceanografía* **16**, 217-229.
- Robles F, de la Herran R, Ludwig A, Rejon CR, Rejon MR, Garrido-Ramos MA (2004) Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes. *Gene* **338**, 133-142.
- Robles F, de la Herran R, Ludwig A, Rejon CR, Rejon MR, Garrido-Ramos MA (2005) Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in the ancient fish sturgeon. *Genome* **48**, 18-28.
- Rochard E, Castelnaud G, Lepage M (1990) Sturgeons (Pisces, Acipenseridae) - Threats and Prospects. *Journal of Fish Biology* **37**, 123-132.
- Rochard E, Williot P, Castelnaud G, Lepage M (1991) Eléments de systématique et de biologie des populations sauvages d'esturgeons. In: *Acipenser* (ed. P. Williot - Cemagref Publ. A, France : 475-507).
- Rochard E, Lepage M, Meauze L (1997) Identification and characterisation of the marine distribution of the European sturgeon *Acipenser sturio*. *Aquatic Living Resources* **10**, 101-109.
- 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.
- Rohland N, Hofreiter M (2007a) Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols* **2**, 1756-1762.
- Rohland N, Hofreiter M (2007b) Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotechniques* **42**, 343-352.
- Rolland JL, Bonhomme F, Lagardere F, Hassan M, Guinand B (2007) Population structure of the common sole (*Solea solea*) in the Northeastern Atlantic and the Mediterranean Sea: revisiting the divide with EPIC markers. *Marine Biology* **151**, 327-341.
- Rompler H, Dear PH, Krause J, Meyer M, Rohland N, Schoneberg T, Spriggs H, Stiller M, Hofreiter M (2006a) Multiplex amplification of ancient DNA. *Nature Protocols* **1**, 720-728.
- Rompler H, Rohland N, Lalueza-Fox C, Willerslev E, Kuznetsova T, Rabeder G, Bertranpetit J, Schoneberg T, Hofreiter M (2006b) Nuclear gene indicates coat-color polymorphism in mammoths. *Science* **313**, 62-62.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572-1574.

- Rouchy JM, Caruso A (2006) The Messinian salinity crisis in the Mediterranean basin: A reassessment of the data and an integrated scenario. *Sedimentary Geology* **188**, 35-67.
- Roule L (1922) Etude sur l'esturgeon du Golfe de Gascogne et du bassin Girondin. *Office scientifique et technique des pêches maritimes. Notes et Mémoire no. 20*, 12pp.
- Rubidge EM, Taylor EB (2004) Hybrid zone structure and the potential role of selection in hybridizing populations of native westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) and introduced rainbow trout (*O-mykiss*). *Molecular Ecology* **13**, 3735-3749.
- Rudnick JA, Katzner TE, Bragin EA, Rhodes OE, Dewoody JA (2005) Using naturally shed feathers for individual identification, genetic parentage analyses, and population monitoring in an endangered Eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*) population from Kazakhstan. *Molecular Ecology* **14**, 2959-2967.
- Ruzzante DE, Taggart CT, Doyle RW, Cook D (2001) Stability in the historical pattern of genetic structure of Newfoundland cod (*Gadus morhua*) despite the catastrophic decline in population size from 1964 to 1994. *Conservation Genetics* **2**, 257-268.
- Ryan WBF, Pitman WC, Major CO, Shimkus K, Moskalenko V, Jones GA, Dimitrov P, Gorur N, Sakinc M, Yuce H (1997) An abrupt drowning of the Black Sea shelf. *Marine Geology* **138**, 119-126.
- Ryder OA (1986) Species Conservation and Systematics - the Dilemma of Subspecies. *Trends in Ecology & Evolution* **1**, 9-10.
- Sagnes P (1997) Potential artefacts in morphometric analyses of fish: Effects of formalin preservation on 0+ grayling. *Journal of Fish Biology* **50**, 910-914.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle-Cell Anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Schafer R, Ali S, Epplen JT (1986) The Organization of the Evolutionarily Conserved Gata Gaca Repeats in the Mouse Genome. *Chromosoma* **93**, 502-510.
- Schipper J, Chanson JS, Chiozza F, Cox NA, Hoffmann M, Katariya V, Lamoreux J, Rodrigues ASL, Stuart SN, Temple HJ, Baillie J, Boitani L, Lacher TE, Mittermeier RA, Smith AT, Absolon D, Aguiar JM, Amori G, Bakkour N, Baldi R, Berridge RJ, Bielby J, Black PA, Blanc JJ, Brooks TM, Burton JA, Butynski TM, Catullo G, Chapman R, Cokeliss Z, Collen B, Conroy J, Cooke JG, da Fonseca GAB, Derocher AE, Dublin HT, Duckworth JW, Emmons L, Emslie RH, Festa-Bianchet M, Foster M, Foster S, Garshelis DL, Gates C, Gimenez-Dixon M, Gonzalez S, Gonzalez-Maya JF, Good TC, Hammerson G, Hammond PS, Happold D, Happold M, Hare J, Harris RB, Hawkins CE, Haywood M, Heaney LR, Hedges S, Helgen KM, Hilton-Taylor C, Hussain SA, Ishii N, Jefferson TA, Jenkins RKB, Johnston CH, Keith M, Kingdon J, Knox DH, Kovacs KM, Langhammer P, Leus K, Lewison R, Lichtenstein G, Lowry LF, Macavoy Z, Mace GM, Mallon DP, Masi M, McKnight MW, Medellin RA, Medici P, Mills G, Moehlman PD, Molur S, Mora A, Nowell K, Oates JF, Olech W, Oliver WRL, Oprea M, Patterson BD, Perrin WF, Polidoro BA, Pollock C, Powel A, Protas Y, Racey P, Ragle J, Ramani P, Rathbun G, Reeves RR, Reilly SB, Reynolds JE, Rondinini C, Rosell-Ambal RG, Rulli M, Rylands AB, Savini S, Schank CJ, Sechrest W, Self-Sullivan C, Shoemaker A, Sillero-Zubiri C, De Silva N, Smith DE, Srinivasulu C, Stephenson PJ, van Strien N, Talukdar BK, Taylor BL, Timmins R, Tirira DG, Tognelli MF, Tsytulina K, Veiga LM, Vie JC, Williamson EA, Wyatt SA, Xie Y, Young BE (2008) The status of the world's land and marine mammals: Diversity, threat, and knowledge. *Science* **322**, 225-230.
- Schlotterer C, Tautz D (1992) Slippage Synthesis Of Simple Sequence Dna. *Nucleic Acids Research* **20**, 211-215.
- Schlotterer C (2004) The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* **5**, 63-69.
- Schmerer WM, Hummel S, Herrmann B (1999) Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as target. *Electrophoresis* **20**, 1712-1716.

- Schnell IB, Fraser M, Willerslev E, Gilbert MTP (2010) Characterisation of insect and plant origins using DNA extracted from small volumes of bee honey. *Arthropod-Plant Interactions* **4**, 107-116.
- Schug MD, Hutter CM, Wetterstrand KA, Gaudette MS, Mackay TFC, Aquadro CF (1998) The mutation rates of di-, tri- and tetranucleotide repeats in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 1751-1760.
- Schwartz MK, Aubry KB, McKelvey KS, Pilgrim KL, Copeland JP, Squires JR, Inman RM, Wisely SM, Ruggiero LF (2007) Inferring geographic isolation of wolverines in California using historical DNA. *Journal of Wildlife Management* **71**, 2170-2179.
- Schwarz C, Debruyne R, Kuch M, McNally E, Schwarcz H, Aubrey AD, Bada J, Poinar H (2009) New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains. *Nucleic Acids Research* **37**, 3215-3229.
- Schwarz G (1978) Estimating Dimension of a Model. *Annals of Statistics* **6**, 461-464.
- Scotese CR (1997) *Paleogeographic Atlas, PALEOMAP Progress Report 90-0497*. Department of Geology, University of Texas at Arlington, Arlington, Texas. 37 pp.
- Secor DH, Waldman JR (1999) Historical Abundance of Delaware Bay Atlantic Sturgeon and Potential Rate of Recovery in Life in the Slow Lane: Ecology and Conservation of Long-Lived Marine Animals. Editor J. Musick. American Fisheries Society Symposium, Vol. 23, pp. 203-216.
- Sefc KM, Regner F, Turetschek E, Glossl J, Steinkellner H (1999) Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* **42**, 367-373.
- Sefc KM, Payne RB, Sorenson MD (2003) Microsatellite amplification from museum feather samples: Effects of fragment size and template concentration on genotyping errors. *Auk* **120**, 982-989.
- Shapiro B, Drummond AJ, Rambaut A, Wilson MC, Matheus PE, Sher AV, Pybus OG, Gilbert MTP, Barnes I, Binladen J, Willerslev E, Hansen AJ, Baryshnikov GF, Burns JA, Davydov S, Driver JC, Froese DG, Harington CR, Keddie G, Kosintsev P, Kunz ML, Martin LD, Stephenson RO, Storer J, Tedford R, Zimov S, Cooper A (2004) Rise and fall of the Beringian steppe bison. *Science* **306**, 1561-1565.
- Shepherd LD, Millar CD, Ballard G, Ainley DG, Wilson PR, Haynes GD, Baroni C, Lambert DM (2005) Microevolution and mega-icebergs in the Antarctic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 16717-16722.
- Shepherd LD, Lambert DM (2008) Ancient DNA and conservation: lessons from the endangered kiwi of New Zealand. *Molecular Ecology* **17**, 2174-2184.
- Shields PA, Carlson SR (1996) Effects of formalin and alcohol preservation on lengths and weights of juvenile Sockeye Salmon. *Alaska Fishery Research Bulletin*, 81-93.
- Shinde D, Lai YL, Sun FZ, Arnheim N (2003) Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)(n) and (A/T)(n) microsatellites. *Nucleic Acids Research* **31**, 974-980.
- Sidow A, Wilson AC, Pääbo S (1991) Bacterial-DNA in *Clarkia* Fossils. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **333**, 429-433.
- Sire JY, Donoghue PCJ, Vickaryous MK (2009) Origin and evolution of the integumentary skeleton in non-tetrapod vertebrates. *Journal of Anatomy* **214**, 409-440.
- Slater GJ, Thalmann O, Leonard JA, Schweizer RM, Koepfli KP, Pollinger JP, Rawlence NJ, Austin JJ, Cooper A, Wayne RK (2009) Evolutionary history of the Falklands wolf. *Current Biology* **19**, R937-R938.
- Smit S, Widmann J, Knight R (2007) Evolutionary rates vary among rRNA structural elements. *Nucleic Acids Research* **35**, 3339-3354.
- Smith CI, Chamberlain AT, Riley MS, Cooper A, Stringer CB, Collins MJ (2001) Not just old but old and cold? *Nature* **410**, 771-772.

- Smith CI, Chamberlain AT, Riley MS, Stringer C, Collins MJ (2003) The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *Journal of Human Evolution* **45**, 203-217.
- Smith GR (1992) Introgression in Fishes - Significance for Paleontology, Cladistics, and Evolutionary Rates. *Systematic Biology* **41**, 41-57.
- Smith HM (1891) Report on the fisheries of the South Atlantic States. *Bull. U.S. Fish. Comm.* **11**, 269-356.
- Smith JR, Carpten JD, Brownstein MJ, Ghosh S, Magnuson VL, Gilbert DA, Trent JM, Collins FS (1995) Approach to Genotyping Errors Caused by Nontemplated Nucleotide Addition by Taq DNA-Polymerase. *Genome Research* **5**, 312-317.
- Smith TIJ (1985) The fishery, biology, and management of atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*, in North-America. *Environmental Biology of Fishes* **14**, 61-72.
- Soulé ME, Wilcox BA (1980) Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective.
- Spieth PT (1974) Gene Flow and Genetic Differentiation. *Genetics* **78**, 961-965.
- St. Pierre R, Parauka F (2009) *Acipenser oxyrinchus*. In: *IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. www.iucnredlist.org*.
- Stamatis C, Triantafyllidis A, Moutou KA, Mamuris Z (2004) Mitochondrial DNA variation in northeast atlantic and mediterranean populations of norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Molecular Ecology* **13**, 1377-1390.
- Steeves TE, Holdaway RN, Hale ML, McLay E, McAllan IAW, Christian M, Hauber ME, Bunce M (2010) Merging ancient and modern DNA: extinct seabird taxon rediscovered in the North Tasman Sea. *Biology Letters* **6**, 94-97.
- Steffensen KD, Powell LA, Koch JD (2010) Assessment of Hatchery-Reared Pallid Sturgeon Survival in the Lower Missouri River. *North American Journal of Fisheries Management* **30**, 671-678.
- Sternberg M (1998) Les produits de la pêche et la modification des structures halieutiques en Gaule Narbonnaise du IIIe siècle av. J.-C. au Ier siècle ap. J.-C. Les données de Lattes (Hérault), Marseille (Bouches-du-Rhône) et Olbia-de-Provence (Var) *Mélanges de l'Ecole Française de Rome, MEFRA*. **110**, 81-109.
- Sternin V, Doré I (1998) *Le caviar, de la pêche au grain*. INRA Editions, Paris.
- Stiller M, Green RE, Ronan M, Simons JF, Du L, He W, Egholm M, Rothberg JM, Keats SG, Ovodov ND, Antipina EE, Baryshnikov GF, Kuzmin YV, Vasilevski AA, Wuenschell GE, Termini J, Hofreiter M, Jaenicke-Despres V, Pääbo S (2006) Patterns of nucleotide misincorporations during enzymatic amplification and direct large-scale sequencing of ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 13578-13584.
- Stiller M, Knapp M, Stenzel U, Hofreiter M, Meyer M (2009) Direct multiplex sequencing (DMPS)-a novel method for targeted high-throughput sequencing of ancient and highly degraded DNA. *Genome Research* **19**, 1843-1848.
- Stiller M, Baryshnikov G, Bocherens H, d'Anglade AG, Hilpert B, Munzel SC, Pinhasi R, Rabeder G, Rosendahl W, Trinkaus E, Hofreiter M, Knapp M (2010) Withering Away-25,000 Years of Genetic Decline Preceded Cave Bear Extinction. *Molecular Biology and Evolution* **27**, 975-978.
- Streif H (2004) Sedimentary record of Pleistocene and Holocene marine inundations along the North Sea coast of Lower Saxony, Germany. *Quaternary International* **112**, 3-28.
- Swofford DL (2002) *PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tabardel M (1994) *Le point sur la situation de l'esturgeon (Acipenser sturio L.) en Méditerranée occidentale et possibilités de réintroduction dans le Rhône.*, Rennes / Arles, ENSA.
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits LP, Bouvet J (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* **24**, 3189-3194.

- Taberlet P, Camarra JJ, Griffin S, Uhres E, Hanotte O, Waits LP, DuboisPaganon C, Burke T, Bouvet J (1997) Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology* **6**, 869-876.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**, 453-464.
- Takezaki N, Nei M (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* **144**, 389-399.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-1599.
- Tautz D, Renz M (1984) Simple Sequences Are Ubiquitous Repetitive Components of Eukaryotic Genomes. *Nucleic Acids Research* **12**, 4127-4138.
- Tautz D, Trick M, Dover GA (1986) Cryptic Simplicity in DNA Is a Major Source of Genetic-Variation. *Nature* **322**, 652-656.
- Tautz D (1989) Hypervariability of Simple Sequences as a General Source for Polymorphic DNA Markers. *Nucleic Acids Research* **17**, 6463-6471.
- Taylor AC, Sherwin WB, Wayne RK (1994) Genetic-Variation of Microsatellite Loci in a Bottlenecked Species - the Northern Hairy-Nosed Wombat *Lasiorhinus-Krefftii*. *Molecular Ecology* **3**, 277-290.
- Taylor SS, Jamieson IG, Wallis GP (2007) Historic and contemporary levels of genetic variation in two New Zealand passerines with different histories of decline. *Journal of Evolutionary Biology* **20**, 2035-2047.
- Teletchea F, Maudet C, Hänni C (2005) Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnology* **23**, 359-366.
- Thomas WK, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC (1990) Spatial and Temporal Continuity of Kangaroo Rat-Populations Shown by Sequencing Mitochondrial-DNA from Museum Specimens. *Journal of Molecular Evolution* **31**, 101-112.
- Tiedemann R, Moll K, Paulus KB, Scheer M, Williot P, Bartel R, Gessner J, Kirschbaum F (2007) Atlantic sturgeons (*Acipenser sturio*, *Acipenser oxyrinchus*): American females successful in Europe. *Naturwissenschaften* **94**, 213-217.
- Tilhii MI (1929) German sturgeon in the Rioni river (en russe). *Prioroda*, p.369.
- Tortonese E (1989) *Acipenser naccarii* Bonaparte, 1836. In: *The freshwater fishes of Europe. Vol.1, Part II: General introduction to fishes, Acipenseriformes*. (ed. Holcik J), pp. 284-293. AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Toucanne S, Zaragosi S, Bourillet JF, Cremer M, Eynaud F, Van Vliet-Lanoe B, Penaud A, Fontanier C, Turon JL, Cortijo E, Gibbard PL (2009) Timing of massive 'Fleuve Manche' discharges over the last 350 kyr: insights into the European ice-sheet oscillations and the European drainage network from MIS 10 to 2. *Quaternary Science Reviews* **28**, 1238-1256.
- Toucanne S, Zaragosi S, Bourillet JF, Marieu V, Cremer M, Kageyama M, Van Vliet-Lanoe B, Eynaud F, Turon JL, Gibbard PL (2010) The first estimation of Fleuve Manche palaeoriver discharge during the last deglaciation: Evidence for Fennoscandian ice sheet meltwater flow in the English Channel ca 20-18 ka ago. *Earth and Planetary Science Letters* **290**, 459-473.
- Tsigenopoulos CS, Durand JD, Unlu E, Berrebi P (2003) Rapid radiation of the Mediterranean *Luciobarbus* species (Cyprinidae) after the Messinian salinity crisis of the Mediterranean Sea, inferred from mitochondrial phylogenetic analysis. *Biological Journal of the Linnean Society* **80**, 207-222.
- Tyagi S, Kramer FR (1996) Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* **14**, 303-308.
- Urbanyi B, Horvath A, Kovacs B (2004) Successful hybridization of *Acipenser* species using cryopreserved sperm. *Aquaculture International* **12**, 47-56.

- Valdiosera CE, Garcia N, Anderung C, Dalen L, Cregut-Bonnouere E, Kahlke RD, Stiller M, Brandstrom M, Thomas MG, Arsuaga JL, Gotherstrom A, Barnes I (2007) Staying out in the cold: glacial refugia and mitochondrial DNA phylogeography in ancient European brown bears. *Molecular Ecology* **16**, 5140-5148.
- Van Geel B, Aptroot A, Baittinger C, Birks HH, Bull ID, Cross HB, Evershed RP, Gravendeel B, Kompanje EJO, Kuperus P, Mol D, Nierop KGJ, Pals JP, Tikhonov AN, van Reenen G, van Tienderen PH (2008) The ecological implications of a Yakutian mammoth's last meal. *Quaternary Research* **69**, 361-376.
- VanAndel TH, Tzedakis PC (1996) Palaeolithic landscapes of Europe and environs, 150,000-25,000 years ago: An overview. *Quaternary Science Reviews* **15**, 481-500.
- Vecsei P (2001) CITES Identification Guide - Sturgeons and Paddlefish.
- Venkatesh B, Ning Y, Brenner S (1999) Late changes in spliceosomal introns define clades in vertebrate evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 10267-10271.
- Venkatesh B, Erdmann MV, Brenner S (2001) Molecular synapomorphies resolve evolutionary relationships of extant jawed vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 11382-11387.
- Vial E (1904a) *L'esturgeon du Rhône. La famille de Porcellet au XVe siècle*. Revue Félibréenne, Tome 15, 120-137.
- Vial E (1904b) *L'esturgeon du Rhône. La famille de Porcellet au XVe siècle*. Revue Félibréenne, Tome 15, 120-137.
- Vila C, Amorim IR, Leonard JA, Posada D, Castroviejo J, Petrucci-Fonseca F, Crandall KA, Ellegren H, Wayne RK (1999) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology* **8**, 2089-2103.
- Vinas J, Perez-Serra A, Vidal O, Bremer JRA, Pla C (2010) Genetic differentiation between eastern and western Mediterranean swordfish revealed by phylogeographic analysis of the mitochondrial DNA control region. *Ices Journal of Marine Science* **67**, 1222-1229.
- Vladykov VD (1955) A comparison of atlantic sea sturgeon with a new subspecies from the Gulf of Mexico (*Acipenser oxyrinchus desotoi*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **12**, 754-761.
- Volff JN (2005) Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* **94**, 280-294.
- Vrijenhoek RC, Pfeiler E, Wetherington JD (1992) Balancing Selection in a Desert Stream-Dwelling Fish, *Poeciliopsis-Monacha*. *Evolution* **46**, 1642-1657.
- Vrijenhoek RC (1994) Genetic diversity and fitness in small populations. In: *Conservation Genetics* (eds. Loeschcke V, Tomiuk J, Jain SK), pp. 37-53. Birkhauser, Basel, Switzerland.
- Wake DB, Vredenburg VT (2008) Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 11466-11473.
- Waldman JR, Nolan K, Hart J, Wirgin, II (1996) Genetic differentiation of three key anadromous fish populations of the Hudson River. *Estuaries* **19**, 759-768.
- Waldman JR, Grunwald C, Stabile J, Wirgin I (2002) Impacts of life history and biogeography on the genetic stock structure of Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*, Gulf sturgeon *A. oxyrinchus desotoi*, and shortnose sturgeon *A. brevirostrum*. *Journal of Applied Ichthyology* **18**, 509-518.
- Waldman JR, Doukakis P, Wirgin I (2008) Molecular analysis as a conservation tool for monitoring the trade of North American sturgeons and paddlefish. *Journal of Applied Ichthyology* **24**, 20-28.
- Wallace AR (1863) On the physical geography of the Malay Archipelago. *Journal of the Royal Geographical Society* **33**.
- Walsh PS, Erlich HA, Higuchi R (1992) Preferential PCR Amplification of Alleles: Mechanisms and Solutions. *Genome Research* **1**, 241-250.



- Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R (1996) Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research* **24**, 2807-2812.
- Wandeler P, Smith S, Morin PA, Pettifor RA, Funk SM (2003) Patterns of nuclear DNA degeneration over time - a case study in historic teeth samples. *Molecular Ecology* **12**, 1087-1093.
- Wandeler P, Hoeck PEA, Keller LF (2007) Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* **22**, 634-642.
- Wasser SK, Shedlock AM, Comstock K, Ostrander EA, Mutayoba B, Stephens M (2004) Assigning African elephant DNA to geographic region of origin: Applications to the ivory trade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 14847-14852.
- Wattier R, Engel CR, Saumitou-Laprade P, Valero M (1998) Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology* **7**, 1569-1573.
- Watts PC, Thompson DJ, Allen KA, Kemp SJ (2007) How useful is DNA extracted from the legs of archived insects for microsatellite-based population genetic analyses? *Journal of Insect Conservation* **11**, 195-198.
- Wayne RK, Jenks SM (1991) Mitochondrial-Dna Analysis Implying Extensive Hybridization Of The Endangered Red Wolf *Canis-Rufus*. *Nature* **351**, 565-568.
- Weber DS, Stewart BS, Garza JC, Lehman N (2000) An empirical genetic assessment of the severity of the northern elephant seal population bottleneck. *Current Biology* **10**, 1287-1290.
- Weber JL, May PE (1989) Abundant Class of Human DNA Polymorphisms Which Can Be Typed Using the Polymerase Chain-Reaction. *American Journal of Human Genetics* **44**, 388-396.
- Welsh A, May B (2006) Development and standardization of disomic microsatellite markers for lake sturgeon genetic studies. *Journal of Applied Ichthyology* **22**, 337-344.
- Welsh AB, Blumberg M, May B (2003) Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A-medirostris*. *Molecular Ecology Notes* **3**, 47-55.
- Whiteley AR, Hastings K, Wenburg JK, Frissell CA, Martin JC, Allendorf FW (2010) Genetic variation and effective population size in isolated populations of coastal cutthroat trout. *Conservation Genetics* **11**, 1929-1943.
- Whittaker JC, Harbord RM, Boxall N, Mackay I, Dawson G, Sibly RM (2003) Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics* **164**, 781-787.
- Willerslev E, Hansen AJ, Christensen B, Steffensen JP, Arctander P (1999) Diversity of Holocene life forms in fossil glacier ice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 8017-8021.
- Willerslev E, Hansen AJ, Binladen J, Brand TB, Gilbert MTP, Shapiro B, Bunce M, Wiuf C, Gilichinsky DA, Cooper A (2003) Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science* **300**, 791-795.
- Willerslev E, Hansen AJ, Poinar HN (2004) Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost. *Trends in Ecology & Evolution* **19**, 141-147.
- Willerslev E, Cappellini E, Boomsma W, Nielsen R, Hebsgaard MB, Brand TB, Hofreiter M, Bunce M, Poinar HN, Dahl-Jensen D, Johnsen S, Steffensen JP, Bennike O, Schwenninger JL, Nathan R, Armitage S, de Hoog CJ, Alfimov V, Christl M, Beer J, Muscheler R, Barker J, Sharp M, Penkman KEH, Haile J, Taberlet P, Gilbert MTP, Casoli A, Campani E, Collins MJ (2007) Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested Southern Greenland. *Science* **317**, 111-114.
- 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, Brun R, Pelard M, Mercier D (2000) Induced maturation and spawning in an incidentally caught adult pair of critically endangered European sturgeon, *Acipenser sturio* L. *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie* **16**, 279-281.
- Williot P, Arlat G, Chebanov M, Gulyas T, Kasimov R, Kirschbaum F, Patriche N, Pavlovskaya LP, Poliakova L, Pourkazemi M, Kim Y, Zhuang P, Zholdasova IM (2002) Conservation and broodstock management. *International Review of Hydrobiology* **87**, 483-506.
- Wirgin, II, Stabile JE, Waldman JR (1997) Molecular analysis in the conservation of sturgeons and paddlefish. *Environmental Biology of Fishes* **48**, 385-398.
- Wirgin I, Waldman JR, Rosko J, Gross R, Collins MR, Rogers SG, Stabile J (2000) Genetic structure of Atlantic sturgeon populations based on mitochondrial DNA control region sequences. *Transactions of the American Fisheries Society* **129**, 476-486.
- Wirgin I, Waldman J, Stabile J, Lubinski B, King T (2002) Comparison of mitochondrial DNA control region sequence and microsatellite DNA analyses in estimating population structure and gene flow rates in Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus*. *Journal of Applied Ichthyology* **18**, 313-319.
- Wirgin I, Grunwald C, Carlson E, Stabile J, Peterson DL, Waldman J (2005) Range-wide population structure of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. *Estuaries* **28**, 406-421.
- Wirgin I, Grunwald C, Stabile J, Waldman J (2007) Genetic evidence for relict Atlantic sturgeon stocks along the mid-Atlantic coast of the USA. *North American Journal of Fisheries Management* **27**, 1214-1229.
- Wisely SM, Buskirk SW, Fleming MA, McDonald DB, Ostrander EA (2002) Genetic diversity and fitness in black-footed ferrets before and during a bottleneck. *Journal of Heredity* **93**, 231-237.
- Wisely SM, Maldonado JE, Fleischer RC (2004) A technique for sampling ancient DNA that minimizes damage to museum specimens. *Conservation Genetics* **5**, 105-107.
- Wisely SM, Statham MJ, Fleischer RC (2008) Pleistocene refugia and holocene expansion of a grassland-dependent species, the black-footed ferret (*Mustela nigripes*). *Journal of Mammalogy* **89**, 87-96.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **22**, 130-8.
- Wolc A, Jozwiakowska-Nitka M, Szablewski P, Szwaczkowski T (2008) Inbreeding in captive bred Przewalski horses from local populations. *Folia Zoologica* **57**, 300-307.
- Wolstenholme DR (1992) Animal mitochondrial-DNA - Structure and evolution. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology* **141**, 173-216.
- Woodward SR, Weyand NJ, Bunnell M (1994) DNA-Sequence from Cretaceous Period Bone Fragments. *Science* **266**, 1229-1232.
- Worthy TH, Holdaway RN (2002) *The Lost World of the Moa*. Indiana University Press, Bloomington, Indiana.
- Xu X, Peng M, Fang Z, Xu XP (2000) The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nature Genetics* **24**, 396-399.
- Yang ZH (1996) Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *Trends in Ecology & Evolution* **11**, 367-372.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002a) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* **11**, 1-16.
- Zane L, Patarnello T, Ludwig A, Fontana F, Congiu L (2002b) Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Molecular Ecology Notes* **2**, 586-588.

- Zardoya R, Vollmer DM, Craddock C, Streelman JT, Karl S, Meyer A (1996) Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **263**, 1589-1598.
- Zardoya R, Castilho R, Grande C, Favre-Krey L, Caetano S, Marcato S, Krey G, Patarnello T (2004) Differential population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and the chub mackerel (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology* **13**, 1785-1798.
- Zhang SM, Yan Y, Deng H, Wang DQ, Wei QW, Wu QJ (1999) Genome size, ploidy characters of several species of sturgeons and paddlefishes with comment on cellular evolution of Acipenseriformes  
*Acta Zoologica Sinica*, 200–206.
- Zhigang J, Harris RB (2008) *Elaphurus davidianus*. In: *IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. www.iucnredlist.org*.
- Zhu B, Liao X, Shao Z, Rosenthal H, Chang J (2005) Isolation and characterization of microsatellites in Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Molecular Ecology Notes* **5**, 888-892.
- Zhu B, Zhao N, Shao ZJ, Lek S, Chang JB (2006) Genetic population structure of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) in the Yangtze River revealed by artificial neural network. *Journal of Applied Ichthyology* **22**, 82-88.
- Zischler H, Hoss M, Handt O, Vonhaeseler A, Vanderkuyl AC, Goudsmit J, Pääbo S (1995) Detecting Dinosaur DNA. *Science* **268**, 1192-1193.
- Zonneveld KAF (1996) Palaeoclimatic reconstruction of the last deglaciation (18-8 ka BP) in the Adriatic Sea region; A land-sea correlation based on palynological evidence. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* **122**, 89-106.

# ANNEXE 1 : CONDITIONS D'EXPERIMENTATIONS SUR L'ADNA DURANT CETTE THESE

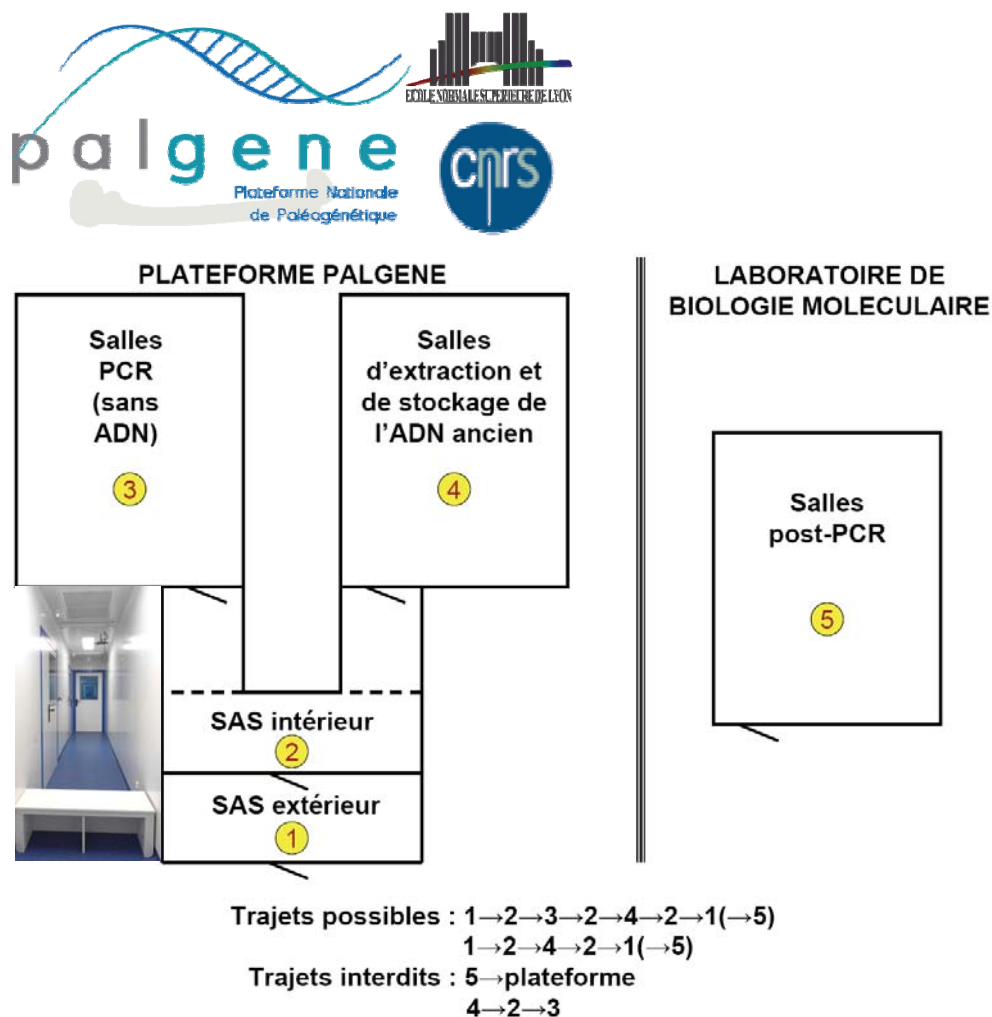
## UTILISATION DE LOCAUX SPECIFIQUES :

Toutes les expérimentations sur le matériel ancien (restes archéologiques ou spécimens de muséums) ont été réalisées sur la Plateforme Nationale de Paléogénétique Palgene (CNRS, ENS-Lyon), spécialement conçue pour les analyses paléogénétiques (Figure A1-1). La séparation physique de la plateforme par rapport aux autres laboratoires permet d'éviter les contaminations. Pour la même raison, l'entrée sur la plateforme est interdite à toute personne passée le même jour par un autre laboratoire de biologie.

Les mesures permettant d'éviter les contaminations sur la plateforme Palgene incluent également :

- la séparation physique des salles où les réactions de PCR sont préparées (« salles PCR » sans ADN) et des salles où l'ADNa est extrait et manipulé (« salles d'extraction » et « salle de stockage des extraits anciens »). Deux SAS contrôlent le passage dans ces différentes zones. Afin d'éviter la contamination des salles PCR par de l'ADN, les procédures interdisent de s'y rendre après être passé dans les salles d'extraction ou de stockage de l'ADNa (Figure A1-1) ;
- l'irradiation UV des salles et des hottes d'expérimentation entre les périodes d'activité ; les UVs rendent l'ADN impropre à l'amplification par PCR en créant des liaisons covalentes, essentiellement entre les thymines (dimérisation) ;
- le maintien en surpression par rapport à l'environnement extérieur, limitant l'entrée de contaminants ; à noter l'existence d'un gradient de surpression « salles PCRs » > « salles d'extraction et de stockage » > « couloir et SASs » permettant de focaliser la protection sur les salles d'expérimentation ;
- le nettoyage systématique des salles et du matériel avec un produit stérilisant (Actril®, formule à 5% d'acide acétique, 1% de peroxyde d'hydrogène et 1% d'acide péracétique), détruisant tous les microorganismes et dégradant l'ADN par oxydation et hydrolyse.

- l'utilisation de consommables stériles et de pointes à filtres ; les emballages des consommables sont systématiquement nettoyé à l'Actril avant d'entrer sur la plateforme, afin de limiter les contaminations environnementales.
- le port obligatoire d'une blouse intégrale, de deux paires de surchaussures (par-dessus des sabots ne quittant jamais la plateforme), d'un masque et de gants (plus éventuellement des surmanches lors des extractions d'ADN).



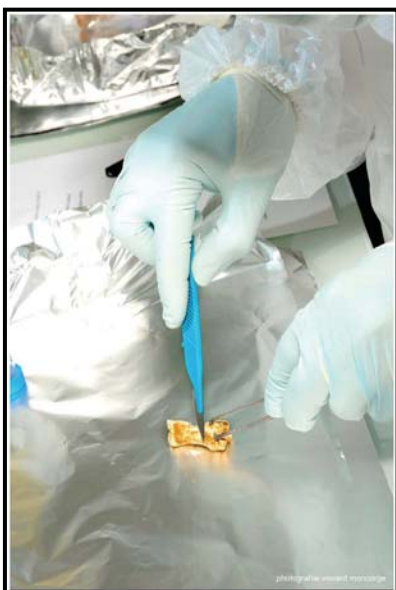
**Figure A1-1 :** Schématisation des locaux dans lesquels les expérimentations sur l'ADN ancien se sont déroulées. L'ordre dans lequel les salles peuvent être parcourues ou non est indiqué en bas. Photographie : Vincent Moncorgé.

**CONDITIONS D'ÉCHANTILLONNAGE :****Restes archéologiques :**

L'intégralité de la préparation des échantillons est réalisée sur la plateforme Palgene dans les salles d'extraction. L'extérieur des fragments osseux est gratté au scalpel afin d'éliminer les éventuels sédiments restants ainsi que les contaminants de surface (Figure A1-2). Des échantillons de 150 à 500 mg sont ensuite prélevés sur les zones nettoyées et mis à digérer dans du tampon de lyse. Les échantillons sont traités les uns après les autres, sur des aires de travail différentes afin d'éviter les contaminations croisées.

**Spécimens de muséum :**

Des échantillons de tissus ou d'os sont prélevés à l'aide d'un scalpel sur les spécimens naturalisés ou conservés dans l'alcool. Les zones les moins bien conservées (zones plâtrées ou avec beaucoup de résine par exemple) sont évitées pour limiter la quantité d'inhibiteurs et optimiser la quantité de tissu. Les prélèvements sont réalisés directement au musée, dans les conditions les plus stériles possibles (masque, gants, surmanches...). Les échantillons sont ensuite nettoyés dans les salles d'extraction de la plateforme Palgene suivant la même procédure que pour les restes archéologiques, puis mis à digérer dans du tampon de lyse. Là encore, les échantillons sont traités les uns après les autres, sur des aires de travail différentes afin d'éviter les contaminations croisées.



**Figure A1-2 :** Nettoyage de la surface d'un reste archéologique (ici une phalange de Hyène des cavernes), avant prélèvement d'un échantillon pour extraction d'ADNa. Photographie : Vincent Moncorgé.

**CONDITIONS D'EXTRACTION DE L'ADN (FIGURE A1-3):**

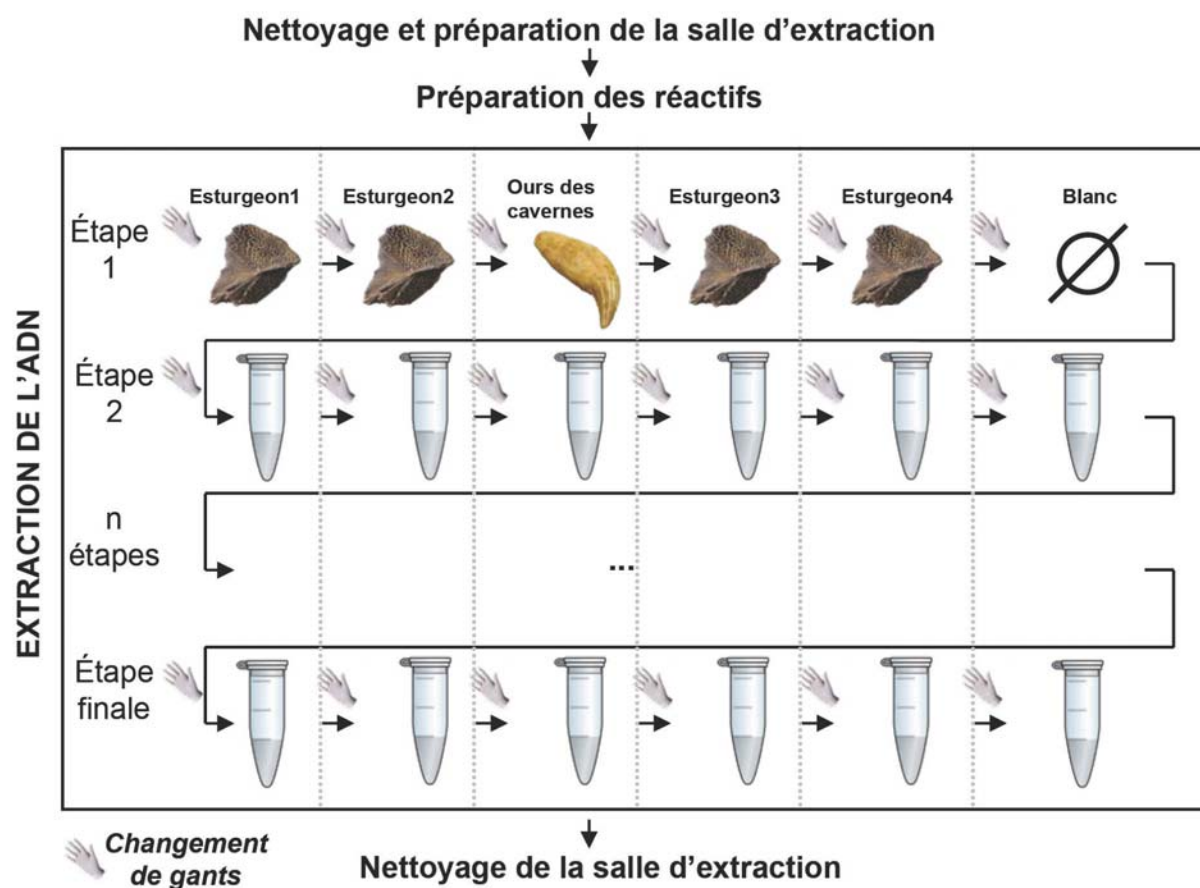
Le protocole d'extraction se déroule sur deux jours dans les salles d'extraction de la plateforme Palgene. Le premier jour comporte la préparation des échantillons et leur mise en lyse dans un tampon soude-EDTA-détergent (digère les tissus et la matrice osseuse). Le deuxième jour, l'ADN est purifié à partir du lysat lors d'une succession d'étapes, suivant le protocole dit « au silica » mis au point par Rohland & Hofreiter (2007a) ou le protocole dit « au phénol-chloroforme » utilisé par exemple par Loreille *et al.* (2001). A l'issue de l'extraction, l'ADN est stocké en solution aqueuse à 4°C pour utilisation ultérieure.

Chaque session d'extraction comporte un à quatre échantillons anciens d'esturgeon, un échantillon ancien d'une autre espèce et un blanc. A chaque étape du protocole, les échantillons sont traités séquentiellement, toujours dans le même ordre et en terminant par le blanc. Les gants sont changés entre chaque échantillon pour éviter les contaminations.

Le nombre d'échantillons d'esturgeon par session est adapté en fonction de leur caractère précieux ; ainsi les échantillons les plus anciens (par exemple les deux fragments d'écaille du site de Ponthézières, datant de 5 ka BP, code labo CH793, CH1008) ont été extraits un à un (avec à chaque fois un échantillon ancien d'une autre espèce et un blanc).

L'échantillon issu d'une autre espèce (ours des cavernes, ours brun, hyène des cavernes, mouton, chèvre ou chien) est dit « de contamination croisée ». De l'ADN endogène a déjà été extrait avec succès de cet échantillon lors d'une extraction antérieure. Cet échantillon sert donc aussi de témoin positif pour la nouvelle extraction. Si l'extrait d'ADN obtenu pour cet échantillon contient de l'ADN d'esturgeon, c'est le signe d'une contamination croisée (c'est-à-dire qu'un des échantillons d'esturgeon coextrait l'a contaminé). Si il ne contient pas d'ADN de l'espèce attendue (ours des cavernes, ours brun, hyène des cavernes, mouton, chèvre ou chien), c'est que l'extraction a échoué.

Le blanc d'extraction est identique aux autres tubes d'extraction à la différence près qu'aucun matériel biologique n'y est introduit volontairement. Ainsi, la présence d'ADN dans le blanc à l'issue de l'extraction est le signe d'une contamination ayant eu lieu au cours de l'extraction. La détection des contaminations sur l'échantillon de contamination croisée est plus fine que sur le blanc d'extraction, car l'ADN endogène de l'échantillon de contamination croisée peut faciliter l'amplification par PCR de contaminants.



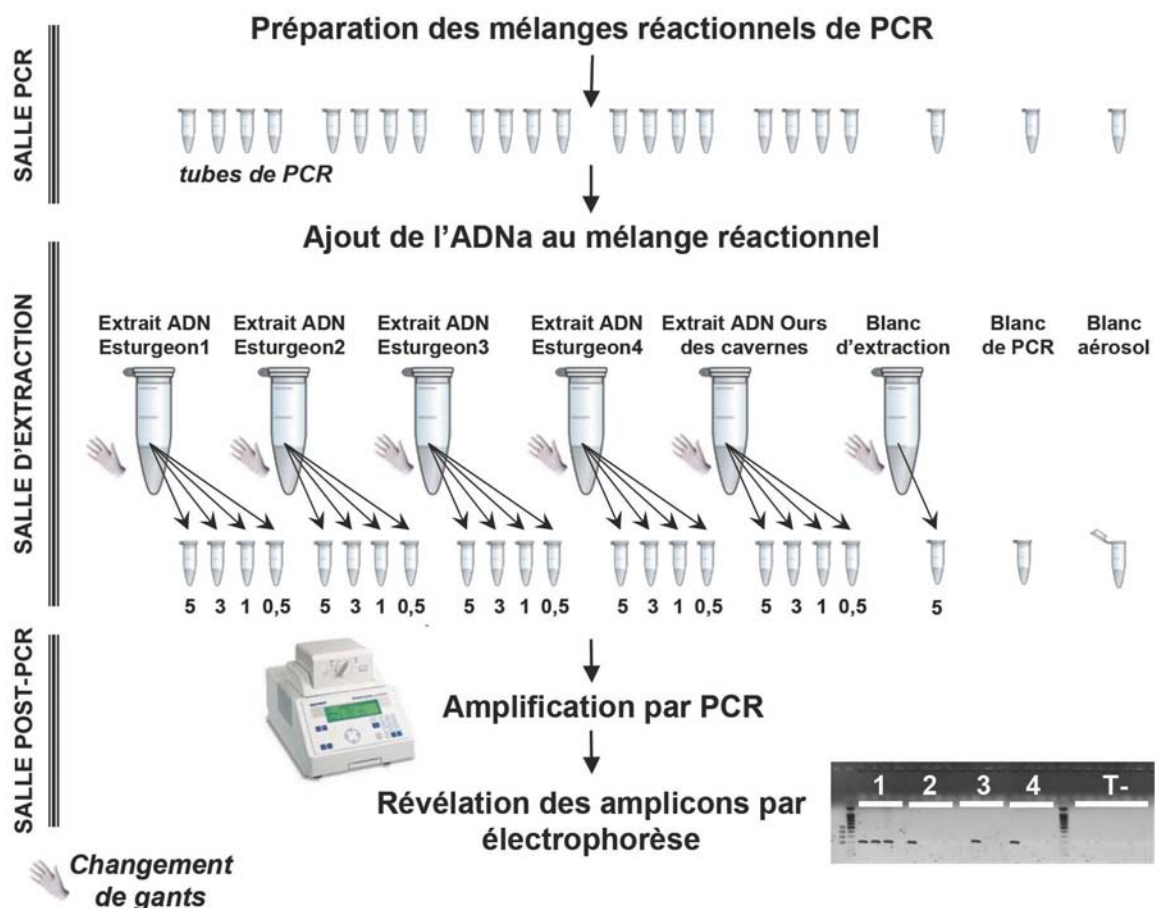
**Figure A1-3 :** Déroulement schématique d'une session d'extraction d'ADNa incluant quatre échantillons d'esturgeon, un échantillon de contamination croisée et un blanc.

#### CONDITIONS D'AMPLIFICATION DE L'ADN PAR PCR (FIGURE A1-4) :

L'amplification de l'ADNa par PCR est sujette aux contaminations, car celui-ci est un moins bon substrat que l'ADN moderne pour la Taq polymérase.



Afin d'éviter les contaminations, le mélange réactionnel de la PCR est réalisé sur la plateforme Palgene dans des salles spécifiques où aucun ADN n'est jamais manipulé (« salles PCR » de la Figure A1-1). Plusieurs contrôles de PCR sont par ailleurs inclus à chaque session de PCR, afin de détecter les contaminations : le blanc de PCR (sans ADN), le blanc d'aérosol (identique au blanc de PCR sauf que le tube reste ouvert lors de l'ajout de l'ADN dans les autres tubes), le blanc d'extraction et les tests de contamination croisée (ajout d'extrait d'ours ou de hyène dans le mélange réactionnel permettant d'amplifier de l'ADN d'esturgeon). Pour chaque extrait d'intérêt, plusieurs volumes sont testés (entre 0,5 et 5  $\mu$ L) afin d'apprécier la concentration en ADN et la présence d'éventuels inhibiteurs de PCR. Une fois les extraits ajoutés et les tubes hermétiquement fermés, la PCR est réalisée en dehors de la plateforme et la présence d'amplicons est détectée par électrophorèse sur gel d'agarose.

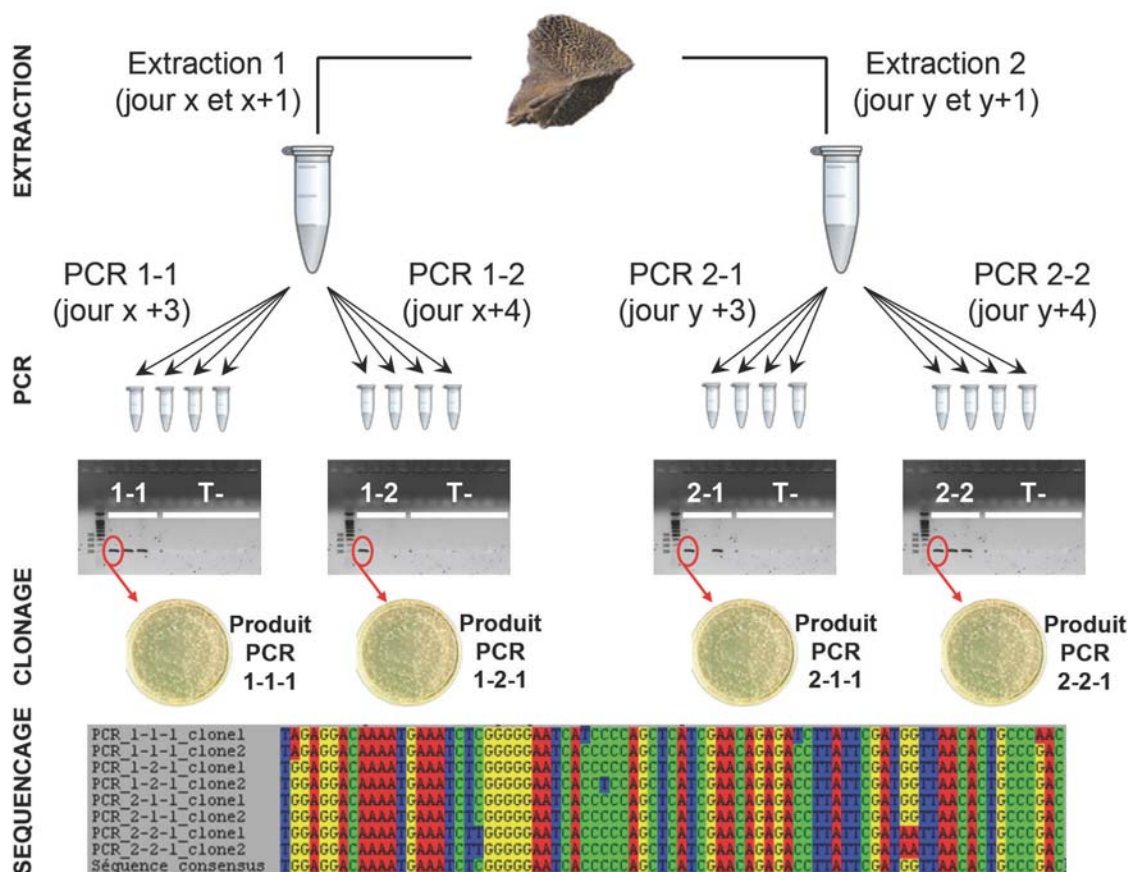


**Figure A1-4 :** Déroulement schématique d'une session de PCR sur ADN incluant quatre échantillons d'esturgeon, un échantillon de contamination croisée, le blanc d'extraction, le blanc de PCR et le blanc d'aérosol. Les chiffres indiquent le volume d'extrait ajouté par tube, en microlitre.

**REPRODUCTION DES RESULTATS (FIGURE A1-5):**

Chaque session de PCR se déroule sur une journée. Pour chaque extrait au moins deux sessions indépendantes de PCR sont réalisées, et les résultats doivent être reproductibles d'une session à l'autre ; plusieurs amplicons issus des différentes sessions de PCR sont clonés et séquencés permettant d'obtenir une séquence consensus fiable, qui sera utilisée lors des analyses.

Pour les échantillons précieux, deux extractions indépendantes sont réalisées au cours de deux sessions d'extraction différentes. Afin de limiter les effets expérimentateur dépendants, ces deux extractions sont généralement réalisées par deux personnes différentes. Les résultats obtenus d'une extraction à l'autre doivent être reproductibles. Environ la moitié des échantillons d'esturgeon analysés durant cette thèse ont été extrait deux fois et les résultats obtenus ont toujours été cohérents entre les réplicats.



**Figure A1-5 :** Schéma d'analyse d'un échantillon indiquant les reproductions nécessaires à la validation des résultats.

# ANNEXE 2 : PRESENTATION DES ECHANTILLONS

N° d'échantillon	Code labo Lyon	Code collection	Site archéologique / Musée d'origine	Materiel (colonne gauche, A=reste archéologique, M= tissu sec muséum, F=tissu frais)	Lieu de capture (colonne gauche=code géographique, colonne droite=code environnement ; voir note de bas de page)	Date de capture	Age approximatif en années (utilisé pour Beast)	Contact
<b>RESTES ARCHEOLOGIQUES</b>								
1	CH1009	LL-UF 196-2	Le Langon, Vendée, France	écaille dermique osseuse	AF Fleuves Sèvres-Niortaise ou Vendée F	0-50 ap.J-C	2035	Nathalie DESSE-BERSET
2	CH793	Ptz-Co3 d10 H9	Ponthezières, Oléron Island, France	écaille dermique osseuse	AF Ile d'Oléron M	vers 3000 av.J-C	5000	Nathalie DESSE-BERSET
3	CH1008	Ptz-Co 3 d10 E4	Ponthezières, Oléron Island, France	écaille dermique osseuse	AF Ile d'Oléron M	vers 3000 av.J-C	5000	Nathalie DESSE-BERSET
4	CH1010	SGE-3016	Saint-Germain d'Esteuil, Gironde, France	écaille dermique osseuse	AF estuaire de Gironde E	300 av.J-C-200 ap.J-C	2110	Nathalie DESSE-BERSET
5	CH1011	SGE-3005	Saint-Germain d'Esteuil, Gironde, France	écaille dermique osseuse	AF estuaire de Gironde E	300 av.J-C-200 ap.J-C	2110	Nathalie DESSE-BERSET
6	CH1188	Tri/1990 - Fabrica I Tanque B6 Camada 2	Troia, ville de Grândola, Portugal	écaille dermique osseuse	AI estuaire du Sado E	5e siècle ap.J-C	1560	Nathalie DESSE-BERSET
7	CH1236	LatRP3228-US 53230	Lattes, près de la ville de Montpellier, France	écaille dermique osseuse	MO fleuves Rhône ou Lez E	450-425 av.J-C	2447	Gaël PIQUES
8	CH1239	LatRP3228-US 51118	Lattes, près de la ville de Montpellier, France	écaille dermique osseuse	MO fleuves Rhône ou Lez E	425-400 av.J-C	2422	Gaël PIQUES
9	CH1240	LatPP2823-US 50292	Lattes, près de la ville de Montpellier, France	écaille dermique osseuse	MO fleuves Rhône ou Lez E	425-400 av.J-C	2422	Gaël PIQUES
10	CH1241	LatRP1742-US 50033	Lattes, près de la ville de Montpellier, France	écaille dermique osseuse	MO fleuves Rhône ou Lez E	vers 400 av.J-C	2410	Gaël PIQUES
11	CH1242	LatRP3228-US 60202	Lattes, près de la ville de Montpellier, France	écaille dermique osseuse	MO fleuves Rhône ou Lez E	100-50 av.J-C	2085	Gaël PIQUES
12	CH1235	PSG2002.104-US 1356, Z8, S1	Parc St-Georges, ville de Lyon, France	fragment d'épine pectorale	MO fleuves Saône ou Rhône probablement, mais origine distante non exclue F	3e siècle ap.J-C	1760	Gaël PIQUES
13	CH480	JH 87-US 453	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 1b, 525-475 av.J-C	2510	Nathalie DESSE-BERSET
14	CH481	JH 83-US 037	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	fragment d'os occipital	MO fleuve Rhône F	phase 3a, 375-350 av.J-C	2377	Nathalie DESSE-BERSET
15	CH482	JH X-US 075	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 2b-c, 450-400 av.J-C	2435	Nathalie DESSE-BERSET
16	CH483	JH X-US 081	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 2b-c, 450-400 av.J-C	2435	Nathalie DESSE-BERSET
17	CH824	JH 88-US 646	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 2a, 475-425 av.J-C	2460	Nathalie DESSE-BERSET
18	CH825	JH 88-US 709	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 2b, 475-425 av.J-C	2460	Nathalie DESSE-BERSET
19	CH826a	JH 86-US 376	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 2cd, 400-375 av.J-C	2397	Nathalie DESSE-BERSET
20	CH826b	JH 86-US 376	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	fragment d'épine pectorale	MO fleuve Rhône F	phase 2cd, 400-375 av.J-C	2397	Nathalie DESSE-BERSET
21	CH827	JH 88-US 771	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 3a, 375-350 av.J-C	2377	Nathalie DESSE-BERSET
22	CH828	JH 89-US 806	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 3b, 375-300 av.J-C	2347	Nathalie DESSE-BERSET
23	CH829	JH 87-US 580	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 3c, 375-300 av.J-C	2347	Nathalie DESSE-BERSET
24	CH830	JH 84-US 013	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 4c-5a, 300-175 av.J-C	2247	Nathalie DESSE-BERSET
25	CH831	JH 89-US 954	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 5b, 250-175 av.J-C	2222	Nathalie DESSE-BERSET
26	CH832	JH 89-US 876	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 5c, 250-175 av.J-C	2222	Nathalie DESSE-BERSET
27	CH833	JH 87-US 832	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 5d, 250-175 av.J-C	2222	Nathalie DESSE-BERSET
28	CH1018	JH 85-US 277	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 1av.J-C, 525-475 av.J-C	2510	Nathalie DESSE-BERSET
29	CH1019	JH 88-US 563	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 1c-2a, 525-425 av.J-C	2485	Nathalie DESSE-BERSET
30	CH1020	JH 89-US 862	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 2a, 475-425 av.J-C	2460	Nathalie DESSE-BERSET
31	CH1021	JH 89-US 814	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 2ab, 475-425 av.J-C	2460	Nathalie DESSE-BERSET
32	CH1022	JH 87-US 551	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 2ab, 475-425 av.J-C	2460	Nathalie DESSE-BERSET
33	CH1023	JH 88-US 758	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 2ab, 475-425 av.J-C	2460	Nathalie DESSE-BERSET
34	CH1024	JH 88-US 690	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 2d, 400-375 av.J-C	2397	Nathalie DESSE-BERSET
35	CH1025	JH 85-US 274	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	fragment osseux	MO fleuve Rhône F	phase 3b, 375-300 av.J-C	2347	Nathalie DESSE-BERSET
36	CH1026	JH 89-US 845	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 3b, 375-300 av.J-C	2347	Nathalie DESSE-BERSET
37	CH1027	JH 83-US 273	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 3b, 375-300 av.J-C	2347	Nathalie DESSE-BERSET
38	CH1028	JH 88-US 592	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	os dentaire	MO fleuve Rhône F	phase 3c, 375-300 av.J-C	2347	Nathalie DESSE-BERSET
39	CH1029	JH 89-US 953	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 4-5, 300-175 av.J-C	2247	Nathalie DESSE-BERSET
40	CH1030	JH 89-US 946	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 5a, 250-175 av.J-C	2222	Nathalie DESSE-BERSET
41	CH1031	JH 85-US 222	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	écaille dermique osseuse	MO fleuve Rhône F	phase 5, 250-175 av.J-C	2222	Nathalie DESSE-BERSET
42	CH1032	JH 89-US 955-1	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	fragment d'épine pectorale	MO fleuve Rhône F	phase 5a, 250-175 av.J-C	2222	Nathalie DESSE-BERSET
43	CH1033	JH 89-US 942	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	fragment d'épine pectorale	MO fleuve Rhône F	phase 5d, 250-175 av.J-C	2222	Nathalie DESSE-BERSET
44	CH1116	JH058	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	os dentaire	MO fleuve Rhône F	525-175 av.J-C	2360	Nathalie DESSE-BERSET
45	CH1196	JH 88-US 625	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	fragment d'épine pectorale	MO fleuve Rhône F	phase 1av.J-C, 525-475 av.J-C	2519	Nathalie DESSE-BERSET

## ANNEXE 2

46	CH1197	JH 85-US 282	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	fragment d'épine pectorale	MO	fleuve Rhône	F	phase 1c, 525-475 av.J-C	2510	Nathalie DESSE-BERSET
47	CH1198	JH 88-US 708	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	fragment d'épine pectorale	MO	fleuve Rhône	F	phase 2a, 475-425 av.J-C	2460	Nathalie DESSE-BERSET
48	CH1199	JH 84-US 175	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	fragment d'épine pectorale	MO	fleuve Rhône	F	phase 2ab, 475-425 av.J-C	2460	Nathalie DESSE-BERSET
49	CH1200	JH 89-US 945	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	fragment d'épine pectorale	MO	fleuve Rhône	F	phase 2d, 400-375 av.J-C	2397	Nathalie DESSE-BERSET
50	CH1201	JH 88-US 737	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	fragment d'épine pectorale	MO	fleuve Rhône	F	phase 3a, 375-350 av.J-C	2347	Nathalie DESSE-BERSET
51	CH1202	JH 88-US 745	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	fragment d'épine pectorale	MO	fleuve Rhône	F	phase 3c, 375-300 av.J-C	2347	Nathalie DESSE-BERSET
52	CH1203	JH 87-US 464	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	fragment d'épine pectorale	MO	fleuve Rhône	F	phase 4a, 300-250 av.J-C	2285	Nathalie DESSE-BERSET
53	CH1204	JH 84-US 097	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	os dentaire	MO	fleuve Rhône	F	phase 4b-5b, 300-175 av.J-C	2247	Nathalie DESSE-BERSET
54	CH1205	JH 89-US 949	Jardin d'Hiver, ville d'Arles, France	fragment d'épine pectorale	MO	fleuve Rhône	F	phase5b, 250-175 av.J-C	2222	Nathalie DESSE-BERSET
55	CH1012	Mmj-US 33	Montmajour, ville d'Arles, France	fragment osseux	MO	fleuve Rhône	F	Phase I, 10e-12e siècles ap.J-C	1010	Nathalie DESSE-BERSET
56	CH1189	Mmj- US 62	Montmajour, ville d'Arles, France	fragment osseux	MO	fleuve Rhône	F	4e-6e siècles ap.J-C	1610	Nathalie DESSE-BERSET
57	CH1190	Mmj-US 12, Z1, S2	Montmajour, ville d'Arles, France	fragment osseux	MO	fleuve Rhône	F	Phase I, 10e-12e siècles ap.J-C	1010	Nathalie DESSE-BERSET
58	CH1191	Mmj-US 32, Z1, S2	Montmajour, ville d'Arles, France	fragment osseux	MO	fleuve Rhône	F	Phase I, 10e-12e siècles ap.J-C	1010	Nathalie DESSE-BERSET
59	CH1192	Mmj-US 38, Z1, S2	Montmajour, ville d'Arles, France	fragment osseux	MO	fleuve Rhône	F	Phase I, 10e-12e siècles ap.J-C	1010	Nathalie DESSE-BERSET
60	CH1193	Mmj-US 65	Montmajour, ville d'Arles, France	fragment osseux	MO	fleuve Rhône	F	Phase I, 10e-12e siècles ap.J-C	1010	Nathalie DESSE-BERSET
61	CH1194	Mmj-US 28, Z1, S3	Montmajour, ville d'Arles, France	fragment osseux	MO	fleuve Rhône	F	Phase Ia, 10e-11e siècles ap.J-C	1060	Nathalie DESSE-BERSET
62	CH1195	Mmj-US 11, Z1, S2	Montmajour, ville d'Arles, France	fragment osseux	MO	fleuve Rhône	F	Phase IV, 18e siècle ap.J-C	260	Nathalie DESSE-BERSET
<b>SPECIMENS DE MUSEUM</b>										
63	CH1145 CH1146	MZUF-3035	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	nageoire pectorale peau près de l'anus	NO	Katégat, entre Danemark et Suède	M	inconnue	210	Stefano VANNI
64	CH1305 CH1306	MNHN-0000-3115	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	nageoire pectorale peau ventrale	AF	estuaire de la Seine, France	E	1823	187	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
65	CH1307 CH1308	MNHN-0000-3108	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	nageoire pectorale peau et écaille dermique près de l'anus	AF	estuaire de la Seine, France	E	1851	159	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
66	CH1289 CH1290	MNHN-0000-5160	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	écaille dermique de l'opercule os de la colonne vertébrale	AF	fleuve Seine, France	F	1858	152	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
67	CH1299 CH1300	MNHN-0000-3119	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	écaille dermique près de l'anus nageoire pectorale	AF	estuaire en Bretagne, France	E	avant 1870	210	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
68	CH1309 CH1310	MNHN-B-2609	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	nageoire pectorale peau ventrale	AF	estuaire de l'Elorn, Bretagne, France	E	inconnue	210	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
69	CH1313 CH1314	MHNNantes-Z.019558	Muséum d'Histoire Naturelle de Nantes, France	nageoire caudale peau ventrale	AF	Loire à Nantes, France	E	1880	130	Marie-Laure GUERIN et Thierry BOISGARD
70	CH1317 CH1318	MHNNantes-Z.019308	Muséum d'Histoire Naturelle de Nantes, France	nageoire pectorale peau ventrale	AF	fleuve Loire, France	F	1886	124	Marie-Laure GUERIN et Thierry BOISGARD
71	CH1315 CH1316	MHNNantes-Z.019631	Muséum d'Histoire Naturelle de Nantes, France	nageoire caudale muscle et os ventral	AF	Loire à Nantes, France	E	1896	114	Marie-Laure GUERIN et Thierry BOISGARD
72	CH1319 CH1320	MHNNantes-Z.58274	Muséum d'Histoire Naturelle de Nantes, France	nageoire caudale écaille dermique ventrale	AF	estuaire de la Loire, France	E	inconnue	210	Marie-Laure GUERIN et Thierry BOISGARD
73	CH1291 CH1292	MNHN-0000-5162	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	nageoire pectorale arc branchial	AF	océan Atlantique près de la Rochelle, France	M	1830	180	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
74	CH1293 CH1294	MNHN-0000-5162	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	nageoire pectorale arc branchial	AF	océan Atlantique près de la Rochelle, France	M	1830	180	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
75	CH1311 CH1312	MNHN-0000-3573	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	nageoire pectorale os de la tête	AF	estuaire de la Veronne près des Sables d'Olonne, France	E	avant 1870	210	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
76	CH1297 CH1298	MNHN-1962-1295	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	os de la tête nageoire pectorale	AF	fleuve Charentes à Saintes, France	F	avant 1962	210	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
77	CH1285 CH1286	MNHN-0000-2610	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	muscle peau de la langue	AF	estuaire de la Gironde, France	E	1850	160	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
78	CH1287 CH1288	MNHN-0000-2610	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	intestin nageoire pectorale	AF	estuaire de la Gironde, France	E	1850	160	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
79	CH1283 CH1284	MNHN-0000-5159	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	nageoire caudale arc branchial	AF	estuaire de la Gironde, France	E	avant 1870	210	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
80	CH1301 CH1302	MNHN-1894-0087	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	nageoire pectorale peau	AF	fleuve Dordogne près de Libourne, France	F	avant 1894	210	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
81	CH1325 CH1326	MNHN-1939-0008	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	arc branchial nageoire anale	AF	estuaire de la Gironde à Saint-Ciers, France	F	1939	71	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
82	CH1335	MHNB-2003-2395	Muséum d'Histoire Naturelle de Bordeaux France	nageoire anale	AF	probablement estuaire de Gironde mais incertain	E	probablement avant 1950	210	Nathalie MEMOIRE (MHNT)

## ANNEXE 2

83	CH1336	MHNB-2007-278-0	Muséum d'Histoire Naturelle de Bordeaux, France	écaille dermique osseuse	AF	probablement estuaire de Gironde, mais incertain	E	probablement avant 1950	210	Nathalie MEMOIRE (MHNT)
84	CH1337	MHNB-2003-2077	Muséum d'Histoire Naturelle de Bordeaux, France	écaille dermique osseuse	AF	probablement estuaire de Gironde, mais incertain	E	probablement avant 1950	210	Nathalie MEMOIRE (MHNT)
85	CH1303 CH1304	MNHN-B-2611	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	nageoire pectorale peau et écaille dermique de la tête	AF	fleuve Garonne, France	F	inconnue	210	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
86	CH1333 CH1334	MNHT-ICHT-1995-380	Muséum d'Histoire Naturelle de Toulouse, France	peau de la cavité operculaire peau de la bouche	AF	fleuve Garonne à Toulouse, France	F	inconnue	210	Pierre DALOUS et Brian AIELLO
87	CH1038	MB05-2204	Museu Nacional de Historia Natural de Lisbon, Portugal	muscle et peau	AI	Freixo de Espada a Cinta, fleuve Douro, Portugal	F	1972	38	Maria Judite ALVES
88	CH1234	?	Museu de Zoologia de Barcelona, Spain	peau	MO	origine inconnue	F	18e siècle	210	Nathalie DESSEBERSET
89	CH1332	MNHT-ICHT-1995-25	Muséum d'Histoire Naturelle de Toulouse (MHNT)	peau sous la tête	MO	Mer Méditerranée au large de Port-Vendres, France	M	1888	122	Pierre DALOUS et Brian AIELLO
90	CH557 CH558	MHNG 125.100	Muséum d'histoire naturelle de la Ville de Genève, Switzerland	peau muscle interne	MO	fleuve Rhône en aval de Lyon, France	F	1830	180	Sonia FISCH MULLER
91	CH553 CH554 CH1329	MHNNimes-245	Museum d'Histoire Naturelle de Nimes, France	peau près de l'opercule peau près de l'opercule peau et écaille dermique ventrale	MO	fleuve Rhône, France	F	1871	139	Adeline ROUILLY
92	CH551 CH552	MHNM-1248	Muséum d'Histoire Naturelle de Marseille, France	nagoires peau de l'opercule	MO	fleuve Rhône, France	F	1883	127	Sylvie PICHARD
93	CH820 CH821	MHNGr-IC3	Muséum d'Histoire Naturelle de Grenoble, France	peau ventrale nageoire pectorale	MO	rivière Isère (affluent du Rhône) à Noyarey, France	F	1892	118	Armand FAYARD
94	CH1330	MHNNimes-49	Museum d'Histoire Naturelle de Nimes, France	peau proche de la nageoire pectorale gauche	MO	rivière Gard (affluent du Rhône), France	F	1875-1925	110	Adeline ROUILLY
95	CH1331	MHNNimes-50	Museum d'Histoire Naturelle de Nimes, France	peau latérale	MO	fleuve Rhône, France	F	1875-1925	110	Adeline ROUILLY
96	CH555 CH556 CH1327 CH1328	MHNNimes-244	Museum d'Histoire Naturelle de Nimes, France	peau de l'opercule peau ventrale peau ventrale peau et écaille dermique ventrale	MO	fleuve Rhône à Beaucaire, France	F	1928	82	Adeline ROUILLY
97	CH540 CH541 CH542	MR000-049	Muséum Requien, Avignon, France	nagoires peau proche de la nageoire pectorale peau de la bouche	MO	fleuve Rhône à Avignon, France	F	1938	72	Evelyne CREGUT
98	CH543 CH544 CH545	MNHN-1898-1257	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	nagoires peau de l'opercule peau et muscle de la bouche	MO	mer Méditerranée au large de Nice	M	1876	134	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
99	CH984	MHNNice-Ex672	Muséum d'Histoire Naturelle de Nice, France	peau	MO	mer Méditerranée au large de Nice	M	1878	132	Olivier GERRIET
100	CH985	MHNNice-Ex673	Muséum d'Histoire Naturelle de Nice, France	peau ventrale	MO	mer Méditerranée au large de Nice	M	1878	132	Olivier GERRIET
101	CH547 CH1036	MHNL-5235-42006251	Musée des Confluences, Lyon, France	nagoires et peau peau ventrale	MO	mer Méditerranée au large de Nice	M	1879	131	Joël CLARY et Jean-Louis MARTELLI
102	CH548	MHNL-5280-42006250	Musée des Confluences, Lyon, France	nagoires et peau	MO	mer Méditerranée au large de Nice	M	1879	131	Joël CLARY et Jean-Louis MARTELLI
103	CH549 CH550 CH1035	MHNL-5259-42005478	Musée des Confluences, Lyon, France	nagoires peau près de l'anus peau ventrale	MO	mer Méditerranée au large de Nice	M	1879	131	Joël CLARY et Jean-Louis MARTELLI
104	CH978 CH979	MHNNice-Tax117	Muséum d'Histoire Naturelle de Nice, France	peau ventrale peau et nagoires tombés du spécimen	MO	probablement mer Méditerranée au large de Nice	M	1850-1900	135	Olivier GERRIET
105	CH982 CH983	MHNNice-Tax118	Muséum d'Histoire Naturelle de Nice, France	peau et nagoires tombés du spécimen peau ventrale	MO	probablement mer Méditerranée au large de Nice	M	1850-1900	135	Olivier GERRIET
106	CH986 CH987	MHNNice-Boc390	Muséum d'Histoire Naturelle de Nice, France	nageoire caudale peau près de la nageoire caudale	MO	probablement mer Méditerranée au large de Nice	M	1850-1900	135	Olivier GERRIET
107	CH822	MHNGr-IC4	Muséum d'Histoire Naturelle de Grenoble, France	peau ventrale	MO	mer Méditerranée	M	1800-1880	170	Armand FAYARD
108	CH1295 CH1296	MNHN-0000-5165	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	peau ventrale arc branchial	MO	fleuve Tibre près de Rome, Italie	F	1823	187	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE
109	CH1133 CH1134	MZUF-5708	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	organes internes et peau ventrale nageoire anale	MO	fleuve Tibre près de Rome, Italie	F	1878	132	Stefano VANNI
110	CH1135 CH1136	MZUF-6499	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	organes internes et peau ventrale peau et écaille dermique ventrale	MO	fleuve Tibre près de Rome, Italie	F	1878	132	Stefano VANNI
111	CH1175 CH1176	MZUF-5704	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	os et muscle autour de la colonne vertébrale nageoire caudale	MO	mer Méditerranée à Livourne, Italie	M	1879	131	Stefano VANNI

## ANNEXE 2

112	CH1151 CH1152	MZUF-5716	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	organes internes et peau ventrale nageoire dorsale	MO	mer Méditerranée à Livourne, Italie	M	1908	102	Stefano VANNI
113	CH1153 CH1154	MZUF-6481	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	peau et muscles ventraux + intestin nageoire pectorale gauche	MO	mer Méditerranée à Livourne, Italie	M	1908	102	Stefano VANNI
114	CH1147 CH1148	MZUF-5714	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	coeur et intestin nageoire pectorale	MO	mer Méditerranée à Salerno, Italie	M	1886	124	Stefano VANNI
115	CH1149 CH1150	MZUF-6475	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	peau et muscle du ventre nageoire pectorale droite	MO	mer Méditerranée à Salerno, Italie	M	1886	124	Stefano VANNI
116	CH1155 CH1156	MZUF-5718	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	peau et muscle du ventre nageoire pectorale	A	mer Adriatique à Rimini, Italie	M	1877-1887	128	Stefano VANNI
117	CH1157 CH1158	MZUF-6500	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	peau et muscle du ventre arc branchial	A	mer Adriatique à Rimini, Italie	M	1877-1887	128	Stefano VANNI
118	CH1179 CH1180	MZUF-5720	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	os et muscle autour de la colonne vertébrale nageoire pelvienne gauche	A	mer Adriatique à Comacchio, Italie	M	1896	114	Stefano VANNI
119	CH1181 CH1182	MZUF-6474	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	os et muscle autour de la colonne vertébrale nageoire pelvienne	A	mer Adriatique à Comacchio, Italie	M	1896	114	Stefano VANNI
120	CH1167 CH1168	MZUF-5719	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	peau ventrale nageoire pelvienne	A	fleuve Pô à Cremona, Italie	F	1898-1909	106	Stefano VANNI
121	CH1169 CH1170	MZUF-6494	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	organes internes et peau ventrale nageoire pectorale	A	fleuve Pô à Cremona, Italie	F	1898-1909	106	Stefano VANNI
122	CH1171 CH1172	MZUF-6495	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	peau ventrale + intestin nageoire pelvienne	A	fleuve Pô à Cremona, Italie	F	1898-1909	106	Stefano VANNI
123	CH1183 CH1184	MZUF-5920	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	peau ventrale nageoire pelvienne	A	mer Adriatique à Chioggia, Italie	E	1881	129	Stefano VANNI
124	CH1185 CH1186	MZUF-5921	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	os et muscle autour de la colonne vertébrale nageoire pelvienne	A	mer Adriatique à Chioggia, Italie	E	1884	126	Stefano VANNI
125	CH1137 CH1138	MZUF-5717	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	organes internes et peau ventrale nageoire pelvienne gauche	A	mer Adriatique à Venise - Chioggia, Italie	E	1880-1885	127	Stefano VANNI
126	CH1139 CH1140	MZUF-6496	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	os et muscle autour de la colonne vertébrale peau ventrale	A	mer Adriatique à Venise - Chioggia, Italie	E	1880-1885	127	Stefano VANNI
127	CH1141 CH1142	MZUF-6497	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	organes internes et peau ventrale os et peau d'une écaille latérale	A	mer Adriatique à Venise - Chioggia, Italie	E	1880-1885	127	Stefano VANNI
128	CH1143 CH1144	MZUF-6498	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	organes internes et peau ventrale peau pectorale	A	mer Adriatique à Venise - Chioggia, Italie	E	1880-1885	127	Stefano VANNI
129	CH1159 CH1160	MZUF-5707	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	peau et muscle du ventre arc branchial	A	mer Adriatique à Venise, Italie	E	1872	138	Stefano VANNI
130	CH1161 CH1162	MZUF-6484	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	peau et muscle du ventre arc branchial	A	mer Adriatique à Venise, Italie	E	1872	138	Stefano VANNI
131	CH1163 CH1164	MZUF-6483	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	os et muscle autour de la colonne vertébrale nageoire pectorale gauche	A	mer Adriatique à Venise, Italie	E	1872	138	Stefano VANNI
132	CH1165 CH1166	MZUF-6485	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	peau et muscle du ventre nageoire pectorale	A	mer Adriatique à Venise, Italie	E	1872	138	Stefano VANNI
133	CH1177 CH1178	MZUF-6486	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	os et muscle autour de la colonne vertébrale arc branchial	A	mer Adriatique à Venise, Italie	E	1872-1884	132	Stefano VANNI
134	CH1173 CH1174	MZUF-5721	Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola", Florence, Italy	peau ventrale arc branchial	A	mer Adriatique à Fano, Italie	M	1907	83	Stefano VANNI
135	CH1323 CH1324	MNHN-0000-7820	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France	peau et os entre les nageoires pectorales peau ventrale	A	mer Adriatique	M	avant 1870	210	Patrice PRUVOST et Romain CAUSSE

136	CH813 CH814	MGAB7876	Muzeul National de Istorie a Romaniei, Bucarest, Romania	nageoire caudale nageoire caudale	N	fleuve Danube, Roumanie	F	1875-1925	110	Dumitru MURARIU
137	CH815 CH816	MGAB7297	Muzeul National de Istorie a Romaniei, Bucarest, Romania	os et tissu mou de la tête os et tissu mou de la tête	N	fleuve Danube, Roumanie	F	1875-1925	110	Dumitru MURARIU
138	CH1129 CH1130 CH1131	MGAB, no collection ID	Muzeul National de Istorie a Romaniei, Bucarest, Romania	os et peau près de l'opercule gauche nageoire caudale os de la dernière écaille dorsale	N	Mer Noire	M	1900-1950	85	Dumitru MURARIU
139	CH1132	MGAB 2336	Muzeul National de Istorie a Romaniei, Bucarest, Romania	os et peau d'une écaille latérale	N	delta du Danube à Sfântu Gheorghe	E	1900-1950	85	Dumitru MURARIU
140	CH1321 CH1322	MHNNantes-Z.58275	Muséum d'Histoire Naturelle de Nantes, France	nageoire caudale peau ventrale	nd	inconnu	nd	inconnue	210	Marie-Laure GUERIN et Thierry BOISGARD
141	CH976 CH977	MHNNice-Tax115	Muséum d'Histoire Naturelle de Nice, France	peau ventrale peau et nageoires tombés du spécimen	nd	inconnu	nd	1850-1900	135	Olivier GERRIET Olivier GERRIET
142	CH980 CH981	MHNNice-Tax116	Muséum d'Histoire Naturelle de Nice, France	peau et nageoires tombés du spécimen peau ventrale	nd	inconnue	nd	1850-1900	135	Olivier GERRIET
<b>ECHANTILLONS ACTUELS</b>										
143	ST133		Cemagref, Bordeaux, France	nageoire	AF	estuaire de Gironde	E	1980-95	15	Patrick WILLIOT et Eric ROCHARD
144	ST134		Cemagref, Bordeaux, France	nageoire	AF	estuaire de Gironde	E	1980-95	15	Patrick WILLIOT et Eric ROCHARD
145	ST139		Cemagref, Bordeaux, France	nageoire	AF	estuaire de Gironde	E	1980-95	15	Patrick WILLIOT et Eric ROCHARD
146	ST141		Cemagref, Bordeaux, France	nageoire	AF	estuaire de Gironde	E	1980-95	15	Patrick WILLIOT et Eric ROCHARD
147	ST143		Cemagref, Bordeaux, France	nageoire	AF	estuaire de Gironde	E	1980-95	15	Patrick WILLIOT et Eric ROCHARD
148	ST145		Cemagref, Bordeaux, France	nageoire	AF	estuaire de Gironde	E	1980-95	15	Patrick WILLIOT et Eric ROCHARD
149	ST146		Cemagref, Bordeaux, France	nageoire	AF	estuaire de Gironde	E	1980-95	15	Patrick WILLIOT et Eric ROCHARD
150	ST147		Cemagref, Bordeaux, France	nageoire	AF	estuaire de Gironde	E	1980-95	15	Patrick WILLIOT et Eric ROCHARD
151	ST148		Cemagref, Bordeaux, France	nageoire	AF	estuaire de Gironde	E	1980-95	15	Patrick WILLIOT et Eric ROCHARD
152	ST149		Cemagref, Bordeaux, France	nageoire	AF	estuaire de Gironde	E	1980-95	15	Patrick WILLIOT et Eric ROCHARD
153	ST026			ADN	AM	fleuve St-John, Canada	F	1990-2000	15	Ame LUDWIG
154	ST037			ADN	AM	fleuve St-John, Canada	F	1990-2001	15	Ame LUDWIG
155	ST039			ADN	AM	fleuve St-John, Canada	F	1990-2002	15	Ame LUDWIG
156	ST042			ADN	AM	fleuve Delaware, USA	F	1990-2003	15	Ame LUDWIG
157	ST044			ADN	AM	fleuve Delaware, USA	F	1990-2004	15	Ame LUDWIG
158	ST049			ADN	AM	fleuve Delaware, USA	F	1990-2005	15	Ame LUDWIG
159	ST050			ADN	AM	fleuve Delaware, USA	F	1990-2006	15	Ame LUDWIG
160	ST053			ADN	AM	fleuve Delaware, USA	F	1990-2007	15	Ame LUDWIG
161	ST055			ADN	AM	fleuve Delaware, USA	F	1990-2008	15	Ame LUDWIG
162	ST059			ADN	AM	fleuve Shark, USA	F	1990-2009	15	Ame LUDWIG
163	ST060			ADN	AM	fleuve Shark, USA	F	1990-2010	15	Ame LUDWIG
164	ST064			ADN	AM	fleuve Shark, USA	F	1990-2011	15	Ame LUDWIG

Code géographique : NO=Mer du Nord, AF=Atlantique français, AI=Atlantique ibérique, MO=Méditerranée Occidentale, A=Mer Adriatique, N=Mer Noire  
Code environnemental : F=fleuve, E=estuaire, M=mer ou océan

## ANNEXE 3 : JEUX DE DONNEES DES ARTICLES

N° d'échantillon	Code labo Lyon	Bilan détermination paléogénétique	Article 1	Article 2	Article 3	Article 4	Article 5	II-C-1-c Méditerranée	II-C-1-c Adriatique
<b>RESTES ARCHEOLOGIQUES</b>									
1	CH1009	<i>A. oxyrinchus</i>							
2	CH793	<i>A. oxyrinchus</i>							
3	CH1008	<i>A. sturio</i>							
4	CH1010	<i>A. sturio</i>							
5	CH1011	<i>A. oxyrinchus</i>							
6	CH1188	<i>A. sturio</i>							
7	CH1236	<i>A. sturio</i>							
8	CH1239	<i>A. sturio</i>							
9	CH1240	<i>A. sturio</i>							
10	CH1241	<i>A. sturio</i>							
11	CH1242	<i>A. sturio</i>							
12	CH1235	<i>A. sturio</i>							
13	CH480	<i>A. sturio</i>							
14	CH481	<i>A. sturio</i>							
15	CH482	<i>A. sturio</i>							
16	CH483	<i>A. sturio</i>							
17	CH824	<i>A. sturio</i>							
18	CH825	<i>A. sturio</i>							
19	CH826a	<i>A. sturio</i>							
20	CH826b	<i>A. sturio</i>							
21	CH827	<i>A. sturio</i>							
22	CH828	<i>A. sturio</i>							
23	CH829	<i>A. sturio</i>							
24	CH830	<i>A. sturio</i>							
25	CH831	<i>A. sturio</i>							
26	CH832	<i>A. sturio</i>							
27	CH833	<i>A. sturio</i>							
28	CH1018	<i>A. sturio</i>							
29	CH1019	<i>A. sturio</i>							
30	CH1020	<i>A. sturio</i>							
31	CH1021	<i>A. sturio</i>							
32	CH1022	<i>A. sturio</i>							
33	CH1023	<i>A. sturio</i>							
34	CH1024	<i>A. sturio</i>							
35	CH1025	<i>A. sturio</i>							
36	CH1026	<i>A. sturio</i>							
37	CH1027	<i>A. sturio</i>							
38	CH1028	<i>A. sturio</i>							
39	CH1029	<i>A. sturio</i>							
40	CH1030	<i>A. sturio</i>							
41	CH1031	<i>A. sturio</i>							
42	CH1032	<i>A. sturio</i>							
43	CH1033	<i>A. sturio</i>							
44	CH1116	<i>A. sturio</i>							
45	CH1196	<i>A. sturio</i>							
46	CH1197	<i>A. sturio</i>							
47	CH1198	<i>A. sturio</i>							
48	CH1199	<i>A. sturio</i>							



49	CH1200	<i>A. sturio</i>		
50	CH1201	<i>A. sturio</i>		
51	CH1202	<i>A. sturio</i>		
52	CH1203	<i>A. sturio</i>		
53	CH1204	<i>A. sturio</i>		
54	CH1205	<i>A. sturio</i>		
55	CH1012	<i>A. sturio</i>		
56	CH1189	<i>A. sturio</i>		
57	CH1190	<i>A. sturio</i>		
58	CH1191	<i>A. sturio</i>		
59	CH1192	<i>A. sturio</i>		
60	CH1193	<i>A. sturio</i>		
61	CH1194	<i>A. sturio</i>		
62	CH1195	<i>A. sturio</i>		
<b>SPECIMENS DE MUSEUM</b>				
63	CH1145	<i>A. oxyrinchus</i>		
	CH1146			
64	CH1305	Hybride <i>A. oxyrinchus</i> - <i>A. sturio</i>		
	CH1306			
65	CH1307	<i>A. oxyrinchus</i>		
	CH1308			
66	CH1289	Hybride <i>A. oxyrinchus</i> - <i>A. sturio</i>		
	CH1290			
67	CH1299	<i>A. sturio</i>		
	CH1300			
68	CH1309	<i>A. sturio</i>		
	CH1310			
69	CH1313	<i>A. oxyrinchus</i>		
	CH1314			
70	CH1317	<i>A. sturio</i>		
	CH1318			
71	CH1315	<i>A. oxyrinchus</i>		
	CH1316			
72	CH1319	<i>A. sturio</i>		
	CH1320			
73	CH1291	<i>A. sturio</i>		
	CH1292			
74	CH1293	<i>A. sturio</i>		
	CH1294			
75	CH1311	<i>A. oxyrinchus</i>		
	CH1312			
76	CH1297	<i>A. sturio</i>		
	CH1298			
77	CH1285	<i>A. sturio</i>		
	CH1286			
78	CH1287	<i>A. sturio</i>		
	CH1288			
79	CH1283	<i>A. sturio</i>		
	CH1284			
80	CH1301	<i>A. sturio</i>		
	CH1302			
81	CH1325	-		
	CH1326			
82	CH1335	<i>A. sturio</i>		
83	CH1336	<i>A. sturio</i>		
84	CH1337	<i>A. sturio</i>		

85	CH1303	<i>A. sturio</i>			
	CH1304				
86	CH1333	<i>A. sturio</i>			
	CH1334				
87	CH1038	-			
88	CH1234	<i>A. oxyrinchus</i>			
89	CH1332	-			
90	CH557	<i>A. sturio</i>			
	CH558				
	CH553				
91	CH554	Hybride <i>A. oxyrinchus</i> - <i>A. sturio</i>			
	CH1329				
	CH551				
92	CH552	<i>A. sturio</i>			
	CH820				
93	CH821	<i>A. sturio</i>			
	CH1330				
94	CH1331	<i>A. sturio</i>			
96	CH555	-			
	CH556				
	CH1327				
	CH1328				
	CH540				
97	CH541	-			
	CH542				
	CH543				
98	CH544	<i>A. naccarii</i>			
	CH545				
	CH984				
99	CH984	<i>A. sturio</i>			
100	CH985	<i>A. sturio</i>			
101	CH547	<i>A. ruthenus</i>			
	CH1036				
102	CH548	<i>A. sturio</i>			
103	CH549	<i>A. sturio</i>			
	CH550				
	CH1035				
104	CH978	<i>A. sturio</i>			
	CH979				
105	CH982	<i>A. sturio</i>			
	CH983				
106	CH986	-			
	CH987				
107	CH822	<i>A. sturio</i>			
	CH1295				
108	CH1296	<i>A. sturio</i>			
	CH1133				
109	CH1134	<i>A. sturio</i>			
	CH1135				
110	CH1136	<i>A. sturio</i>			
	CH1175				
111	CH1176	<i>A. naccarii</i>			
	CH1151				
112	CH1152	<i>A. sturio</i>			
	CH1153				
113	CH1154	<i>A. sturio</i>			
	CH1147				
114	CH1148	<i>A. sturio</i>			
	CH1149				
115	CH1150	<i>A. sturio</i>			
	CH1155				
116	CH1156	<i>A. sturio</i>			
	CH1157				
117	CH1158	<i>A. sturio</i>			
	CH1179				
118	CH1180	-			

119	CH1181 CH1182	-			
120	CH1167 CH1168	<i>A. sturio</i>			
121	CH1169 CH1170	<i>A. sturio</i>			
122	CH1171 CH1172	<i>A. sturio</i>			
123	CH1183 CH1184	-			
124	CH1185 CH1186	-			
125	CH1137 CH1138	<i>A. sturio</i>			
126	CH1139 CH1140	<i>A. sturio</i>			
127	CH1141 CH1142	<i>A. sturio</i>			
128	CH1143 CH1144	<i>A. sturio</i>			
129	CH1159 CH1160	<i>A. sturio</i>			
130	CH1161 CH1162	<i>A. sturio</i>			
131	CH1163 CH1164	<i>A. sturio</i>			
132	CH1165 CH1166	<i>A. sturio</i>			
133	CH1177 CH1178	<i>A. naccarii</i>			
134	CH1173 CH1174	<i>A. sturio</i>			
135	CH1323 CH1324	<i>A. sturio</i>			
136	CH813 CH814	<i>A. sturio</i>			
137	CH815 CH816	<i>A. sturio</i>			
138	CH1129 CH1130 CH1131	<i>A. sturio</i>			
139	CH1132 CH1321	<i>A. sturio</i>			
140	CH1322	<i>A. sturio</i>			
141	CH976 CH977	<i>A. sturio</i>			
142	CH980 CH981	<i>A. naccarii</i>			
<b>ECHANTILLONS ACTUELS</b>					
143	ST133	<i>A. sturio</i>			
144	ST134	<i>A. sturio</i>			
145	ST139	<i>A. sturio</i>			
146	ST141	<i>A. sturio</i>			
147	ST143	<i>A. sturio</i>			
148	ST145	<i>A. sturio</i>			
149	ST146	<i>A. sturio</i>			
150	ST147	<i>A. sturio</i>			
151	ST148	<i>A. sturio</i>			
152	ST149	<i>A. sturio</i>			
153	ST026	<i>A. oxyrinchus</i>			
154	ST037	<i>A. oxyrinchus</i>			
155	ST039	<i>A. oxyrinchus</i>			
156	ST042	<i>A. oxyrinchus</i>			
157	ST044	<i>A. oxyrinchus</i>			
158	ST049	<i>A. oxyrinchus</i>			
159	ST050	<i>A. oxyrinchus</i>			
160	ST053	<i>A. oxyrinchus</i>			
161	ST055	<i>A. oxyrinchus</i>			
162	ST059	<i>A. oxyrinchus</i>			
163	ST060	<i>A. oxyrinchus</i>			
164	ST064	<i>A. oxyrinchus</i>			

# ANNEXE 4 : RESULTATS ADNMT ET ADNNUC

N° d'échantillon	Code labo Lyon	Séquences ADN mitochondrial			Génotypes ADN nucléaire (cases grises avec tiret : données manquantes / cases vides : individus non testé)										Bilan détermination paléogénétique	
		Espèce mitochondriale	Haplo-type Dloop 5'	Haplo-type Dloop entière	Discrimination	Nac / Stu-Oxy		Nac / Stu-Oxy		Nac / Stu-Oxy		Nac / Stu-Oxy		Nac / Stu-Oxy		
						LS19 (norm.F-R)	LS54 (norm. Fsh-Rsh)	LS68 (norm. F-R)	Aox23 (norm. Flong-R)	AoxD161 (norm. F-R)	148 oxy	156 oxy*	127b oxy	127c oxy		129 oxy
RESTES ARCHEOLOGIQUES																
1	CH1009	<i>A. oxyrinchus</i>	A	nd	<i>A. oxyrinchus</i>	131	146	119	119	148 oxy	156 oxy*	127b oxy	127c oxy	129 oxy	129 oxy	<i>A. oxyrinchus</i>
2	CH793	<i>A. oxyrinchus</i>	partiel	nd												<i>A. oxyrinchus</i>
3	CH1008	<i>A. sturio</i>	As1	nd												<i>A. sturio</i>
4	CH1010	<i>A. sturio</i>	As1	nd	<i>A. sturio</i>	-	-	119	hh	172	hh	148b	hh	161	hh	<i>A. sturio</i>
5	CH1011	<i>A. oxyrinchus</i>	A	nd	<i>A. oxyrinchus</i>	-	-	119	119	156 oxy*	hh	127a oxy	148a oxy	129 oxy	129 oxy	<i>A. oxyrinchus</i>
6	CH1188	<i>A. sturio</i>	As6	As6	<i>A. sturio</i>	122	hh	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. sturio</i>
7	CH1236	<i>A. sturio</i>	As2	nd												<i>A. sturio</i>
8	CH1239	<i>A. sturio</i>	As2	nd												<i>A. sturio</i>
9	CH1240	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	123	123	136	144	133b	145c	169	169	<i>A. sturio</i>
10	CH1241	<i>A. sturio</i>	As2	nd												<i>A. sturio</i>
11	CH1242	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	hh	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. sturio</i>
12	CH1235	<i>A. sturio</i>	As3	As3	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	144	152	133a	142b	161	165a	<i>A. sturio</i>
13	CH480	<i>A. sturio</i>	As3	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	136	148	151a	151a	153	165b	<i>A. sturio</i>
14	CH481	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	hh	119	hh	140	152	139a	139a	169	181	<i>A. sturio</i>
15	CH482	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	hh	119	123	152	hh	130	hh	173	hh	<i>A. sturio</i>
16	CH483	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	hh	119	123	132	144	139a	139b	169	169	<i>A. sturio</i>
17	CH824	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	hh	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. sturio</i>
18	CH825	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. sturio</i>
19	CH826a	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	132	148	148b	148b	153	161	<i>A. sturio</i>
20	CH826b	<i>A. sturio</i>	As3	nd												<i>A. sturio</i>
21	CH827	<i>A. sturio</i>	As16	nd												<i>A. sturio</i>
22	CH828	<i>A. sturio</i>	As2	nd												<i>A. sturio</i>
23	CH829	<i>A. sturio</i>	As3	nd												<i>A. sturio</i>
24	CH830	<i>A. sturio</i>	As3	nd												<i>A. sturio</i>
25	CH831	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	-	-	-	-	148	hh	133a	136	-	-	<i>A. sturio</i>
26	CH832	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	hh	119	hh	132	hh	136	142b	-	-	<i>A. sturio</i>
27	CH833	<i>A. sturio</i>	As2	As2d	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	148	152	133b	148a	161	169	<i>A. sturio</i>
28	CH1018	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	144	156	145a	151b	165a	hh	<i>A. sturio</i>
29	CH1019	<i>A. sturio</i>	As3	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	140	144	145a	151a	157	165a	<i>A. sturio</i>
30	CH1020	<i>A. sturio</i>	As3	nd	<i>A. sturio</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. sturio</i>
31	CH1021	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	132	136	148b	148b	153	169	<i>A. sturio</i>
32	CH1022	<i>A. sturio</i>	As3	nd	<i>A. sturio</i>	122	hh	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. sturio</i>
33	CH1023	<i>A. sturio</i>	As3	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	152	152	133a	133a	165b	165b	<i>A. sturio</i>
34	CH1024	<i>A. sturio</i>	As17	nd												<i>A. sturio</i>
35	CH1025	<i>A. sturio</i>	As2	As2b	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	136	152	148a	148c	169	177	<i>A. sturio</i>
36	CH1026	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	hh	-	-	140	hh	-	-	-	-	<i>A. sturio</i>
37	CH1027	<i>A. sturio</i>	As18	nd												<i>A. sturio</i>
38	CH1028	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	140	148	145a	151b	157	165a	<i>A. sturio</i>
39	CH1029	<i>A. sturio</i>	As3	nd												<i>A. sturio</i>
40	CH1030	<i>A. sturio</i>	As11	nd												<i>A. sturio</i>
41	CH1031	<i>A. sturio</i>	As2	nd												<i>A. sturio</i>
42	CH1032	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	hh	123	hh	144	hh	-	-	169	hh	<i>A. sturio</i>
43	CH1033	<i>A. sturio</i>	As3	nd	<i>A. sturio</i>	122	hh	119	hh	-	-	148c	hh	157	hh	<i>A. sturio</i>
44	CH1116	<i>A. sturio</i>	As3	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	123	hh	148	hh	-	-	-	-	<i>A. sturio</i>
45	CH1196	<i>A. sturio</i>	As3	nd	<i>A. sturio</i>	-	-	-	-	160	hh	130	hh	169	185	<i>A. sturio</i>



92	CH551 CH552	<i>A. sturio</i>	As2	As2c	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	136	148	142b	148b	161	165b	<i>A. sturio</i>
93	CH820 CH821	<i>A. sturio</i>	As2	nd												<i>A. sturio</i>
94	CH1330	<i>A. sturio</i>	As2	nd												<i>A. sturio</i>
95	CH1331	<i>A. sturio</i>	As11	nd												<i>A. sturio</i>
96	CH555 CH556 CH1327 CH1328	-	-	nd												-
97	CH540 CH541 CH542	<i>A. sturio</i>	As3	nd												-
98	CH543 CH544 CH545	<i>A. naccarii</i>	Anac	nd	<i>A. naccarii</i>	126 nac	137 nac	-	-	136 nac	156 nac	-	-	129a nac 129b nac	133a nac 133b nac	<i>A. naccarii</i>
99	CH984	<i>A. sturio</i>	As2	nd												<i>A. sturio</i>
100	CH985	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	140	144	139b	148a	161	177	<i>A. sturio</i>
101	CH547 CH1036	<i>A. ruthenus</i>	Aruth	nd	<i>A. ruthenus</i>	-	-	103 ruth	hh	-	-	-	-	105 ruth	105 ruth	<i>A. ruthenus</i>
102	CH548 CH549	<i>A. sturio</i>	As14	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	144	148	142b	hh	169	hh	<i>A. sturio</i>
103	CH550 CH1035	<i>A. sturio</i>	As19	nd												<i>A. sturio</i>
104	CH978 CH979	<i>A. sturio</i>	As11	As11b	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	144	144	148b	148b	161	173	<i>A. sturio</i>
105	CH982 CH983	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	-	-	148a	hh	161	165b	<i>A. sturio</i>
106	CH986 CH987	-	-	nd												-
107	CH822	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	152	156	130	hh	165	169	<i>A. sturio</i>
108	CH1295 CH1296	<i>A. sturio</i>	As2	As2a	<i>A. sturio</i>	122	122	123	123	140	160	148b	148b	173	173	<i>A. sturio</i>
109	CH1133 CH1134	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	140	160	139a	148a	161	173	<i>A. sturio</i>
110	CH1135 CH1136	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	160	160	139a	148a	173	173	<i>A. sturio</i>
111	CH1175 CH1176	<i>A. naccarii</i>	Anac	nd	<i>A. naccarii</i>	126 nac	137 nac	139 nac	167 nac	152a nac 152b nac	160 nac	-	-	133c nac	137 nac	<i>A. naccarii</i>
112	CH1151 CH1152	<i>A. sturio</i>	As14	As14	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	136	148	130	142b	161	161	<i>A. sturio</i>
113	CH1153 CH1154	<i>A. sturio</i>	As1	As1b	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	140	140	142b	157	169	169	<i>A. sturio</i>
114	CH1147 CH1148	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	hh	119	hh	-	-	-	-	-	-	<i>A. sturio</i>
115	CH1149 CH1150	<i>A. sturio</i>	As2	nd												<i>A. sturio</i>
116	CH1155 CH1156	<i>A. sturio</i>	As11	As11a	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	148	164	142d	148b	161	169	<i>A. sturio</i>
117	CH1157 CH1158	<i>A. sturio</i>	As11	nd												<i>A. sturio</i>
118	CH1179 CH1180	-	-	nd												-
119	CH1181 CH1182	-	-	nd												-
120	CH1167 CH1168	<i>A. sturio</i>	As15	nd												<i>A. sturio</i>
121	CH1169 CH1170	<i>A. sturio</i>	As15	nd												<i>A. sturio</i>
122	CH1171 CH1172	<i>A. sturio</i>	As2	nd												<i>A. sturio</i>
123	CH1183 CH1184	-	-	nd												-
124	CH1185 CH1186	-	-	nd												-
125	CH1137 CH1138	<i>A. sturio</i>	As13	As13	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	136	148	130	130	149	173	<i>A. sturio</i>
126	CH1139 CH1140	<i>A. sturio</i>	As15	As15b	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	140	148	142b	148a	157	161	<i>A. sturio</i>
127	CH1141 CH1142	<i>A. sturio</i>	As2	As2e	<i>A. sturio</i>	122	122	123	123	148	156	130	142c	161	161	<i>A. sturio</i>
128	CH1143 CH1144	<i>A. sturio</i>	As2	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	136	152	139b	142c	149	165a	<i>A. sturio</i>
129	CH1159 CH1160	<i>A. sturio</i>	As2	nd												<i>A. sturio</i>
130	CH1161 CH1162	<i>A. sturio</i>	As20	nd												<i>A. sturio</i>
131	CH1163 CH1164	<i>A. sturio</i>	As15	As15a	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	148	148	139c	148c	161	169	<i>A. sturio</i>
132	CH1165 CH1166	<i>A. sturio</i>	As13	nd												<i>A. sturio</i>

133	CH1177 CH1178	<i>A. naccarii</i>	Anac	nd	<i>A. naccarii</i>	125 nac 126 nac	137 nac	135 nac	139 nac	136 nac 148 nac	152 nac 168 nac	-	-	121 nac	133c nac	<i>A. naccarii</i>
134	CH1173 CH1174	<i>A. sturio</i>	As15	As15b	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	140	148	142c	148c	157	169	<i>A. sturio</i>
135	CH1323 CH1324	<i>A. sturio</i>	As15	As15b	<i>A. sturio</i>	122	122	119	119	132	140	136	145a	161	169	<i>A. sturio</i>
136	CH813 CH814	<i>A. sturio</i>	As12	nd	<i>A. sturio</i>	122	hh	123	hh	144	148	-	-	-	-	<i>A. sturio</i>
137	CH815 CH816	<i>A. sturio</i>	As12	nd	<i>A. sturio</i>	122	122	123	123	144	152	139a	139a	157	161	<i>A. sturio</i>
138	CH1129 CH1130 CH1131	<i>A. sturio</i>	As12	As12	<i>A. sturio</i>	122	122	123	123	140	152	139a	139a	161	161	<i>A. sturio</i>
139	CH1132	<i>A. sturio</i>	As2	nd												<i>A. sturio</i>
140	CH1321 CH1322	<i>A. sturio</i>	As1	nd												<i>A. sturio</i>
141	CH976 CH977	<i>A. sturio</i>	As8	nd	<i>A. sturio</i>	122	hh	119	hh	144	168	148a	154	-	-	<i>A. sturio</i>
142	CH980 CH981	<i>A. naccarii</i>	Anac	nd	<i>A. naccarii</i>	125 nac	126 nac	151 nac 159 nac	167 nac	136 nac	152 nac 168 nac	-	-	125 nac	133c nac	<i>A. naccarii</i>
<b>ECHANTILLONS ACTUELS</b>																
143	ST133	<i>A. sturio</i>	As1	As1a	<i>A. sturio</i>	122	146	119	119	144	168	154	154	165a	169	<i>A. sturio</i>
144	ST134	<i>A. sturio</i>	As1	As1a	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	144	168	148a	154	165a	169	<i>A. sturio</i>
145	ST139	<i>A. sturio</i>	As1	As1a	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	144	168	154	154	161	169	<i>A. sturio</i>
146	ST141	<i>A. sturio</i>	As1	As1a	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	144	144	154	154	161	169	<i>A. sturio</i>
147	ST143	<i>A. sturio</i>	As1	As1a	<i>A. sturio</i>	122	146	119	119	144	168	148a	154	161	169	<i>A. sturio</i>
148	ST145	<i>A. sturio</i>	As1	As1a	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	144	168	154	154	161	173	<i>A. sturio</i>
149	ST146	<i>A. sturio</i>	As1	As1a	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	144	168	154	154	161	165a	<i>A. sturio</i>
150	ST147	<i>A. sturio</i>	As1	As1a	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	144	168	154	154	161	161	<i>A. sturio</i>
151	ST148	<i>A. sturio</i>	As1	As1a	<i>A. sturio</i>	122	146	119	123	144	168	154	154	161	173	<i>A. sturio</i>
152	ST149	<i>A. sturio</i>	As1	As1a	<i>A. sturio</i>	122	122	119	123	144	144	154	154	165a	173	<i>A. sturio</i>
153	ST026	<i>A. oxyrinchus</i>			<i>A. oxyrinchus</i>	131	146	119	119	148 oxy	160 oxy	127b oxy	151 oxy	149 oxy	149 oxy	<i>A. oxyrinchus</i>
154	ST037	<i>A. oxyrinchus</i>			<i>A. oxyrinchus</i>	131	146	119	119	152 oxy	160 oxy	127b oxy	127a oxy	149 oxy	149 oxy	<i>A. oxyrinchus</i>
155	ST039	<i>A. oxyrinchus</i>			<i>A. oxyrinchus</i>	131	146	119	119	148 oxy	160 oxy	127a oxy	148 oxy	149 oxy	149 oxy	<i>A. oxyrinchus</i>
156	ST042	<i>A. oxyrinchus</i>			<i>A. oxyrinchus</i>	131	146	119	119	144 oxy	156	134 oxy	164 oxy	129 oxy	137 oxy	<i>A. oxyrinchus</i>
157	ST044	<i>A. oxyrinchus</i>			<i>A. oxyrinchus</i>	125	131	119	123	152 oxy	152 oxy	127a oxy	127a oxy	129 oxy	137 oxy	<i>A. oxyrinchus</i>
158	ST049	<i>A. oxyrinchus</i>			<i>A. oxyrinchus</i>	131	131	119	119	164 oxy	164 oxy	127a oxy	127c oxy	125 oxy	125 oxy	<i>A. oxyrinchus</i>
159	ST050	<i>A. oxyrinchus</i>			<i>A. oxyrinchus</i>	131	146	119	119	136 oxy	140 oxy	127b oxy	127a oxy	141 oxy	145 oxy	<i>A. oxyrinchus</i>
160	ST053	<i>A. oxyrinchus</i>			<i>A. oxyrinchus</i>	125	164	119	123	148 oxy	152 oxy	127a oxy	148 oxy	133 oxy	133 oxy	<i>A. oxyrinchus</i>
161	ST055	<i>A. oxyrinchus</i>			<i>A. oxyrinchus</i>	131	164	119	123	148 oxy	156 oxy	127a oxy	148 oxy	133 oxy	149 oxy	<i>A. oxyrinchus</i>
162	ST059	<i>A. oxyrinchus</i>			<i>A. oxyrinchus</i>	131	164	99	119	144 oxy	152 oxy	135 oxy	156 oxy	129 oxy	133 oxy	<i>A. oxyrinchus</i>
163	ST060	<i>A. oxyrinchus</i>			<i>A. oxyrinchus</i>	131	146	119	119	152 oxy	172 oxy	131 oxy	145 oxy	133 oxy	133 oxy	<i>A. oxyrinchus</i>
164	ST064	<i>A. oxyrinchus</i>			<i>A. oxyrinchus</i>	146	146	99	119	148 oxy	156	131 oxy	133 oxy	129 oxy	133 oxy	<i>A. oxyrinchus</i>

# ANNEXE 5 : QUANTIFICATION qPCR

N° d'échantillon	Code labo Lyon	Bilan détermination paléogénétique	Quantification par qPCR																	
			ADN mitochondrial								ADN nucléaire								Comparaison ADNmt / ADNnuc	
			fragment 1 : 121 pb // fragment 2 : 86 pb								fragment 1 : 122 pb // fragment 2 : 86 pb									
			Moyenne fgt 1	Moyenne fgt 2	Moyenne 1 / Moyenne 2	Ecart-type fgt 1	Ecart-type fgt 2	Ecart-type / Moyenne fgt 1	Ecart-type / Moyenne fgt 2	Moyenne fgt 1	Moyenne fgt 2	Moyenne 1 / Moyenne 2	Ecart-type fgt 1	Ecart-type fgt 2	Ecart-type / Moyenne fgt 1	Ecart-type / Moyenne fgt 2	Moyenne ADNmt/ADNnuc fgt long	Moyenne ADNmt/ADNnuc fgt court		
en nombre de molécules par µL d'extrait			en nombre de molécules par µL d'extrait		en %	en %	en nombre de molécules par µL d'extrait			en nombre de molécules par µL d'extrait		en %	en %	rapport						
<b>RESTES ARCHEOLOGIQUES</b>																				
1	CH1009	<i>A. oxyrinchus</i>	4317	7493	1,7	291	226	7	3	10	0	-	1	-	7	-	422	-		
2	CH793	<i>A. oxyrinchus</i>																		
3	CH1008	<i>A. sturio</i>																		
4	CH1010	<i>A. sturio</i>	57	99	1,7	9	12	16	12	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
5	CH1011	<i>A. oxyrinchus</i>	126	225	1,8	17	46	13	21	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
6	CH1188	<i>A. sturio</i>	0	175	-	-	24	-	14	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
7	CH1236	<i>A. sturio</i>	6	22	3,6	2	19	28	86	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
8	CH1239	<i>A. sturio</i>	3	15	4,3	3	10	92	69	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
9	CH1240	<i>A. sturio</i>	415	940	2,3	87	147	21	16	1	1	2,0	0	1	0	50	621	710		
10	CH1241	<i>A. sturio</i>	13	19	1,5	10	13	73	65	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
11	CH1242	<i>A. sturio</i>	1356	2751	2,0	97	220	7	8	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
12	CH1235	<i>A. sturio</i>	699	2222	3,2	58	238	8	11	0	3	-	-	2	-	67	-	644		
13	CH480	<i>A. sturio</i>	200	399	2,0	49	179	24	45	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
14	CH481	<i>A. sturio</i>	1140	4068	3,6	310	440	27	11	0	5	-	-	0	-	0	-	765		
15	CH482	<i>A. sturio</i>	693	1677	2,4	72	313	10	19	0	11	-	-	0	-	0	-	150		
16	CH483	<i>A. sturio</i>	87	284	3,3	30	89	35	31	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
17	CH824	<i>A. sturio</i>	203	404	2,0	18	98	9	24	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
18	CH825	<i>A. sturio</i>																		
19	CH826a	<i>A. sturio</i>	2079	4715	2,3	98	259	5	5	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
20	CH826b	<i>A. sturio</i>	0	52	-	-	18	-	34	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
21	CH827	<i>A. sturio</i>																		
22	CH828	<i>A. sturio</i>																		
23	CH829	<i>A. sturio</i>																		
24	CH830	<i>A. sturio</i>																		
25	CH831	<i>A. sturio</i>	86	275	3,2	39	70	46	25	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
26	CH832	<i>A. sturio</i>	142	324	2,3	50	83	35	26	0	1	-	-	-	-	0	-	316		
27	CH833	<i>A. sturio</i>	9018	20385	2,3	520	1574	6	8	10	79	7,8	1	20	7	26	881	256		
28	CH1018	<i>A. sturio</i>	159	371	2,3	42	182	26	49	0	0									
29	CH1019	<i>A. sturio</i>	1034	2302	2,2	86	376	8	16	1	7	6,2	1	5	57	71	928	334		
30	CH1020	<i>A. sturio</i>																		
31	CH1021	<i>A. sturio</i>	696	1156	1,7	213	309	31	27	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
32	CH1022	<i>A. sturio</i>	185	414	2,2	94	43	51	10	0	10	-	-	0	-	0	-	40		
33	CH1023	<i>A. sturio</i>	484	1206	2,5	43	161	9	13	10	10	1,0	1	1	7	7	47	118		
34	CH1024	<i>A. sturio</i>																		
35	CH1025	<i>A. sturio</i>	1245	3026	2,4	117	247	9	8	1	5	4,6	0	4	0	83	1216	649		
36	CH1026	<i>A. sturio</i>	1098	2727	2,5	213	180	19	7	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
37	CH1027	<i>A. sturio</i>																		
38	CH1028	<i>A. sturio</i>	2005	4747	2,4	268	499	13	11	10	0	0,0	1	-	7	-	196	-		
39	CH1029	<i>A. sturio</i>																		
40	CH1030	<i>A. sturio</i>																		
41	CH1031	<i>A. sturio</i>																		
42	CH1032	<i>A. sturio</i>	503	1534	3,1	118	139	24	9	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
43	CH1033	<i>A. sturio</i>	180	395	2,2	26	142	15	36	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
44	CH1116	<i>A. sturio</i>	145	397	2,7	23	94	16	24	0	1	-	-	0	-	0	-	326		
45	CH1196	<i>A. sturio</i>	175	547	3,1	75	78	43	14	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
46	CH1197	<i>A. sturio</i>	46	116	2,5	10	49	21	42	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
47	CH1198	<i>A. sturio</i>	0	28	-	-	6	-	20	0	0	-	-	-	-	-	-	-		



48	CH1199	<i>A. sturio</i>	724	2620	3,6	69	150	10	6	1	10	10,1	0	4	0	39	708	253
49	CH1200	<i>A. sturio</i>	1215	3098	2,5	138	281	11	9	0	2	-	-	1	-	60	-	1335
50	CH1201	<i>A. sturio</i>	63	226	3,6	24	26	38	12	0	1	-	-	0	-	0	-	162
51	CH1202	<i>A. sturio</i>	842	2746	3,3	151	154	18	6	1	5	6,0	0	3	12	71	1110	608
52	CH1203	<i>A. sturio</i>	423	1809	4,3	79	239	19	13	1	4	3,5	0	2	0	64	413	499
53	CH1204	<i>A. sturio</i>	44	167	3,8	24	53	55	32	0	0	-	-	-	-	-	-	-
54	CH1205	<i>A. sturio</i>	218	607	2,8	37	91	17	15	0	3	-	-	0	-	0	-	242
55	CH1012	<i>A. sturio</i>	6301	11683	1,9	287	969	5	8	10	13	1,3	1	1	7	6	615	907
56	CH1189	<i>A. sturio</i>	722	2349	3,3	23	181	3	8	2	5	2,2	2	5	68	97	301	453
57	CH1190	<i>A. sturio</i>	6043	11201	1,9	495	1430	8	13	1	4	5,3	0	1	11	30	8316	2930
58	CH1191	<i>A. sturio</i>	6346	10578	1,7	293	743	5	7	1	11	11,1	0	7	0	63	6199	932
59	CH1192	<i>A. sturio</i>	2692	6161	2,3	151	733	6	12	0	2	-	-	0	-	17	-	2648
60	CH1193	<i>A. sturio</i>	1244	3071	2,5	86	268	7	9	1	3	2,8	0	3	0	118	1215	1065
61	CH1194	<i>A. sturio</i>	684	1744	2,5	81	253	12	14	0	3	-	-	1	-	46	-	694
62	CH1195	<i>A. sturio</i>	3433	7918	2,3	651	171	19	2	1	5	6,6	0	1	4	28	4914	1716
<b>SPECIMENS DE MUSEUM</b>																		
63	CH1145	<i>A. oxyrinchus</i>	0	1	-	-	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-
	CH1146																	
64	CH1305	Hybride <i>A. oxyrinchus - A. sturio</i>	73470	194515	2,6	5370	10299	7	5	23	210	9,1	6	23	25	11	3202	928
	CH1306																	
65	CH1307	<i>A. oxyrinchus</i>	3917	9214	2,4	656	1148	17	12	16	20	1,2	0	8	0	42	243	462
	CH1308																	
66	CH1289	Hybride <i>A. oxyrinchus - A. sturio</i>	4542	17073	3,8	448	1339	10	8	8	72	9,5	1	29	11	41	603	238
	CH1290		3776	15522	4,1	523	583	14	4	0	24	-	-	13	-	54	-	634
	CH1299																	
67	CH1300	<i>A. sturio</i>	38783	108549	2,8	4159	12115	11	11	63	720	11,4	19	147	29	20	612	151
	CH1309																	
68	CH1310	<i>A. sturio</i>	27145	125261	4,6	1874	17681	7	14	38	726	19,0	14	129	35	18	710	172
	CH1313																	
69	CH1314	<i>A. oxyrinchus</i>	2264	19512	8,6	453	709	20	4	0	0	-	-	-	-	-	-	-
	CH1317																	
70	CH1318	<i>A. sturio</i>	12797	54470	4,3	994	10790	8	20	0	22	-	-	13	-	59	-	2466
	CH1315		8582	65340	7,6	543	2841	6	4	9	213	23,3	3	45	30	21	940	307
71	CH1316	<i>A. oxyrinchus</i>	61426	249016	4,1	1535	34633	2	14	0	16	-	-	0	-	0	-	15258
	CH1319																	
72	CH1320	<i>A. sturio</i>	1530	7904	5,2	119	750	8	9	4	24	5,5	0	15	0	64	358	333
	CH1291																	
73	CH1292	<i>A. sturio</i>	4684	10975	2,3	380	1560	8	14	7	51	7,6	3	15	50	29	695	216
	CH1293																	
74	CH1294	<i>A. sturio</i>	927	2240	2,4	206	228	22	10	0	0	-	-	-	-	-	-	-
	CH1311																	
75	CH1312	<i>A. oxyrinchus</i>	318	932	2,9	20	117	6	13	0	0	-	-	-	-	-	-	-
	CH1297																	
76	CH1298	<i>A. sturio</i>																
	CH1285																	
77	CH1286	<i>A. sturio</i>	551	1814	3,3	203	189	37	10	0	23	-	-	17	-	75	-	80
	CH1287																	
78	CH1288	<i>A. sturio</i>	4888	23351	4,8	409	2059	8	9	0	6	-	-	0	-	0	-	4228
	CH1283																	
79	CH1284	<i>A. sturio</i>	1451	12887	8,9	289	1847	20	14	0	0	-	-	-	-	-	-	-
	CH1301																	
80	CH1302	<i>A. sturio</i>	42200	258651	6,1	1551	14803	4	6	0	0	-	-	-	-	-	-	-
	CH1325																	
81	CH1326	-																
82	CH1335	<i>A. sturio</i>																
83	CH1336	<i>A. sturio</i>																
84	CH1337	<i>A. sturio</i>																
	CH1303																	
85	CH1304	<i>A. sturio</i>	8416	40303	4,8	664	5391	8	13	0	38	-	-	29	-	75	-	1067
	CH1333																	
86	CH1334	<i>A. sturio</i>																
87	CH1038	-																
88	CH1234	<i>A. oxyrinchus</i>																
89	CH1332	-																
	CH557																	
90	CH558	<i>A. sturio</i>																
	CH553																	
91	CH554	Hybride <i>A. oxyrinchus - A. sturio</i>	1937	17113	8,8	261	294	13	2	0	4	-	-	2	-	57	-	4008
	CH1329																	
92	CH551	<i>A. sturio</i>	5370	24299	4,5	432	1948	8	8	10	102	10,0	1	28	7	28	525	238
	CH552																	

93	CH820	<i>A. sturio</i>																	
	CH821																		
94	CH1330	<i>A. sturio</i>																	
95	CH1331	<i>A. sturio</i>																	
96	CH555	-																	
	CH556																		
	CH1327																		
97	CH1328	-																	
	CH540																		
	CH541																		
98	CH542	<i>A. naccarii</i>																	
	CH543																		
	CH544																		
	CH545																		
99	CH984	<i>A. sturio</i>	21	120	5,6	2	54	9	45	0	0	-	-	-	-	-	-	-	
100	CH985	<i>A. sturio</i>	3243	16332	5,0	282	1341	9	8	1	30	26,4	0	2	0	8	2864	547	
101	CH547	<i>A. ruthenus</i>																	
	CH1036																		
102	CH548	<i>A. sturio</i>	2886	10040	3,5	265	560	9	6	0	34	-	-	12	-	34	-	293	
103	CH549	<i>A. sturio</i>																	
	CH550																		
	CH1035																		
104	CH978	<i>A. sturio</i>	3523	23983	6,8	295	951	8	4	10	181	17,7	1	53	7	29	344	133	
105	CH979	<i>A. sturio</i>																	
	CH982																		
	CH983	<i>A. sturio</i>	598	3419	5,7	39	253	7	7	1	3	3,0	0	2	0	64	585	1121	
106	CH986	-																	
	CH987																		
107	CH822	<i>A. sturio</i>	150	1837	12,2	29	74	19	4	10	0	-	0	-	0	-	15	-	
108	CH1295	<i>A. sturio</i>																	
	CH1296		2371218	5130865	2,2	139382	491054	6	10	2	33	17,5	1	18	69	55	1250000	154418	
109	CH1133	<i>A. sturio</i>	4366	58881	13,5	179	3452	4	6	10	265	25,9	1	40	7	15	426	222	
110	CH1134	<i>A. sturio</i>																	
	CH1135		3451	70610	20,5	366	4691	11	7	14	398	29,2	14	97	101	24	253	178	
	CH1136																		
111	CH1175	<i>A. naccarii</i>																	
	CH1176																		
112	CH1151	<i>A. sturio</i>	16501	70760	4,3	662	2743	4	4	34	1226	36,5	12	107	36	9	492	58	
	CH1152																		
113	CH1153	<i>A. sturio</i>	185633	822022	4,4	11294	48271	6	6	0	0	-	0	0	-	-	-	-	-
	CH1154		12082	61471	5,1	290	1116	2	2	3	225	79,6	1	21	43	10	4273	273	
114	CH1147	<i>A. sturio</i>	257	6965	27,1	58	764	23	11	0	7	-	-	0	3			1023	
	CH1148																		
115	CH1149	<i>A. sturio</i>	65	79	1,2	12	42	19	53	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	CH1150																		
116	CH1155	<i>A. sturio</i>	3440	16200	4,7	662	2009	19	12	10	113	11,1	1	8	7	7	336	143	
	CH1156																		
117	CH1157	<i>A. sturio</i>	0	9	-	-	6	-	64	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	CH1158																		
118	CH1179	-																	
	CH1180																		
119	CH1181	-																	
	CH1182																		
120	CH1167	<i>A. sturio</i>	0	17	-	-	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	CH1168																		
121	CH1169	<i>A. sturio</i>	0	36	-	-	22	-	63	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	CH1170																		
122	CH1171	<i>A. sturio</i>																	
	CH1172																		
123	CH1183	-																	
	CH1184																		
124	CH1185	-																	
	CH1186																		
125	CH1137	<i>A. sturio</i>	221013	1032797	4,7	7829	21077	4	2	126	6088	48,5	13	513	10	8	1760	170	
	CH1138																		
126	CH1139	<i>A. sturio</i>	76933	414173	5,4	3082	7231	4	2	30	1051	34,8	8	152	26	14	2551	394	
	CH1140		234	1367	5,8	46	135	20	10	1	20	19,5	0	6	0	29	229	69	
127	CH1141	<i>A. sturio</i>	8853	75879	8,6	349	5601	4	7	22	3080	142,6	9	184	43	6	410	25	
	CH1142																		
128	CH1143	<i>A. sturio</i>	1627	8973	5,5	344	629	21	7	0	13	-	-	3	-	23	-	691	
	CH1144																		
129	CH1159	<i>A. sturio</i>	0	51	-	-	26	-	50	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	CH1160																		
130	CH1161	<i>A. sturio</i>	44	633	14,2	9	104	20	16	0	2	-	-	1	-	53	-	259	
	CH1162																		
131	CH1163	<i>A. sturio</i>	1059	14706	13,9	119	707	11	5	1	21	15,8	1	15	50	73	792	697	
	CH1164																		
132	CH1165	<i>A. sturio</i>	2606	61742	23,7	307	4333	12	7	1	12	11,7	0	5	0	43	2546	5162	
	CH1166																		

133	CH1177 CH1178	<i>A. naccarii</i>																
134	CH1173 CH1174	<i>A. sturio</i>	2457	9119	3,7	294	702	12	8	1	37	49	0	2	17	5	3247	246
135	CH1323 CH1324	<i>A. sturio</i>	14272476	19270854	1,4	928074	1513344	7	8	7287	89880	12,3	1095	13037	15	15	1959	214
			2860517	3863204	1,4	148553	201652	5	5	4438	22929	5,2	463	6946	10	30	645	168
136	CH813 CH814	<i>A. sturio</i>																
137	CH815 CH816	<i>A. sturio</i>	702	2379	3,4	187	491	27	21	0	5	-	-	1	-	24	-	443
138	CH1129 CH1130 CH1131	<i>A. sturio</i>	4140	20701	5,0	470	1521	11	7	0	16	-	-	6	-	38	-	1283
139	CH1132	<i>A. sturio</i>																
140	CH1321 CH1322	<i>A. sturio</i>	0	94	-	-	29	-	31	0	0	-	-	-	-	-	-	-
141	CH976 CH977	<i>A. sturio</i>	55	392	7,1	23	40	42	10	0	3	-	-	2	-	71	-	142
142	CH980 CH981	<i>A. naccarii</i>	32068	0	-	2170	-	7	-	0	96	-	-	22	-	23	-	0
<b>ECHANTILLONS ACTUELS</b>																		
143	ST133	<i>A. sturio</i>	183133	197888	1,1	22353	14566	12	7	2949	3366	1,1	434	421	15	12	62	59
144	ST134	<i>A. sturio</i>	589568	554037	0,9	10956	16426	2	3	7315	7317	1,0	463	250	6	3	81	76
145	ST139	<i>A. sturio</i>	1693426	1496502	0,9	76687	34252	5	2	16982	15387	0,9	1513	596	9	4	100	97
146	ST141	<i>A. sturio</i>	523324	435401	0,8	21705	24939	4	6	4444	4121	0,9	610	223	14	5	118	106
147	ST143	<i>A. sturio</i>	846713	777459	0,9	98653	27059	12	3	8636	10057	1,2	517	534	6	5	98	77
148	ST145	<i>A. sturio</i>	1203826	1023764	0,9	28266	30942	2	3	10411	10569	1,0	732	419	7	4	116	97
149	ST146	<i>A. sturio</i>	1416408	1274887	0,9	99626	30392	7	2	11472	12496	1,1	725	43	6	0	123	102
150	ST147	<i>A. sturio</i>	834267	749154	0,9	18899	27536	2	4	5357	5676	1,1	314	639	6	11	156	132
151	ST148	<i>A. sturio</i>	2946835	2545359	0,9	197010	49497	7	2	33604	34326	1,0	1470	4979	4	15	88	74
152	ST149	<i>A. sturio</i>	929819	775652	0,8	55769	19371	6	2	10509	10840	1,0	937	726	9	7	88	72
153	ST026	<i>A. oxyrinchus</i>																
154	ST037	<i>A. oxyrinchus</i>																
155	ST039	<i>A. oxyrinchus</i>																
156	ST042	<i>A. oxyrinchus</i>																
157	ST044	<i>A. oxyrinchus</i>																
158	ST049	<i>A. oxyrinchus</i>																
159	ST050	<i>A. oxyrinchus</i>																
160	ST053	<i>A. oxyrinchus</i>																
161	ST055	<i>A. oxyrinchus</i>																
162	ST059	<i>A. oxyrinchus</i>																
163	ST060	<i>A. oxyrinchus</i>																
164	ST064	<i>A. oxyrinchus</i>																

ANNEXE 6 : CHAPITRE PALEO GEOGRAPHIE DU LIVRE  
“BIOLOGY AND CONSERVATION OF THE ATLANTIC  
EUROPEAN STURGEON *ACIPENSER STURIO* L, 1758.”

(EDITE PAR WILLIOT P., ROCHARD E., DESSE-BERSET N., KIRSCHBAUM F. AND GESSNER J.)

## 1-2-2 Palaeogeographic patterns of *A. sturio*

Olivier CHASSAING <sup>1,2</sup>, Nathalie DESSE-BERSET <sup>3</sup>, Marilyne Duffraisse <sup>1</sup>, Gaël PIQUES <sup>4</sup>,  
Catherine HANNI <sup>1</sup>, Patrick BERREBI <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Paléogénétique et Evolution Moléculaire, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon,  
Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, INRA, Ecole Normale Supérieure de Lyon,  
46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France.

<sup>2</sup> Institut des Sciences de l'Evolution, UMR 5554 CNRS/UM2/IRD, Université Montpellier  
2, cc065, place Bataillon, 34095 Montpellier cedex 05, France.

<sup>3</sup> UMR 6130, CEPAM/CNRS, université de Nice Sophia-Antipolis, 250, avenue Albert-  
Einstein, 06560 Valbonne, France.

<sup>4</sup> Archéologie des sociétés Méditerranéennes, UMR 5140 CNRS, 390 avenue de Pérols,  
34970 Lattes, France.

Corresponding author: [patrick.berrebi@univ-montp2.fr](mailto:patrick.berrebi@univ-montp2.fr)

**Abstract**

Determination of the evolutionary history of the European sturgeon is severely handicapped by its recent decline. Studying ancient biological material such as museum specimens or archaeological remains represents the only opportunity to access the past diversity of the species. Extracting and analysing DNA from ancient material provide the means to compare sturgeons from the entire former geographical range of the species genetically. Here we present a combination of paleogenetic data which give new insights on phylogeographic patterns of *A. sturio*. A high genetic diversity was present on the Iberian Atlantic coast, as well as in the Mediterranean and Adriatic seas which is concluded to represent the origin of the species range. Contrastingly, the diversity was low on the European Atlantic and the North Sea coasts as well as in the Black Sea, suggesting that these areas were colonized only recently.

**1-2-2-1 Introduction**

Biogeographic patterns of species – i.e. their spatial distribution and abundance – can be interpreted in the light of geology, geography, climatology, ecology and genetics (e.g. Taberlet et al. 1998). A time component can be introduced by using palaeontological or archaeological data, in order to infer past biogeographic patterns (e.g. Hadly *et al.* 2004). The goal of this chapter is to review palaeogeographic patterns of *A. sturio* by analysing genetic data obtained from samples covering its former range.

Biogeographic approaches have been applied at the level of the order Acipenseriformes (Bemis & Kynard 1997; Choudhury & Dick 1998), and phylogeographic studies have been carried out for some sturgeon species, particularly in North America (see for example Bowen & Avise 1990; Wirgin et al. 2000; Waldman et al. 2002 and Grunwald et al. 2007 for *A. oxyrinchus*). Concerning the European sturgeon *A. sturio*, data are limited because of the rarefaction of the species and the unavailability of fresh samples. Two centuries ago, *A. sturio* was indeed common in Europe – spawning in all major rivers from the North Sea to the Black Sea (see chapter 1-2-1 for details) – but nowadays only one population remains in the Gironde-Garonne-Dordogne basin system in France (Williot *et al.* 1997; Gonthier 2009). At the genetic level, little is known about extinct

populations because they disappeared before the extensive use of molecular markers, which began in the 1960ies. The only way to study genetic characteristics of extinct populations is thus to analyse museum specimens (naturalized or preserved in ethanol) or archaeological remains (mainly dermal bony scutes). Paleogenetic methods allow the access to genetic informations from ancient samples (Orlando et al. 2002; Calvignac et al. 2008; Pages et al. 2009), we will therefore give a central place to paleogenetic analyses in this review, which is mainly based on the phylogeography of *A. sturio* described by Chassaing (2010). By analysing the genetic structure of *A. sturio* on the main geographic regions from its former range, we expect (i) to obtain insights into its evolutionary history (geographical origin of the species, recent demographic events, relationships with sympatric species) and (ii) its life history (migration patterns), but also (iii) to quantify the loss of genetic diversity due to human activities and (iv) to make some assumptions about conservation of the remaining Gironde population.

### **1-2-2-2 Which molecular marker?**

Many molecular markers are used to study intraspecific genetic variability and identify population structure. Among them, mitochondrial DNA has been the most extensively used in animal phylogeography because (i) it is present in all animals, (ii) this haploid locus is maternally inherited without recombination and (iii) it evolves rapidly and provides character states from which phylogenetic relationships can be readily deduced (Avice et al. 1987). Furthermore, mitochondrial DNA is present in numerous copies per cell – between 1000 and 10,000 depending on the tissue and the species – therefore being easier to recover from ancient samples than nuclear DNA being present in only two copies per cell (Paabo et al. 2004).

The higher the variability of a genetic marker the more information it will provide. Many studies on animals have therefore focused on the major non-coding region of mitochondrial DNA i.e. the control region or D-Loop, because it evolves faster than the average mitochondrial sequence and offers a higher variability. This is the case in fish in general, and in sturgeons in particular (Brown et al. 1993). A ~210 base pair (bp) fragment of the D-Loop has been commonly used in *A. sturio* (see Ludwig et al. 2000 for PCR amplification details). Here we will focus on results obtained with this marker.

### 1-2-2-3 Paleogenetics studies: a necessity

*A. sturio* from the Gironde basin from wild catches or from hatchery reared individuals constitute the only source of fresh DNA samples available for the entire species, and have therefore been used as an *A. sturio* standard in genetic studies (Birstein & DeSalle 1998; Ludwig et al. 2000). To have access to the genetic variability of the species, samples from all over its former range have to be analysed. These samples exist, but consist in (i) archaeological remains, mainly excavated from human occupation sites (see chapter 1-2-4 for French examples) and (ii) naturalized or alcohol-preserved specimens, collected since the creation of museums of natural history starting from the 18<sup>th</sup> century. Until the 1980ies molecular techniques did not allow recovering DNA from ancient samples, but with the invention of the Polymerase Chain Reaction (PCR) by Saiki et al. in 1985 the dream came true.

Specific methodologies have been developed to extract and analyse ancient DNA, giving birth to paleogenetics (Paabo, 1989; Hänni et al. 1990). To avoid problems of contaminations by fresh DNA and to ensure ancient DNA sequence authentication, strict criteria have been established (Cooper & Poinar 2000). They include (i) the use of specially dedicated facilities – independent from labs where fresh DNA is handled, overpressurized, decontaminated by UV-lights and cleaned with bleach or other sterilants (ii) the monitoring of contaminations by performing several blanks in parallel to the experiments (iii) the reproduction of the results in independent experiments and (iv) the cloning and sequencing of independent PCR products to rule out artefactual substitutions, imitating mutations, linked to post-mortem DNA degradation. Following these criteria is essential to avoid errors.

### 1-2-2-4 *A. sturio* samples included

Samples used in this study are listed in Table 1 comprising 136 ancient *A. sturio* samples, spreading among seven geographical regions covering the former range of the species, and dating from 2,500 BP to present. 77 fresh samples were also considered but were not taken into account for phylogeographic reconstructions as they consist of closely related individuals from the relict Gironde population, and all analysed sturgeons shared the same mitochondrial haplotype (Ludwig et al. 2000, 2002).

The definition of geographical regions was performed based on barriers that potentially limit migrations between sturgeon populations from adjacent regions. 1- Oresund and Danish straits between Baltic and North seas, 2- Dover strait between North Sea and Atlantic Ocean, 3- Gulf of Cap Breton between French and Iberian Atlantic Ocean, 4- Gibraltar strait between Atlantic Ocean and Mediterranean Sea, 5- Sicily and Messina straits between Western and Eastern Mediterranean, 6- Otranto strait limiting the Adriatic Sea and 7- the Dardanelles-Bosphorus straits between Mediterranean and Black seas. Points 2 and 6 are quite hypothetical as migrations through these straits have been recorded (Rochard et al. 1997; Economidis et al. 2000), but were conserved as they separate major seas.

Within a geographical region, several rivers are present, each inhabited by a specific sturgeon population. We considered that populations from a same region are more closely related between them than with populations from other regions.

We also mixed samples of different historic periods to reduce sample size variations between geographical regions (see Table 1). Therefore, we will not consider change of genetic diversity over time here (see Chassaing (2010) for diachronic analysis of the genetic diversity of the Rhone River population).

#### **1-2-2-5 A. *sturio* phylogeography**

Twenty different haplotypes were identified for *A. sturio* on the 210 bp fragment of the mitochondrial D-Loop (see Table 1 for accession numbers), among which 14 were newly described in Chassaing (2010). They can be assembled in three main groups- A, B1 and B2 - when plotted on a phylogenetic network (Figure 1). Group B1 is the most diverse and includes 10 haplotypes - among which the only haplotype found in the extant Gironde population - whereas groups A and B2 both contain 5 haplotypes. *A. sturio* haplotypes from groups A and B2 are the most closely related with those from its sister species *A. oxyrinchus*.

The genetic composition of the samples of *A. sturio* in each of the seven predefined geographical areas is given in Figure 2. Haplogroup B1 was present in the samples from each region from the Baltic Sea to the Black Sea. It was dominant in all samples except in the Black Sea, and was the only group found in the samples from the North Sea and the Baltic Sea. In contrast, haplogroup A is present in both samples from the Atlantic Ocean



and the Mediterranean Sea but is absent from the samples of the two margins of the distribution, the North and Baltic seas and the Adriatic and Black seas. Haplogroup B2 was detected only in the Mediterranean, the Adriatic and the Black seas.

Only one haplotype from haplogroup B1 was found in the seven scutes from the Baltic Sea attributed to *A. sturio* (among 227, the majority of which were attributed to *A. oxyrinchus* ; Ludwig et al. (2008)) suggesting a low genetic diversity. The same situation was observed among the 12 samples from the North Sea analysed in Ludwig et al. (2002). Three haplotypes were detected on the French Atlantic coast in 15 samples, one from group A and two from group B1. The dominant haplotype was similar to the only one present in the extant Gironde population. Five haplotypes were found in the Iberian Atlantic region among only six samples, three from group B1 and two from group A. Four of these haplotypes were restricted to this area. In Western Mediterranean, 11 haplotypes were observed among 77 samples. This was the only region where all three haplogroups were represented, with five, three and three haplotypes respectively for haplogroups B1, A and B2. Nevertheless, 80% of the samples correspond to only two haplotypes – which for this reason represent the most numerous haplotypes of group A and B1 in this study (Figure 1). Seven of the 11 haplotypes were restricted to this area. Five haplotypes were detected among 15 samples from the Adriatic Sea, three from haplogroup B1 and two from haplogroup B2. Three haplotypes were restricted to the samples from the Adriatic Sea. Finally, two haplotypes were identified in the Black Sea: one from group B1 and one from group B2. The B2 haplotype found in the Black Sea samples is limited to this area and is represented in three of the four sturgeons analysed.

#### **1-2-2-6 Conclusions on the evolutionary history of *A. sturio***

Total number of haplotypes, number of private haplotypes (found only in a particular region) and haplotype diversity are high for *A. sturio* in Iberian Atlantic, Western Mediterranean and Adriatic regions, contrasting with lower values in other regions (Figure 3). Furthermore, the western Mediterranean was the only region where all three haplogroups were detected. These regions of high genetic diversity are considered as

the ancient core area of the species' distribution prior to radiation. The extant sturgeons from the Gironde could be seen as a relict of a peripheral population.

A gradient of diversity is noticeable from the Baltic Sea to the Mediterranean Sea, northern populations being genetically homogeneous and southern populations being much more diverse. This pattern is similar to the one observed for *A. oxyrinchus* on the American East coast (Wirgin et al. 2000; Grunwald et al. 2007), and could be the result of a recent colonization of northern areas after the Late Glacial Maximum (LGM, ca. 30-25 ka before present (BP) or the Younger Dryas cold interval (ca. 12 ka BP) (Chassaing 2010). Climatic conditions in Europe favoured a permafrost extension as far south as 45-50°N during the LGM, with most rivers glaciated during winter (Toucanne *et al.* 2009). It is likely that sturgeons were absent from glaciated rivers northward to 50°N and only survived in southern refugia – probably Iberian Peninsula, Mediterranean and Adriatic rivers, characterized by a high genetic diversity (Figure 2 and 3). With climate warming, sturgeons from these refugia could have colonized deglaciated rivers. Only few migrants are necessary to establish a self-sustainable population (Ludwig et al. 2008), and by founder effect, only a subset of source populations' genetic diversity was conserved in colonized areas. The most probable source for the colonization of previously glaciated rivers is the Iberian Peninsula or south-western French Atlantic Rivers like the Adour or the Gironde River. Competition with *A. oxyrinchus* for river colonization could also have played a role in shaping pattern of genetic diversity of *A. sturio* in the North of Europe (Chassaing 2010).

However, the diversity of *A. sturio* is still not known with the same precision all throughout its historic range. Additional samples from the Baltic and North seas should be analysed to confirm the genetic homogeneity of the northern range. No samples from the Eastern Mediterranean were available, and only four samples from the Black Sea were analysed, so that the eastern part of the former distribution of *A. sturio* remains poorly known.

There were probably few rivers in which sturgeons spawned on the East coast of the Adriatic Sea, in Eastern Mediterranean and in the Black Sea (cf chapter 1-2-1), and it could explain the rarity of available samples in these regions, along with poor sample preservation. Concerning the Black Sea, an aggravating factor could be that *A. sturio* was the less frequent sturgeon species among six that were present in the area (Bacalbasa-Dobrovici & Holcik 2000); *A. sturio* was present along with *A. ruthenus*, *A. stellatus*,

*A. gueldenstaedtii*, *A. nudiventris* and *Huso huso*. Three phylogeographic hypotheses can be envisaged for the Black Sea population of *A. sturio* (i) it originated from Mediterranean populations that entered the Black Sea after the connection between the two basins between 10 and 7 ka BP (Aksu et al. 2002) (ii) it was already present at the time of the connection and represent an ancient isolated population (iii) it was an ancient isolated population, but also receive migrants from Mediterranean populations after the Bosphorus-Dardanelles opening. Samples from Eastern Mediterranean and more samples from the Black Sea are needed to solve this question.

#### **1-2-2-7 Conclusions on the life history of *A. sturio***

Considering that northern European rivers were glaciated, and that Baltic and North seas were emerged during the LGM, it means that colonization of northern Europe by *A. sturio* could have occurred relatively quickly at the geological timescale (less than 20 ka). This capacity to colonize new available habitats was also observed for *A. oxyrinchus* on the American East coast (Wirgin et al. 2000), and means that mature adults can sporadically spawn in non native rivers. This capacity should be linked with the migratory behaviour of several sturgeon species and the possibility to colonize new river systems (Wirgin et al. 2007).

However, private haplotypes were identified in each geographical region – except putatively recently colonized – with a peak in Western Mediterranean (Figure 3). The presence in a region of haplotypes that are not shared with neighbouring regions is a sign of genetic differentiation, result of low gene flow between adjacent regions. Natural barriers and homing behaviour are the most plausible explanations for this observation. Migratory behaviour and homing are not exclusive. We know that any homing behaviour suffer a small proportion of exceptions and that occurrence of straying fish does not imply reproduction.

#### **1-2-2-8 Implications for conservation**

The location of the hotspot of *A. sturio* genetic diversity southward to the Gironde River and especially in Mediterranean could enhance reintroduction programs in rivers of the

Iberian Peninsula, Mediterranean Sea and Adriatic Sea, which constitute the historical core of the species (Chassaing 2010). Conditions for a reintroduction could become less favourable with global warming (Lassalle et al., 2010), but sturgeons survived in these area during warmer period than today.

Nowadays, only one haplotype is found in the remaining Gironde population, whereas at least 20 existed throughout the historic range of the species (Figure 1). At least 95% of the mitochondrial genetic diversity of *A. sturio* has been lost over the last two centuries. The loss of Iberian, Mediterranean and Adriatic genetic diversity is particularly worrying because we may think that these populations were perhaps more prone to adapt to warm climate than the population from the Gironde, which is genetically homogeneous. With respect to global warming, potential of adaptation could have been beneficial for the species (Chassaing 2010). Some rare fish are still caught by chance in Mediterranean waters (Paschos *et al.* 2008), even if no more functional population exist. It could perhaps be worthwhile to use them for artificial reproduction in order to save this potential of adaptation.

The low number of *A. sturio* samples from the Baltic Sea available in museums and archaeological sites is explained by the dominant presence of *A. oxyrinchus* until the recent sturgeon disappearance in this area (Ludwig et al. 2008). Little is known about biotic interactions between these species, but they can naturally hybridize (Ludwig et al. 2008; Chassaing 2010) and it is likely they may compete for food resources. It would therefore be important to protect the extant fragile Gironde population from contacts with *A. oxyrinchus* and to restrict *A. oxyrinchus* reintroduction to the Baltic region, despite its historical presence is attested by archaeological and molecular evidences on the French coast (Desse-Berset 2009; Desse-Berset & Williot in press; Chassaing 2010).

### **Bibliography:**

Aksu AE, Hiscott RN, Kaminski MA, Mudie PJ, Gillespie H, Abrajano T, Yasar D (2002) Last glacial-Holocene paleoceanography of the Black Sea and Marmara Sea: stable isotopic foraminiferal and coccolith evidence. *Mar Geol*, 190, 119-149.

Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific Phylogeography - the Mitochondrial-DNA Bridge between Population-Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489-522.

- Bacalbasa-Dobrovici N, Holcik J (2000) Distribution of *Acipenser sturio* L., 1758 in the Black Sea and its watershed. *Boletín Instituto Español De Oceanografía* **16**, 37-41.
- Bemis WE, Kynard B (1997) Sturgeon rivers: An introduction to Acipenseriform biogeography and life history. *Environmental Biology of Fishes*, **48**, 167-184.
- Birstein VJ, DeSalle R (1998) Molecular phylogeny of Acipenserinae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **9**, 141-155.
- Bowen BW, Avise JC (1990) Genetic-structure of Atlantic and Gulf of Mexico populations of Sea Bass, Menhaden, and Sturgeon - Influence of zoogeographic factors and life-history patterns. *Marine Biology*, **107**, 371-381.
- Brown JR, Beckenbach AT, Smith MJ (1993) Intraspecific DNA-sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Molecular Biology and Evolution*, **10**, 326-341.
- Calvignac S, Hughe S, Tougard C, Michaux J, Thevenot M, Philippe M, Hamdine W & Hanni C (2008). Ancient DNA evidence for the loss of a highly divergent brown bear clade during historical times. *Molecular Ecology* **17**, 1962-1970.
- Chassaing O (2010) Organisation génétique des populations d'esturgeon européen *Acipenser sturio* : passé, présent et futur. PhD dissertation, Université Montpellier 2.
- Choudhury A, Dick TA (1998) The historical biogeography of sturgeons (Osteichthyes : Acipenseridae): a synthesis of phylogenetics, palaeontology and palaeogeography. *Journal of Biogeography*, **25**, 623-640.
- Cooper A, Poinar HN (2000) Ancient DNA: Do it right or not at all. *Science*, **289**, 1139-1139.
- Desse-Berset N (2009) First archaeozoological identification of Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus* Mitchill 1815) in France. *Comptes Rendus Palevol*, **8**, 717-724.
- Desse-Berset N, Williot P (in press). Emerging questions from the discovery of the long term presence of *Acipenser oxyrinchus* in France. *Journal of Applied Ichthyology*.
- Economidis PS, Koutrakis ET, Bobori DC (2000) Distribution and conservation of *Acipenser sturio* L., 1758 and related species in Greek waters. *Boletín Instituto Español De Oceanografía* **16**, 81-88.
- Gonthier P (2009) European sturgeon ... A come back? *Cahiers Agricultures* **18**, 195-198.
- Grunwald C, Maceda L, Waklman J, Stabile J, Wirgin I (2007) Conservation of Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*: delineation of stock structure and distinct population segments. *Conservation Genetics*.
- Hadly EA, Ramakrishnan U, Chan YL, *et al.* (2004) Genetic response to climatic change: Insights from ancient DNA and phylochronology. *Plos Biology* **2**, 1600-1609.
- Hanni C, Laudet V, Sakka M, Begue A, Stehelin D (1990). Amplification of Mitochondrial-DNA Fragments from Ancient Human Teeth and Bones. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* **310**, 365-370.
- Lassalle G, Crouzet P, Gessner J, Rochard E (2010) Global warming impacts and conservation responses for the critically endangered European Atlantic sturgeon. *Biological Conservation*, doi:10.1016.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
- Ludwig A, Arndt U, Debus L, Rosello E, Morales A (2009) Ancient mitochondrial DNA analyses of Iberian sturgeons. *Journal Of Applied Ichthyology*, **25**, 5-9.
- Ludwig A, Arndt U, Lippold S, Benecke N, Debus L, King TL, Matsumura S (2008) Tracing the first steps of American sturgeon pioneers in Europe. *Bmc Evolutionary Biology*, **8**.

- Ludwig A, Debus L, Lieckfeldt D, Wirgin I, Benecke N, Jenneckens I, Williot P, Waldman JR, Pitra C (2002) When the American sea sturgeon swam east - A colder Baltic Sea greeted this fish from across the Atlantic Ocean in the Middle Ages. *Nature*, 419, 447-448.
- Ludwig A, May B, Debus L, Jenneckens I (2000) Heteroplasmy in the mtDNA control region of sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics*, 156, 1933-1947.
- Orlando L, Bonjean D, Bocherens H, Thenot A, Argant A, Otte M, Hanni C (2002). Ancient DNA and the population genetics of cave bears (*Ursus spelaeus*) through space and time. *Molecular Biology and Evolution* **19**, 1920-1933.
- Paabo S (1989). Ancient DNA - Extraction, Characterization, Molecular-Cloning, and Enzymatic Amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 1939-1943.
- Paabo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M (2004). Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics* **38**, 645-679.
- Pages M, Desse-Berset N, Tougard C, Brosse L, Hanni C, Berrebi P (2009). Historical presence of the sturgeon *Acipenser sturio* in the Rhone basin determined by the analysis of ancient DNA cytochrome b sequences. *Conservation Genetics* **10**, 217-224.
- Paschos I, Perdikaris C, Gouva E, Nathanailides C (2008) Sturgeons in Greece: a review. *Journal of Applied Ichthyology* **24**, 131-137.
- Rochard E, Castelnaud G, Lepage M (1990) Sturgeons (Pisces, Acipenseridae) - Threats and Prospects. *Journal of Fish Biology* **37**, 123-132.
- Rochard E, Lepage M, Meauze L (1997) Identification and characterisation of the marine distribution of the European sturgeon *Acipenser sturio*. *Aquatic Living Resources* **10**, 101-109.
- Saiki R K, Scharf S, Faloona F, Mullis K B, Horn G T, Erlich H A, Arnheim N (1985). Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle-Cell Anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**, 453-464.
- Toucanne S, Zaragosi S, Bourillet J F, Cremer M, Eynaud F, Van Vliet-Lanoe B, Penaud A, Fontanier C, Turon J L, Cortijo E, Gibbard P L (2009). Timing of massive 'Fleuve Manche' discharges over the last 350 kyr: insights into the European ice-sheet oscillations and the European drainage network from MIS 10 to 2. *Quaternary Science Reviews* **28**, 1238-1256.
- Waldman JR, Grunwald C, Stabile J, Wirgin I (2002) Impacts of life history and biogeography on the genetic stock structure of Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*, Gulf sturgeon *A-oxyrinchus desotoi*, and shortnose sturgeon *A-brevirostrum*. *Journal of Applied Ichthyology*, 18, 509-518.
- Williot P, Rochard E, Castelnaud G, *et al.* (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.
- Wirgin I, Waldman JR, Rosko J, Gross R, Collins MR, Rogers SG, Stabile J (2000) Genetic structure of Atlantic sturgeon populations based on mitochondrial DNA control region sequences. *Transactions of the American Fisheries Society*, 129, 476-486.
- Wirgin I, Grunwald C, Stabile J, Waldman J (2007) Genetic evidence for relict Atlantic sturgeon stocks along the mid-Atlantic coast of the USA. *North American Journal of Fisheries Management* **27**, 1214-1229.

**Figure captions:**

**Figure 1** Phylogenetic network of all known *A. sturio* D-Loop haplotypes, realized with Network Publisher 1.2 (Fluxus Technology Ltd). Circles represent distinct haplotypes, their width is proportional to sample number, and their color refers to haplogroups.

**Figure 2** Geographical repartition of *A. sturio* D-Loop haplogroups. Circles are proportional to sample size, colours refer to groups defined in Figure 1, and light grey lines separate distinct haplotypes. Dashed lines mark potential natural barriers delimiting geographical regions (see text).

**Figure 3** Total number of haplotype, number of restricted haplotypes and haplotypic diversity for each geographical region defined in Figure 2, computed with DnaSP (Librado & Rozas 2009).

**Acknowledgments:**

We would like to thank all museum curators (Paris, Lyon, Nice, Grenoble, Genève, Nîmes, Avignon, Marseille, Florence, Bucarest) for allowing us to sample sturgeons in their collections, Laurent Brosse and Valentin Radu for sampling some of the museum specimens, and all members of teams Paleogenetics and Molecular Evolution (IGFL, UMR5242) and Métapopulations, Coévolution et Conservation (ISEM, UMR5554) for their support.

**Table 1:** Geographical origin, date and number of *A. sturio* samples used in this review

Geographical origin	Date	Sample type	Sample number	Reference / Provider	Genbank accession nos
Gironde	extant	fresh tissue	n = 67		AJ249673
North Sea	19 <sup>th</sup> -20 <sup>th</sup> cent. AD	museum specimen	n = 12		AJ249673
Western Mediterranean	19 <sup>th</sup> cent. AD	museum specimen	n = 1	Ludwig et al., 2002	AJ428274
Adriatic Sea	19 <sup>th</sup> cent. AD	museum specimen	n = 1		AJ428274
Baltic Sea	8 <sup>th</sup> -13 <sup>th</sup> cent. AD	archaeological bone (Ralswiek, Germany)	n = 1-7	Ludwig et al., 2008	AJ428274
Iberian Atlantic	4 <sup>th</sup> cent. BC - 15 <sup>th</sup> cent. AD	archaeological bone (Castro Marim, Portugal ; La Cartuja, Spain)	n = 5	Ludwig et al., 2009	EU420003-7
Gironde	extant	fresh tissue	n = 10	Williot P. (Cemagref, Bordeaux, France)	HQ239243- HQ239358
French Atlantic	19 <sup>th</sup> -20 <sup>th</sup> cent. AD	museum specimen	n = 13	Museum National d'Histoire Naturelle (MNHN, Paris) and Museum d'Histoire Naturelle de Nantes (MHNNantes)	
Iberian Atlantic	5 <sup>th</sup> cent. AD	archaeological bone (Troia, Portugal)	n = 1	Desse-Berset N. (Cepam, Nice, France)	
Western Mediterranean	19 <sup>th</sup> -20 <sup>th</sup> cent. AD	museum specimen	n = 20	Musée Requien (MR, Avignon, France), Museum National d'Histoire Naturelle (MNHN, Paris, France), Museum d'Histoire Naturelle de la ville de Genève (MNHG, Genève, Switzerland), Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola" (MZUF, Florence, Italy) and Museum d'Histoire Naturelle de Nîmes (MHNNîmes, Nîmes, France), de Lyon (MHNL, Lyon, France), de Grenoble (MHNG, Grenoble, France), de Nice (MHNNice, Nice, France), de Marseille (MHNM, Marseille, France).	
Western Mediterranean	6 <sup>th</sup> cent. BC - 18 <sup>th</sup> cent. AD	archaeological bone (Jardin d'Hiver and Montmajour, France)	n = 50	Desse-Berset N. (Cepam, Nice, France)	
Western Mediterranean	5 <sup>th</sup> cent. BC - 3 <sup>rd</sup> cent.	archaeological bone (Lattes and Parc St-Georges of Lyon, France)	n = 6	Piquès G. (Archéo-Lattes, Lattes, France)	



		AD		
Adriatic Sea	19 <sup>th</sup> - 20 <sup>th</sup> cent. AD	museum specimen	n = 14	Museum National d'Histoire Naturelle (MNHN, Paris, France) and Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze, Zoological Section "La Specola" (MZUF, Florence, Italy)
Black Sea	19 <sup>th</sup> - 20 <sup>th</sup> cent. AD	museum specimen	n = 4	Muzeul National de Istorie Naturale Grigore Antipa (MGAB, Bucarest, Romania)

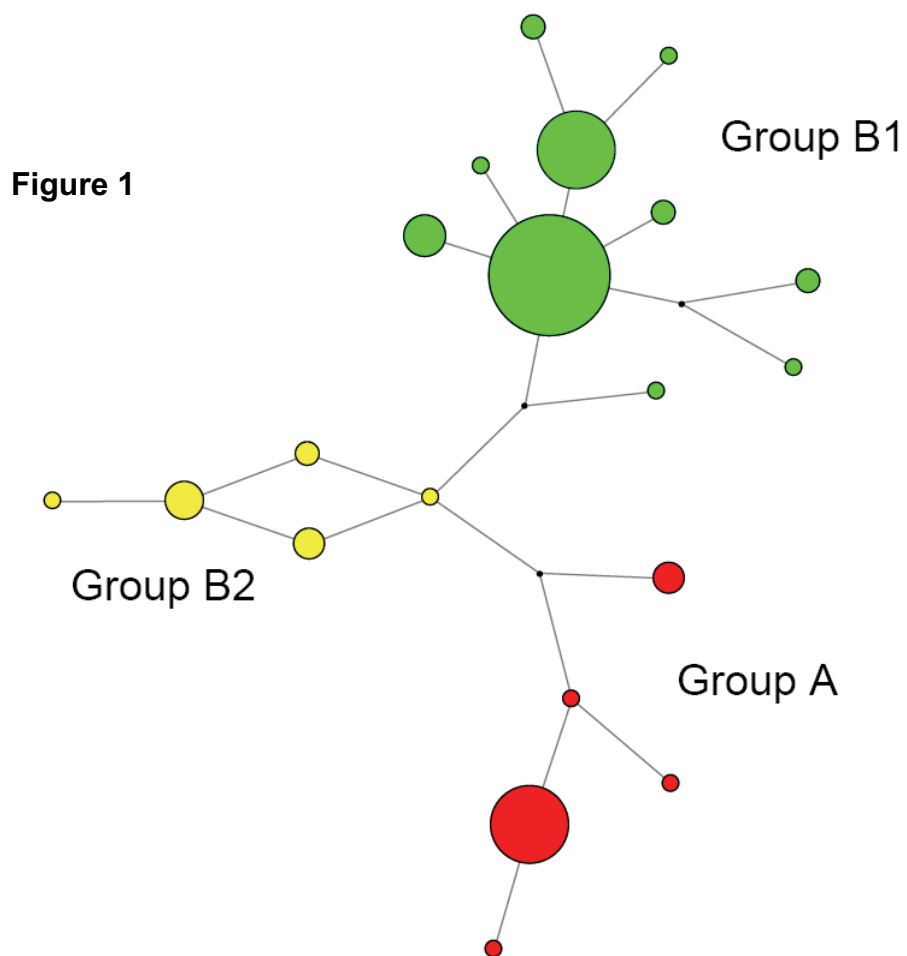


Figure 2

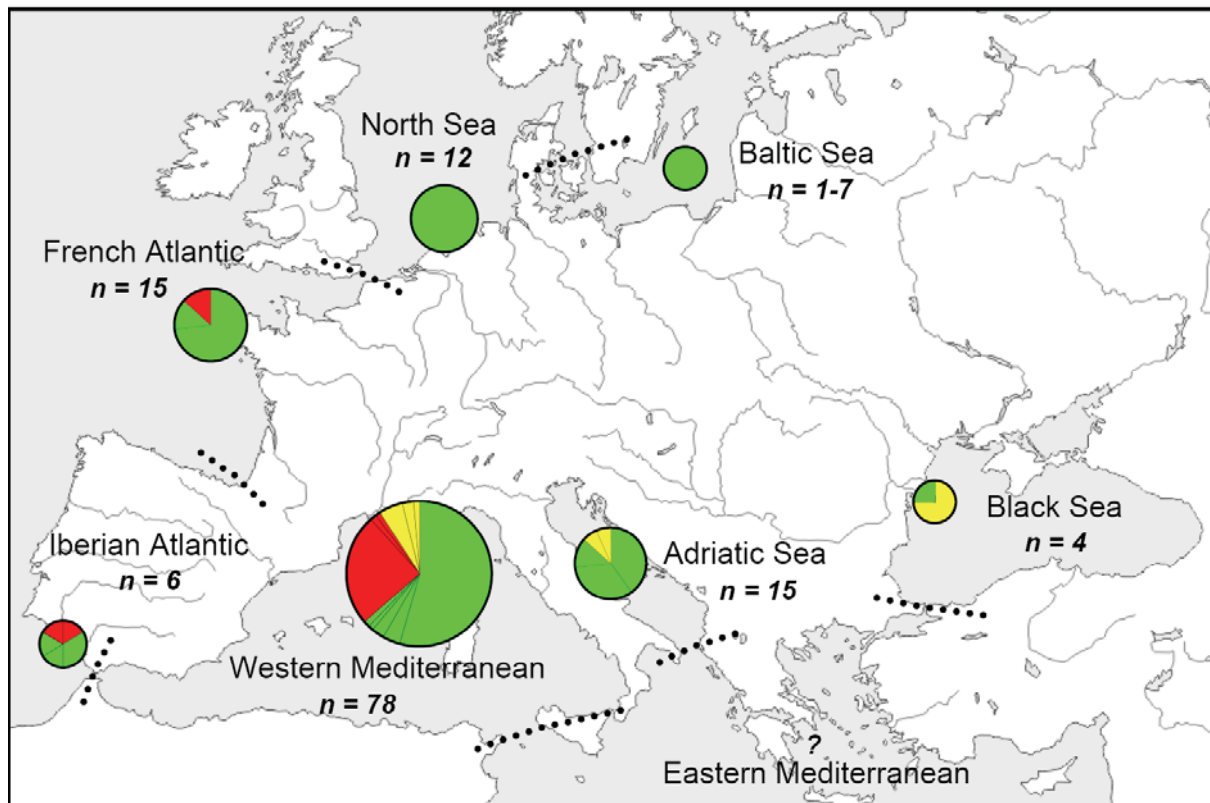


Figure 3

