



Approches moléculaires pour l'étude de la biodiversité des mammifères marins

Jean-Luc Jung

► To cite this version:

Jean-Luc Jung. Approches moléculaires pour l'étude de la biodiversité des mammifères marins. Systématique, phylogénie et taxonomie. Université de Bretagne Occidentale, 2017. tel-04037362

HAL Id: tel-04037362

<https://hal.science/tel-04037362>

Submitted on 20 Mar 2023

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

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



**UNIVERSITE
BRETAGNE
LOIRE**



Habilitation à Diriger les Recherches
UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
sous le sceau de la COMUE Université Bretagne Loire

présentée par

Jean-Luc JUNG

Préparée au Laboratoire **BioGeMME**
(Biologie et Génétique des Mammifères Marins dans
leur Environnement, ERCR 4 de l'UBO)

Approches moléculaires pour l'étude de la biodiversité des mammifères marins

Habilitation à Diriger les Recherches
Soutenue le 8 novembre 2017

devant le jury composé de :

Olivier Adam

Professeur, Université Paris Sud, Rapporteur

Nadia Améziane

Professeure, Muséum National d'Histoire Naturelle, Rapporteuse

Cédric le Maréchal

Professeur - Praticien Hospitalier, Université de Brest, Examinateur

Jacky de Montigny

Professeur, Université de Strasbourg, Rapporteur

Valérie Stiger

Maitre de Conférences, Université de Brest, Examinatrice

Invités :

Susan Gallon

Agence Française pour la Biodiversité

Benjamin Guichard

Agence Française pour la Biodiversité

Chercher, c'est aller où on ne sait pas ...

Virginie Van Wassenhove



Quelques mammifères marins, tels que l'on se les représentait dans le milieu scolaire dans les années 1800 en France.
©Musée Jean Frédéric Oberlin, Waldersbach

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord aux membres de ce jury : à Nadia Améziane, pour avoir accepté d'être rapporteure de ce mémoire ainsi que pour les discussions si constructives que nous avons eues ces derniers mois ; à Jacky De Montigny, pour l'apport de son regard de généticien sur ce travail ; à Valérie Stiger et à Cédric Le Maréchal pour avoir accepté de faire partie de ce jury ; et enfin à Olivier Adam, pour m'avoir emmené dans l'univers des baleines à bosse, pour l'analyse qu'il fera de ce travail, et pour cette nouvelle étape de franchie dans notre réflexion commune. Je remercie aussi Susan Gallon et Benjamin Guichard, de l'Agence Française pour la Biodiversité et spécialistes des mammifères marins, d'avoir accepté de participer au jury en tant qu'invités.

Les travaux présentés dans ce mémoire sont indissociables de l'existence du Laboratoire BioGeMME, reconnu en 2012 par le Conseil Scientifique de l'Université de Brest, évalué en 2013 par un comité scientifique interne, puis renouvelé successivement en 2014 et 2017. Mes remerciements vont à tous les acteurs qui ont porté et concrétisé avec moi ce projet, et en particulier François-Gilles Carpentier, Carole Decker, et Eric Alfonsi qui pendant sa thèse s'est largement investi dans cette aventure ; ainsi qu'à tous les étudiant-e-s, qui pendant leurs stages de Masters 1 et 2, de Licence, de Lycée et Collège pour quelques-uns, sont venus depuis la France (des universités de Marseille, de Paris VI, de Strasbourg, de la Côte d'Opale, et même de Brest), depuis l'Italie et depuis la Mauritanie, pour apporter leur contribution et leur bonne humeur aux travaux du Laboratoire.

Plusieurs structures et personnes ont cru au projet et ont rendu possible la création à Brest d'un Laboratoire utilisant des approches d'Ecologie Moléculaire pour étudier la biodiversité des mammifères marins. Sami Hassani, d'Océanopolis, a été le premier à construire des projets d'étude des mammifères marins avec moi. Yves-Marie Paulet de l'IUEM-UBO, Claude Férec et Cédric Le Maréchal de l'UMR 1078 INSERM-UBO, Douraied Ben Salem et Luc Bressollette du CHRU de Brest, Anne-Louise Nédelec de la DRI de l'UBO, m'ont toutes et tous particulièrement aidé, je les en remercie très chaleureusement. Le Parc Naturel Marin d'Iroise aussi a été un des premiers soutiens de BioGeMME pendant la Thèse d'Eric Alfonsi. Chantal Hily-Mazé a décrypté pour nous le dédale que représentait la construction administrative d'un nouveau Laboratoire Universitaire, avec une compétence et une bonne humeur constantes. Je lui exprime toute ma reconnaissance, je ne suis pas sûr que BioGeMME aurait réussi à fonctionner sans elle. Les travaux décrits dans ce mémoire reposent sur des connaissances acquises sur le terrain depuis des années (voire des décennies) et des collections d'échantillons réalisées par des structures et correspondants locaux. Je

leur en suis particulièrement reconnaissant à tous. A Madagascar, j'ai notamment eu la chance de rencontrer Dina Andrianaiavoravelona, Isabelle Charrier, Sophia Rakotoharimalala, Anjara Saloma, Laurène Trudelle, Henri Bellon, Francois-Xavier Mayer et de travailler grâce à tous les membres et écovolontaires de la remarquable association Cétamada. A Saint-Pierre-et-Miquelon, ce sont Catherine, Morgane et Joël Detchevery, Aurélie Martin, Frank Urtizberea, Roger Etcheberry et Jérôme Anger qui ont rendu possible une étude génétique des baleines à bosse. J'ai eu la chance de collaborer avec Oumar Ba, Fred Marret, Wim Mullié et Koen Van Waerebeek en Mauritanie, et avec Olga Filatova en Russie. Je dois des remerciements particuliers à Vincent Ridoux de l'Université de La Rochelle, ainsi qu'à tous les membres, organisateurs comme correspondants, du Réseau National Echouage Français. Le fonctionnement de ce réseau nous a permis de réaliser plusieurs des études présentées dans ce mémoire. Vincent Ridoux a aussi aidé directement à la création du Laboratoire BioGeMME, par exemple en participant, avec Yves-Marie Paulet, Cédric Le Maréchal, Sami Hassani et Philippe Le Niliot à son comité scientifique interne en 2013.

L'enseignement universitaire, tout comme la recherche, sont des sports d'équipes. Cela fait des années que j'enseigne la Biologie Moléculaire en Licence et en Master à l'Université de Brest, en partageant organisation, cours, créneaux, constructions récurrentes de nouveaux programmes, et toutes les autres réjouissances, avec mes collègues du département de Biologie de l'UFR Sciences et Techniques. Un grand merci tout particulièrement à ceux du groupe pédagogique « Biologie Moléculaire », et à Aline Amérand qui a plusieurs fois pris en charge la gestion de la L3BCMP pour m'aider.

Je fais aussi un clin d'œil à mes premiers formateurs en Laboratoire de recherche, Pierre Pfeiffer, Vassilis Sarantoglou, et particulièrement à Günther Hahne avec qui j'ai partagé 4 années de travail et de réflexion durant ma thèse.

J'ai une pensée particulière pour Nolwenn Hymery, camarade de paillasse de Laboratoire à une période où notre écosystème professionnel était différent.

Enfin, la famille : Une partie importante de ce que je connais et comprends du milieu marin vient de l'apprentissage transgénérationnel que j'ai reçu de Joseph Tual, entre Keller et Galgrac'h. Je lui en suis plus que reconnaissant.

Et mes remerciements vont à Jeannette, Anne-Françoise, Gabriel et Jules pour leur aide, soutien, idées, et surtout pour leur présence !

* *

*

Avant propos	6
Partie 1 : Synthèse des activités de recherche	8
Préambule	9
Chapitre I. Contexte Scientifique. L'Ecologie Moléculaire et les mammifères marins : complexité de mise en œuvre mais résultats considérables	13
Obtenir des échantillons est la première difficulté à résoudre pour toute étude d'Ecologie Moléculaire portant sur des mammifères marins	15
Décryptage de la biodiversité des mammifères marins par des approches d'Ecologie Moléculaire : identification d'espèces et variations intraspécifiques	18
Chapitre II. Ecologie Moléculaire et conservation de la biodiversité : les liens sont-ils suffisants ?	28
Les apports de l'Ecologie Moléculaire à la conservation du milieu marin et le « gap » de la génétique appliquée à la conservation	29
Les mammifères marins, des espèces en danger ?	32
Apports de mon travail à la conservation du milieu marin	36
Chapitre III. La baleine à bosse (<i>Megaptera novaeangliae</i>). Isolation par la distance et apprentissage transgénérationnel influent la structuration génétique de l'espèce	38
<i>Megaptera novaeangliae</i> , seule espèce actuelle du genre, comporte trois sous-espèces	39
L'apprentissage transgénérationnel influe sur la structuration génétique de l'espèce	41
Madagascar, une zone de reproduction des baleines à bosse ouverte sur tout l'hémisphère sud	46
Dans les eaux Russes du Pacifique Nord, la fidélité des baleines à bosse pour leur site d'alimentation est d'une précision géographique très inattendue	68
Saint-Pierre-et-Miquelon, un site de nourrissage des baleines à bosse de l'Atlantique Nord à préserver	99
Les études menées en parallèle sur les trois sous-espèces de baleines à bosse mettent en évidence des différences de structuration génétique	110
Compréhensions nouvelles et réflexions en termes de conservation des baleines à bosse	113
Chapitre IV. Mouvements et populations chez le marsouin commun (<i>Phocoena phocoena</i>) le long des côtes atlantiques françaises	116
Chapitre V. Le phoque gris en limite sud de sa répartition, diversité génétique, histoire ancestrale et régime alimentaire	140
Chapitre VI. Outils moléculaires et étude de la biodiversité spécifique des mammifères marins	167
Perspectives de mon travail de recherche	202
Diversité intraspécifique des baleines à bosse.	203
Etude de la diversité spécifique : listes de mammifères marins en Mauritanie, participation à la mise au point des approches d'ADNe pour les mammifères marins, et étude de problématiques taxonomiques particulières	206
Références Bibliographiques	209
Partie 2 : Curriculum vitae et déroulement de carrière	221
Titres universitaires	222
Productions scientifiques	223
Liste des publications dans des revues avec comités de lecture.	223
Autres publications, dans des ouvrages et dans des revues sans comité de lecture	224
Présentations orales, scientifiques et de communication scientifique	226
Communications lors de conférences internationales et nationales depuis 2009 sous forme de posters et de présentations orales	228
Participation à l'organisation de conférences nationales et internationales	229
Encadrement de recherche	230
Supervision de post-doctorants	230
Co-encadrements de doctorants	230
Encadrements de stages de Master 2 et de longue durée	231
Encadrements de stages de Master 1	232
Autres activités de recherche	233
Direction, animation de laboratoires et équipes de recherche	233
"Reviewer" pour les revues	233
Participation à des Jurys de Thèse	233
Expertise	233
Communication scientifique	234
Responsabilités pédagogiques	235
Responsabilités administratives et fonctions d'intérêt collectif	235
Distinctions	235

Avant propos

La rédaction d'une HDR est certainement un moment très à part dans la carrière d'un enseignant-chercheur, pendant lequel des idées, réflexions, compréhensions, hypothèses, souvent en maturation depuis longtemps, doivent trouver à s'organiser, s'exprimer, se confronter à la nécessité d'une formulation la plus claire possible, et répondre à une organisation logique et convaincante. Ce moment se doit d'être un peu « hors du temps », quelque peu détaché de l'immédiateté à laquelle nous conduisent souvent les autres facettes de notre métier.

Pourtant, et logiquement je l'imagine, notre attention se porte sur les réflexions les plus actuelles de notre travail de recherche ; les plus anciennes ayant servi à les construire graduellement y sont incluses *de facto*. Pour ma part, les modèles biologiques que j'étudie sont devenus progressivement de moins en moins aisés à expérimenter. Si lors de ma thèse et des premières années de ma carrière de Maître de Conférences à Brest j'ai pu mettre au point des expérimentations de laboratoire mimant l'effet de différentes conditions naturelles sur des végétaux, il m'est difficile, depuis que les mammifères marins représentent mon modèle d'étude, d'imaginer faire de même à part dans quelques cas très particuliers (Hymery et al. 2013). Par contre, les approches de la Biologie Moléculaire, que j'ai commencé à utiliser dès mes premières journées en laboratoire et que je continue à apprendre actuellement, ont pris une importance de plus en plus grande dans la résolution des problématiques écologiques. L'Ecologie Moléculaire a maintenant une place majeure dans le décryptage de la biodiversité. Même appliquées à des organismes aussi difficiles à étudier et à comprendre que les mammifères marins, les approches d'Ecologie Moléculaire livrent des informations inaccessibles autrement sur la richesse des variations intraspécifiques et les diversités rencontrées au sein des espèces. Comprendre et expliquer les origines de ces variations représente le défi suivant.

Etudier la biodiversité des mammifères marins par des approches d'Ecologie Moléculaire relève donc d'une dimension première de compréhension fondamentale de la structuration des

populations naturelles, notamment en regard des conditions environnementales et des changements du milieu marin, d'origine anthropique ou non. Mais les mammifères marins sont aussi des espèces souvent mobiles, à longue durée de vie, qui peuvent être situées au sommet de la chaîne alimentaire. Ils sont donc considérés comme des espèces indicatrices pertinentes de la qualité du milieu marin et de ses variations. Ces sont aussi des espèces « parapluies », dont la protection est réputée entraîner, par un effet parapluie, celle d'autres compartiments de l'écosystème, moins facilement pris en compte.

A la dimension de compréhension fondamentale s'ajoute donc un aspect majeur d'application à la conservation du milieu marin.

La première partie de ce mémoire, *synthèse des activités de recherche*, décrit les travaux que j'ai menés dans les douze dernières années et portant sur l'étude de la biodiversité des cétacés et pinnipèdes. La partie la plus actuelle de mon travail y a pris, par un choix réfléchi, une part majeure. L'application des compréhensions fondamentales aux démarches de conservation du milieu naturel est aussi largement abordée. Cette partie se termine par les perspectives de mon travail, dans lesquelles les mots-clés « biodiversité des baleines à bosse », « identification d'espèces » et « ADNe » ont une importance majeure.

La description de mon parcours professionnel et mon curriculum vitae représentent la deuxième partie de ce mémoire.

Partie 1 :

Synthèse des activités de recherche

Préambule

Mon travail de recherche se situe dans les grands domaines de l'Ecologie Moléculaire et de l'analyse de la biodiversité par des approches moléculaires.

Pendant ma thèse, puis lors des premières années de ma carrière de Maître de Conférences, j'ai caractérisé des variations de réactions des végétaux supérieurs face à des conditions environnementales diverses, notamment de stress. Ces variations peuvent avoir des origines physiologiques et/ou génétiques (voir par exemple Jung et al. 1993 ; 1995a ; 1995b ; Jung 1998). Depuis 2005, j'ai orienté mon travail de recherche vers d'autres modèles biologiques : à l'aide d'outils moléculaires, j'étudie la biodiversité des mammifères marins, ceci à deux niveaux. Tout d'abord, j'ai contribué à la mise au point d'outils d'identification et de reconnaissance d'espèces. Ensuite, j'ai utilisé des approches de génétique des populations pour détecter des groupes génétiques intraspécifiques, essayer d'expliquer leur(s) origine(s), et identifier leurs variations éventuelles, particulièrement celles induites par des changements environnementaux.

Dans le premier Chapitre de ce mémoire, j'ai décrit les compréhensions nouvelles amenées par les démarches d'Ecologie Moléculaire concernant la structure des populations des mammifères marins. Alors que les mammifères marins, en général très mobiles, auraient pu présenter des différences génétiques intraspécifiques très réduites, les vingt-cinq dernières années de recherche ont permis de montrer qu'il n'en était rien. Plusieurs causes, historiques, environnementales, liées aux activités humaines ou pas, peuvent être à l'origine de populations différentes. Le comportement lui-même joue un grand rôle, et depuis très récemment, l'hypothèse a été émise que des cultures partagées, transmises entre individus d'un même groupe, pourraient entraîner des différenciations génétiques.

Mes travaux ont un but premier de compréhension fondamentale. En addition, appliqués à la conservation du milieu marin, ils ont aussi des intérêts forts en termes de connaissance et de suivi de la biodiversité, notamment face aux changements environnementaux. Dans le Chapitre II de ce mémoire, je décris des apports potentiels, peut-être parfois sous-utilisés, des travaux d'Ecologie Moléculaire à la conservation du milieu marin, de manière générale tout d'abord, puis appliqués aux travaux que je mène.

Dans les dernières années, mon travail a porté essentiellement sur l'étude des baleines à bosse (*Megaptera novaeangliae*), une espèce de cétacés cosmopolite, au comportement très complexe

et à la structuration génétique intraspécifique particulièrement ardue - et intéressante - à décrypter. Le Chapitre III de ce mémoire porte donc sur cette espèce. J'y décris l'existence et l'origine des trois sous-espèces de baleines à bosse, ainsi que leurs caractéristiques migratoires particulières, entre zones d'alimentation et zones de reproduction. J'étudie les baleines à bosse dans trois zones géographiques distinctes, chacune correspondant à l'une des trois sous-espèces. Tout d'abord à Madagascar, dans le cadre des projets pluridisciplinaires *Baobab* et *Generation* portés par l'Institut des Neurosciences Paris-Saclay (UMR 9197, CNRS Université Paris Sud) avec l'association de science participative Malgache *Cétamada*. Dans le Pacifique Nord ensuite, j'analyse la diversité génétique des baleines à bosse des eaux russes en collaboration avec des collègues de l'Université de Moscou. Enfin, je caractérise génétiquement les baleines à bosse de Saint-Pierre-et-Miquelon, en collaboration avec l'Institut des Neurosciences Paris-Saclay et des structures locales. Ces trois projets, et les résultats qu'ils ont déjà apportés, sont décrits successivement dans le Chapitre III de ce mémoire, après, pour chacun d'eux, un point bibliographique de la compréhension actuelle de la diversité génétique des baleines à bosse dans chacun des trois sites étudiés.

Les deux dernières parties de ce Chapitre III ont pour but d'analyser comparativement les résultats obtenus sur chacune des trois sous-espèces. Des différences claires de structuration génétique, indiquant peut-être des comportements migratoires différents et des fidélités plus ou moins marquées semblent apparaître à cette analyse globale. En termes de conservation aussi, les résultats obtenus amènent des réflexions très différentes, notamment pour le Pacifique Nord où nous avons mis en évidence une fidélité géographique très localisée, reflétant probablement une culture transmise de manière transgénérationnelle et qui a façonné des structures de populations très marquées.

Les Chapitres IV et V décrivent successivement les études que j'ai pu mener sur deux espèces de mammifères marins très abondantes en Atlantique Nord, et notamment en Bretagne. Le marsouin commun (*Phocoena phocoena*) est actuellement très fréquent le long de la côte atlantique française, après en avoir tout d'abord disparu depuis les années 1950 puis fait une réapparition spectaculaire dans les années 2000. Nous avons mis en évidence un double flux de déplacement du marsouin commun particulièrement inattendu le long de la façade atlantique française (Chapitre IV). Le phoque gris (*Halichoerus grypus*) ensuite, seul pinnipède de ce mémoire, est en limite sud de sa répartition en Bretagne. La diversité génétique actuelle de l'espèce reflète son histoire ancestrale en Atlantique Nord (Chapitre V).

La taxonomie des mammifères marins est très complexe, sujette à modifications, et certaines espèces sont très peu connues. Un objectif de mon travail, décrit dans le Chapitre VI de ce mémoire, a consisté à adapter les approches de type code-barre de l'ADN (*DNA barcoding*, Hebert et al. 2003) aux mammifères marins. J'ai ainsi pu participer à définir un outil de routine permettant d'identifier l'espèce à laquelle appartient un échantillon. Cette mise au point m'a permis d'étudier la biodiversité des mammifères marins le long des côtes atlantiques françaises et mauritaniennes. C'est lors de cette étude que *Balaenoptera omurai*, la plus récente des espèces de rorqual identifiée, a pu être détectée pour la première fois en Atlantique. Elle m'a aussi permis de participer, dans le cadre d'une collaboration internationale, à la découverte d'une très probable nouvelle espèce de baleine à bec (Morin et al. 2017).

A la fin de chacun des Chapitres décrivant mes travaux (de III à VI), un Tableau regroupe les collaborations ayant permis chacune de ces études, et listant les étudiants y ayant participé. Des publications sont insérées dans certains Chapitres. Il s'agit de publications dont je suis soit premier auteur soit dernier auteur et auteur correspondant.

*

* *

Etudier les mammifères marins en utilisant des approches d'Ecologie Moléculaire était une thématique très novatrice lorsque je l'ai initiée en 2005 à l'UBO, université dans laquelle aucun laboratoire n'étudiait ni les prédateurs supérieurs du milieu marin ni l'impact des changements du milieu sur leur biodiversité. J'ai initié mes travaux notamment grâce à des collaborations avec deux structures impliquées dans le suivi et la conservation de la biodiversité du milieu marin en Bretagne, Océanopolis, CCSTI (Centre de Culture Scientifique, Technique et Industrielle) de la mer de Brest, et le Parc Naturel Marin d'Iroise. Le Réseau National Echouage, coordonné par Pélagis (UMS 3462, CNRS - Université de la Rochelle) a permis mes premiers travaux grâce à ses collections d'échantillons. Depuis, je travaille dans le cadre de plusieurs collaborations nationales et internationales décrites dans ce mémoire.

Afin de pouvoir développer ces projets novateurs pour l'Université de Brest dans un cadre administratif et scientifique satisfaisant, j'ai été le porteur du dossier de demande de création d'un nouveau laboratoire de recherche, en réponse à l'appel à projets "Création d'Equipes Reconnues par le Conseil Scientifique (ERCS) de l'Université". Ce projet a été présenté en

janvier 2012 au Conseil Scientifique de l'UBO, qui a émis un avis favorable à la création de l'ERCS à l'unanimité de ses membres.

Le Laboratoire BioGeMME (Biologie et Génétique des Mammifères Marins dans leur Environnement) existe donc depuis janvier 2012. Il a été évalué et renouvelé en janvier 2014 et en janvier 2016. J'en suis le responsable depuis sa création.

Tous les résultats décrits dans ce mémoire correspondent aux projets de recherche menés dans le cadre des activités du Laboratoire BioGeMME.

Chapitre I. Contexte Scientifique

**L'Ecologie Moléculaire et les mammifères marins :
complexité de mise en œuvre mais résultats considérables**

L'Ecologie Moléculaire est appliquée à l'étude des mammifères marins depuis le début des années 1990 (Hoelzel & Dover 1989 ; Baker et al. 1990 ; Brown et al. 1991 ; Weinrich et al. 1991). Le volume 1 de *Molecular Ecology*, paru en 1992, contient la première revue bibliographique résumant les résultats obtenus grâce à l'étude des polymorphismes de l'ADN chez les mammifères marins (Hoelzel 1992).

Cette revue mettait en avant les problématiques d'échantillonnage, résolues en partie par la mise au point, - récente à ce moment là -, d'arbalètes et de fléchettes spécialisées. Celles-ci permettaient de prélever des biopsies de petite taille, moins traumatisantes que celles réalisées à l'aide de systèmes dérivés de harpons employés jusque-là (Lambertsen 1987 ; Hoelzel et al. 1992). Les premiers résultats obtenus avaient immédiatement montré la puissance de ces nouvelles approches : suspicion d'une nouvelle espèce de rorqual de Bryde (reconnue maintenant comme rorqual d'Omura, Wada et al. 2003 ; Jung 2016 ; voir aussi Chapitre VI), détection d'une structuration génétique liée à la fidélité pour les sites d'alimentation chez les baleines à bosse (Figure 1 ; Baker et al. 1990), et existence de populations sympatriques d'orques (Hoelzel & Dover 1991).

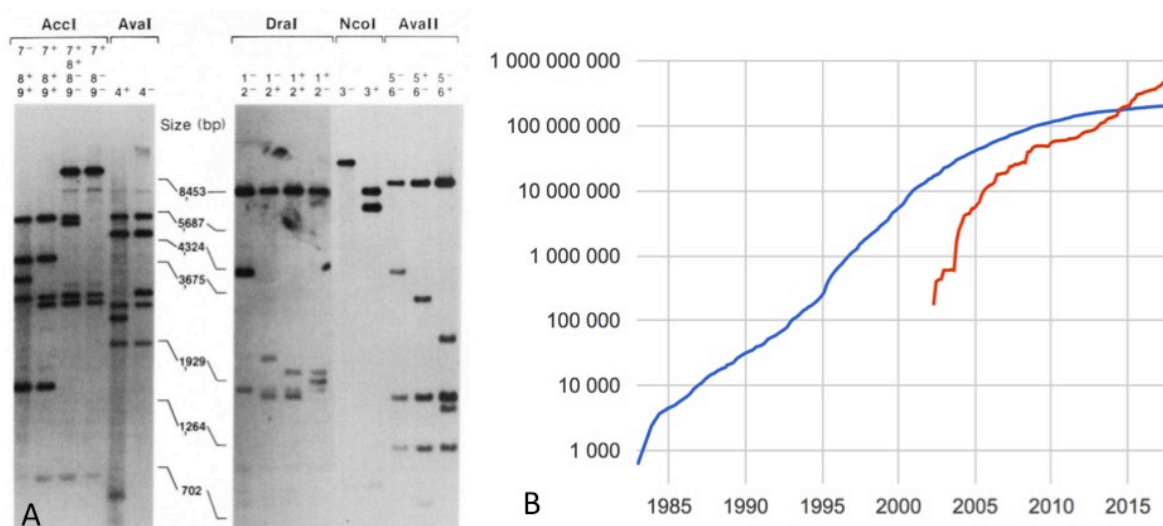


Figure 1 : Données historiques et capacités actuelles.

(A) Fragments de restriction d'ADN mitochondrial, ayant permis à Baker et al. (1990) de mettre en évidence les différences génétiques entre baleines à bosse provenant de différentes régions géographiques, et d'attribuer ces différences à une fidélité migratoire. Photographie tirée de Baker et al. Nature 1990 (344) 238-240

(B) Nombre de séquences présentes dans la Genbank depuis sa création en 1982 (en rouge, séquences déterminées dans le cadre de projets de séquençage de génomes entiers, en bleu, autres séquences). L'échelle des ordonnées est logarithmique. Données provenant de www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics (page consultée le 25 août 2017).

En mars 1990, lorsque la publication de Baker et al. est parue dans Nature, il y avait 33377 séquences, tous organismes confondus, répertoriées dans la Genbank

Depuis, les outils de la biologie et de la génétique moléculaire ont progressé de manière exceptionnelle. L'acquisition des données expérimentales, particulièrement des séquences d'ADN, le stockage des données de séquences dans les banques (Figure 1), leur comparaison à grande échelle et les exploitations statistiques des polymorphismes de l'ADN en termes d'analyse génétique ont été largement simplifiés.

Obtenir des échantillons est la première difficulté à résoudre pour toute étude d'Ecologie Moléculaire portant sur des mammifères marins

Malgré ces progrès spectaculaires coté « laboratoire », les mammifères marins dans leur milieu naturel sont et resteront toujours difficiles à étudier par des approches moléculaires. Ils sont définis comme « ... tous les mammifères dont l'alimentation est issue des océans » (Ridoux, 2016), et ne forment donc pas un clade au sens phylogénétique. Trois taxons principaux de mammifères marins sont distingués : les cétacés, appartenant aux cétartiodactyles (cétacés à dents, les odontocètes et cétacés à fanons, les mysticètes) ; les phoques qui sont des carnivores ; et les siréniens (des téthythériens, groupe comprenant aussi les éléphants) (Fontaine, 2015 ; Ridoux et al. 2016). A ces trois groupes principaux peuvent s'ajouter certaines espèces de loutres et l'ours blanc qui se nourrissent en mer (Ridoux et al. 2016).

Nous évoquerons plus particulièrement les cétacés et pinnipèdes, sur lesquels portent mes travaux. Beaucoup sont très mobiles, pélagiques, certains effectuent des migrations sur de très longues distances entre des zones d'alimentation et des zones de reproduction ; et même si leur nature de mammifère les oblige à respirer à la surface de l'eau, certains ont des comportements si discrets qu'il est difficile de les observer. Néanmoins, toute étude d'Ecologie Moléculaire nécessite des échantillons biologiques comme source d'ADN. La majorité des études actuelles portant sur les grands cétacés sont basées sur l'obtention de biopsies, à l'exemple des baleines à bosse (Baker et al. 2013) ; des baleines franches australes (Carroll et al. 2015) ; des rorquals communs (Archer et al. 2013) ; des baleines bleues (Attard et al. 2016) ; des baleines à becs (Morin et al. 2016) ou des orques (Foote et al. 2016). Quasiment aucun accident lié à des prélèvements de biopsies n'a été répertorié à l'exception d'un cas (Bearzi, 2000), et leur absence d'effet majeur a été démontré en plusieurs occasions (Cantor et al. 2010 ; Noren & Mocklin 2012 ; Crain et al. 2013). Les biopsies prélevées à l'arbalète sont utilisées de manière similaire sur des cétacés de plus petite taille, comme, par exemple, les dauphins communs (Mirimin et al. 2009) ou les grands dauphins (Louis et al. 2014). Des prélèvements non

invasifs, opportunistes, peuvent aussi être recueillis, à l'exemple de fragments de peau que perdent spontanément cachalots et baleines à bosse, qui permettent des analyses génétiques fiables (Figure 2 ; Richard et al. 1986 ; Pierszalowski et al. 2012). D'autres prélèvements non-invasifs et opportunistes peuvent être utilisés, comme des souffles (Frère et al. 2010 ; Delfour et al. 2013) ou des fèces (Green et al. 2013a,b), mais la collecte de ces échantillons en milieu naturel est une difficulté majeure.



Figure 2 : Fragments de peau de baleine à bosse récoltés de manière opportuniste dans le canal de l'île Sainte-Marie à Madagascar et utilisés dans le cadre des études présentées dans le Chapitre III de ce mémoire.
Photo ©Cétamada

Les échouages de mammifères marins représentent aussi une source opportuniste récurrente de données et d'échantillons. Des réseaux d'échouages, nationaux ou régionaux, sont organisés dans de nombreux pays (la liste complète de ces structures est accessible <http://www.marinemammalcenter.org/science/crc-marine-stranding-network>). En France, le Réseau National Echouage est coordonné par l'UMS 3462 PELAGIS (*Systèmes d'Observation pour la Conservation des Mammifères et Oiseaux Marins*, CNRS – Université de la Rochelle). Océanopolis, CCSTI (*centre de Culture Scientifique, Technologique et Industrielle*) de la Mer, localisé à Brest, en est le représentant régional pour la Bretagne. Un réseau de correspondants, qui couvre le littoral maritime français métropolitain et d'outre-mer, permet de collecter de manière récurrente et standardisée données et échantillons. Des rapport annuels décrivant les échouages par espèce et par région sont produits (voir par exemple Van Canneyt et al. 2015). Ce recueil de données standardisées permet des exploitations poussées, notamment en termes de variations de distribution d'espèces, à l'exemple du marsouin commun en Atlantique Nord (Jung et al. 2009 ; Peletier et al. 2013, voir aussi Chapitre IV). Des événements de mortalité inattendue peuvent aussi être détectés, et leurs causes envisagées (Mullié et al. 2014). Les prélèvements réalisés par les réseaux échouages représentent une source précieuse

d'échantillons pour des analyses de laboratoire, particulièrement génétiques. Leur significativité écologique a pu être discutée en termes de représentativité de la population globale, mais de nombreuses preuves de leur pertinence ont été données depuis (par exemple Peltier et al. 2013). Des échantillons provenant de mammifères marins échoués sont utilisés avec pertinence dans une proportion importante d'études génétiques, en conjonction avec d'autres échantillons provenant de biopsies (par exemple Archer et al. 2013 ; Louis et al. 2014), ou seuls (par exemple Fontaine et al. 2007 ; Alfonsi et al. 2012 ; Decker et al. 2017).

Les promesses à venir de l'ADN environnemental

Le terme d'ADN environnemental (ADNe) désigne l'ADN extrait d'un échantillon de milieu environnant (eau ou sol par exemple) sans isolement préalable d'organismes vivants (Taberlet et al. 2012). Les différents organismes qui contribuent à l'ADN récolté peuvent être identifiés grâce au séquençage des molécules présentes, cette démarche étant appelée « *eDNA metabarcoding* » (Pompanon et al. 2011 ; Taberlet 2012). Au départ appliquée surtout aux microorganismes, cette approche a été utilisée pour déterminer des régimes alimentaires (Valentini et al. 2009) ou identifier une espèce invasive de grenouille dans des étangs alpins (Ficetola et al. 2008). Valentini et al. (2016) ont pu montrer que l'*eDNA metabarcoding* pouvait être appliqué à des milieux aquatiques de grande dimension. Dans le milieu marin, des poissons osseux et cartilagineux ont été détectés et identifiés jusqu'à l'espèce à partir, par exemple, de prélèvements effectués autour d'un récif corallien (Miya et al. 2015) ou dans des régions côtières (Andruskiewicz et al. 2017).

Appliqué aux mammifères marins, l'*eDNA metabarcoding* représenterait un outil particulièrement pertinent de suivi d'espèces. Peu d'études ont été menées jusqu'à présent, mais des marsouins communs ont été déjà détectés grâce à des prélèvements d'eau de la mer Baltique (Foote et al. 2012), montrant la faisabilité de l'approche (même si dans ce cas-là il s'agissait d'une étude ciblée sur une espèce). Mettre au point une approche de *metabarcoding* permettant d'identifier les mammifères marins à partir de prélèvements d'eau de mer représente une voie actuelle particulièrement pertinente de recherche, qui, d'un côté permettrait d'obtenir des échantillons sans recours à des biopsies, et d'un autre côté ouvrirait des possibilités de monitoring de biodiversité des mammifères marins inédites.

Décryptage de la biodiversité des mammifères marins par des approches d'Ecologie Moléculaire : identification d'espèces et variations intraspécifiques

Les approches d'Ecologie Moléculaire permettent de décrypter la biodiversité des mammifères marins à deux niveaux : (i) l'identification d'espèces, que ce soit pour la détection de nouvelles espèces ou bien la détermination de l'espèce à laquelle appartiennent des échantillons non identifiables autrement, et, (ii) l'analyse des variations intraspécifiques, l'identification de populations, leur répartition géographique, et la recherche des causes de cette diversité intraspécifique.

La taxonomie des mammifères marins peut paraître *a priori* figée et avoir été clairement établie depuis des décennies. En réalité, des espèces, de cétacés surtout, sont encore en cours d'identification, et l'utilisation des approches d'Ecologie Moléculaire est devenue primordiale dans ce cadre. Par exemple, le rorqual d'Omura (*Balaenoptera omurai*) n'a été reconnu en tant qu'espèce qu'en 2003 (Wada et al. 2003) ; l'étude de l'ADN mitochondrial a permis d'identifier ce qui sera très certainement reconnu prochainement comme une nouvelle espèce de rorqual dans le golfe du Mexique (Rosel & Wilcox 2014) ainsi qu'une espèce putative de baleine à bec dans le Pacifique Nord (Morin et al. 2016). Dans tous les cas, il s'agit d'espèces cryptiques, difficilement identifiables par l'analyse morphologique externe uniquement, mais pour lesquelles les données moléculaires mettent en évidence des distances génétiques trop fortes avec les espèces voisines pour refléter simplement une variation intraspécifique. Un comité pour la taxonomie des mammifères marins (« *The Taxonomy Committee of the Society for Marine Mammalogy* ») a pris en charge le maintien à jour de la liste des espèces reconnues (35 espèces de pinnipèdes et 89 de cétacés consultables à <https://www.marinemammalscience.org/species-information/list-marine-mammal-species-subspecies>).

Mais même lorsque les espèces sont clairement définies, certains représentants en sont difficilement identifiables par l'observation morphologique, et seul l'outil moléculaire permet *in fine* des reconnaissances au niveau de l'espèce (Alfonsi et al. 2013 ; Jung et al. 2016). Par exemple, les baleines à bec (famille des Ziphiidae, 22 espèces) représentent à elles seules plus d'un quart des espèces de cétacés (Morin et al. 2016). Ce sont tous des grands plongeurs (le record de plongée mesuré pour un cétacé est détenu par une baleine à bec de Cuvier, *Ziphius cavirostris*, à 3000 m de profondeur, Schorr et al. 2014), pélagiques, au comportement discret. L'identification correcte des spécimens de certaines de ces espèces rares, à la taxonomie complexe et peut-être en cours de définition (Morin et al. 2016), dont les caractéristiques

anatomiques sont donc peu connues, est un véritable challenge. Seules des approches moléculaires permettent des identifications spécifiques dans certains cas (Thompson et al. 2012 ; Dalebout et al. 2014 ; Morin et al. 2016). Dans d'autres cas, c'est la nature des échantillons eux-mêmes, très dégradés ou très partiels, qui implique le recours à une identification grâce à l'ADN (Baker et al. 2006 ; Baker et al. 2008 ; Alfonsi et al. 2013 ; Jung et al. 2016, Figure 3).

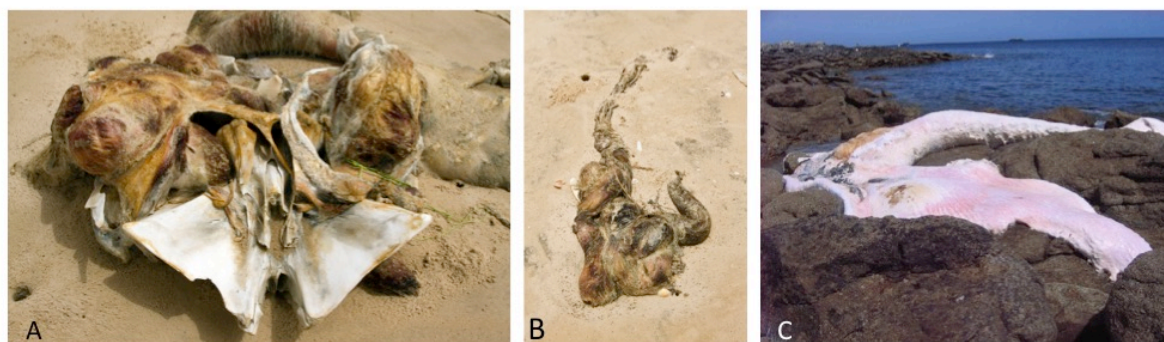


Figure 3 : Exemple de trois échantillons très partiels de cétacés échoués en Mauritanie (A, B) et en mer d'Iroise (C) identifiés grâce à leur ADN (voir Chapitre VI). A et B, *Balaenoptera borealis*, C : *Balaenoptera physalus*
Photos A et B, ©Wim Mullié ; Photo C, ©Parc Naturel Marin d'Iroise

*

* *

Mais c'est au niveau de l'analyse de la biodiversité intraspécifique que l'étude de l'ADN des mammifères marins a permis les avancées les plus importantes ces dernières années. En majorité, les cétacés et les pinnipèdes sont très mobiles (Stone et al. 1990 ; Vincent et al. 2005 ; Hoffman et al. 2006 ; Hoffman et al. 2012 ; Samaran et al. 2013 ; Quintela et al. 2014 ; Ridoux 2016). Comparé au milieu terrestre, le milieu marin présente des barrières physiques atténuées pour ces nageurs actifs (Palumbi 1994). Ces deux facteurs, grande capacité aux déplacements et barrières physiques environnementales réduites, suggèrent *a priori* que la diversité intraspécifique pourrait être faible chez les mammifères marins, et que des populations panmictiques à grande échelle géographique pourraient représenter une règle générale.

Mais en réalité, dans une très large proportion de cas, les études génétiques portant sur les cétacés et pinnipèdes ont mis en évidence des groupes intraspécifiques, présentant des différences génétiques d'intensités plus ou moins fortes, différences identifiées dans les génomes nucléaires et mitochondriaux ou mitochondriaux uniquement. Dans certains cas, ces disparités correspondent à des zones géographiques différentes, de taille variable, ou, dans d'autres cas, elles ne montrent pas de liens avec une répartition spatiale particulière. Les causes

de ces différences génétiques ont été graduellement déchiffrées dans plusieurs cas, les principales sont décrites dans les paragraphes suivants.

Changements climatiques passés et préférences pour des habitats influent sur la structure génétique actuelle des mammifères marins

Des changements climatiques passés représentent une première catégorie d'explications. La dernière période glaciaire, puis sa fin il y a approximativement 12 000 ans (Hewitt 2000 ; 2004 ; Boehme et al. 2012) et le réchauffement survenu par la suite sont certainement à l'origine de la différenciation des sous-espèces de marsouin commun (Fontaine et al. 2014). La fin de la dernière période glaciaire correspond aussi à des signaux d'expansion démographique reflétés dans la diversité génétique actuelle de plusieurs espèces de pinnipèdes en Atlantique Nord, notamment le phoque gris (Decker et al. 2016 ; publication 4). Chez les baleines à bosse, des clades identifiés par l'ADN mitochondrial sont d'origine antérieure au dernier maximum glaciaire, et la divergence en trois sous-espèces géographiquement séparées provient clairement du comportement migratoire de l'espèce, associé à l'inversion des saisons entre les deux hémisphères (Jackson et al. 2014, voir Chapitre III).

Des spécialisations pour certains habitats peuvent amener à la formation d'écotypes, définis comme des groupes d'individus différant à la fois génétiquement et par des caractéristiques écologiques, comme par exemple une spécialité alimentaire (Lowry 2012). Ces écotypes peuvent occuper des zones géographiques distinctes ou/et communes. Chez les mammifères marins, des écotypes sont distingués chez les orques dans le Pacifique, en Atlantique, et en Antarctique sur la base de variations génétiques, comportementales et morphologiques (De Bruyn et al. 2013 ; Morin et al. 2015). Les différences sont si importantes que Morin et al. (2010) ont proposé de les considérer en tant qu'espèces ou sous-espèces (Morin et al. 2010). Chez les grands dauphins, deux écotypes, côtiers et pélagiques, sont aussi distingués en Atlantique (Hoelzel et al. 1998 ; Louis et al. 2014a ; 2014b).

Impacts des activités humaines et du changement climatique sur la diversité génétique des mammifères marins.

Peu de cas d'impacts directs des activités humaines sur la structuration génétique des mammifères marins ont été identifiés jusqu'à présent, à part bien sur la chasse industrielle. L'homme a pratiqué jusqu'à récemment une chasse intensive aux cétacés et pinnipèdes, de petite et de grande taille. En Atlantique Nord par exemple, lorsque la chasse à la baleine à

bosse a été interdite par la commission baleinière internationale (*International Whaling Commission*, IWC) en 1955, on estime qu'il restait moins de 1000 individus (Ruegg et al. 2013). Le nombre de baleines à bosse ayant existé avant la chasse industrielle peut être estimé de deux manières différentes, à partir des données des livres de bord des navires baleiniers ou en partant de la diversité génétique actuelle. Les deux approches livrent des résultats très différents : les estimations génétiques ont des valeurs beaucoup plus fortes que les estimations basées sur les recueils historiques (au moins 112 000 baleines à bosse avant le début de la chasse en Atlantique Nord pour les estimations génétiques, Ruegg et al. 2013 ; contre une vingtaine de milliers pour les estimations basées sur les captures, Punt et al. 2006). Quoiqu'il en soit, la chasse a réduit drastiquement le nombre de baleines à bosse, en Atlantique Nord mais aussi dans le reste du globe, quasiment jusqu'à l'extinction (Reilly et al. 2008). De telles réductions du nombre d'individus d'une espèce ont obligatoirement un impact sur sa diversité génétique globale, et représentent des cas potentiels de goulot d'étranglement génétique. Un cas extrême est celui de l'éléphant de mer boréal (*Mirounga angustirostris*), qui a vu son abondance chuter en dessous d'une centaine d'individus il y a un siècle, pour remonter à plus de 175 000 dans les années 2000 (Weber et al. 2000). La diversité génétique de l'espèce est restée bien sur extrêmement basse (Sanvito et al. 2012).

Aujourd'hui, et depuis le moratoire de 1982, les baleines sont beaucoup moins chassées. Seuls le Japon, la Norvège et l'Islande chassent encore les baleines, en plus de quelques chasses traditionnelles très localisées. Certaines espèces de pinnipèdes restent par contre plus ciblées (Figure 4).



Figure 4 : Du phoque (espèce non déterminée) dans les rayons d'une épicerie à Saint-Jean de Terre-Neuve, Canada. Aout 2016.

Même si peu d'exemples concrets existent, d'autres activités humaines contemporaines peuvent par contre avoir des effets sur les structures des populations de mammifères marins, en ayant des impacts plus marqués sur certaines populations. Mendez et al. (2010) ont par exemple mis en évidence des impacts des captures accidentelles sur la diversité génétique des dauphins de la Plata (*Pontoporia blainvillei*). Beaucoup de mammifères marins utilisent des habitats côtiers, qu'ils en soient résidents ou de passage, à l'exemple des baleines à bosse décrites à Madagascar, Saint-Pierre-et-Miquelon et dans le Pacifique Nord (Chapitre III). Certaines espèces possèdent des structures de populations corrélées à des habitats localisés : les écotypes de grands dauphins par exemple, dont l'un est côtier (Louis et al. 2014a), ou les groupes de baleines à bosse dans leur zones d'alimentation ou/et de reproduction (voir par exemple Chapitre III). Des activités humaines modifiant les habitats côtiers peuvent alors spécifiquement impacter certains groupes, génétiquement différents, à l'intérieur d'une espèce. Chaque cas sera alors à étudier spécifiquement.

Les preuves d'impacts directs du changement climatique sur les écosystèmes marins sont nombreuses (par exemple, Poloczanska et al. 2013). Ces changements peuvent affecter la diversité génétique intraspécifique (Pauls et al. 2013). Des effets majeurs du changement climatique sur les aires de répartition des mammifères marins ont été modélisés (Lambert et al. 2011), et des cas concrets ont pu être démontrés. Par exemple, les marsouins communs sont présents plus longtemps actuellement à l'ouest du Groenland que dans les années 90, suivant certainement les changements d'abondance d'une de leur proie majeure, la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*) (Heide-Jorgensen et al. 2011). Un autre cas particulièrement démonstratif se trouve en Arctique : la fonte des glaces accélérée agrandit le passage Nord-Ouest, entre l'Atlantique Nord et le Pacifique Nord (Heide-Jorgensen et al. 2012). Des baleines boréales (*Balaena mysticetus*), suivies par balises *Argos*, ont été capables de traverser ce passage en 2010, alors que les populations de chaque bassin océanique sont normalement séparées (Heide-Jorgensen et al. 2012). De tels changements d'aires de répartition vont clairement avoir des effets potentiels sur la structuration génétique des mammifères marins. Des groupes séparés géographiquement vont à nouveau partager des territoires communs, à l'exemple des baleines boréales en Arctique (Heide-Jorgensen et al. 2012). Les marsouins communs quant à eux, présentent des disparités génétiques à faible échelle géographique malgré une répartition qui semble plus ou moins continue (Alfonsi et al. 2012, Fontaine et al. 2017 ; voir aussi Chapitre IV). Des changements de leurs aires de répartition, bien identifiés en Atlantique-Nord, liés au changement climatique (Heide-Jorgensen et al. 2011) ou de cause

encore inconnue (Jung et al. 2009 ; Hammond et al. 2013) vont clairement bouleverser les variations génétiques intra-spécifiques (Alfonsi et al. 2012 ; voir aussi Chapitre IV).

Philopatrie et fidélité pour des sites d'alimentation peuvent entraîner des différences génétiques entre groupes

Plusieurs espèces de grands vertébrés marins très mobiles partagent des comportements de fidélité pour des sites spécifiques, qu'ils soient destinés à l'accouplement et la mise bas, ou à l'alimentation. Des tortues marines (Bowen & Karl 2007), des requins (Jorgensen et al. 2009 ; Keeney et al. 2005), des pinnipèdes (Pomeroy et al. 2000 ; Fabiani et al. 2003 ; Hoffman & Forcada 2012 ; Klimova et al. 2014) et des cétacés (Palsboll et al. 1995 ; Engelhaupt et al. 2009 ; Baker et al. 2013) peuvent présenter une fidélité pour leur site de naissance, appelée philopatrie. Souvent, cette fidélité est plus marquée chez les femelles alors que les mâles sont plus mobiles (Fabiani et al. 2003 ; Keeney et al. 2005 ; Hoffman & Forcada 2012 ; Baker et al. 2013).

Cette fidélité peut se répercuter en termes de structuration génétique de l'espèce, puisque tous les individus d'une même zone géographique n'auront pas des probabilités équivalentes de se reproduire entre-eux. Des différences de fréquences de répartition d'allèles entre des groupes d'individus possédant des fidélités pour des sites de reproduction différents vont apparaître à l'analyse des génomes nucléaires comme mitochondriaux. Néanmoins, si la philopatrie est plus marquée pour les femelles que pour les mâles, et que les mâles sont donc plus impliqués dans les flux de gènes entre groupes, les deux génomes ne montreront pas des niveaux de différenciation équivalents. Le génome mitochondrial, hérité de la mère uniquement, montrera des différences plus marquées entre groupes, alors que les marqueurs nucléaires, d'héritage biparental, pourront montrer des différences moindres, voire non significatives entre groupes de reproduction. Ce cas de figure est par exemple observé chez des pinnipèdes (Andersen et al. 1998 ; Burg et al. 199 ; Fabiani et al. 2003 ; Klimova et al. 2014), des cétacés (Baker et al. 2013), mais aussi des requins et tortues (Bowen & Karl 2007).

Certains cétacés sont des espèces migratrices, et montrent en plus de leur philopatrie une fidélité pour une zone d'alimentation. C'est le cas typique de certains grands cétacés, à l'exemple des baleines à bosse (Palsboll et al. 1995 ; Baker et al. 2013 ; publication 1), les baleines franches australes (Carroll et al. 2015) ; des baleines bleues (Attard et al. 2016) ou des baleines de Minke (Quintela et al. 2014). Pour ces espèces particulières, il faut donc prendre en

compte une double fidélité, pour leur zone de reproduction et leur zone d'alimentation (Baker et al. 2013). Le cas le mieux connu est celui des baleines à bosse, qui ont fait l'objet d'études approfondies en termes de structuration génétique (détaillées dans le Chapitre III). Chez ces espèces de baleines, la double fidélité géographique est transmise au fil des générations par l'apprentissage de la mère au baleineau, ce qui entraîne des différences génétiques entre groupes (voir par exemple Palsboll et al. 1995 ; Baker et al. 2013 ; Bettridge et al. 2015), liées à une culture existant au sein d'un groupe (voir partie suivante, Whitehead 2017).

« Roméo et Juliette » joué par les baleines et les orques : Traditions culturelles et barrières aux flux de gènes.

Dans « *Roméo et Juliette* », William Shakespeare nous décrit une barrière aux flux de gènes liée au comportement et aux traditions familiales transmises de manière transgénérationnelle. Roméo et Juliette sont de la même espèce, de sexe opposé, ils habitent la même ville (Vérone), leur probabilité de rencontre est élevée. Celle-ci survient, et les signaux échangés (biochimiques, visuels, acoustiques, ...) les amènent à prévoir de se reproduire ensemble ...

Mais, et cela est comportemental et transmis au fil des générations entre individus du même groupe, donc il s'agit de culture, les deux familles, Montaigu pour Roméo et Capulet pour Juliette, ne se côtoient pas et s'affrontent même. Cet affrontement entre familles rivales va empêcher Romeo et Juliette de mélanger leurs gènes, et empêcher un fils de Montaigu de recevoir un ADN mitochondrial Capulet. Dans une population à l'équilibre de Hardy-Weinberg, Roméo et Juliette auraient dû pouvoir se reproduire sans obstacle, leur histoire est donc un exemple de barrière au flux de gènes provoquée par la culture au sein d'une population.

Les liens entre culture et génétique ont été surtout étudiés chez l'homme (Creanza et al. 2017). Un exemple particulièrement démonstratif de coévolution liée à la culture est la sélection d'allèles du gène de la lactase permettant de digérer le lait dans les populations pastorales africaines (Tishkoff et al. 2007). En plus de l'homme, les grands singes (chimpanzés, gorilles et orangs-outans) montrent aussi un ensemble de pratiques culturelles, transmises entre individus de la même espèce, et influant l'évolution de chacun des groupes (Whiten, 2017). Mais pour l'instant, aucun lien n'a pu être fait entre culture et génétique chez ces espèces (Whiten, 2017). Chez les cétacés, la culture, - partage par l'apprentissage d'informations ou de comportements entre individus d'un même groupe -, joue un grand rôle (Whitehead 2017). Cette transmission

peut porter par exemple sur des spécialisations alimentaires, des migrations, des méthodes de chasse, des vocalisations particulières.

Les liens entre culture et génétique sont maintenant démontrés chez une espèce matrilineaire, vivant en groupes spécialisés formés d'une même lignée maternelle, les orques (*Orcinus orca*). Comme évoqué précédemment, les orques présentent des écotypes sympatriques (partageant les mêmes zones géographiques). Ces écotypes se distinguent par des caractéristiques morphologiques, comportementales et génétiques (Morin et al. 2015, De Bruyn et al. 2013). Dans le Pacifique Nord par exemple, on distingue un écotpe « *resident* » se nourrissant de saumons, un écotpe « *transient* » se nourrissant de mammifères marins, et un écotpe « *off-shore* » ciblant les requins (Morin et al. 2015). L'hypothèse actuelle est que ces écotypes ont pour origine des petits groupes d'orques qui se sont spécialisés dans une technique de chasse particulière, qui leur a apporté un avantage sélectif (Foote et al. 2016 ; Whitehead 2017). La formation des écotypes implique de plus qu'un isolement reproductif se soit produit entre les différents groupes. La culture joue un rôle dans les deux phénomènes, en permettant la transmission de la technique de chasse entre individus du même groupe, et en favorisant la reproduction entre individus du même groupe (on retrouve ici nos *Montaigus* et *Capulets* en version cétacés). Cet isolement reproductif entre groupes sympatriques pourrait par exemple être basé sur des différences de vocalisations (Whitehead 2017).

En utilisant des approches de génomique comparative, Foote et al. (2016) ont mis en évidence des sélections particulières de gènes en fonction des écotypes. Cela concerne par exemple des gènes impliqués dans le métabolisme de la méthionine chez les écotypes allopatriques d'orques ciblant les mammifères marins comme proies. L'hypothèse émise est que les écotypes se nourrissant de mammifères auraient des ressources moins stables en méthionine que ceux se nourrissant de poisson, d'où un métabolisme de la méthionine modifié (Foote et al. 2016). Un parallèle peut être fait entre la sélection de gènes de métabolisation du lactate chez l'homme et ces résultats concernant le métabolisme de la méthionine chez l'orque, notamment parce que cette sélection correspond à un phénomène d'évolution convergente, se retrouvant chez deux écotypes indépendants d'orques partageant une même culture acquise indépendamment par les deux groupes (Whitehead 2017).



Figure 5 : Grand dauphin utilisant une éponge, baie Shark en Australie (Photographie tirée de Mann et al. 2008). Cette capacité, transmise par apprentissage, appartient à la culture d'un groupe de dauphins tous identifiés par un même haplotype mitochondrial.

Un autre cas de coévolution entre génétique et culture chez les cétacés est rencontré chez les grands dauphins (*Tursiops truncatus*). Dans l'ouest de la baie Shark en Australie, des grands dauphins ont appris à pêcher en utilisant un outil, une éponge, pour gratter le fond de la mer (Mann et al. 2008, Figure 5). Cette pratique, transmise par apprentissage entre individus, n'est pas partagée par tous les grands dauphins de la zone géographique considérée (Mann et al. 2008). Koops et al. (2014) ont montré qu'il existait une répartition dans l'espace de trois haplotypes mitochondriaux rencontrés dans l'ouest de la baie Shark. Les dauphins utilisant les éponges appartiennent tous à la même lignée maternelle, identifiée par l'un des trois haplotypes mitochondriaux (Koops et al. 2014). Dans ce cas, le terme d'auto-stop (« hitchhiking ») génétique est utilisé, la capacité à utiliser des éponges représentant une culture, transmise entre individus de la même lignée maternelle, donc en même temps que l'ADN mitochondrial (Koops et al. 2014 ; Whitehead, 2017).

Chez les rorquals (genres *Balaenoptera* et *Megaptera*), il n'y a *a priori* pas de formation de groupes sociaux stables comme chez les cachalots ou les orques. Par contre, le baleineau peut rester jusqu'à une année complète avec sa mère (Baker et al. 1987). Cette année de proximité offre la possibilité d'un apprentissage transgénérationnel, de la mère au baleineau. Un élément de cet apprentissage est connu et bien caractérisé pour les espèces migratoires, il s'agit du chemin entre la zone de reproduction, utilisée pour l'accouplement et la mise bas, et la zone d'alimentation (Baker et al. 2013 ; Carroll et al. 2016). Ces deux zones peuvent, et sont en général, distantes de plusieurs milliers de kilomètres (Bettridge et al. 2015). Le chemin

migratoire est considéré comme une culture, propre à certains groupes d'individus, et transmis de manière transgénérationnelle (Baker et al. 2013 ; Carroll et al. 2016). Cette culture entraîne des disparités génétiques entre différentes zones d'alimentation et de reproduction, reflétées par exemple par des distributions variables d'haplotypes mitochondriaux entre sites. Dans ce cas-là, la culture du chemin de migration possédée par un groupe de baleines, transmise entre individus au fil des générations, crée des barrières aux flux de gènes qui se reflètent sur des marqueurs génétiques neutres (région de contrôle de l'ADN mitochondrial, polymorphisme de microsatellites, ...).

En addition de leur comportement migratoire, les rorquals, et particulièrement les baleines à bosse, possèdent au moins deux autres éléments entrant dans la culture de certains groupes : des techniques alimentaires comme le « *lobtail feeding* » (Allen et al. 2013) et les chants des mâles (Payne & Vay 1971 ; Cazau et al. 2016). Les chants émis, spécifiques de groupes, permettent de mettre en évidence des échanges entre zones géographiques (Darling & Sousa-Lima 2006, Noad et al. 2000), et sont transmis de manière culturelle (Garland et al. 2017).

Jusqu'à présent, seule la culture que constitue le comportement migratoire a pu être liée à des différences génétiques, prouvant, chez les baleines à bosse et les baleines franches australes une co-évolution génétique et culturelle qui se traduit par des barrières aux flux de gènes entre populations ayant des fidélités différentes (Baker et al. 2017 ; Carroll et al. 2015 ; publication 1).

Le champ de recherche que représentent les liens entre culture et structuration génétique des populations est certainement l'un des plus prometteurs actuellement chez les cétacés (Carroll et al. 2015 ; Foote et al. 2016 ; Withehead 2017 ; Publication 1) et, en plus de compréhensions fondamentales nouvelles, il apportera aussi des informations primordiales en termes de conservation.

Chapitre II.

Ecologie Moléculaire et conservation de la biodiversité : les liens sont-ils suffisants ?

Les apports de l'Ecologie Moléculaire à la conservation du milieu marin et le « gap » de la génétique appliquée à la conservation

La conservation de la biodiversité et la gestion du milieu naturel bénéficient des apports de l'Ecologie Moléculaire dans plusieurs domaines majeurs (Figure 6). En premier lieu, le décryptage de la biodiversité inter- et intraspécifique, tel que décrit dans la partie précédente, qui doit permettre d'identifier des espèces et des groupes génétiquement différents à l'intérieur des espèces (Alfonsi et al. 2012 ; Louis et al. 2014 ; Morin et al. 2015 ; 2016). Ces éléments permettront d'aider à la définition des groupes à conserver et des unités de gestion. La génétique des populations offre des outils extrêmement pertinents pour cela (Palsboll et al. 2007). Une fois ces groupes définis, les analyses de l'ADN permettent de suivre et de cataloguer la biodiversité de manière très fine, aux niveaux spécifiques ou intraspécifiques (Viricel & Rosel 2012 ; Alfonsi et al. 2013 ; Jung et al. 2016 ; Jung 2017). L'ADNe ouvre, et ouvrira, dans ce domaine, des possibilités majeures supplémentaires (Foote et al. 2012 ; Valentini et al. 2016, voir Chapitre VI). L'Ecologie Moléculaire permet aussi d'estimer les tendances d'évolution de chaque groupe (expansions, goulots d'étranglement), sa diversité génétique, de déterminer des tailles efficaces de population (Ruegg et al. 2013 ; Jackson et al. 2014 ; Decker et al. 2016). Les barrières aux flux de gènes entre groupes pourront aussi être recherchées, avec très souvent une vision historique possible et des hypothèses quant à leur nature, environnementale par exemple (Fontaine et al. 2007 ; Alfonsi et al. 2012 ; Baker et al. 2013 ; Decker et al. 2016 ; publication 4).

L'Ecologie Moléculaire, dans le cadre de démarches appelées « *wildlife forensic* » (Lyengar 2014), permet aussi de réaliser des identifications d'échantillons, notamment commerciaux, même très modifiés, dans des cas de trafic d'espèces protégées, de braconnage et de non-respect de réglementations de droit de chasse par exemple (Baker et al. 2006 ; Baker 2008).

La génétique appliquée à la conservation est maintenant une discipline reconnue, une revue internationale à comité de lecture et impact facteur (IF = 1,52) lui est consacrée (« *Conservation Genetics* »), et deux ouvrages majeurs ont été publiés (Frankham et al. 2010 ; Allendorf et al. 2013).

Néanmoins, les études génétiques restent sous-utilisées dans beaucoup de plans de gestion du milieu naturel et de protection d'espèces menacées. Pierson et al. (2016) ont évalué à plus de 80% le nombre de plans de restauration d'espèces intégrant des données de génétique (ou des projets d'acquisition de données génétiques) aux Etats-Unis, alors qu'il n'y en aurait que 17% à

faire de même en Europe. La France fait quand même partie des pays européens intégrant le plus ces données génétiques dans ses plans de conservation (Pierson et al. 2016). D'autres auteurs ont mis en évidence des proportions similairement faibles de données de génétique incluses dans des plans de gestion, ceci dans différents pays du globe (Rodriguez-Clark et al. 2015 ; Cook & Sgro 2017). Ce manque d'utilisation des données de génétique dans les plans de gestion et de restauration de la biodiversité a été appelé le *gap* de la génétique appliquée à la conservation (« *conservation genetics gap* » ; Taylor et al. 2017).

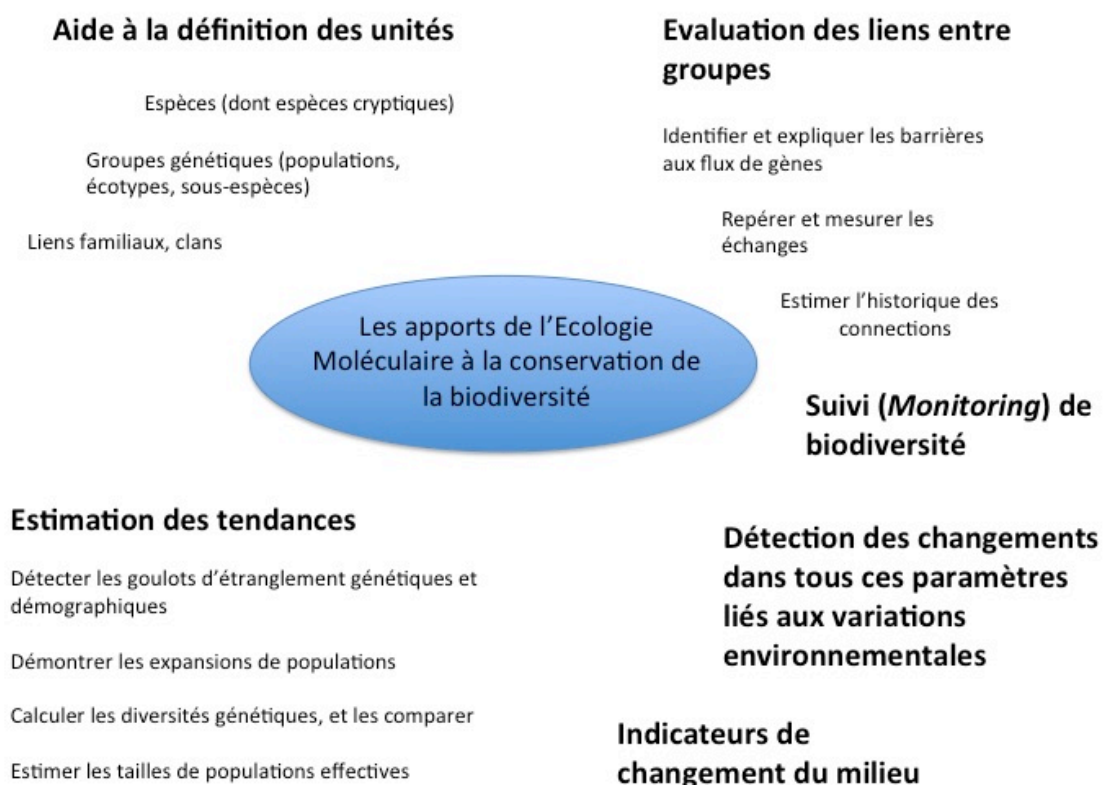


Figure 6 : Description des apports de l'Ecologie Moléculaire à la définition des stratégies de gestion et de conservation de la biodiversité

Une raison de l'existence de ce *gap* pourrait concerner le vocabulaire propre aux généticiens, en général très spécialisé. Par exemple, Hoban et al. (2013) proposent de ne plus utiliser des termes comme « coalescence » ou « bayésien ». La présentation des données de génétique est elle aussi souvent plus complexe et ardue à décrypter pour les non-spécialistes que celles produites par d'autres approches (Kershaw & Rosenbaum 2016). Mais les gestionnaires pourraient aussi considérer les données de génétique comme reflétant des problématiques à long terme, à prendre en compte de manière moins urgente que d'autres éléments (Cook & Sgro 2016). Le coût, souvent surestimé *a priori*, associé à un manque de connaissance parmi

les gestionnaires des bénéfices et intérêts des résultats des études de génétique font aussi baisser leur utilisation dans les projets de conservation (Taylor et al. 2017).

Les publications des résultats des études de génétique, même réalisées dans un but de conservation de la biodiversité, font aussi rarement apparaître leurs effets en termes de gestion, bien qu'un léger mieux puisse exister ces dernières années. A titre d'illustration, la revue « *Conservation Genetics* » est publiée depuis l'année 2000. Dix-sept volumes ont été publiés, contenant au total 2361 articles au 1^{er} septembre 2017. Entre 2000 et 2013, seuls 13 articles, soit 0,8% des articles publiés, mentionnaient le terme « *Policy* » (politique) (Hoban et al. 2013). Actuellement, ce sont 229 articles (9,7%) qui contiennent ce terme. La même tendance existe pour le terme « *Management* », trouvé dans 408 articles en 2013 (24,8%, Hoban et al. 2012), et dans 1602 actuellement (67,9%).

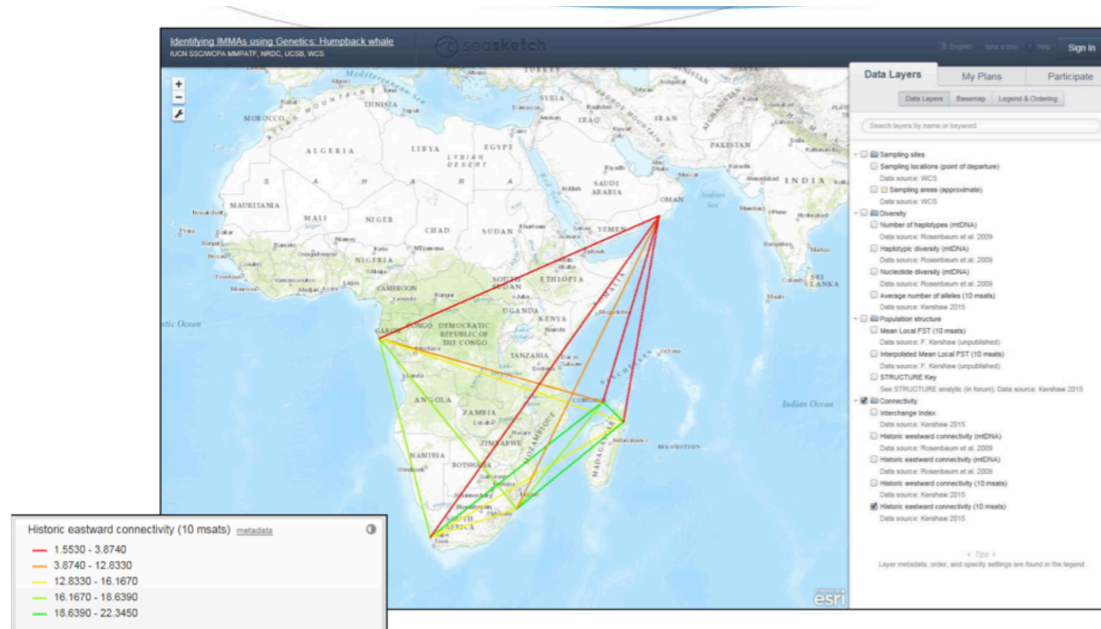


Figure 7 : Exemple de représentation graphique simplifiée de différenciation génétique de groupes de baleines à bosse (Kershaw & Rosenbaum 2016).

La couleur des traits qui relient les sites varie en fonction de la distance génétique, du vert (distance minimale) au rouge (distance génétique forte)

Plusieurs initiatives pourraient bien aider à rapprocher les généticiens et les gestionnaires du milieu naturel (Hoban et al. 2013 ; Taylor et al. 2016). Par exemple, Kershaw & Rosenbaum (2016) essaient de construire un réseau de généticiens spécialistes du monde marin (appelé « *Geospatial Genetics Community* ») visant à produire des données plus facilement visualisables. Taylor et al. (2017) proposent la création de réseaux de génétique appliquée à la conservation regroupant gestionnaires et généticiens pour favoriser les contacts et les échanges d'information. L'union internationale pour la conservation de la nature (IUCN) s'est dotée d'un groupe d'experts en génétique le CGSG (« *Conservation Genetics Specialist Group* ») pour

promouvoir l'utilisation de la génétique dans les démarches d'étude et de protection des espèces menacées.

Les mammifères marins, des espèces en danger ?

Historiquement, la chasse a représenté la principale menace qui a pesé sur les mammifères marins. Les espèces de baleines ont été successivement protégées depuis les années 1950 par la commission baleinière internationale, leur nombre devenant extraordinairement faible. En 1982, un moratoire de la chasse à la baleine a été décidé (Figure 8). Seule la chasse scientifique du Japon, et les chasses commerciales de la Norvège et de l'Islande subsistent encore aujourd'hui en plus de quelques chasses traditionnelles très localisées (Ridoux 2016) et de braconnage (Van Waerebeek et al. 2017). Les pinnipèdes restent eux plus exposés à la chasse commerciale, notamment au Canada (Ridoux 2016).



Figure 8 : Un symbole appréciable : une baleine à bosse dans le port baleinier basque historique de Red Bay au Labrador, en aout 2016

Des zones marines protégées, dédiées spécifiquement aux mammifères marins ou concernant le milieu marin en général, ont été, et sont encore, définies (Figure 9, Hoyt 2011).

Malgré toutes les protections mises en place, Davidson et al. (2012) ont estimé que 37% des espèces de mammifères marins (au sens large, incluant les ours blanc et deux espèces de loutres) étaient aujourd'hui en danger d'extinction. Certains cas sont particulièrement problématiques, le dauphin de Chine (*Lipotes vexillifer*) est *a priori* disparu aujourd'hui ; le

marsouin de Californie (*Phocoena sinus*, Dalton 2010 ; Taylor et al. 2016) et la baleine franche de l'Atlantique (*Eubalaena glacialis*) ne comptent plus que quelques centaines voire dizaines de membres.

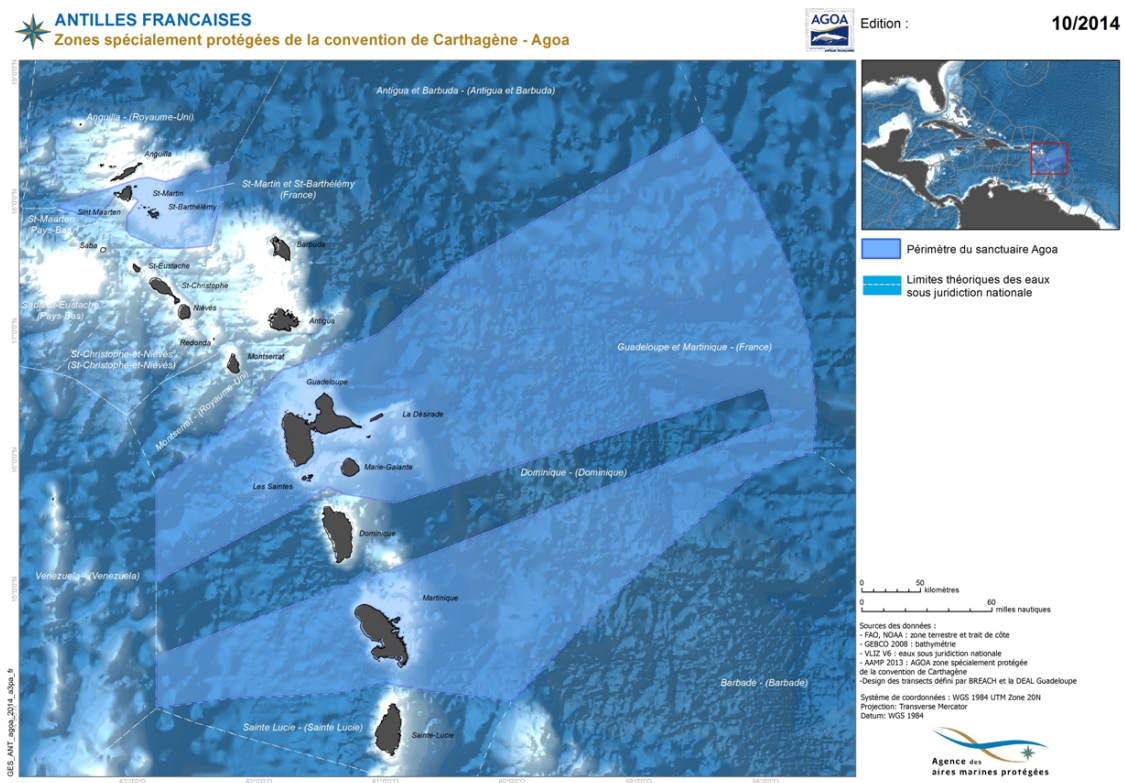


Figure 9 : Carte du sanctuaire Agoa dans les Antilles françaises, une zone protégée dédiée spécifiquement aux mammifères marins.

<http://www.sanctuaire-agoa.fr/Documentation3/Carte-de-perimetre-du-sanctuaire-Agoa> téléchargée le 5 septembre 2017

Si, à l'instar de la baleine à bosse, d'autres espèces hier fortement impactées par la chasse voient leurs effectifs augmenter globalement depuis leur protection, certaines populations ou groupes sont menacés, à cause souvent d'un faible nombre d'individus, d'une diversité génétique et d'une aire de répartition réduites, ainsi que de la proximité d'activités humaines intenses. Un exemple typique est représenté par la population isolée de baleines à bosse du nord de l'Océan Indien, reconnue en réel danger (Minton et al. 2012 ; Bettridge et al. 2015).

Les menaces principales, d'origine anthropique ou non, pesant sur les mammifères marins sont connues. Pour les baleines à bosse, elles ont été listées par exemple par Fleming & Jackson (2011) et par Bettridge et al. (2015). Ces menaces sont globalement généralisables à tous les mammifères marins, en prenant en compte des spécificités d'espèces, d'habitats et d'activités anthropiques particulières et localisées.

Les mammifères marins sont sensibles aux nuisances sonores (Barlow & Gisiner 2006 ; Southall et al. 2007 ; Cato et al. 2013). Le bruit d'origine anthropique a largement augmenté dans tous les océans dans les dernières années (Bettridge et al. 2015). Les sons peuvent provenir des navires, des constructions sous-marines, des sonars militaires ou des campagnes de recherche de gaz et de pétrole par exemple. Les impacts du bruit sur les mammifères marins, traumatiques ou provoquant des déplacements et/ou des changements de comportement, ont été prouvés par de nombreuses études sur des espèces de mammifères marins très différentes (Barlow & Gisinger 2006 ; Southall et al. 2008 ; Cato et al. 2013 ; Cerchio et al. 2014). Les navires ont aussi des effets négatifs directs sur les mammifères marins, les collisions étant connues pour se produire de manière répétée (Van Waerebeek et al. 2008 ; Figure 10).



Figure 10 : Collision d'un grand cétacé avec la proue d'un bateau (A) et marsouin commun échoué en zone fortement anthropisée dans le nord de la Mauritanie (B).

Photographies ©Wim Mullié

Les cétacés et pinnipèdes accumulent des polluants lipophiles dans leurs tissus adipeux (Aguilar et al. 2002 ; O'Shea & Tanabe 2003). Les grands dauphins du golfe normand breton contiennent par exemple des taux extrêmement forts de PCB (*polychlorobiphényles*), de mercure, de phtalates (Zanutti 2016). L'absence de possibilité d'expérimentation directe a longtemps rendu difficile l'obtention de preuves définitives de la toxicité des ces accumulations chez les mammifères marins (Hymery et al. 2013). Mais les impacts directs des accumulations de PCB par exemple sur plusieurs espèces de delphinidés dans les eaux Européennes sont maintenant clairement démontrés (Jepson et al. 2015).

Même si ils sont beaucoup moins ciblés actuellement par la chasse, les mammifères marins restent très exposés aux captures accidentelles de la pêche au filet (Tregenza et al. 1997 ;

Mendez et al. 2010 ; Mannocci et al. 2012). Dans le monde, Read et al. (2004) ont estimé à plusieurs centaines de milliers le nombre de mammifères marins capturés accidentellement chaque année. Pour certaines espèces, comme les marsouins communs, et dans certains endroits (la Mauritanie par exemple) les impacts de ces captures accidentelles sont préoccupants (Mullié et al. 2013). Dans les premiers mois de l'année 2017, ce sont les dauphins communs qui ont montré une mortalité liée aux captures accidentelles inquiétante dans le golfe de Gascogne (<http://www.observatoire-pelagis.cnrs.fr/actualites-240/actualites/Situation-proccupante-dauphins>). La situation est largement plus alarmante encore pour les espèces menacées comme le marsouin de Californie (Dalton, 2010 ; Taylor et al. 2016).

Le développement côtier fait partie aussi des principales menaces impactant cétacés et pinnipèdes, en regroupant anthropisation, pollution, trafic et travaux maritimes, bruit, ... avec des zones d'habitat préférentielles de certaines espèces (Louis et al. 2014a ; Trudelle et al. 2016 ; Figure 10). Beaucoup de ports sont en développement, ce qui amène des pollutions sonores et des modifications physiques du milieu pendant les travaux puis un trafic accru par la suite, incluant donc de nouvelles pollutions sonores et des risques de collision à long terme.

Les activités d'observation des cétacés (« *whale-watching* ») représentent aussi une industrie touristique en fort développement. O'Connor et al. (2009) ont estimé que plus de 13 000 emplois étaient liés directement à l'observation touristique des cétacés dans le monde. En 2008, presque 13 millions de touristes sont allés observer des cétacés en mer, dépensant pour cela plus de 2 milliards de dollars (O'Connor et al. 2009). L'intensité mondiale de cette activité ouvre la voie à des interactions potentiellement négatives entre bateaux d'observateurs et cétacés observés. Néanmoins, des règlements régulant les conditions d'observations des mammifères marins sont très généralement établis, permettant une cohabitation espérée comme tolérable (à l'exemple du règlement du Parc Marin du Saguenay–Saint Laurent au Canada qui regroupe de nombreuses entreprises d'observation de cétacés aux alentours de Tadoussac <http://laws-lois.justice.gc.ca/fra/reglements/DORS-2002-76> ; ou de la charte pour une approche respectueuse des mammifères marins mise en place par le Parc Naturel Régional de Mayotte <http://www.aies-marines.fr/Proteger/Sensibiliser-le-public/Observer-sans-deranger/Des-chartes-pour-une-approche-respectueuse-des-mammiferes-marins-a-Mayotte>).

Les mammifères marins ont aussi des pathogènes spécifiques, pouvant causer des épidémies. Des champignons parasites causant des mycoses (Paniz-Mondolfi et al. 2012), des bactéries, responsables notamment des brucelloses (Jauniaux et al. 2010) et des virus, notamment des morbillivirus et des papillomavirus (Jauniaux et al. 2000 ; Van Bressen et al. 2009, 2014). Plusieurs de ces pathogènes sont d'ailleurs aussi des pathogènes de l'homme (Van Bressen et

al. 2009 ; Paniz-Mondolfi et al. 2012). Les impacts de ces agents infectieux sur les populations de mammifères marins sensibles, cétacés et pinnipèdes, sont réels, et semblent accrus en milieux fortement anthropisés de part leur association avec d'autres facteurs de risque (Van Bressen et al. 2009). Les toxines produites par des algues représentent aussi une menace pour les mammifères marins (Scholin et al. 2000)

Les prédateurs des mammifères marins sont soit d'autres mammifères marins soit certaines espèces de requins. Les orques sont des superprédateurs et certains écotypes se sont spécialisés dans la chasse aux mammifères marins (Morin et al. 2015). D'autres cas existent, comme des phoques gris et des grands dauphins attaquant des marsouins communs (Cotter et al. 2011 ; Bouveroux et al. 2014).

Le changement climatique, entraînant réchauffement et acidification du milieu marin peut représenter une menace pour certaines espèces de mammifères marins (Davidson et al. 2012). L'altération des habitats est une menace directe, les changements de distribution et d'abondance des proies en est une indirecte (par exemple Perry et al. 2005 ; Mac Leod et al. 2007 ; Gambaiani et al. 2008 ; Simmonds & Elliot 2008 ; Heide-Jorgensen et al. 2011, voir aussi dernière partie du Chapitre III).

Apports de mon travail à la conservation du milieu marin

Les apports potentiels de mes travaux à la conservation du milieu marin sont présentés dans la Figure 11. La mise au point des identifications en routine d'espèces à partir d'échantillons même très dégradés me permet de participer et d'enrichir des programmes de monitoring de biodiversité, incluant l'identification de cétacés échoués en Mauritanie. J'ai utilisé cette même démarche pour déterminer le régime alimentaire de phoques gris et de marsouins communs dans le cadre du programme « *Inpecmam* », porté par le Parc Naturel Marin d'Iroise, qui visait à estimer les interactions entre pêcheurs et mammifères marins en Iroise. Ces aspects sont présentés dans les Chapitre V et VI de ce mémoire.

Concernant les baleines à bosse, les estimations de diversité génétique, leur comparaison à large échelle géographique, les calculs de différences génétiques entre groupes ont mis en relief des disparités selon les sous-espèces considérées. Les fidélités géographiques, transmises de manière transgénérationnelle et représentant une culture spécifique à certains groupes sont particulièrement marqués dans le Pacifique Nord. Ces résultats seront, je l'espère, pris en compte en termes de conservation, particulièrement sous l'aspect définition des unités de gestion.

Le marsouin commun est une espèce en déplacement à l'échelle de l'Atlantique Nord depuis plusieurs années. La structuration génétique fine de l'espèce, et les variations de cette structuration à cause de changements environnementaux, ne sont pas encore élucidés totalement. Les travaux présentés dans le Chapitre IV de ce mémoire participent à cette compréhension globale nécessaire pour une bonne prise en charge de l'espèce, très impactée par exemple par les captures accidentelles. Les phoques gris sont en expansion en Atlantique Nord, et si les preuves de mobilité importante de l'espèce ne manquent pas, des différences génétiques existent entre grandes zones géographiques mais aussi entre colonies. La spécificité des colonies situées au sud de l'aire de répartition de l'espèce n'est pas connue, mais les résultats présentés dans le Chapitre V de ce mémoire mettent bien en évidence l'existence d'une spécificité alimentaire locale, et de différences génétiques à grande échelle.

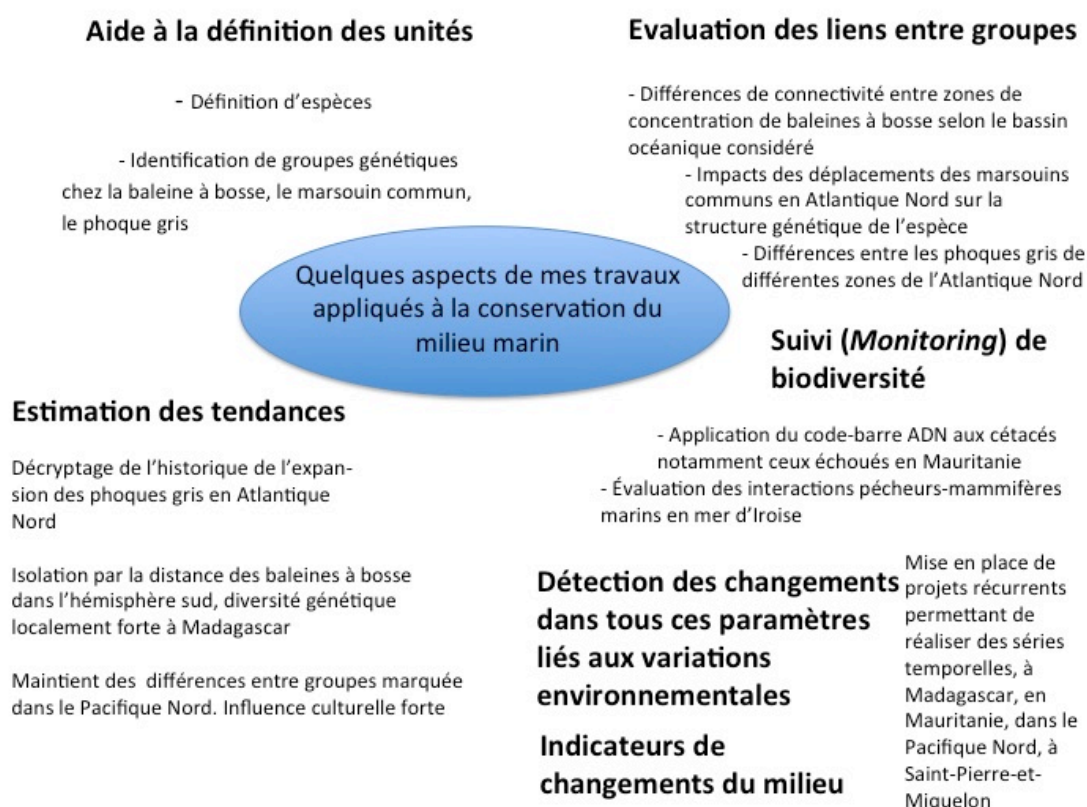


Figure 11 : Description des apports de mes travaux à la conservation du milieu marin

Chapitre III.

La baleine à bosse (*Megaptera novaeangliae*).

**Isolation par la distance et apprentissage transgénérationnel
influent la structuration génétique de l'espèce**

Les baleines à bosse forment une espèce de cétacés cosmopolite, dont le comportement est caractérisé notamment par des migrations annuelles entre aires d'alimentation estivales situées dans les hautes latitudes et zones de reproduction hivernales tropicales et subtropicales (Dawbin 1966 ; Bettridge et al. 2015). L'inversion des saisons fait que les baleines à bosse de l'hémisphère sud (HS) et de l'hémisphère nord (HN) fréquentent leurs zones de reproductions, qui peuvent être géographiquement proches, à des périodes différentes de l'année.

***Megaptera novaeangliae*, seule espèce actuelle du genre, comporte trois sous-espèces**

Historiquement, l'espèce a subi plusieurs changements taxonomiques. Le genre *Megaptera*, décrit par John Edward Gray (1846), comporte une seule espèce contemporaine, *M. novaeangliae* (Borowski, 1781). Pourtant, à l'échelle mondiale, des différences de morphologie, de coloration notamment, et de génétique distinguent les baleines à bosse du Pacifique Nord (PN), de l'Atlantique Nord (AN), et des océans de l'HS (Pacifique, Atlantique et Océan Indien). Les échanges entre ces trois populations semblent très limités. Très certainement à cause de ces variations morphologiques intra-spécifiques et de leur répartition cosmopolite, plusieurs noms d'espèces ont été attribués entre 1780 et 1897 à différents groupes de baleines à bosse (Clapham et & Mead, 1999, en listent vingt-huit différents). Mais toutes ces dénominations d'espèces ont été invalidées depuis. D'autres grands cétacés comme les rorquals communs présentent une subdivision géographique en trois bassins océaniques qui semble similaire (Archer et al. 2013).

En termes de génétique, des clades d'origine ancestrale, identifiés sur la base de polymorphismes de séquence de la région de réplication de l'ADN mitochondrial (MCR), ont été mis en évidence il y a plus de 20 ans (Baker et al. 1993 ; Palsboll et al. 1995 ; Baker et al. 1998 ; Baker & Medrano-Gonzalez, 2002). Ces clades, nommés AC, IJ et CD en fonction de la présence de fragments de restriction (Baker et al. 1990), correspondraient à des événements distincts d'expansion de l'espèce. Palsboll et al. (1995) ont identifié par exemple deux clades en AN, dont l'un est seulement présent en AN Ouest, et qui pourraient correspondre à deux vagues de colonisation (Jackson et al. 2014). Ces clades ne sont pas associés strictement aux trois bassins océaniques, mais leur répartition géographique n'est pas neutre : le clade AE est très présent dans le PN, le clade CD y étant moins fréquent et le clade IJ absent ; ce clade IJ est par contre celui retrouvé dans toute l'AN, et CD celui qui est limité à l'AN Ouest (Palsboll et

al. 1995, Baker & Medrano-Gonzalez, 2002). Les trois clades, ainsi qu'un quatrième nommé SH identifié plus récemment (Olavaria et al. 2007, Engel et al. 2007) se retrouvent dans l'hémisphère sud (HS), CD y étant le plus fréquent.

Jackson et al. (2014) ont réalisé l'étude génétique des baleines à bosse la plus complète à ce jour au niveau mondial. Cette étude repose sur une comparaison de séquences d'ADN mitochondrial (465 pb de la MCR) chez plus de 2700 baleines à bosse des trois bassins océaniques. A l'exception de trois, tous les haplotypes (n=219) sont privés pour chaque bassin océanique (seuls trois haplotypes sont partagés, un entre l'AN et l'HS et deux entre le PN et l'HS).

En se basant sur un taux de mutation de la MCR chez la baleine à bosse déterminé par des comparaisons phylogénétiques ($3,94\% \text{ bp}^{-1} \text{ Ma}^{-1}$; Jackson et al. 2009), la séparation des clades ancestraux a pu être estimée comme remontant au pléistocène, il y a approximativement 880 000 ans (Figure 12).

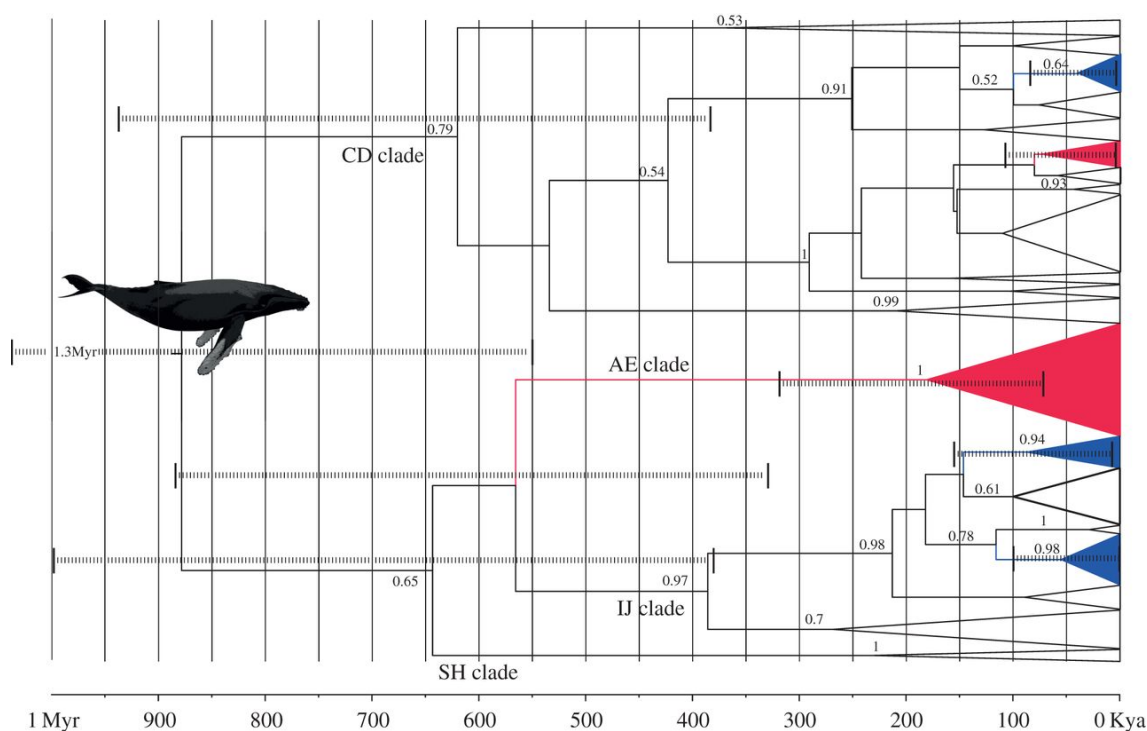


Figure 12 : Arbre phylogénétique et chronogramme des clades d'haplotypes mitochondriaux chez la baleine à bosse, reconstruits à l'aide de la méthode bayésienne implémentée dans le logiciel BEAST (Drummont & Rambaut, 2007). Figure provenant de la publication de Jackson et al. 2014, Proc . R. Soc. B. 281-20133222.

Les noms des clades (CD, IJ, AE et SH) sont représentés. Les clades identifiés dans le PN sont représentés en rouge, ceux de l'AN en bleu. Les clades de l'hémisphère sud ne sont pas colorés. Jackson et al. 2014 ont estimé que le premier clade (AE) s'est différencié dans le PN il y a approximativement 170 000 ans, et que les deux clades de l'AN se seraient différenciés il y a moins de 100 000 ans.

De tels clades ne sont pas détectés en étudiant des séquences d'ADN nucléaire (Ruegg et al. 2013, Jackson et al. 2014, Kershaw et al. 2017).

Des différenciations très fortes entre les trois bassins océaniques ont été calculées par Jackson et al. (2014), avec par exemple des valeurs de Φ_{ST} supérieures à $\Phi_{ST}=0,50$ entre le PN et l'HS, et à $\Phi_{ST}=0,15$ entre l'AN et l'HS. Le génome nucléaire de la baleine à bosse montre aussi des différenciations génétiques entre les trois bassins océaniques, plus fortes entre les deux océans de l'HN qu'entre ceux-ci et l'HS (Jackson et al. 2014).

En se basant sur ces différences génétiques marquées, Jackson et al. (2014) ont proposé que trois sous-espèces de baleines à bosse soient distinguées, *M. novaeangliae novaeangliae* correspondant à l'AN ; *M. n. kuzira* au PN et *M. n. australis* à l'HS (ces deux dernières dénominations provenant de noms d'espèces décrites, respectivement, en 1850 par Gray et en 1828 par Lesson (Clapham & Mead, 1999)). Ces trois sous-espèces sont maintenant listées en tant que telles par le « *Taxonomy Committee of the Society for Marine Mammalogy* » en charge du maintien à jour de la liste des espèces et sous-espèces de mammifères marins reconnues (Committee on Taxonomy, 2016).

En addition à ces trois sous-espèces, il faut noter qu'une population particulière, atypique, de baleines à bosse est retrouvée dans la Mer d'Arabie dans le nord de l'Océan Indien (Minton et al. 2012). Cette population très particulière est isolée génétiquement et ne migre plus (Rosenbaum et al. 2009 ; Bettridge et al. 2015 ; Kershaw et al. 2017).

L'apprentissage transgénérationnel influe sur la structuration génétique de l'espèce

Les baleines à bosse se caractérisent par leur grande mobilité individuelle. Cela est connu depuis l'époque historique de la chasse à la baleine : des harpons ou des marques métalliques identifiés, fichés dans le corps d'une baleine après une chasse partiellement manquée ou un marquage volontaire, pouvaient être retrouvés à des distances considérables dans le corps de la même baleine, à nouveau chassée par un autre navire (Olsen 1914 cité dans IWC 2011 ; Dawbin 1966 ; Guarrigue et al. 2000). A la fin des années 70, Katona et al. (1979) ont mis au point des approches de photoidentification chez les baleines à bosse en montrant que la pigmentation de la face inférieure de la nageoire caudale est spécifique de chaque individu (Katona et al. 1979 ; Katona & Whitehead, 1981). La photoidentification d'une même baleine en Antarctique et en Colombie a alors démontré que des baleines à bosse étaient capables d'effectuer des migrations annuelles de plus de 8000 km (Stone et al. 1990). Une mobilité interocéanique a aussi été mise en évidence depuis, entre l'Océan Indien et l'Atlantique Sud,

cette fois ci grâce à l'identification d'un même génotype déterminé à partir de l'ADN extrait de deux biopsies différentes, prélevées pour l'une le long des côtes de Madagascar et pour l'autre au Gabon (Pomilla & Rosenbaum, 2005). Cette mobilité exceptionnelle pour un mammifère a été confirmée dans les 30 dernières années à de nombreuses occasions, grâce à des photoidentifications, des « recaptures » génétiques, et grâce à des poses directes de balises Argos permettant de suivre le déplacement des baleines (par exemple Kennedy et al. 2013 ; 2014 ; Cerchio et al. 2016 ; Trudelle et al. 2016).

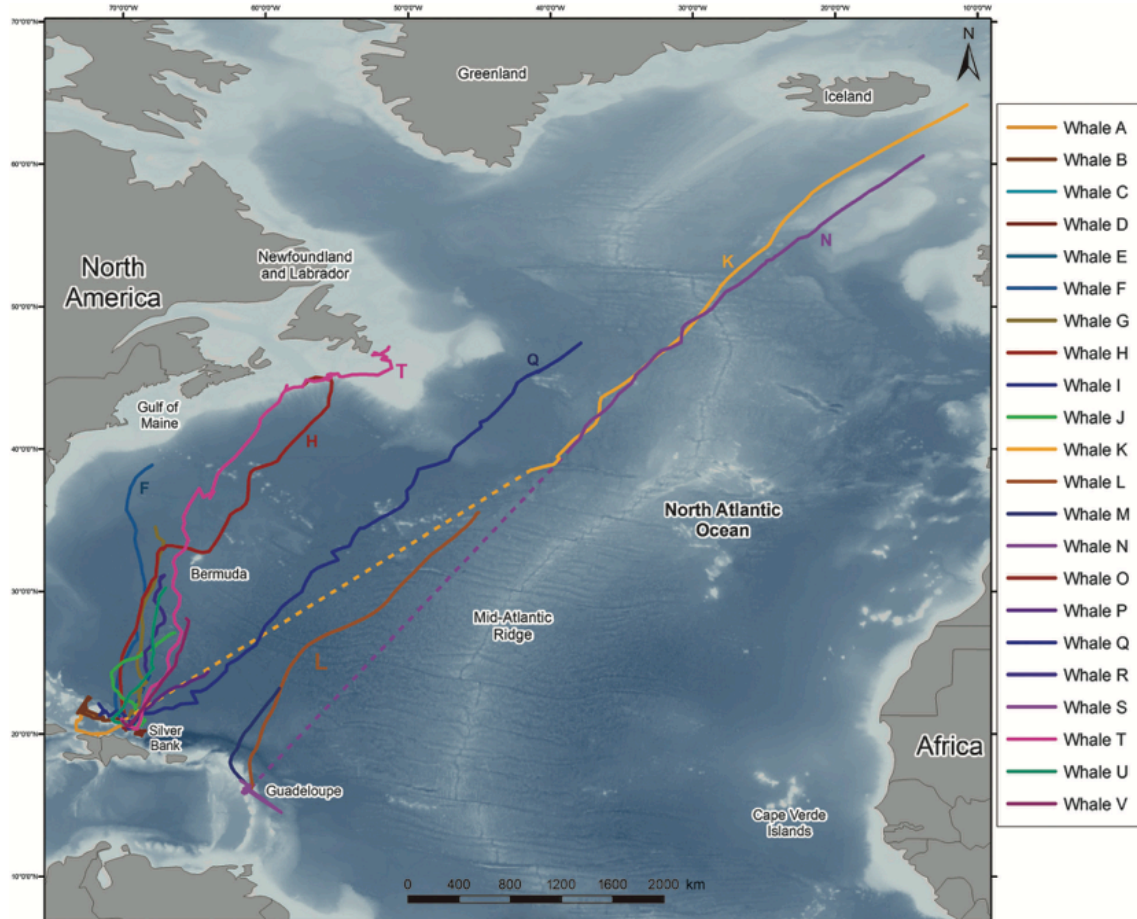


Figure 13 : Mouvement de 22 baleines à bosse suivies entre 2008 et 2012 en Atlantique Nord grâce à l'implantation de balises Argos. Figure tirée de la publication de Kennedy et al. 2014, Can. J. Zool. Le suivi des trajectoires permet de mettre en évidence les mouvements dans les zones de reproduction et de montrer des corrélations entre zones de reproduction et d'alimentation.

Comme évoqué dans le Chapitre I, cette grande capacité de déplacement des baleines à bosse, associée au fait que le milieu marin présente des barrières physiques aux flux de gènes atténuées par rapport au milieu terrestre (Palumbi, 1994) pourraient suggérer que les trois bassins océaniques abriteraient chacun une population de baleines à bosse panmictique, sans grande disparité génétique. Pourtant, toutes les études réalisées ces dernières années ont montré l'existence de groupes génétiques au sein des trois sous-espèces, à différentes échelles

géographiques et de différents ordres de grandeur en termes de génétique selon les cas considérés (voir par exemple Palsboll et al. 1995 ; Baker et al. 2013 ; Kershaw et al. 2017 ; voir aussi les parties suivantes). Des barrières physiques ou environnementales ne peuvent pas expliquer ces structurations génétiques (Palumbi 1996).

La répartition des baleines à bosse au sein de chaque bassin océanique n'est pas homogène. Cette connaissance date elle-aussi de la période de la chasse active à la baleine. Les journaux de bord des navires baleiniers permettent d'identifier des zones où les probabilités de rencontre avec les baleines à bosse étaient plus grandes (voir par exemple Reeves et al. 2001 ; Kennedy 2013). Depuis les années 60, des approches scientifiques ciblées ont permis de mieux décrypter la répartition des baleines à bosse. Des observations et comptages effectués depuis des bateaux et des avions ; des études acoustiques (les baleines à bosse émettent des sons caractéristiques) ; après les années 80, l'établissement de catalogues de photoidentification ; plus récemment la pose de balises Argos, sont autant d'approches qui ont été appliquées dans les trois bassins océaniques abritant les sous-espèces de baleines à bosse, et qui ont permis de mieux comprendre leur répartition et de faire le lien avec leur comportement migratoire (par exemple dans le PN : Calambokidis et al. 2008 ; Barlow et al. 2011 ; dans l'HS : Best et al. 1998 ; Minton et al. 2012 ; Burns et al. 2013 ; dans l'AN : Gandhillon, 2012 ; Kennedy et al. 2014 ; Stevick et al. 2016).

Dans chaque bassin océanique, des zones de nourrissage, riches en proies, accueillent des baleines à bosse pendant les périodes estivales. Ces zones peuvent être proches des côtes (notamment dans l'HN). Les proies sont des poissons de petite taille vivant en bancs (maquereaux, sardines, harengs, capelans, lançons principalement) ou du krill de la famille des *Euphausiidae* (Filatova et al. 2013 ; Bettridge et al. 2015 ; Wright et al. 2015). Les baleines à bosse semblent être des prédateurs plus ou moins opportunistes, capables de se nourrir des ressources disponibles (Filatova et al. 2013).

Les zones de reproduction représentent l'autre type de zones de concentration des baleines à bosse, fréquentées pendant l'hiver (de janvier à mai dans l'HN, de juillet à novembre dans l'HS) pour se reproduire et mettre bas dans les eaux chaudes tropicales et subtropicales. Des préférences pour des zones aux eaux peu profondes, souvent côtières semblent exister (Trudelle et al. 2016). La gestation dure à peu près 11 mois, ainsi que l'allaitement, bien que le sevrage puisse commencer au bout de 5 à 6 mois (Baker et al. 1987). Les baleines à bosse se nourrissent en été, et jeunent en hiver.

Les trajets entre les zones de nourrissage et de reproduction font souvent plusieurs milliers de kilomètres (Stone et al. 1990 ; Bettridge et al. 2015), et, c'est l'une des caractéristiques de

l'espèce, les baleines à bosse montrent un certain degré de fidélité pour les deux types de zones de concentration.

D'autres vertébrés très mobiles du milieu marin comme des requins, des tortues ou des saumons montrent aussi une fidélité pour leur lieu de naissance, (Pardini et al. 2001 ; Bowen & Karl, 2007 ; Lohmann et al. 2008 ; Jorgensen et al. 2009). Mais cette fidélité est (1) limitée au lieu de naissance et (2) génétiquement programmée. Elle s'explique par exemple chez les tortues par une empreinte du champ magnétique terrestre « enregistrée » à la naissance, et qui permettra ultérieurement de retrouver l'endroit exact (Lohmann et al. 2008 ; Putman et al. 2015). Le comportement des baleines à bosse et leur mode de reproduction offre une autre explication à la double fidélité qui s'applique potentiellement aux zones de reproduction et de nourrissage : le baleineau effectue sa première migration avec sa mère. Il y a donc un apprentissage transgénérationnel du chemin migratoire vers la zone de nourrissage, puis du retour vers la zone de reproduction si le sevrage ne se produit pas avant.

Ce comportement de fidélité géographique, transmis au fil des générations par l'apprentissage de la mère au jeune, va pouvoir provoquer des différences génétiques au sein d'une population (voir par exemple Palsboll et al. 1995 ; Baker et al. 2013 ; Bettridge et al. 2015). La fidélité des femelles semble supérieure à celle des mâles, ce qui peut se refléter dans des différences entre groupes plus marquées pour l'ADN mitochondrial, transmis uniquement par la mère, que pour l'ADN nucléaire, résultat d'un brassage génétique entre les deux parents (Baker et al. 2013). L'existence dans un même bassin océanique de plusieurs zones de reproduction et de plusieurs zones d'alimentation peut amener à des situations complexes. Des baleines à bosse provenant de zones de reproduction différentes pourront posséder une fidélité pour une même zone d'alimentation, et à l'opposé, des baleines d'une même zone de reproduction pourront avoir des zones d'alimentation différentes. Les chemins migratoires de différents individus pourront dès lors très bien se croiser, et la caractérisation génétique des différents groupes devenir particulièrement complexe. La « force » de la fidélité pour les zones de reproduction et d'alimentation devra aussi pouvoir être estimée, puisque des exemples montrent que des mêmes individus peuvent aussi fréquenter des zones de reproduction différentes dans un même bassin océanique, allant ainsi à l'encontre de cette notion de fidélité (Darling and Cerchio, 1993 ; Pomilla & Rosenbaum, 2005 ; Calambokidis et al. 2008 ; Stevick et al. 2016).

Mon travail sur les baleines à bosse porte sur trois zones géographiques distinctes, dans le cadre de trois projets collaboratifs, menés à Madagascar, dans l'ouest du Pacifique Nord et à Saint-Pierre-et-Miquelon. Dans chacun de ces cas, mon travail a pour but (1) de caractériser

génétiqnement les baleines à bosse de chaque site étudié, (2) de comparer chaque échantillonnage à grande échelle géographique afin de mieux comprendre les facteurs pouvant influencer la structuration génétique de l'espèce à l'échelle d'un bassin océanique, et d'estimer les degrés de fidélité pour chacun des sites étudiés, (3) de rechercher, lorsque l'échantillonnage le permet, d'éventuelles variations interannuelles pouvant refléter des changements environnementaux et (4) de mesurer l'importance des compréhensions nouvelles obtenues en termes de conservation de l'espèce et du milieu marin en général.

Les trois parties suivantes décrivent plus précisément chacun des trois projets et les résultats déjà obtenus pour chacun d'entre eux.

Madagascar, une zone de reproduction des baleines à bosse ouverte sur tout l'hémisphère sud

Dans l'hémisphère sud (HS), sept stocks (nommées de A à G), dont certains sont divisés en plusieurs sous-stocks, ont été définis par la commission baleinière internationale (*International Whaling Commission*, IWC) sur la base d'aires de reproduction caractérisées et prenant en compte des aires d'alimentation en Antarctique et des corridors possibles de migration (Figure 14 ; IWC 2011). Un huitième stock, nommé stock X, est constitué par une population séparée et atypique, ne migrant plus, localisée dans le nord de l'Océan Indien (Minton et al. 2012).

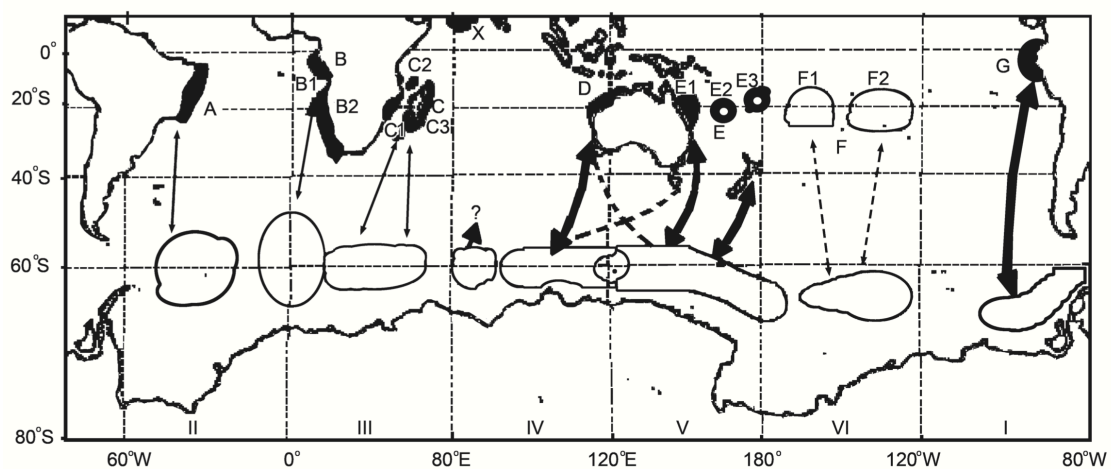


Figure 14 : Carte établie par la commission baleinière internationale montrant la répartition des 7 stocks hypothétiques correspondant à des zones de reproduction de l'HS (extraite de IWC, 2011).

Les six zones d'alimentation sont numérotées de I à VI, et les connexions sont montrées par des traits pointillés lorsqu'il s'agit d'hypothèses, et continus lorsque des échanges ont été démontrés (le nombre d'échanges démontrés est corrélé à l'épaisseur du trait).

Les stocks proposés correspondent à des zones de concentration hivernale de baleines à bosse, et se situent le long des côtes du Brésil (stock A), de l'Afrique de l'Ouest (Stock B), de l'Afrique de l'Est et de Madagascar (Stock C), de l'ouest de l'Australie (Stock D), de l'est de l'Australie (Stock E), de la Polynésie (Stock F) et de la Colombie (Stock G). Les six zones d'alimentation définies correspondent à six zones antarctiques et subantarctiques de chasse à la baleine (Mackintosh, 1942). Plusieurs voies migratoires ont été identifiées entre les zones de reproduction de l'HS et les zones d'alimentation les plus proches, que ce soit à l'aide de marques en acier (Mackintosh 1942 ; Dawbin 1966) ou, plus récemment, de photoidentification, de marquage génétique ou de balises Argos (Stone et al. 1990 ; Stevick et al. 2014 ; Cerchio et al. 2016 ; Trudelle et al. 2016). Néanmoins, les liens avec les zones d'alimentation ne sont pas totalement éclaircis (Bettridge et al. 2015), à l'exemple de celles

correspondant à l'ouest du continent Africain (stock B de l'IWC, Figure 14) où des baleines à bosse sont retrouvées jusqu'au Ghana et en Guinée au Nord (Van Waerebeek et al. 2009 ; Bamy et al. 2010 ; Bettridge et al. 2015) dans une période de l'année qui correspond à l'hiver austral. Certains échanges ont par contre été démontrés, comme entre les baleines à bosse du Brésil et une zone d'alimentation située autour de la Georgie du Sud et des Iles Sandwiches du Sud (zone notée II sur la Figure 14, Engel & Martin 2009).

Les eaux de Madagascar abritent le sous-stock C3 de baleines à bosse dans l'HS

Le sud ouest de l'Océan Indien est une zone importante pour l'espèce, des concentrations de baleines à bosse viennent s'y reproduire et mettre bas. L'IWC a identifié cette zone globale comme correspondant au stock C, mais la complexité notamment des chemins migratoires proposés (Best et al. 1998) a amené la création de 3 sous-stocks (Figure 15) : le stock C1 correspondant aux eaux côtières du Mozambique jusqu'au Kenya au Nord, le stock C2 correspondant au canal du Mozambique et aux Comores (Kiska et al. 2010), et le C3 à Madagascar (Rosenbaum et al. 1997 ; Best et al. 1998 ; IWC 2011 ; Cerchio et al. 2016 ; Trudelle et al. 2016). Une quatrième zone de concentration pourrait se situer vers les Mascareignes (Dulau-Drouot et al. 2008). Des déplacements individuels entre ces quatre zones de reproduction ont été mis en évidence (par exemple IWC 2011 ; Fossette et al. 2014 ; Cerchio et al. 2016 ; Trudelle et al. 2016 ; Dulau et al. 2017), et leurs degrés de connectivité et d'échanges restent à établir, notamment par des approches de génétique.

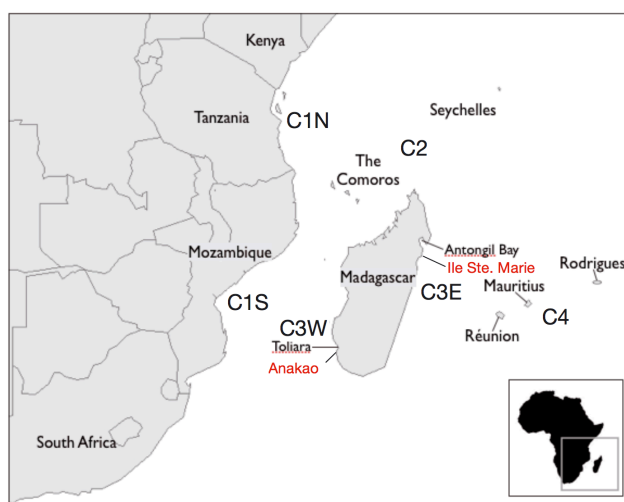


Figure 15 : Répartition des sous-stocks proposés par la commission baleinière internationale dans le Sud Ouest de l'Océan Indien (carte tirée de Cerchio et al. 2016).

Sur cette carte, les stocks C1 et C3 sont séparés chacun en deux régions, et un 4^{ème} sous stock hypothétique est proposé (C4, qui correspondrait à Maurice et à la Réunion).

Une baleine à bosse, marquée par une balise Argos à Madagascar en 2013 a été suivie jusqu'aux Iles Crozet (Cerchio et al. 2016 ; Trudelle et al. 2016). Une même destination a été identifiée pour une baleine à bosse marquée aux Comores (Fossette et al. 2014), sans qu'il ne puisse être déterminé si elle représentait la fin de la migration vers la zone d'alimentation, ou seulement une étape (Fossette et al. 2014 ; Cerchio et al. 2016 ; Trudelle et al. 2016). Les Iles Crozet, ou une éventuelle destination finale située plus au sud, se situent dans la zone III d'alimentation de l'IWC (Figure 14).

Les polymorphismes de l'ADN mitochondrial des baleines à bosse de l'Hémisphère Sud, étudiés depuis une dizaine d'année, ont permis de décrypter partiellement les liens et différences entre zones de reproduction

La fidélité plus ou moins marquée des baleines à bosse pour leurs aires d'alimentation et de reproduction, transmise entre générations par l'apprentissage, se traduit par des différences génétiques entre groupes de baleines à bosse (Baker et al. 2013). Ces différences proviennent des lignées maternelles, au sein desquelles peuvent se transmettre parallèlement ADN mitochondrial et fidélité à un site. Les études génétiques des baleines à bosse dans l'HS se sont au départ concentrées sur l'ADN mitochondrial, afin de détecter d'éventuelles structures de populations liées à des fidélités pour des zones de reproduction particulières.

Olavarria et al. (2007) ont étudié plus de 1100 baleines à bosse échantillonnées entre 1990 et 2002 de l'ouest de l'Australie jusqu'en Colombie, recouvrant les stocks D, E, F et G définis par l'IWC (Figure 14). Six zones de concentration hivernales correspondant potentiellement à six zones de reproduction ont été définies, l'ouest de l'Australie, la Nouvelle Calédonie, les Iles Tonga, les Iles Cook, la Polynésie Française et la Colombie (donc un découpage ne correspondant que partiellement aux stocks de l'IWC). La détermination du sexe des baleines dont provenait chaque échantillon a montré une large majorité de mâles (deux tiers de mâles pour un tiers de femelles). La région de contrôle (MCR) de l'ADN mitochondrial a été séquencée sur 470 pb, et les résultats comparés entre les différentes zones géographiques. La diversité génétique (mesurée aussi bien par la diversité haplotypique (h) que nucléotidique (π)) varie selon les zones. La Colombie ($h=0,900$), la Polynésie Française ($h=0,913$) et les Iles Cook ($h=0,923$) présentent les diversités les plus faibles, les plus fortes étant rencontrées en Nouvelle Calédonie ($h=0,974$), en Australie ($h=0,970$) et dans les Iles Tonga ($h=0,962$). Une faible proportion d'haplotypes est partagée entre plusieurs zones géographiques (2 haplotypes seulement sont retrouvés dans les 6 zones), alors que plus de 50% sont privés (retrouvés dans

une seule zone géographique). Les clades ancestraux CD et IJ ont été retrouvés en majorité, le clade AE en minorité (deux haplotypes retrouvés seulement en Colombie), confirmant ainsi leur répartition géographique déjà connue (Baker & Medrano-Gonzalez 2002). Un quatrième clade a été caractérisé et nommé SH (pour « *Southern Hemisphere* ») (Olavarria et al. 2007 ; Engel et al. 2008). Les tests de différenciation génétique se sont montrés significatifs entre la majorité des zones géographiques (Olavarria et al. 2007). Ceci est particulièrement marqué pour la Colombie, qui présente des valeurs de $F_{ST} > 0.04$ et de $\Phi_{ST} > 0.05$ pour toutes les comparaisons avec d'autres zones de reproduction. La Polynésie Française et les Iles Cook montrent elles aussi de fortes valeurs de différenciation avec le reste des zones. Olavarria et al. (2007) notent que, à part le cas de la Colombie et de la Polynésie Française, il semble que la distance génétique augmente avec la distance géographique entre les zones. Il faut noter que la zone identifiée comme accueillant le stock G couvre plus de 3000 km de côtes (Félix et al. 2012). Une certaine hétérogénéité de cette zone a d'ailleurs été suggérée depuis au vu de polymorphismes de l'ADN mitochondrial (Félix et al. 2012).

Les baleines à bosse du stock A, identifiées le long des côtes du Brésil (IWC 2011 ; Figure 14), ont été caractérisées génétiquement par Engel et al. (2008). Le ratio mâles/femelles est approximativement égal à 1/1, ce qui est une particularité de cette zone de reproduction (Cypriano-Souza et al. 2010). La MCR (400 pb séquencées) présente une diversité haplotypique forte ($h=0,972$) comparable à celle de l'ouest de l'Australie et largement supérieure à celle de la Colombie. Les quatre clades (CD, IJ, SH et AE) sont retrouvés dans les proportions attendues (Baker & Medrano-Gonzales 2002 ; Olavarria et al. 2007). Lors de cette étude, 77 baleines à bosse ont aussi été échantillonnées près de la Péninsule Antarctique dans les zones d'alimentation antarctiques nommées I et II par l'IWC (Figure 14). La diversité haplotypique calculée dans ces deux zones d'alimentation est faible, comparable à celle de la Colombie ($h_{zoneI}=0,913$; $h_{zoneII}=0,916$). Les tests de différenciation ne montrent pas de disparité entre les deux zones d'alimentation, ni entre les zones d'alimentation et la Colombie, mais mettent par contre en évidence une différence entre les deux zones d'alimentation et le Brésil ($F_{ST} > 0.05$, et $\Phi_{ST} > 0.03$).

Les polymorphismes de l'ADN mitochondrial des baleines à bosse des stocks B et C de l'IWC ont été étudiés par Rosenbaum et al. (2009). Presque 500pb de la MCR ont été séquencées à partir de 1527 biopsies réalisées entre 1991 et 2004 au Brésil, au Gabon, à l'est et à l'ouest de l'Afrique du Sud, en Mozambique, à Mayotte et aux Comores, ainsi qu'à Madagascar. Cette étude avait pour but d'estimer la différence génétique entre les stocks B et C, mais aussi entre les sous-stocks B1 et B2, et C1, C2 et C3. Les échantillons ont donc été regroupés en zones

géographiques correspondant aux sous-stocks de l'IWC (2011, Figure 14). Trente-huit biopsies avaient aussi été prélevées dans la population sédentaire du nord de l'Océan Indien (stock X, Minton et al. 2012). La diversité génétique calculée était forte ($h > 0,974$) pour les stocks A, B et C, à l'opposé de celle du Nord de l'Océan Indien ($h = 0,69$). Les comparaisons entre les baleines à bosse de l'Océan Indien et celles de toutes les autres zones échantillonnées montraient des différences significatives ($F_{ST} > 0.11$ et $\Phi_{ST} > 0.079$ pour toutes les comparaisons). Aux niveaux des comparaisons entre stocks, seules les valeurs de F_{ST} globales (entre les 4 zones) ont été calculées (Rosenbaum et al. 2009). La forte différence entre le nord de l'Océan Indien et les trois autres zones géographiques à elle seule doit suffire à rendre le calcul global significatif, ce qui masque potentiellement les différences - ou absence de différence - entre les trois autres zones. Les différences entre sous-stocks ont été évaluées par le calcul, entre toutes les combinaisons possibles, des indices F_{ST} et Φ_{ST} . Rosenbaum et al. (2009) n'ont pas appliqué de correction de Bonferroni pour tests multiples au seuil de significativité. Les valeurs de Φ_{ST} ne montrent de différence significative que entre le sous-stock B1 d'un côté et le stock A et les sous-stocks C1 et C3. Les valeurs de F_{ST} par contre sont plus souvent significatives, et seuls C2 et C3 ne montrent pas de différence entre eux.

Les baleines à bosse des façades ouest et est de l'Australie (stock D et E respectivement) ont été comparées par Schmitt et al. (2014a) et par Anderson (2013) : des différences génétiques faibles ont été retrouvées entre les deux groupes, de valeur largement inférieure à ce que suggérerait la forte séparation géographique des deux zones de reproduction (Schmitt et al. 2014a).

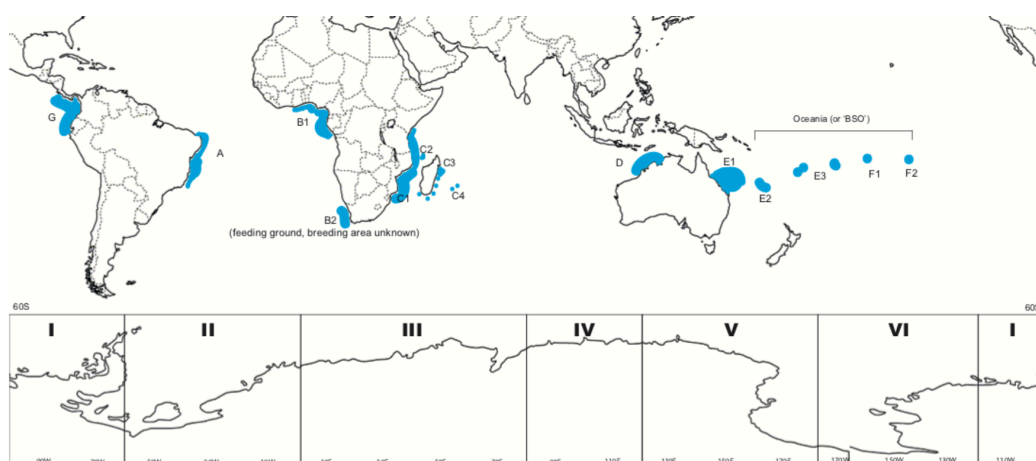


Figure 16 : Localisation des zones de reproduction des baleines à bosse dans l'hémisphère sud d'après Jackson et al. (2015). Les lettres de A à G correspondent aux stocks définis par l'IWC (2011). B1, B2, C1, C2, C3 et C4 sont les sous-stocks définis par l'IWC (2011). Les stocks E et F sont divisés en sous-stocks sur la base principalement des résultats d'Olavarria et al. (2007). Carte extraite de Jackson et al. (2015).

Rosenbaum et al. (2017) ont essayé de regrouper ces études menées séparément. Les polymorphismes de la MCR (311 pb) de plus de 3000 baleines à bosse échantillonnées entre 1991 et 2004 dans toutes les zones de reproduction identifiées de l'HS ont été analysés simultanément (Figure 16). Cette étude confirme les variations déjà connues de diversité haplotypique entre zones de reproduction (la population du Nord de l'Océan Indien présentant la diversité haplotypique la plus faible, suivie de la Colombie et de la Polynésie Française). Les diversités haplotypiques les plus fortes sont rencontrées dans les zones de reproduction du Brésil, des côtes africaines (est et ouest) et de l'ouest de l'Australie. Madagascar, qui correspond au stock C3 de l'IWC (Figure 15) montre la diversité haplotypique la plus forte de l'HS (Rosenbaum et al. 2017). Les comparaisons deux à deux entre stocks tels que définis par l'IWC révèlent globalement des valeurs de différenciations (F_{ST} et Φ_{ST}) significatives, faibles pour les différences entre les stocks A, B, C et D, très fortes pour les différences entre le Nord de l'Océan Indien et toutes les autres zones, et marquées entre la Colombie, la Polynésie et tous les autres stocks (Rosenbaum et al. 2017), confirmant ainsi les résultats déjà obtenus précédemment (Olavarria et al. 2007 ; Engel et al. 2008 ; Rosenbaum et al. 2009). Pour les comparaisons prenant en compte les subdivisions entre sous-stocks, les deux indices livrent des résultats contrastés. Les valeurs de F_{ST} , calculées sur la base des répartitions d'haplotypes, sont faibles mais significatives pour toutes les comparaisons. Les valeurs de Φ_{ST} , calculées sur la base des différences nucléotidiques, ne sont significatives ni, globalement, entre les 4 sous-stocks B2, C1, C2 et C3 ni entre le stock A et le sous-stock B1 (Rosenbaum et al. 2017), confirmant les résultats déjà connus (Rosenbaum et al. 2009).

Il existe donc clairement des structurations génétiques entre zones de reproduction dans l'HS, mais les niveaux de différences génétiques varient selon les cas (le Nord de l'Océan Indien tout d'abord, la Colombie, la Polynésie Française et les Iles Cook ensuite abritant les groupes les plus différents). Une certaine fidélité des baleines à bosse dans l'Hémisphère Sud pour leurs zones de reproduction est donc bien mise en évidence, variable selon les zones considérées.

L'analyse du génome nucléaire révèle un phénomène d'isolation par la distance (IBD, « Isolation By Distance ») à l'échelle de l'Hémisphère Sud

Récemment, Kershaw et al. (2017) ont analysé les polymorphismes de l'ADN nucléaire (10 loci contenant des microsatellites ont été étudiés) chez plus de 3000 baleines à bosse biopsiées

dans les zones de reproduction du Brésil, de l'est et de l'ouest du continent Africain, de Madagascar, des Comores, des Mascareignes et du nord de l'Océan Indien. Tout comme pour l'ADN mitochondrial, la population sédentaire du nord de l'Océan Indien est la plus différenciée de toutes les autres (F_{ST} tous significatifs). Le Brésil, ainsi que le sous-stock B1, montrent un certain degré de différenciation entre eux et avec les autres sous-stocks étudiés, mais difficilement reproductibles selon les indices utilisés, F_{ST} ou D de Jost (Jost, 2008 ; Kershaw et al. 2017). L'approche Bayésienne, implémentée dans le programme STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) et visant à identifier des populations en minimisant les écarts à l'équilibre de Hardy Weinberg, n'a pu détecter de groupes dans l'échantillonnage que grâce à l'apport de « locpriors » géographiques (Hubisz et al. 2009). Cette approche semble alors privilégier l'existence de trois groupes génétiques, le premier correspondant au stock A et au sous stock B1, le deuxième comprenant les sous-stocks B2, C1, C2 et C3, le troisième au Nord de l'Océan Indien (Kershaw et al. 2017). Kershaw et al. (2017) ont aussi recherché un lien entre distance géographique et distance génétique. Ce lien existe, et, à l'échelle de la zone géographique étudiée, il apparaît que la distance semble être le facteur majeur ayant déterminé la différenciation génétique entre groupes, comme cela a été identifié chez d'autres espèces de cétacés (par exemple Fontaine et al. 2007). A une échelle plus locale, les auteurs émettent l'hypothèse que la fidélité aux sites de reproduction serait prépondérante mais pas exclusive, et qu'elle serait plus marquée chez les femelles que chez les mâles (Kershaw et al. 2017).

Les polymorphismes de dix loci contenant des microsatellites ont aussi été comparés entre des baleines à bosse de l'est et de l'ouest de l'Australie (Schmitt et al. 2014a), révélant une différenciation significative mais très modérée correspondant bien aux résultats obtenus plus à l'ouest par Kershaw et al. (2017). Cypriano-Souza et al. (2017) ont confirmé la différence entre la Colombie et le Brésil à l'aide de marqueurs nucléaires (16 loci contenant des microsatellites analysés).

Les zones d'alimentation sont encore à préciser dans l'Hémisphère Sud, et le degré de fidélité des baleines à bosse à estimer

Peu d'études génétiques ont porté sur les zones d'alimentation de l'HS. Les six zones d'alimentation ont été définies sur la base des données de chasse, de marquage à l'aide de « marques » en acier (« *discovery tags* », Mackintosh 1942 ; Dawbin 1966), et confirmées par des observations de photoidentification et de poses de balises Argos (Stone et al. 1990 ; Stevick et al. 2014 ; Cerchio et al. 2016 ; Trudelle et al. 2016). Les zones d'alimentation de

l'HS se répartissent tout autour du pôle à des latitudes plus ou moins élevées, avec des barrières continentales réduites par rapport à l'hémisphère nord. Une hypothèse actuelle est que les « barrières » (environnementales ou liées à la fidélité) seraient moins fortes dans l'HS que dans l'hémisphère nord. Une illustration spectaculaire de la grande mobilité des baleines à bosse dans l'HS est donnée par l'étude de Robbins et al. (2011), qui ont utilisé des données historiques (des marques en acier) et de la photoidentification pour rechercher, dans les zones d'alimentation de l'HS, des baleines ayant été identifiées dans la zone de reproduction des Samoa et des Iles Cook. Six recaptures ont été réalisées dans les zones d'alimentation I, V et VI de l'IWC (2011, Figure 14). Notamment, un individu a été identifié en 2002 dans la zone I le long de la péninsule antarctique, puis en 2005 dans les Samoa, et enfin à nouveau le long de la péninsule Antarctique en 2009 (Robins et al. 2011). La distance entre les Samoa et la péninsule antarctique est au minimum de 9400km, soit un trajet aller retour de 18800 km, et ce chemin migratoire ne fait pas partie des voies hypothétiques de l'IWC (2011, Figure 14).

En étudiant des polymorphismes de l'ADN nucléaire et mitochondrial, Schmitt et al. (2014b) ont pu montrer une correspondance entre les baleines à bosse de la zone d'alimentation V et les zones de reproduction de l'est de l'Australie et de Nouvelle Calédonie. Amaral et al. (2016) ont étudié 399 échantillons de baleines à bosse prélevés dans les zones arctiques et subantarctiques correspondant aux aires d'alimentation définies par l'IWC. Les polymorphismes de l'ADN mitochondrial et nucléaire montrent que la zone I (les échantillons de cette zone proviennent essentiellement de la péninsule antarctique dans cette étude) semble se distinguer de toutes les autres zones à l'exception de la zone II (Amaral et al. 2016), confirmant ainsi les résultats de Engel et al. (2008). L'analyse sans *a priori* par le logiciel STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) met par contre en évidence une différence entre la zone 3 et les autres zones d'alimentation (Amaral et al. 2016). Cypriano-Souza et al. (2017) ont bien confirmé le lien entre la zone de reproduction de la Colombie et la péninsule Antarctique, à l'aide de marqueurs mitochondriaux et nucléaires. Beaucoup reste donc encore à comprendre dans l'HS en termes de chemins migratoires entre zones d'alimentation et de reproduction et de degré de fidélité, notamment géographique, des baleines à bosse.

BAOBAB et GENERATION, deux programmes pluridisciplinaires d'étude des baleines à bosse de Madagascar

Comme décrit précédemment, les eaux de Madagascar accueillent chaque année un nombre important de baleines à bosse pendant leur période d'accouplement et de mise bas. Elles se

concentrent autour de certaines zones, notamment coté est de Madagascar, dans le canal de l’Ile Sainte-Marie et la baie d’Antongil (Rosenbaum et al. 1997 ; Cerchio et al. 2009). Peu de recaptures par photoidentification y sont réalisées (Cerchio et al. 2016), ce qui témoigne d’une abondance assez importante, estimée à presque 9000 individus en 2015 (Jackson et al. 2015). Quelques études ont porté sur les baleines à bosse de l’est de Madagascar (Rosenbaum et al. 1997 ; Razafindrakoto et al. 2001 ; Erst & Rosenbaum 2003 ; Cerchio et al. 2009), mais très peu de données étaient disponibles sur leur utilisation de l’habitat, leur comportement pendant leur présence en zone de reproduction (et notamment leur mobilité dans le sud ouest de l’Océan Indien entre les différentes zones correspondant aux sous-stocks C1-C4 de l’IWC (2011)). Aucune étude génétique n’avait ciblé spécifiquement les baleines à bosse de Madagascar (même si des biopsies avaient déjà été prélevées dans les eaux de Madagascar et incluses dans des études globales (Rosenbaum et al. 2009 ; 2017 ; Kershaw et al. 2017)).

Pour combler ces manques de connaissance, deux programmes de recherche pluridisciplinaires successifs ont été initiés et portés par le Professeur Olivier Adam (Institut des Neurosciences Paris-Saclay (Neuro-PSI), UMR 9197, CNRS Université Paris Sud), spécialiste des études d’acoustique chez les cétacés, en partenariat avec l’association Malgache Cétamada. Cétamada organise depuis plusieurs années des campagnes de terrain d’observation, de photo-identification et de comptage des baleines à bosse dans le canal de l’Ile Sainte-Marie. Les deux programmes de recherche, appelés « *BAOBAB* » (*Balises et acoustique pour les observations des baleines à bosse de Madagascar*) et « *GENERATION* » ont été supportés financièrement par la Fondation TOTAL. Ils comprennent des volets d’étude acoustique, des poses de balises Argos et des campagnes récurrentes de prises de biopsies et de prélèvements de squames. Deux articles décrivant les résultats des poses de balises Argos ont été publiés (Cerchio et al. 2016 ; Trudelle et al. 2016). Les résultats mettent en évidence la grande mobilité des baleines à bosse entre les sous-stocks de la zone C (Cerchio et al. 2016), corroborant ainsi d’autres études menées à la Réunion (stock C4, Duleau et al. 2017) et aux Comores (Fossette et al. 2014). Les habitats préférentiels des baleines à bosse, et leur utilisation préférentielle d’eaux peu profondes (<200) dans les zones côtières ont aussi pu être précisés (Trudelle et al. 2016).

Depuis 2012, et dans le cadre de ces programmes BAOBAB puis GENERATION, une centaine de biopsies sont prélevées chaque année. Autour de 500 biopsies ont donc été collectées au total. Je suis en charge du volet génétique de ces deux programmes. Le but de ces travaux est

- de caractériser la diversité génétique des baleines à bosse fréquentant les eaux de l'île Sainte-Marie pendant la saison de reproduction,
- de faire le lien avec d'autres études génétiques menées sur les baleines à bosse dans l'HS, et estimer le degré d'échanges entre les différentes zones de reproduction,
- d'évaluer les possibles variations inter-annuelles.

Les résultats obtenus jusqu'à présent sont décrits dans les quatres paragraphes suivants, l'étude se poursuit actuellement.

Les baleines à bosse de Madagascar présentent une très forte diversité génétique, et l'ADN mitochondrial permet de mettre en évidence des clades

Cent-soixante-sept biopsies et squames de baleines à bosse prélevées en 2012 (n=67) et en 2013 (n=100) ont été étudiés pour l'instant. Les génotypes de microsatellites ont montré que 12 baleines à bosse avaient été échantillonnées deux fois chacune (n=7 en 2012, n=5 en 2013), ces doublons ont donc été retirés. Les résultats de l'analyse actuelle portent donc sur 155 baleines à bosse différentes. Aucune « recapture » n'a été réalisée entre les deux années successives. Le sexage de chaque individu a été réalisé en amplifiant dans une même réaction PCR un fragment de 225pb environ du gène *sry*, présent uniquement sur le chromosome X, et d'un fragment de 445pb environ des gènes *zfx/zfy*, présents respectivement sur les deux chromosomes X et Y, selon un protocole décrit dans les publications 1 et 3. La présence du fragment de 445 pb montre la réussite de l'amplification, et celle du fragment de 225 pb reflète le présence du chromosome Y dans le milieu réactionnel signifiant que l'ADN utilisé provient d'un mâle (Figure 17). Le ratio mâles/femelles déterminé est en faveur des mâles (45 mâles pour 15 femelles en 2012 et 59 mâles pour 36 femelles en 2013).

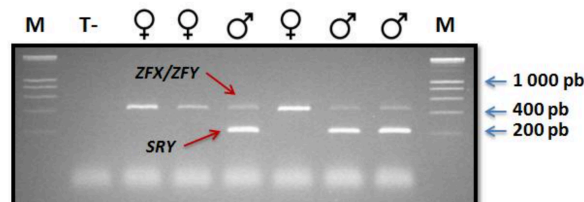


Figure 17. L'ADN a été extrait de 6 biopsies différentes de baleines à bosse réalisées en 2012, puis des fragments des gènes *sry* et *zfx/zfy* ont été amplifiés en parallèle selon les protocoles décrits dans les publications 1 et 3. Le fragment à 445pb démontre la réussite de l'amplification, le fragment à 225 pb reflétant un ADN extrait à partir d'un mâle. Figure tirée du rapport de Master 2 de Loriane Mendez, 2013.

Locus	Gamme de taille des allèles	AR	2012		2013		
			H_E	H_O	AR	H_E	H_O
GT023	97 - 119	7	0.7963	0.833	8.23	0.798	0.797
GT211	193 - 213	9	0.8231	0.800	9.27	0.815	0.797
GT575	140 - 180	12	0.8286	0.883	12.8	0.837	0.840
Ev96	187 - 211	10	0.8651	0.900	11.5	0.848	0.829
Ev37	189 - 223	15	0.9132	0.900	16.0	0.912	0.925
GATA028	150 - 206	11	0.6286	0.683	8.42	0.426	0.383
GATA417	185 - 281	15	0.9139	0.900	14.2	0.902	0.925
GATA053	232 - 280	8	0.8104	0.783	9.58	0.815	0.797
Moyenne			0.8224	0.835		0.794	0.787

Tableau 1 : Statistiques descriptives des 8 loci contenant des microsatellites analysés chez les baleines à bosse biopsiées en 2012 et 2013 à Madagascar.

AR : richesse allélique, H_E : hétérozygotie attendue, H_O hétérozygotie observée.

Les polymorphismes de 8 loci contenant des microsatellites (5 formés de répétitions de dinucléotides GT023, GT211, GT575 Bérubé et al. (2000) ; EV96 et EV37 Valsecchi et al. (1997) ; et 3 tétranucléotides GATA053, GATA417, GATA028 Palsboll et al. (1997b)) ont été analysés selon les protocoles décrits dans la publication 1. Tous les loci sont polymorphes, et montrent, selon les loci, entre 9 et 17 allèles (Tableau 1). Les analyses ont été menées de manière similaire à celles décrites dans les publications 1 et 4. Aucune fréquence d'allèle nul significative n'a été calculée. Aucun écart significatif à l'équilibre de Hardy-Weinberg n'est détecté, tous les F_{IS} par locus et pour l'ensemble des loci sont non significatifs ($F_{IS\ 2012}$ global = -0,007, $F_{IS\ 2013}$ global = 0,015).

L'échantillonnage a alors été réparti en différents groupes, en fonction de l'année du prélèvement et en fonction du sexe. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les mâles et les femelles, ni entre 2012 et 2013 par le calcul d'indice de fixation F_{ST} . Néanmoins, il faut remarquer que les valeurs d'hétérozygotie observée et attendue sont inférieures en 2013 à celles de 2012 (Tableau 1). L'approche sans *a priori* implémentée dans le logiciel STRUCTURE n'a pas pu mettre en évidence de sous-groupe génétique au sein de l'échantillonnage (Figure 18).

Une séquence de 640 pb de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial a été déterminée chez 142 baleines à bosse échantillonnées à Madagascar ($n_{2012}=60$ et $n_{2013}=82$), selon le protocole décrit dans la publication 1. Cinquante-sept haplotypes ont été définis et nommés de Mada1 à Mada57. Les diversités nucléotidiques et haplotypiques sont fortes ($H_d=0,976$ et $\pi=0,015$). Tout comme pour le génome nucléaire, la définition de sous-groupes sur la base du

sexe ou de l'année d'échantillonnage n'a pas permis de révéler des différences significatives en termes de distribution d'haplotypes mitochondriaux (toutes les valeurs de F_{ST} et de Φ_{ST} calculées entre les mâles et les femelles et entre les années d'échantillonnage sont non significatives). Par contre, l'analyse des liens entre haplotypes grâce à la construction d'arbres phylogéniques met en évidence la présence de plusieurs haplogroupes dans notre échantillonnage (Figure 19).

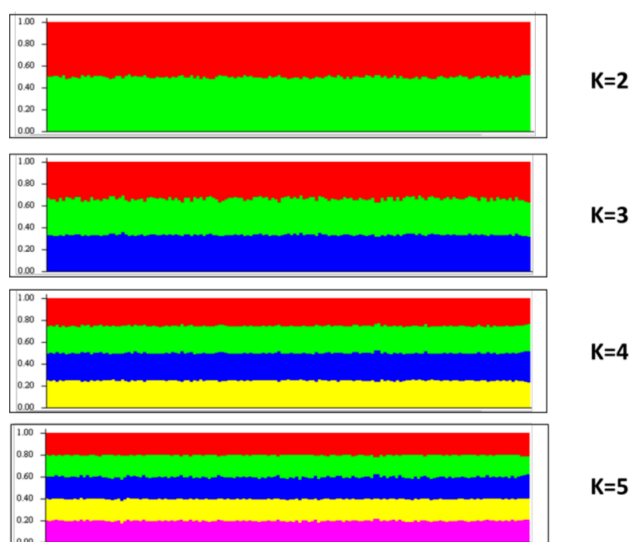


Figure 18 : Représentation graphique de la probabilité pour chaque individu d'appartenir à chacun des K groupes déterminés sur la base des polymorphismes de 8 loci contenant des microsatellites.

L'analyse est menée à l'aide du logiciel STRUCTURE pour des valeurs de K allant de 2 à 5. Les individus sont représentés sur l'axe des abscisses et les probabilités sur l'axe des ordonnées. Aucun groupe génétique particulier n'est mis en évidence ici. Figure provenant du rapport de Master 2 de Claire Bonneville, 2014.

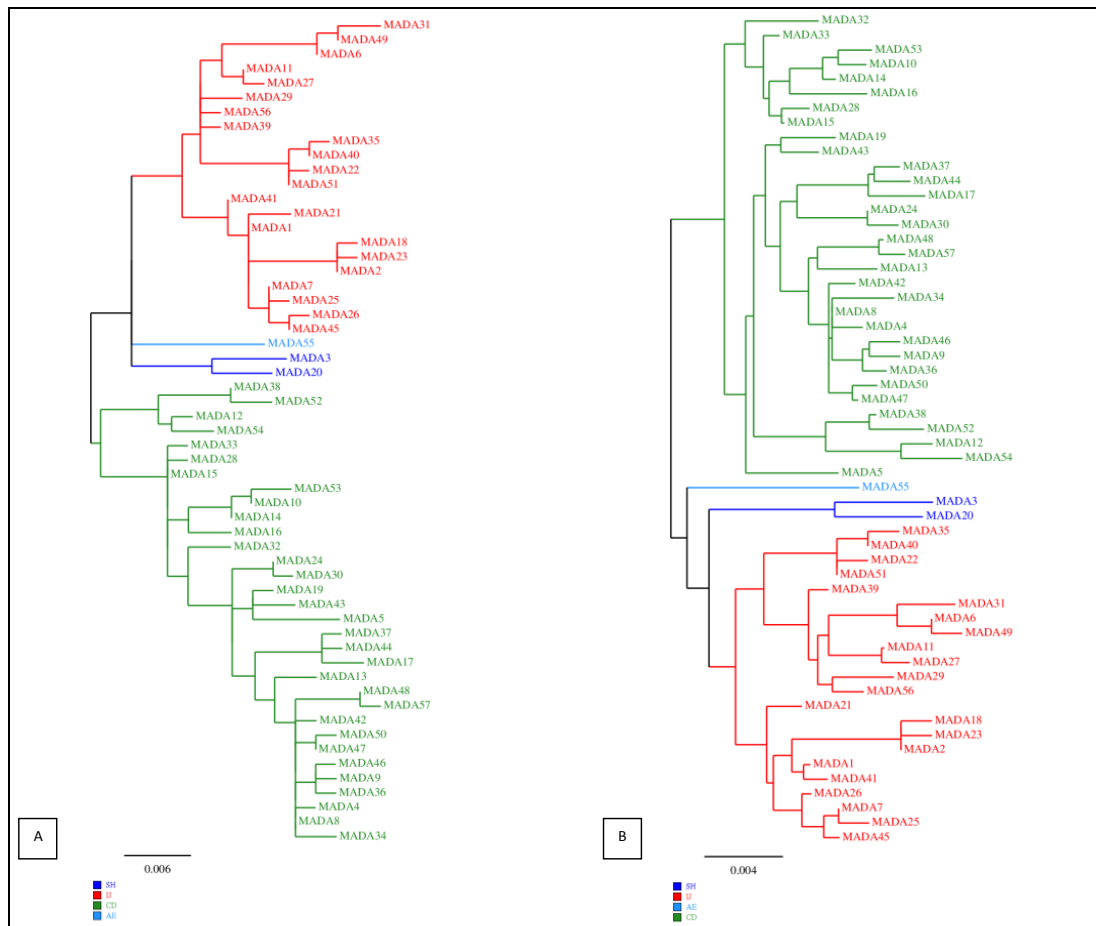


Figure 19 : Arbres phylogéniques construits par la méthode du maximum de parcimonie (A) et des plus proches voisins (B) mettant en évidence l'existence de clades mitochondriaux chez les baleines à bosse de Madagascar.

Ces arbres ont été construits sur le site phyogeny.fr (voir publication 6 pour une description précise du protocole) sur la base de l'alignement des 57 haplotypes définis à partir des 142 séquences de MCR déterminées en 2012 et 2013 à Madagascar. Les haplogroupes sont représentés en différentes couleurs, et leurs liens avec les clades définis par Baker & Medrano-Gonzales (2012), Olavarria et al. (2007) et Engel et al. (2008) sont expliqués dans le paragraphe suivant et dans la Figure 22.

La diversité génétique des baleines à bosse échantillonnées dans le canal de l'île Sainte-Marie à Madagascar fait partie des plus fortes de tout l'hémisphère sud

La zone échantillonnée dans le cadre de notre étude est très localisée : elle se situe principalement dans le canal séparant l'île principale de Madagascar et l'île Sainte-Marie (autour de 25 km de large), dans une zone ne dépassant pas 1000 km² (voir l'exemple des prélèvements de 2012, Figure 20). La comparaison des diversités génétiques des baleines à bosse du canal de l'île Sainte Marie et d'autres zones de reproduction de l'HS représente donc le premier résultat majeur de notre étude.

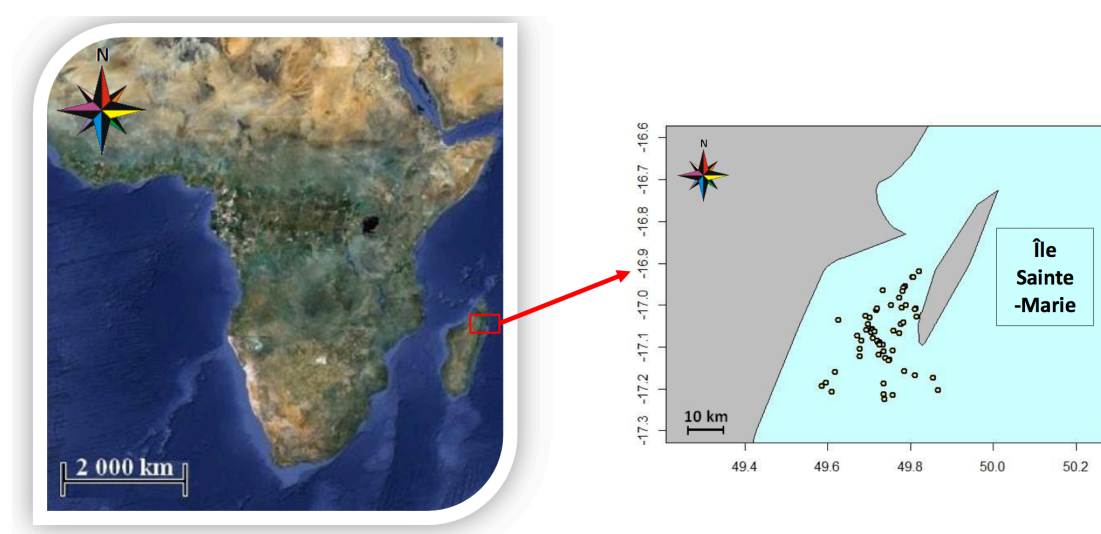


Figure 20 : Localisation des prélèvements réalisés en 2012 dans le canal de l'île Sainte-Marie à Madagascar.
Carte extraite du rapport de Loriane Mendez, Master 2, 2013. Chaque cercle représente la localisation d'une biopsie.

Comparer les tailles des allèles des loci nucléaires contenant des microsatellites nécessite des standardisations des travaux réalisés dans différents laboratoires (voir par exemple Anderson 2013, Fontaine et al. 2017). Par contre, lorsque les mêmes loci sont ciblés dans différentes études, les valeurs d'hétérozygotie observée (H_O) et attendue (H_E) peuvent être évaluées en parallèle. Cinq loci, étudiés par Pomilla et Rosenbaum (2006) chez des baleines à bosse échantillonnées au large du Gabon et au nord-est de Madagascar, et par Cypriano et al. (2010) au Brésil sont en commun avec notre étude. Le Tableau 2 montre la comparaison des valeurs, qui sont très proches dans les quatre sites échantillonnés, reflétant des diversités génétiques comparables telle que mesurées par les polymorphismes des cinq loci nucléaires.

Source des données	Zone géographique	Années de prélèvement	H_O	H_E
Cette étude	Ile Sainte-Marie	2012 - 2013	0.7961	0.8021
Pomilla & Rosenbaum (2006)	Gabon	2001 - 2002	0.8180	0.8140
	Nord-est de Madagascar	1996 - 2001	0.8002	0.8026
Cypriano <i>et al.</i> (2010)	Brésil	1999 - 2005	0.8188	0.8286

Tableau 2 : Comparaison des valeurs d'hétérozygotie observée (H_O) et attendue (H_E) déterminées pour 5 loci contenant des microsatellites entre notre étude et celles de Pomilla et Rosenbaum (2006) et Cypriano et al. (2010). Les cinq loci sont GATA 417, GATA053, GATA028, EV96, Ev37.

Pour l'ADN mitochondrial, une région commune de 329 nt de la MCR a été séquencée lors de notre étude et de celles d'Olavarria et al. (2007) et d'Engel et al. (2008). Un jeu de données représentatif de l'HS a donc pu être construit : il comporte 1430 séquences ($n_{\text{Madagascar}}=142$, notre étude ; $n_{\text{Brésil}}=176$, Engel et al. (2008) ; $n_{\text{Pacifique Sud}} = 1112$, Olavarria et al. (2007))

Olavarria et al. (2007) et Engel et al. (2008) avaient mis en évidence que les plus fortes diversités haplotypiques étaient rencontrées dans l'HS au Brésil, en Australie, dans les Iles Tonga et en Nouvelle Calédonie. Notre échantillonnage présente une diversité haplotypique qui se situe dans cette catégorie de valeurs, - c'est même la plus élevée de cette étude -, loin devant les valeurs rencontrées en Polynésie Française, aux Iles Cook et en Colombie (Tableau 3). Les valeurs de diversité nucléotidique varient de manière globalement similaire.

Zone géographique	Nombre de séquences	Longueur	Diversité haplotypique (Hd)	Diversité nucléotidique (H)
Brésil	176	329 nt	0.972	0.0254
Madagascar	142		0.974	0.0277
Ouest de l'Australie	174		0.966	0.0272
Nouvelle Calédonie	250		0.972	0.0272
Tonga	310		0.962	0.0267
Iles Cook	131		0.923	0.0260
Polynésie Française	99		0.910	0.0253
Colombie	148		0.899	0.0227

Tableau 3 : Comparaison des valeurs de diversités nucléotidiques et haplotypiques de différentes zones de reproduction de l'hémisphère Sud. Les valeurs de Madagascar proviennent de cette étude, les autres ont été calculées sur la base des données de séquences publiées par Engel et al. (2008) pour le Brésil, et par Olavarria et al. (2007) pour l'Australie, la Nouvelle-Calédonie, les îles Tonga, les îles Cook, la Polynésie Française et la Colombie. Tableau extrait de Lambert et al. 2017.

Les différences de répartitions d'haplotypes mitochondriaux entre zones de reproduction montrent un phénomène global d'isolation par la distance dans l'Hémisphère Sud

Nous avons pu calculer des indices de différenciation entre groupes géographiques à partir du jeu de données représentatif de l'HS présenté dans le paragraphe précédent. Les valeurs de S_{NN} et de F_{ST} sont significatives entre toutes les zones (Tableau 4), confirmant des résultats obtenus lors d'autres études avec d'autres échantillonnages (Olavarria et al. 2007 ; Engel et al. 2008, Anderson 2013 ; Rosenbaum et al. 2017), mais présentent des valeurs qui, globalement, semblent croissantes en fonction de l'éloignement géographique. Rosenbaum et al. (2017) ont estimé la différenciation génétique entre des baleines à bosse échantillonnées dans la zone qui correspond au sous-stock C3 (zone dans laquelle se situe le canal de l'île Sainte-Marie) et les autres sites de reproduction de l'hémisphère sud. Nos valeurs de F_{ST} sont en excellente concordance globale bien que les échantillonnages soient très différents (les valeurs de F_{ST} ne diffèrent pas de plus d'un millièème entre les deux études).

	Brésil	Ouest de l'Australie	Nouvelle Calédonie	Tonga	Iles Cook	Polynésie Française	Colombie
F_{ST}	0,011	0,012**	0,018***	0,022***	0,039***	0,044***	0,056***
S_{NN}	0,67***	0,70***	0,79***	0,81***	0,84***	0,86***	0,88***
Distance approximative en km	10000	7000	12500	13700	14800	15800	21600

Tableau 4 : Indices de différenciation génétique et distances approximatives entre Madagascar et les autres zones de reproduction de l'Hémisphère Sud. Les différences génétiques sont estimées sur la base des polymorphismes de l'ADN mitochondrial.

Les indices ont été calculés à l'aide des logiciels ARLEQUIN (F_{ST}) et DNASP (S_{NN}) selon les protocoles décrits dans la publication 1. La significativité a été déterminée par un test de permutations (* : $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Lorsque l'on calcule une distance géographique approximative entre les zones de reproduction, une corrélation claire existe entre distance génétique représentée par le calcul des F_{ST} mitochondriaux et distance géographique (Tableau 4) entre Madagascar et toutes les zones situées à l'ouest, jusqu'à la Colombie (Figure 21). Anderson (2013) et Olavarria et al. (2007) avait déjà suggéré une relation entre distance géographique et distance génétique déterminée sur la base de polymorphismes de l'ADN mitochondrial, mais Rosenbaum et al. (2017) avaient rejeté cette hypothèse. Kershaw et al. (2017) ont par contre mis en évidence une isolation par la distance sur la base de polymorphismes de l'ADN nucléaire.

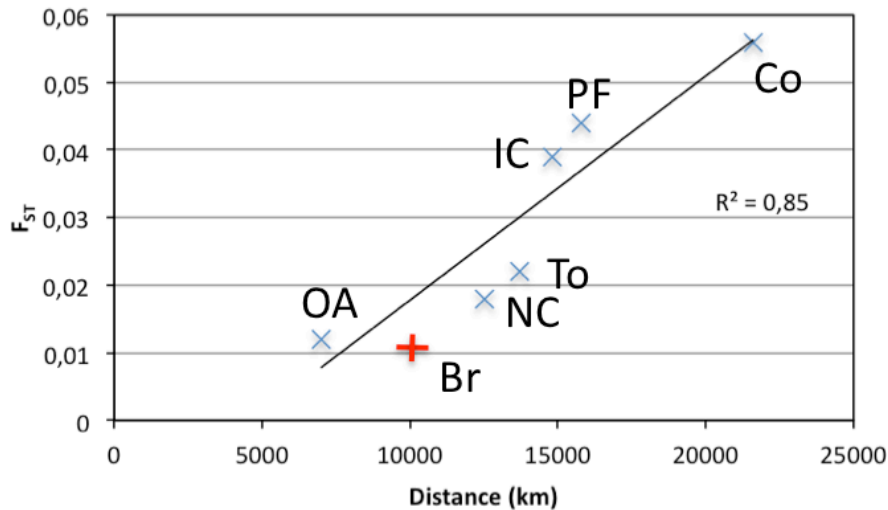


Figure 21 : Relation entre la distance géographique et la distance génétique entre les baleines à bosse de Madagascar et celles des autres zones de reproduction de l'Hémisphère Sud.

Les valeurs de F_{ST} mitochondrial sont représentées en fonction de la distance approximative entre l'île Sainte-Marie de Madagascar et les différentes zones de reproduction de l'HS en se déplaçant vers l'est (points bleus) : Ouest de l'Australie (OA), Nouvelle Calédonie (NC), Tonga (To), Iles Cook (IC), Polynésie Française (PF), Colombie (Co). La courbe de tendance et le coefficient de corrélation ont été calculés à l'aide du logiciel Excel. La valeur du coefficient de corrélation confirme l'existence très probable du phénomène d'isolation par la distance à l'échelle de l'HS. En rouge, la position du Brésil (Br, impliquant un déplacement vers l'ouest), qui semble moins différencié génétiquement qu'attendu d'après la courbe de tendance.

L'alignement des 1430 séquences représentatives de l'HS a aussi été utilisé pour construire un réseau d'haplotypes grâce à la méthode de parcimonie implémentée dans le logiciel NETWORK (<http://www.fluxus-engineering.com/>). La Figure 22 montre le réseau obtenu. Seize haplotypes sur 49 au total retrouvés à Madagascar sont privés (ne sont pas retrouvés dans d'autres zones géographiques), soit moins d'un tiers. Il s'agit dans tous les cas d'haplotypes mineurs (retrouvés chez un ou deux individus).

L'information la plus importante que livre ce réseau d'haplotypes est la présence de quatre clades nettement individualisés, identifiés comme correspondant aux clades IJ, CD et AE (Baker & Medrano 2002) et SH (Olavarria et al. 2007 ; Engel et al. 2008). A Madagascar, les clades CD et IJ sont les plus fréquents, suivis par SH et enfin le clade AE, très minoritaire, puisque trouvé chez une seule femelle en 2013 (Figures 19 et 22). Dans l'hémisphère sud, le clade AE n'avait pour l'instant été retrouvé qu'en Colombie et au Brésil (Engel et al. 2008) à l'exclusion des autres zones de reproduction (Olavarria et al. 2007 ; Anderson, 2013).

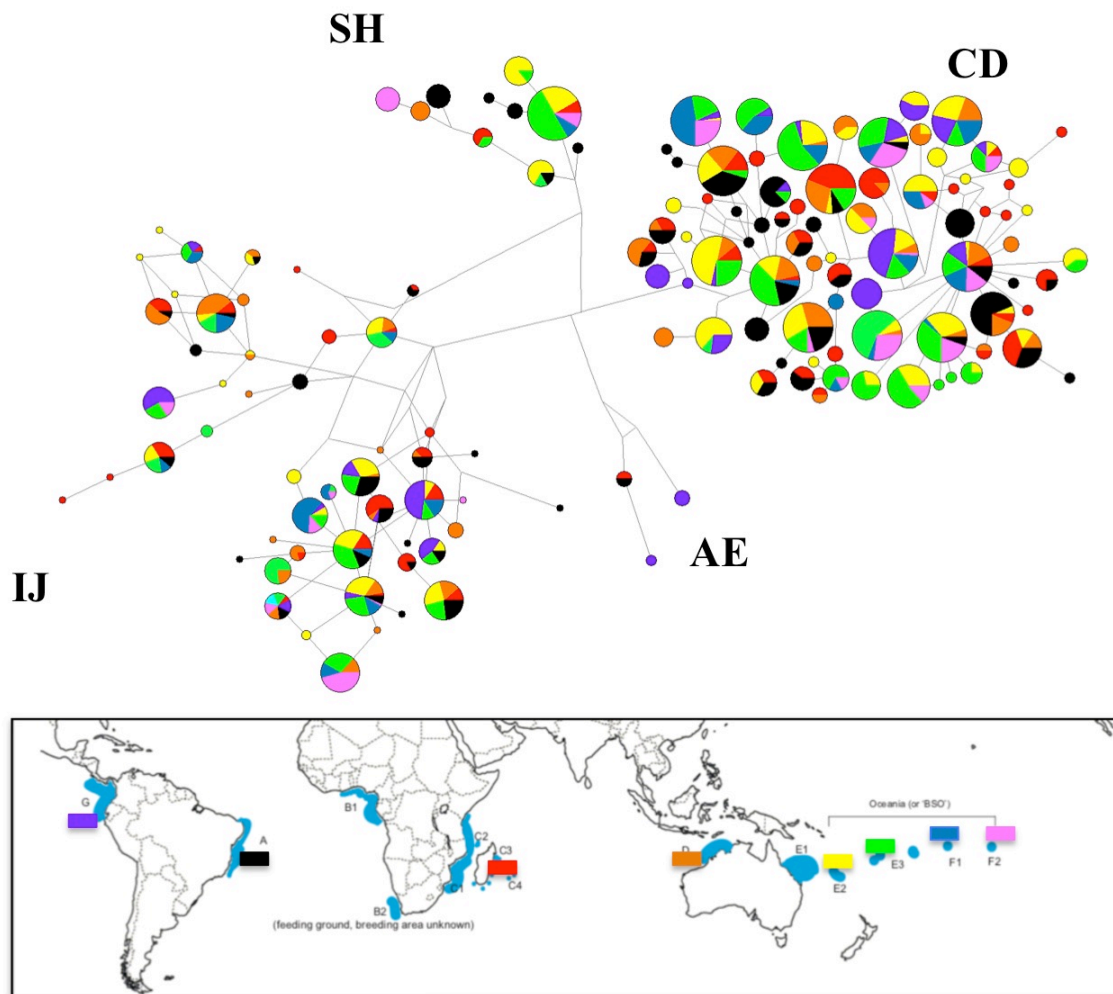


Figure 22 : Réseau d'haplotypes représentatif des polymorphismes de l'ADN mitochondrial (329pb de la MCR) dans un échantillonnage de 1430 séquences représentatif de l'hémisphère sud. Figure modifiées d'après Lambert et al. 2017.

Chaque haplotype est représenté par un cercle de surface proportionnelle au nombre d'individus chez qui il a été retrouvé. La distance entre les haplotypes est proportionnelle au nombre de mutations. Les clades ancestraux précédemment définis, CD, AE, IJ, SH (Baker & Medrano Gonzales 2002 ; Olavarria et al. 2077 ; Engel et al. 2008) sont indiqués. Un code couleur permet d'identifier les zones géographiques dans lesquelles chaque haplotype a été retrouvé : Madagascar (rouge), Ouest de l'Australie (orange), Nouvelle Calédonie (jaune), Tonga (vert), Iles Cook (bleu), Polynésie Française (rose), Colombie (violet), Brésil (noir). Carte modifiée d'après Jackson et al. 2015.

Tous les haplotypes ne présentant qu'une seule couleur ne sont donc retrouvés que dans une seule zone géographique.

Apports et perspectives de l'étude des deux premières années d'échantillonnage de baleines à bosse dans le canal de l'île Sainte-Marie de Madagascar

Depuis 2012, des biopsies et squames sont donc prélevés dans le canal de l'île Sainte-Marie dans le cadre des programmes *BAOBAB* et *GENERATION*. Cet échantillonnage, qui représente déjà autour de 500 biopsies au total, permettra une caractérisation génétique exhaustive des baleines à bosse utilisant les eaux de l'est de Madagascar pendant la période hivernale de reproduction. Il représentera aussi une série temporelle inédite permettant de détecter d'éventuelles variations inter-annuelles.

La détermination du sexe des baleines à bosse, très difficile voire impossible à réaliser sur le terrain, a d'ores et déjà permis des exploitations sexuées des données de balises Argos (Cerchio et al. 2016 ; Trudelle et al. 2016). L'analyse génétique des échantillons des deux premières années (2012 et 2013) présentée dans les paragraphes précédents a quant à elle livré plusieurs informations majeures.

Une très forte diversité génétique

La première est certainement la forte diversité génétique rencontrée au sein de notre échantillonnage, telle qu'estimée à la fois par l'analyse des génomes nucléaires et mitochondriaux. Le fait de cibler les échantillonnages dans une zone particulière, très restreinte géographiquement (Figure 20), ne se reflète donc pas par une baisse de diversité, ni haplotypique ni nucléotidique pour l'ADN mitochondrial. Il aurait été imaginable par exemple d'observer une diversité nucléotidique forte, représentative de la diversité du sud-ouest de l'Océan Indien, mais haplotypique plus faible, provenant du fait qu'une partie seulement des baleines à bosse de la région seraient passées par le canal de l'île Sainte-Marie. Ce n'est pas le cas, et cela confirme bien la grande mobilité des baleines à bosse dans cette zone de l'HS pendant la période de reproduction, observée par exemple grâce à des balises Argos (Cerchio et al. 2016 ; Trudelle et al. 2016 ; Dulau et al. 2017).

Les aires de reproduction de l'HS présentent bien des différences génétiques entre elles

La comparaison de nos données avec celles provenant d'autres études (Olavarria et al. 20007 ; Engel et al. 2008) a permis de réaliser une analyse à l'échelle de l'HS, et d'estimer la séparation génétique en fonction des zones géographiques servant à la reproduction. Un tiers des haplotypes mitochondriaux rencontrés à Madagascar sont privés, c'est à dire non partagés

avec d'autres régions de l'HS. Même la répartition des clades ancestraux n'est pas identique dans tout l'HS, le clade SH étant par exemple absent de Colombie (Olavarria et al. 2007) et le clade AE restreint à la Colombie, le Brésil (Olavarria et al. 2007 ; Engel et al. 2008), et, depuis cette étude, à Madagascar. Cette répartition spécifique du clade AE est discutée plus loin.

Cette comparaison a aussi mis en évidence des différences significatives de répartition d'haplotypes mitochondriaux en fonction des zones géographiques, bien que les indices de différenciation présentent des valeurs en général bien inférieures dans l'HS à celles rencontrées dans le Pacifique Nord : F_{ST} souvent supérieurs à $F_{ST}=0,1$ entre des zones de reproduction différenciées dans le Pacifique Nord et inférieurs à $F_{ST}=0,05$ dans l'HS (notre étude, Olavarria et al. 2007 ; Engel et al. 2008 ; Anderson 2013 ; Baker et al. 2013 ; Rosenbaum et al. 2017 ; publication 1).

La fidélité des baleines à bosse pour leur site de naissance existe donc bien dans l'HS tout comme dans le Pacifique Nord.

L'isolation par la distance est certainement un facteur prépondérant pour expliquer les différences entre zones de reproduction

Néanmoins, la distance géographique entre les sites de reproduction semble jouer un rôle majeur dans les flux de gènes dans l'HS. Kershaw et al. (2017) ont récemment mis en évidence un phénomène d'isolation par la distance entre groupes de reproduction de baleines à bosse de l'HS en étudiant des marqueurs nucléaires, alors que le même groupe de recherche n'a pas retrouvé ce phénomène en étudiant les polymorphismes de l'ADN mitochondrial (Rosenbaum et al. 2017). Cette différence peut s'expliquer par une disparité de comportement entre les sexes, les femelles montrant une philopatrie plus marquée que les mâles. Un tel cas de figure peut se traduire par un brassage génétique plus fort au niveau de l'ADN nucléaire, dont les différences entre groupes géographiques auront alors tendance à se réduire (les mâles se reproduisant avec succès dans un autre groupe apportant les allèles de leur groupe d'origine), alors que les femelles, montrant plus de fidélité pour leur site de naissance, les ADN mitochondriaux resteront plus fortement différenciés entre sites. De tels cas de figure ont déjà été retrouvés chez plusieurs espèces de grands vertébrés marins, à commencer par les baleines à bosse dans le Pacifique Nord (voir par exemple Baker et al. 2013).

Néanmoins, Olavarria et al. (2007) et Anderson (2013) avaient remarqué que dans l'HS, les différences de répartition des haplotypes mitochondriaux semblaient croître avec la distance. Notre étude confirme cette hypothèse sans ambiguïté, la distance génétique mesurée par la répartition des haplotypes mitochondriaux s'accroît clairement en fonction de la distance

géographique, mesurée entre sites de reproduction. Les déplacements directs de baleines à bosse entre différentes zones de reproduction de l'HS déjà répertoriés, par exemple entre le Brésil et Madagascar (Stevick et al. 2011), entre l'Equateur et le Brésil (Stevick et al. 2014), ou, plus localement entre les sous-stocks définis par l'IWC dans le sud-ouest de l'Océan Indien (Erst et al. 2011), confortent cette observation.

La présence du clade AE dans l'HS n'était connue jusqu'à présent qu'en Colombie et au Brésil
L'histoire ancestrale et la répartition du clade AE illustrent bien cette mobilité. Le clade AE est très présent dans le Pacifique Nord et absent dans l'Atlantique Nord (Baker & Medrano-Gonzales 2002). Son individualisation du clade IJ a été estimée comme datant d'il y a plus de 500 000 ans, et son expansion dans le Pacifique Nord serait survenue il y a 170 000 ans (Jackson et al. 2014). Dans l'HS, il avait été retrouvé jusqu'à présent, avec des fréquences très faibles, en Colombie, au Brésil, et dans les aires d'alimentation I et II définies par l'IWC (Olavarria et al. 2007 ; Engel et al. 2008). Sa présence dans l'HS viendrait donc d'un événement rare de migration depuis le Pacifique Nord vers le Pacifique Sud en Colombie, suivi d'échanges en direction de l'est de la Colombie vers le Brésil. Cypriano-Souza et al. (2017), en comparant les polymorphismes des génomes nucléaires et mitochondriaux entre des baleines à bosse du Brésil et de Colombie, ont confirmé la différenciation entre les deux zones de reproduction (Engel et al. 2008), mais ils ont aussi réussi à montrer que des migrations entre les deux zones de reproduction étaient probables. Des échanges entre le Brésil et l'Afrique ont aussi été suggérés par Rosenbaum et al. (2017). Stevick et al. (2011) avaient quant à eux identifié une même baleine à bosse au Brésil et à Madagascar à deux années d'intervalle. La présence du clade AE met en évidence ces événements de migrations entre zones de reproduction de l'HS, depuis la Colombie vers le Brésil, et maintenant vers Madagascar grâce à la découverte de ce clade chez une femelle de notre échantillonnage.

Cypriano-Souza et al (2017), Kershaw et al (2017) et Rosenbaum et al. (2017) ont estimés que les flux de migration étaient directionnels, mais les résultats de ces estimations varient selon les sexes et selon les marqueurs (nucléaires ou mitochondriaux) considérés. Kershaw et al. (2017) ont évalué le sens ouest-est comme préférentiel entre le Brésil et l'Afrique, et Rosenbaum et al. (2017) ont montré que la différenciation entre le Brésil et l'Afrique était beaucoup plus modérée que pensé jusque là. Les migrations mises en évidence par le clade AE dans l'HS privilégient le sens ouest-est (de la Colombie vers le Brésil puis vers l'Afrique), puisque pour l'instant le clade AE n'a pas été retrouvé par exemple en Polynésie Française ou aux Iles Cook.

Poursuite des programmes BAOBAB et GENERATION

L'analyse des biopsies prélevées depuis 2014 permettra d'augmenter le degré de significativité de nos résultats grâce à un nombre plus important d'échantillons analysés. Nous intégrerons aussi nos résultats aux données récentes publiées par Rosenbaum et al (2017) et Kershaw et al. (2017) afin de confirmer les différences entre stocks et la place prépondérante dans l'HS du phénomène d'isolation par la distance. Nous évaluerons aussi, grâce à l'importance du nombre de biopsies prélevées, l'existence de liens de parenté entre les baleines à bosse qui fréquentent le canal de Sainte-Marie une même année et lors d'années successives.

Nous pourrions aussi évaluer les taux de recaptures au fil des années (aucune recapture n'a été réalisée entre 2012 et 2013). Nous disposerons de plus d'une série temporelle inédite qui nous permettra d'étudier la stabilité inter-annuelle des groupes de baleines à bosse de l'Ile Sainte-Marie. A notre connaissance, aucune série temporelle aussi importante de prises de biopsies de baleines à bosse n'a jamais été réalisée, et encore moins dans une zone géographique ciblée et de manière si reproductible en termes de protocoles de prélèvements. Nous pourrions ainsi analyser de manière fine d'éventuelles différences dans la structure génétique des baleines à bosse fréquentant le site au cours des années.

La recherche des zones d'alimentation correspondant à l'est de Madagascar, et l'estimation du degré de fidélité des baleines à bosse pour ces zones représentera aussi l'une des suites majeures de ce projet.

Etude des baleines à bosse de l’Ile Sainte-Marie de Madagascar			
Etudiants ayant participé à cette étude			
Loriane Mendez	Janvier – Juin 2013	Stage de Master 2 d’Océanographie de l’Université de Marseille	Encadrement Jean-Luc Jung
Claire Bonneville	Janvier – Juin 2014	Stage de Master 2 d’Océanographie de l’Université de Marseille	Encadrement Jean-Luc Jung
Aurore Lambert	Janvier 2016 – Juin 2017	Docteur vétérinaire, chercheure associée au Laboratoire BioGeMME	Encadrement Jean-Luc Jung
Projet mené en collaboration avec			
Anjara Saloma Henri Bellon Francois-Xavier Mayer	CETAMADA		
Laurène Trudelle Jean-Benoît Charrassin	LOCEAN-IPSL, CNRS-IRD-MNHN, UMPC Paris VI		
Olivier Adam	Institut des Neurosciences Paris-Saclay (Neuro-PSI), UMR 9197, CNRS Université Paris Sud		

Tableau 5 : Collaborations et étudiants encadrés pour l’étude des baleines à bosse de l’Ile Sainte-Marie de Madagascar
--

Dans les eaux Russes du Pacifique Nord, la fidélité des baleines à bosse pour leur site d'alimentation est d'une précision géographique très inattendue

*Les baleines à bosse du Pacifique Nord sont peut être les mieux connues à ce jour grâce au programme **SPLASH***

Les baleines à bosse du Pacifique Nord (PN) ont fait l'objet d'une étude internationale intensive dans le cadre du programme *SPLASH* pour « *Structure of Population, Levels of Abundance and Status of Humpbacks* » (Calambokidis et al. 2008). Des campagnes de terrain ont été menées entre 2004 et 2006 dans toutes les zones de reproduction et d'alimentation du PN. Des photographies de nageoires caudales ont permis d'identifier presque 8000 individus (le catalogue complet peut être consulté <http://www.splashcatalog.org/>), et plus de 2000 biopsies ont été collectées (Calambokidis et al. 2008 ; Baker et al. 2013). L'abondance globale des baleines à bosse dans le PN a été estimée à 20 000 individus (Calambokidis et al. 2008 ; Barlow et al. 2011). Le PN Ouest présente les abondances les plus réduites, que ce soit dans ses zones de reproduction en Asie (Japon et Philippines, moins de 1000 individus estimés, Calambokidis et al. 2008 ; Barlow et al. 2011) ou d'alimentation dans les eaux Russes (entre 100 et 700 individus selon les estimations, Calambokidis et al. 2008 ; Barlow et al. 2011).

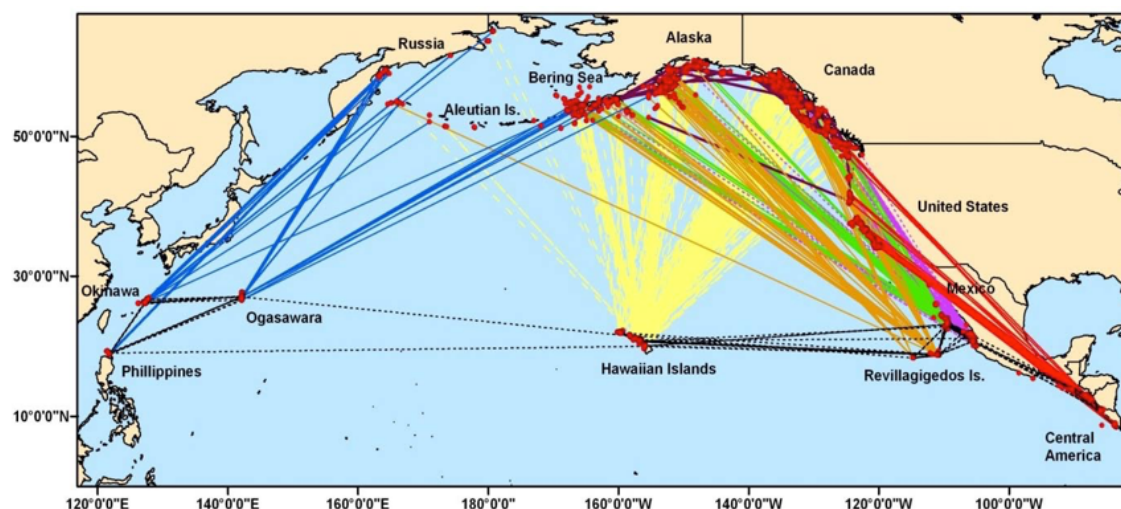


Figure 23 : Connexions entre sites d'alimentation et de reproduction du Pacifique Nord déterminés par photo-identification dans le cadre du programme *SPLASH*. La Figure provient de Calambokidis et al. 2008 et Barlow et al. 2011. Les couleurs correspondent aux aires de reproduction (bleu pour le Pacifique Ouest, jaune pour Hawaï, brun, vert et violet pour les différentes zones du Mexique, et rouge pour l'Amérique centrale). Des échanges directs entre zones de reproduction (traits noirs pointillés) et entre zones d'alimentation (traits violet foncé) ont aussi été identifiés, montrant que la fidélité pour chacun des sites n'est pas absolue.

Dans le cadre de *SPLASH*, 873 individus ont aussi été identifiés à la fois dans une zone de reproduction et d'alimentation grâce à leur nageoire caudale, ce qui a permis de représenter des chemins migratoires hypothétiques qui illustrent bien la complexité des

liens entre les différentes zones de concentration de baleines à bosse dans le PN (Figure 23).

Une étude génétique a pu être menée à l'échelle du bassin océanique dans le cadre de SPLASH

SPLASH a aussi permis de réaliser la première étude génétique à l'échelle d'un bassin océanique complet, incluant aussi bien les zones de reproduction que d'alimentation. En fonction de données d'observation accumulées dans les 30 dernières années et des résultats de *SPLASH* (Johnson & Wolman 1984 ; Steiger & Calambokidis 1991 ; Acebes et al. 2007 ; Calambokidis et al. 2008), 10 aires d'alimentation et 8 aires de reproductions ont été définies dans le Pacifique Nord (Figure 24).

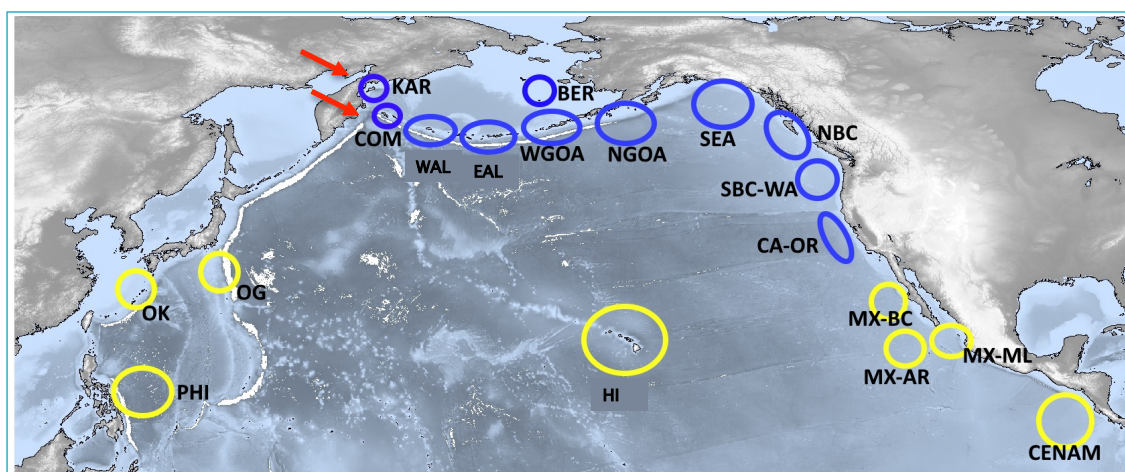


Figure 24 : Localisation des aires de reproduction (n=8, en jaune) et des aires d'alimentation (n=10, en bleu) définies par Baker et al. (2013) dans le Pacifique Nord. Les sites qui ont fait l'objet de notre étude (Kar, Ile Karaginsky et Com, Iles du Commandeur) sont identifiés par deux flèches rouges, et étaient regroupés dans une même zone d'alimentation « Russe » par Baker et al. 2013.

Les 10 zones d'alimentation, de l'ouest vers l'est : *Russia* (ici séparée en Kar et Com), *Western Aleutians* (WAL), *Bering Sea* (BER), *Eastern Aleutians* (EAL), *Western Gulf of Alaska* (WGOA), *Northern Gulf of Alaska* (NGOA), *Southeast Alaska* (SEA), *Northern British Columbia* (NBC), *Southern British Columbia-Washington* (SBC/WA), *California-Oregon* (CA/OR)

Les 8 zones de reproduction, de l'ouest vers l'est : *Philippines* (PHI), *Okinawa* (OK), *Ogasawara* (OG), *Hawaii* (HI), *Mexico-Revillagigedo* (MX-AR), *Mexico-Baja California* (MX-BC), *Mexico-Mainland* (MX-ML), *Central America* (CENAM).

Baker et al. (2013) ont étudié les polymorphismes de l'ADN nucléaire (10 loci contenant des microsatellites polymorphes) et mitochondrial (500pb de la MCR) à partir de 2193 biopsies prélevées dans tout le PN et représentant les 18 zones identifiées. A part d'un coté Okinawa et les Philippines, et de l'autre coté les trois zones mexicaines, les baleines à bosse de toutes les zones de reproduction montrent des différences génétiques marquées entre elles en termes de fréquence de répartition d'haplotypes. Ces différences sont plus marquées pour l'ADN

mitochondrial (F_{ST} global = 0.093) que pour l'ADN nucléaire (F_{ST} global = 0.006, Baker et al. 2013). Les zones d'alimentation ont montré des divergences encore plus marquées (F_{ST} mitochondrial global = 0,121).

La comparaison entre baleines à bosse des zones d'alimentation et celles des zones de reproduction a elle aussi révélé des différences génétiques dans presque tous les cas. Le seul lien direct qui semble exister a été trouvé entre la zone de reproduction d'Amérique Centrale (CENAM, Figure 24) et d'alimentation de Californie – Orégon (CA-OR, Figure 24). A part ce cas précis, il ne semble pas exister de lien linéaire entre une zone d'alimentation et une zone de reproduction, chaque zone étant « mixte », c'est à dire regroupant des baleines à bosse partageant des fidélités différentes (des baleines provenant de plusieurs zones de reproduction semblent se mélanger dans une même zone d'alimentation, et des baleines d'une même zone de reproduction peuvent avoir des fidélités pour différentes zones d'alimentation). Les chemins migratoires sont donc complexes et se croisent à l'échelle du Pacifique Nord.

Des baleines à bosse se distinguent par leur comportement dans deux sites voisins des eaux Russes du Pacifique Nord.

L'Université de Moscou, la « *Kamchatka Branch of the Pacific Geographical Institute* » et l'ONG britannique « *Whale and Dolphin Conservation* » collaborent depuis plusieurs années dans le but d'étudier les cétacés des eaux Russes du Pacifique Nord. Notamment, des campagnes de terrain annuelles sont effectuées en été afin d'étudier les baleines à bosse, de réaliser des campagnes de photoidentification et de prélever des biopsies. La zone étudiée correspond à la zone d'alimentation la plus à l'ouest définie par Baker et al. (2013). Dans le cadre de ces campagnes, Filatova et al. (2013) ont mis en évidence des différences de comportement alimentaire entre les baleines à bosse qui se regroupent autour de l'île Karaginsky (58° 55' 00" N 164° 20' 00" E), se nourrissant de poisson en banc ; et celles qui se concentrent autour de l'île Béring (55° 08' 08" N 166° 10' 41" E, la plus grande des îles du Commandeur), qui se nourrissent principalement de zooplancton. Ces différences de comportement alimentaire ont été identifiées visuellement par l'observation, et confirmées par l'analyse des isotopes de l'azote et du carbone dans des biopsies de tissus adipeux externe de baleines à bosse des deux sites (Filatova et al. 2013). Bien que ces deux sites ne soient distants que de 500 km approximativement, les études menées par photo-identification dans les dernières années montrent qu'il n'existe quasiment pas d'échange entre les deux sites (Olga Filatova, communication personnelle).

Les baleines à bosse des deux sites d'alimentation russes sont très différentes génétiquement

Nous collaborons Olga Filatova et moi-même depuis maintenant trois années pour caractériser génétiquement les baleines à bosse de l'île Karaginsky et des îles du Commandeur, dans le double but (1) de rechercher d'éventuelles différences entre les deux sites qui pourraient être corrélées aux différences de comportement alimentaire et (2) de replacer ces deux sites d'alimentation dans le contexte global du Pacifique Nord.

Depuis plusieurs mois, le Professeur Scott Baker (*Oregon State University*) s'est associé à notre travail, notamment en nous fournissant les données complètes du programme *SPLASH*.

Entre 2008 et 2016, 132 biopsies de baleines à bosse ont été prélevées sur les deux sites par Olga Filatova et collaborateurs. Les polymorphismes de l'ADN mitochondrial (653pb de la MCR) ainsi que ceux de loci nucléaires contenant des microsatellites ont été analysés. Les séquences d'ADN mitochondrial ont aussi pu être comparées aux plus de 2000 séquences déterminées dans le cadre du programme *SPLASH* (Baker et al. 2013). Les résultats obtenus sont décrits en détail dans la publication 1.

Globalement, ces résultats montrent qu'il existe une différence marquée en termes de fréquence de répartition des haplotypes mitochondriaux chez les baleines à bosse des deux sites d'alimentation, avec des valeurs de F_{ST} mitochondriaux élevées et très significatives ($F_{ST}=0,18$ $p<0,001$). Cette différence n'est pas retrouvée au niveau de l'ADN nucléaire. La comparaison des données de séquences d'ADN mitochondrial à large échelle géographique renforce encore cette différence. Les baleines à bosse de Karaginsky se distinguent génétiquement de celles fréquentant toutes les autres zones d'alimentation du Pacifique Nord, alors que celles des îles du Commandeur sont proches des baleines à bosse des îles Aléoutiennes et de la mer de Béring. La différence est tout aussi marquée pour les relations avec les zones de reproduction (Figure 25). Les baleines à bosse des îles du Commandeur sont liées aux zones de reproduction mexicaines, alors que celles de Karaginsky semblent proches de deux des trois sites de reproduction d'Asie, les Philippines et Okinawa.

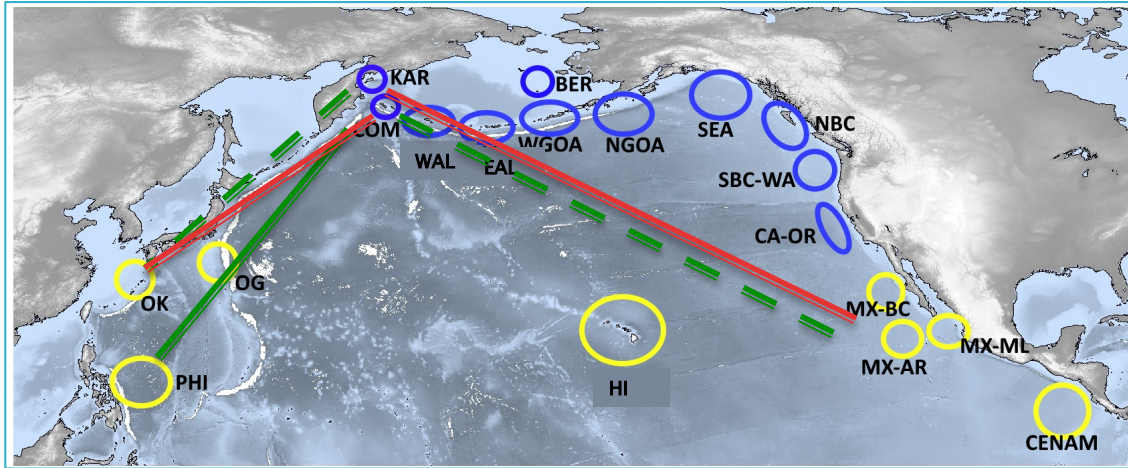


Figure 25 : Représentation globale des différences génétiques entre les baleines à bosse des Iles Karaginski (Kar) et du Commandeur (Com) et celles des zones de reproduction du Pacifique Nord. Les traits rouges représentent les plus fortes différences génétiques identifiées, les traits verts les moins fortes (trait continu vert, pas de différence, trait pointillé vert, des différences minimales). Les valeurs de différence génétique (F_{ST} , Φ_{ST} , χ^2 , et S_{mn}) entre groupes géographiques sont indiquées dans la publication 1. Les baleines à bosse de Karaginsky sont proches de celles des Philippines et dans une moindre mesure d'Okinawa, et très différentes de celles des sites de reproduction mexicains. Les baleines à bosse des îles du Commandeur sont, à l'opposé, proches de celles des trois sites mexicains, et très différentes de celles d'Okinawa.

La fidélité pour des sites d'alimentation très précis et proches géographiquement est une découverte

Notre travail a mis en évidence une différence génétique entre deux groupes de baleines à bosse qui se nourrissent sur deux sites pourtant géographiquement proches. Ces deux sites n'avaient pas été distingués dans les études génétiques précédentes, et avaient été regroupés dans une zone d'alimentation globale. La différence génétique mise en évidence ici porte sur l'ADN mitochondrial, d'héritage maternel uniquement, et pas l'ADN nucléaire hérité des deux parents. Comme cela avait déjà été compris et prouvé précédemment (Baker et al. 1990 ; Palsboll et al. 1995 ; Baker et al. 2013), l'apprentissage transgénérationnel - de la mère au baleineau - du chemin migratoire qui mène du lieu de naissance au site d'alimentation entraîne des différences génétiques au niveau de l'ADN mitochondrial entre groupes d'individus ayant des fidélités différentes. Le fait que ces individus puissent provenir de zones de reproduction distinctes fait que ces différences génétiques ne seront pas obligatoirement retrouvées au niveau de l'ADN nucléaire. De plus, les flux de gènes entre zones de reproduction semblent provenir d'avantage des mâles que des femelles (Baker et al. 2013), ce qui explique aussi que des différences génétiques plus fortes sont rencontrées au niveau de l'ADN mitochondrial que de l'ADN nucléaire.

Nos résultats montrent aussi que les baleines à bosse de Karaginsky se distinguent de celles rencontrées dans toutes les autres zones d'alimentation du Pacifique Nord, et qu'elles proviennent au moins en partie des zones de reproduction asiatiques. Leur abondance est

nécessairement très réduite (autour de 1000 individus estimés pour toutes les zones de reproduction asiatique, Calambokidis et al. 2008 ; Barlow et al. 2011). A l’opposé, les baleines à bosse des îles du Commandeur sont proches de celles fréquentant d’autres zones d’alimentation voisines, localisées notamment dans les Aléoutiennes, et dont les zones de reproduction seraient situées au Mexique. L’abondance des baleines à bosse dans les Aléoutiennes et la mer de Béring est importante, et estimée entre 6 000 et 14 000 individus, et les zones de reproduction mexicaines abritent, après celle d’Hawaï, le plus grand nombre de baleines à bosse du Pacifique Nord (Calambokidis et al. 2008). Les enjeux en termes de conservation sont donc particulièrement importants pour la population de Karaginsky.

Etude des baleines à bosse des eaux russes du Pacifique Nord			
Etudiants ayant participé à cette étude			
Gaëtan Richard	Janvier – Juin 2014	Stage de Master Biosciences de l’Ecole Normale Supérieure de Lyon et de l’Université de Lyon	Encadrement Jean-Luc Jung
Marie Hautin	Janvier – Février 2017	Stage de Master Biologie Santé de l’Université de Brest	Co-Encadrement Carole Decker et Jean-Luc Jung
Projet mené en collaboration avec			
Olga Filatova	Université de Moscou, Russie		
Erich Hoyt	« Whale and Dolphin Conservation » (ONG Britannique)		
Scott Baker	Université de l’Orégon (Etats-Unis)		
Ivan Fedutin Alexander Burdin	« Kamchatka Branch of the Pacific Geographical Institute », Russie		

Tableau 6 : Collaborations et étudiants encadrés pour l’étude des baleines à bosse des eaux russes du Pacifique Nord

Publication 1. « Deciphering humpback whale genetic diversity in Russian Pacific waters suggests fine-scale fidelity to specific feeding sites »

Deciphering humpback whale genetic diversity in Russian Pacific waters suggests fine-scale fidelity to specific feeding sites

Gaëtan Richard^{1,2}, Olga V. Titova³, Ivan D. Fedutin^{3,4}, Debbie Steel⁵, Marie Hautin¹,
Alexander M. Burdin³, Erich Hoyt⁶, Olga A. Filatova^{4*}, Jean-Luc Jung^{1*}

1. Laboratoire BioGeMME (Biologie et Génétique des Mammifères Marins dans leur Environnement), Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

2. Ecole Normale Supérieure de Lyon, France

3. Kamchatka Branch of the Pacific Geographical Institute, Partizanskaya Str. 6, Petropavlovsk-Kamchatsky, 683000 Russia

4. Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow 119234, Russia

5. Marine Mammal Institute and Department of Fisheries and Wildlife, Oregon State University, 2030 SE Marine Science Drive, Newport, Oregon 97365, U.S.A

6. Whale and Dolphin Conservation (WDC), Park House, Allington Park, Bridport, Dorset DT6 5DD, UK

Corresponding author 1:

Jean-Luc Jung, Ph.D.,
Laboratoire BioGeMME, UFR Sciences et Techniques, Université de Brest, 29200 Brest
6 avenue le Gorgeu, 29200 Brest, France
e-mail1: jung@univ-brest.fr e-mail2: jung.jeanluc@gmail.com
Tel: +33 2 98 01 61 29 Fax: +33 2 98 01 63 11

Corresponding author 2:

Gaëtan Richard
e-mail : gaetan-gs.richard@laposte.net

* These authors contributed equally to the work

Abstract

Maternally transmitted fidelity to feeding grounds has been shown to influence the genetic structuring of humpback whales in several oceanic populations. Mitochondrial DNA differences between humpback whales on different feeding grounds can reflect the cultural transmission of migration destinations over generations. In Russian Pacific waters, previous studies combining visual observations and stable isotope analysis have indicated that two groups of humpback whales could be distinguished within what has been considered the same feeding ground, that is between whales found off Commander Islands compared to Karaginsky Gulf, separated by approximately 500km. Here, we assessed whether genetic differentiation exists between these two groups of humpback whales.

We extracted genomic DNA from 132 skin samples collected from humpback whales biopsied between 2008 and 2016, and we described the variation at eight nuclear microsatellite loci and sequences of the mtDNA control region. We discovered a strong and significant differentiation in the mtDNA haplotypes between the two feeding sites ($F_{ST} = 0.18$, $\Phi_{ST} = 0.014$ $p < 0.001$). In contrast, nuDNA did not reveal such differentiation between the two locales. Comparing our results to those from previous ocean-basin study reinforced the differences between the two feeding sites. Commander humpback whales appeared most similar in haplotype frequencies to those of the western Gulf of Alaska and the Aleutians, while Karaginsky differed from all other North Pacific feeding grounds. Comparison to breeding grounds suggest mixed origins for the two feeding sites, although a connection between Karaginsky and the Philippines and to a lesser extend to Okinawa, is likely, as well between Commander and the Mexican breeding grounds.

The mtDNA differentiation between the Commander Islands and Karaginsky Gulf could be explained by cultural transmission of the migration route leading, over generations, to fidelity to a specific feeding site within a particular feeding ground. From a conservation perspective, our findings emphasize the importance of considering these two feeding sites as separate management units.

Introduction

The marine realm is generally thought to present few barriers to gene flow (Palumbi 1994), yet there are numerous examples of highly mobile marine mammal species presenting strong intra-specific structures (*e.g.* Alfonsi et al. 2012; Decker et al. 2017; Fontaine et al. 2014; Hoffman et al. 2009; Louis et al. 2014; Mendez et al. 2011). Among other factors, behavioural traits, including habitat preference, diet specialisation, and fidelity to birthplace (philopatry) have all been shown to lead to genetic differences among populations of different marine mammal species (Alexander et al. 2016; Engelhaupt et al. 2009; Foote et al. 2011; Louis et al. 2014). Maternal experience can be passed to the offspring during the first months of life, thus leading to specific behaviours, socially transmitted over generations, possibly reflected in the distribution of particular mitochondrial DNA haplotypes (Kopps et al. 2014). Maternally directed fidelity to migration routes, which may include specific breeding sites as well as specific feeding sites, has been demonstrated in various species of whales. For these whales, the calves typically stay affiliated with their mothers through the migration to feeding grounds, thus giving the opportunity to pass down knowledge of feeding ground location to their offspring (*e.g.*, Baker et al. 2013, Carroll et al. 2015).

The population structure of the humpback whale, *Megaptera novaeangliae*, is certainly complex. The humpback whale is a migratory species with worldwide distribution. Humpback whales breed in warm waters at low latitudes during winter and migrate to high latitudes in order to feed in summer. Within each ocean basin and hemisphere, the great dispersal capabilities of humpback whales (Stone et al. 1990; Pomilla & Rosenbaum 2005) could lead to a lack of population structure. But, in fact, other parameters shape the highly complex genetic structuring of humpback whale populations (Baker et al. 2013). In each ocean basin, patchworks of genetically differentiated groups which sometimes geographically overlap can be found. Bettridge et al. (2015) recently proposed 15 ‘distinct population segments’ (DPS) worldwide focusing on breeding grounds but considering also migration pathways, on the basis of genetic, ecological, trait and range differences. These DPSs appear to be more relevant and consistent with current knowledge when compared to stock areas defined by the International Whaling Commission (IWC), but in some places an even smaller scale could be envisaged.

In the North Pacific, and in the frame of the international program SPLASH ("*Structure of Populations, Levels of Abundance and Status of Humpback Whales*", Calambokidis, 2008), more than two thousand humpback whale skin samples were collected from ten feeding grounds and eight breeding grounds distinguished on the basis of previous photo-identification captures and abundance estimations (Barlow et al. 2011, Calambokidis et al. 2008). This widespread sample allowed an extensive genetic study of population structure among both breeding and feeding regions (Baker et al. 2013). A highly complex situation was deciphered. Tests of differentiation based on haplotype frequencies highlighted significant differences among almost all feeding grounds and almost all breeding grounds. Differences were also detected by most pairwise comparisons among feeding and breeding grounds, even in some cases where previous photo-identification studies proved strong migration connections. Asymmetrical patterns of interchange between breeding and feeding regions could explain such complexity.

These significantly divergent distributions of mtDNA between grounds most likely reflect the maternal fidelity for migration routes (Baker et al. 1993, 2013, Palumbi & Baker 1994). However, the majority of samples in this study came from the eastern and central North Pacific, and only a few were obtained from the western North Pacific in Russian waters. Due to the small number of samples available from these areas, Baker et al. (2013) analyzed all samples collected in eastern Russia as a single stratum, and did not distinguish between the Commander Islands waters off eastern Kamchatka and the waters around Karaginsky Island, located in northern Kamchatka (Fig. 1), separated by approximately 500km. Working at a finer geographic scale and combining visual observations and stable isotope analysis, Filatova et al. (2013) found that feeding behaviours differ between whales from Commander Islands, feeding on zooplankton, and those in Karaginsky Gulf, feeding on fish. It is notable that similar contrasting feeding behaviours on two different trophic levels were also recently found around Kodiak Island in two geographically proximate groups of humpback whales (Wright et al. 2015). But it is unknown whether these two feeding strategies are due to an acquired behaviour that may be socially transmitted and linked to a genetic divergence or simply to different opportunistic use of the two habitats. Photo-identification (photo-ID) studies have revealed that whales feeding at both Russian sites come from several breeding stocks, as matches have been found with catalogues from Japan, the Philippines, Hawaii and Mexico (Calambokidis 2008). But whether the divergence identified between these

breeding regions (Baker et al. 2013) results in genetic differentiation between the two eastern Russian feeding areas, however, is still unknown.

In order to decipher the genetic characteristics of humpback whale populations in the Russian waters of the western Pacific, we have undertaken a fine-scale genetic characterization of humpback whales sampled around Commander Islands and Karaginsky Gulf. We assess the nuclear and mitochondrial DNA differentiation that could reflect on genetic differentiation between these two feeding sites. We also take advantage of the previous results from the SPLASH program to evaluate the differentiation or relationships with other North Pacific feeding and breeding ground origins.

Materials and methods

Sample collection

Skin biopsy samples were collected from humpback whales on the feeding grounds near Commander Islands ($55^{\circ}08'N$, $166^{\circ}10'E$) and in Karaginsky Gulf ($58^{\circ}55'N$, $164^{\circ}20'E$) from 2008 to 2016 (Fig. 1). Fieldwork took place each year between May and September in both areas. Biopsies were sampled with a crossbow (43kg strength), which fired a hollow-tipped biopsy dart with a floatable head (Lambertsen 1987). The steel tip on the dart was designed to take a cylinder 0.93 cm^3 and up to 2.4 cm long containing skin and external blubber layers (Lambertsen 1987). During each biopsy, a photograph was taken with a Canon EOS 7D equipped with a 400mm Canon lens for later individual identification and to prevent repeat sampling. Whales that were evasive were not subjected to repeated attempts to take biopsies. Samples were preserved in ethanol (90%). For each sampling, records were made of the frame number of the picture, the date, location (latitude and longitude), and the whale's reaction to the sampling. Information about the sex of the whale and group composition was also recorded when determined either in the field or later when studying the photo-ID shots.

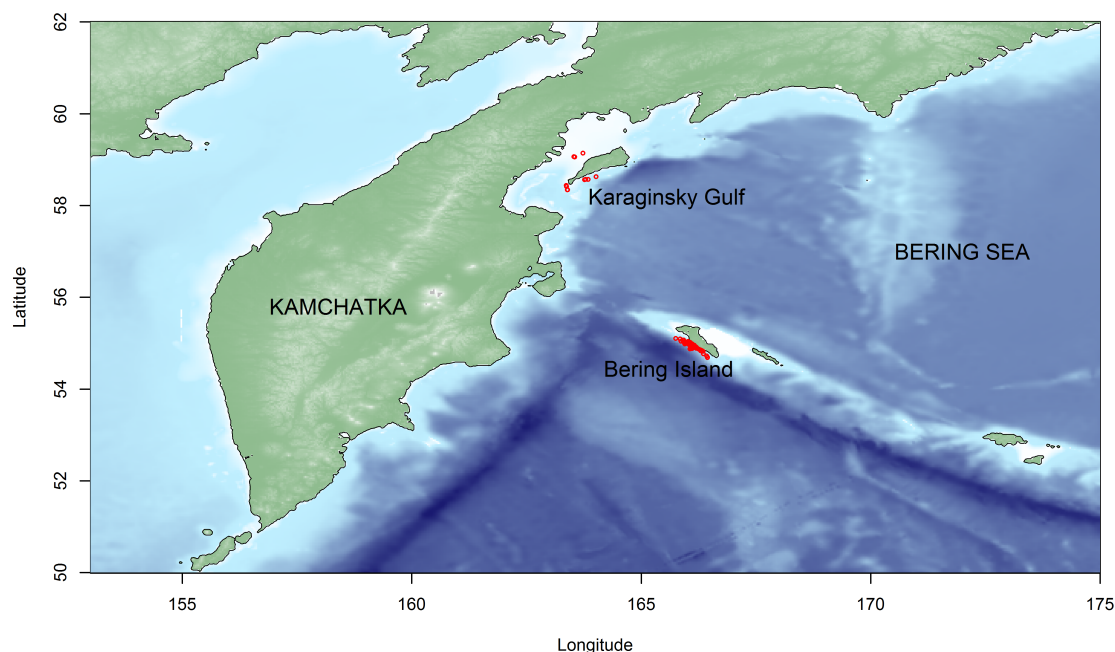


Figure 1. Feeding site locales. Red points indicate the places of sampling of humpback whales.

DNA extraction

Genomic DNA was isolated from the biopsy samples using the standard protocol of the *DNAeasy Blood and Tissue Kit* (QIAGEN) as described in Alfonsi et al. (2012). The genomic DNA concentration and quality were estimated for each extraction by agarose gel electrophoresis and by spectrophotometry using a Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). All DNA extracts were then diluted to 5 ng/μl for further amplification.

Sex determination

Sex for each sampled whale was identified with a Polymerase Chain Reaction (PCR) co-amplification of the male specific *SRY* region and the *ZFY/ZFX* regions as positive controls, as described in Alfonsi et al. (2012).

Microsatellite genotyping, descriptive statistics and genotype analysis

We amplified 8 microsatellite loci: Ev37, Ev96 (Valsecchi & Amos 1996), GATA028, GATA053, GATA417 (Palsboll et al. 1997), GT023, GT211 and GT575 (Bérubé et al. 2000). Amplified fragment sizes were determined on an Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer, and analyzed using the GeneMarker software v2.6 (SoftGenetics).

We checked microsatellite data for the presence of null alleles using the program FreeNA (Chapuis & Estoup 2007). Identical genotypes were detected with the program CERVUS (Kalinowski et al. 2007) with mismatches allowed at up to 2 loci out of 8 to avoid false exclusion due to genotyping errors.

Linkage disequilibrium among loci was tested using the program Fstat, V2.9.3.2 (Goudet 2001). The program Fstat (Goudet 2001) was also used to calculate the inbreeding coefficient, F_{IS} , which estimated the departure from the Hardy-Weinberg equilibrium (excess or deficit of heterozygotes). The program Arlequin (Excoffier & Lischer 2010) was used to estimate the level and significance of the genetic differentiation between groups defined *a priori* by calculating F_{ST} (Weir & Cockerham 1984) and R_{ST} values. We ran the tests assuming random mating within samples and based on 10000 randomisations to detect significance.

We used the Bayesian approach implemented in the program Structure, V2.3.4 (Pritchard et al. 2000), which partitions multilocus genotypes into clusters, while

minimizing departure from Hardy Weinberg equilibrium. It allows determining if the samples are structured in different genetic groups, without any *a priori* knowledge of the existence of the groups. We ran the Structure program with 2 to 5 cluster numbers ($K=2-5$) and 3 independent runs for each K value, using a burn-in period of 100,000 iterations and 1,000,000 Markov Chain Monte Carlo repetitions. We tested ancestry models with and without admixture, and, for both models, correlated or independent alleles.

mtDNA control region sequencing and sequence polymorphism analysis

A section of the mtDNA control region (MCR) of 744 base pairs (bp) ranging from position 15,449 to 16,192 of the complete humpback whale mitogenome (Genbank: AP006467.1) was amplified by PCR using the primers: *L_Dlp1.5/H_Dlp8G* (Garrigue et al. 2004).

The PCR products were then purified and sequenced by a commercial sequencing facility (Beckman Coulter Genomics, UK or GATC, Germany). Electropherogrammes were analysed and edited using SequenceScanner, V1.0 (Applied Biosystems 2005). Final sequences were aligned using CLUSTAL W algorithm (Thompson et al. 1994) on BioEdit Software (Hall 1999).

Two larger datasets were constructed by including the SPLASH haplotypes available from Baker et al. (2013). These haplotypes overlapped on a 472bp common region with our data. In a first step, 53 sequences determined on humpback whales sampled near Commander Islands ($n=17$) and in Karaginsky Gulf ($n=36$) were added to our data, producing a global dataset of $n=170$ sequences (102 from Commander Islands and 68 from Karaginsky Gulf), sampled over a 12 year period (from 2004 to 2016). A second step consisted in including our sequences into the whole North Pacific dataset determined by Baker et al. (2013), thus allowing comparisons between our samples and all the North Pacific breeding and feeding grounds.

Descriptive statistics were calculated using the program DnaSP, V.5.10.01 (Librado & Rozas 2009) and Arlequin (Excoffier & Lischer 2010). We determined the numbers of polymorphic sites (S), haplotypes (h), haplotype diversity (H_d) and nucleotide diversity (π). We then compared predefined groups by calculating a χ^2 test, relevant for samples for which $H_d < 1 - \frac{1}{\min(n_1; n_2)}$ (n_1 and n_2 are the number of individuals in the compared group 1 and group 2, Hudson et al. 1992). We also used the nearest neighbour statistic,

S_{nn} (Hudson, 2000), which measures how often the nearest sequences of a neighbour are from the same studied group. This estimator enabled the testing of data either with low or high haplotype diversity. For two highly differentiated groups, S_{nn} is near 1 whereas for two undifferentiated groups, S_{nn} is near 0.5 (Hudson 2000). Finally, we used the software Arlequin, V3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010), in order to calculate fixation index estimators, F_{ST} and Φ_{ST} , analogs for haploid genomes to the F_{ST} calculated from nuclear diploid data (Weir & Cockerham 1984). All the genetic differentiation estimator calculations were performed with a permutation test of 10000 replicates.

Results

Samples

Table 1 lists all the skin biopsy samples used in this study. We obtained 132 skin samples from both sites, with $n_{\text{Kar}}=33$ in Karaginsky Gulf, and $n_{\text{Com}}=99$ from Commander Islands from 2008 to 2016. DNA extraction and sex determination were achieved for all of the samples (Table 1). Eight microsatellite loci were amplified and analyzed successfully from almost all the samples; genotypes were determined from all but two different sample/locus combinations. Identical microsatellite genotypes showed that four whales were sampled twice a same year in the same locale (in Karaginsky Gulf in 2008, in the Commander Islands in 2009, 2013 and 2016) and that four whales were sampled twice or thrice around the Commander Islands (see table 1 for details). No genotypes differing by only one or two loci were detected among the samples, supporting our conclusion that no other whales sampled several times were undetected because of genotyping errors. The duplicates of the whales of the same field season were removed from all analysis, and duplicates from different field seasons were included if they belonged to different compared groups, *i.e.* only in chronological analysis using inter-annual comparisons. Replicates were removed from all other analyses.

Table 1. Summary of samples used in this study

	Year	Samples	Individuals	Males	Females	Microsatellites	MCR sequences
Karaginsky	2004-2006	36 ^a	36	16	19	-	36
	2008	9	8 ^b	5	3	8	8
	2009	9	9	1	8	9	9
	2015	15	15	11	4	15	15
n_{Kar}		69	68	33	34	32	68
Commander	2004-2006	17	17	4	13	-	17
	2008	2	2 ^c	1	1	2	2
	2009	10	9 ^{d,e}	5	4	9	9
	2010	8	8	3	5	8	8
	2011	17	17 ^{e,f,h}	6	11	17	17
	2012	4	4	1	3	4	4
	2013	36	35 ^{c,e,f,g}	16	17	33	31
	2014	1	1	1	-	1	1
	2015	8	8	6	2	8	7
	2016	13	12 ^{h,i}	3	9	12	11
n_{Com}		116	113(108)	46	65	94	107 (102)
All		185	181(176)	79	99	126 (121)	175 (170)

Humpback whale skin samples were collected near Commander Islands (55°08'N, 166°10'E) and in Karaginsky Gulf (58°55'N, 164°20'E) from 2008 to 2016. Shown in the table are available samples, numbers of individuals, males and females for each locale and for each year, and numbers of microsatellite genotypes and MCR sequences determined. **n_{Kar}** and **n_{Com}** show the total number of samples for each locale, and numbers in brackets are numbers after removal of whales sampled different years.

a: a whale is of undetermined sex. *b*: a whale has been sampled twice in 2008. *c*: a whale has been sampled twice in 2008 and in 2013. *d*: a whale has been sampled twice in 2009. *e*: a whale has been sampled three times, in 2009, 2011 and 2013. *f*: a whale has been sampled in 2011 and in 2013, *g*: a whale has been sampled twice in 2013, *h*: a whale has been sampled in 2011 and 2016, *i*: a whale has been sampled twice in 2016

Microsatellite genotyping analysis and nuclear differentiation

The eight microsatellite loci studied were all polymorphic, with 7 to 15 alleles in the whole samples (Table S1). Analysis with FreeDNA did not detect evidence of significant frequencies of null alleles ($r < 0.05$ for all loci) and there was no evidence of linkage disequilibrium in any pairwise comparison of loci ($p > 0.05$ after Bonferroni correction). The expected heterozygosity calculated as an average for all loci was estimated at 0.76, with a range of 0.49 to 0.88 for the various loci considered independently (Table S1). Overall observed heterozygosity was also determined to be 0.76, with a range between loci from 0.51 to 0.89 (Table S1). F_{IS} values of all loci except two (GT575, $F_{IS}=0.091$, $p=0.024$ and GT211, $F_{IS}=0.080$, $p=0.037$) were not significantly different from zero (Table S1). The overall F_{IS} was non significant ($F_{IS}=0.003$, $p=0.25$, Table S1).

We looked for genetic divergence between *a priori* groups, arranged on the basis of the sex of the animals, their sampling locale, and the years of their sampling, by calculating F_{ST} and R_{ST} . For the inter-annual comparison, some groups present a low number of samples, and some results must therefore be taken with caution (see table 2 for sample sizes). We compared humpback whales sampled in Commander in 2011, in 2013 and from 2014 to 2016, and those sampled in Karaginsky in 2008, 2009 and 2015 (Table 2).

Table 2. Microsatellite differentiation for all groups of samples defined *a priori*.

	Locale		Sex		Years			
	Commander vs. Karaginsky	Male vs. Female	Karaginsky			Commander		
			2008vs2009	2008vs2015	2009vs2015	2011vs2013	2011vs2016	2013vs2016
Number of samples (N)	$N_{Com} = 89$ $N_{Kar} = 32$	$N_{Males} = 63$ $N_{Females} = 58$	$N_{08} = 8$ $N_{09} = 9$	$N_{08} = 8$ $N_{15} = 15$	$N_{09} = 9$ $N_{15} = 15$	$N_{11} = 17$ $N_{13} = 35$	$N_{11} = 17$ $N_{16} = 12$	$N_{13} = 35$ $N_{16} = 12$
F_{ST}	0.004 (ns)	0.0034*	-0.011 (ns)	-0.008 (ns)	-0.025 (ns)	0.011*	-0.004 (ns)	0.003 (ns)
R_{ST}	0.005 (ns)	0.007 (ns ⁽¹⁾)	0.023 (ns)	0.026 (ns)	0.041 (ns)	0.010 (ns)	0.002 (ns)	0.000 (ns)

Genetic differentiation of microsatellite loci between *a priori* determined groups of humpback whales was estimated for all pairs of groups by calculating two indices, the F_{ST} and R_{ST} using Arlequin (Excoffier & Lischer 2010). Significant values ($p < 0.05$) are in bold, with '**' $p < 0.05$, '***' $p < 0.01$ and '****' $p < 0.001$. 'ns' $p \geq 0.05$. ⁽¹⁾ $p < 0.1$

No differences were detected on the basis of microsatellite polymorphisms between Commander and Karaginsky samples. The F_{ST} calculation (but not the R_{ST}) detected a low genetic differentiation between males and females and between samples taken in 2011 and 2013 in Commander.

Comparative analysis of allelic frequencies did not reveal significant differences between whales from Commander and Karaginsky ($F_{ST}=0.004$, $R_{ST}=0.005$, both non significant although the F_{ST} pvalue is < 0.1 , Table 2). However, a low difference was detected between males and females from the two regions ($F_{ST}=0.0034$, $p=0.027$), although a non-significant $R_{ST}=0.006$ ($p=0.08$) did not confirm this difference (Table 2).

Inter annual comparisons of humpback whales sampled on both sites revealed no strong temporal variation of allele frequencies. Only the Commander 2011 and 2013 samples presented a significant F_{ST} value, not confirmed by R_{ST} calculation (Table 2). All other temporal variation indices determined were non significant.

The possible mixed origins of humpback whales in each of the locale prompted us to look for the existence of possible unpredicted genetic groups in Karaginsky and Commander samples using the Bayesian clustering approach implemented in the program Structure. There was no evidence of cryptic structure for the Commander samples, for the Karaginsky or for both pooled (no specific and reproducible groupings of samples were obtained with or without admixture, assuming correlated alleles or not, for $k=2$ to $k=5$; data not shown).

mtDNA control region diversity and differentiation

We sequenced 653 bp, covering around 70% of the mtDNA control region from 117 different individuals (Table 1). We observed 22 variable sites, which defined 16 different haplotypes (15 haplotypes in the Commander sample and 7 in the Karaginsky sample, table S2, Genbank accession numbers: KU893091-KU893108). We found no deletions or insertions; all of the variable sites were transitions and/or transversions. No heteroplasmy was observed. Among the global sample, we calculated a haplotype diversity of $Hd=0.80$ and a nucleotide diversity of $\pi=0.003$.

When the samples were subdivided into different strata (on the basis of locale, sex and the years the animals were sampled in each locale), each group presented haplotype diversity less than $1 - \frac{1}{\min(n1;n2)}$ (Table 3), so we used a χ^2 test in addition to F_{ST} , Φ_{ST} and S_{nn} calculations in order to assess the genetic differentiation between groups (Hudson et al. 1992). All four indices revealed a highly significant haplotype differentiation between individuals from Commander and Karaginsky (Table 3). Nine haplotypes among the 16 were unique to Commander individuals and one haplotype was unique to Karaginsky individuals (table S2). Conversely, none of the differentiation indices were significant between sex and between years of sampling (Table 3), and therefore displayed no genetic differentiation linked to these parameters.

Table 3. Summary of the mtDNA diversity within and genetic differentiation between groups defined *a priori* in the 2008-2016 samples

	Locale	Sex	Years			
	Commander vs. Karaginsky	Male vs. Female	Karaginsky	Commander		
			2008-2009 vs. 2015	2008-2011 vs. 2012-2013	2008-2011 vs. 2014-2016	2012-2013 vs. 2014-2016
Number of samples (N)	$N_{\text{Com}} = 85$ $N_{\text{Kar}} = 32$	$N_{\text{females}} = 60$ $N_{\text{males}} = 56$	$N_{08-09} = 17$ $N_{15} = 15$	$N_{08-11} = 36$ $N_{12-13} = 35$	$N_{08-11} = 36$ $N_{14-16} = 19$	$N_{12-13} = 35$ $N_{14-16} = 19$
Haplotype diversity (H_d)	$H_{d\text{Com}} = 0.74$ $H_{d\text{Kar}} = 0.70$	$H_{d\text{females}} = 0.81$ $H_{d\text{males}} = 0.77$	$H_{d\text{08-09}} = 0.76$ $H_{d\text{15}} = 0.62$	$H_{d\text{08-11}} = 0.74$ $H_{d\text{12-13}} = 0.77$	$H_{d\text{08-11}} = 0.74$ $H_{d\text{14-16}} = 0.77$	$H_{d\text{12-13}} = 0.77$ $H_{d\text{14-16}} = 0.77$
Nucleotide diversity (π)	$\pi_{\text{Com}} = 0.004$ $\pi_{\text{Kar}} = 0.002$	$\pi_{\text{females}} = 0.004$ $\pi_{\text{males}} = 0.003$	$\pi_{08-09} = 0.002$ $\pi_{15} = 0.001$	$\pi_{08-11} = 0.005$ $\pi_{12-13} = 0.004$	$\pi_{08-11} = 0.005$ $\pi_{14-16} = 0.002$	$\pi_{12-13} = 0.004$ $\pi_{14-16} = 0.002$
$1 - \frac{1}{\min(n1; n2)}$	0.97	0.98	0.93	0.97	0.95	0.95
χ^2	48.4***	20.46 (ns)	7.4 (ns)	12.24 (ns)	14.05 (ns)	16.84 (ns)
S_{nn}	0.72***	0.53 (ns)	0.52 (ns)	0.50 (ns)	0.57 (ns)	0.57 (ns)
F_{ST}	0.18***	0.01 (ns)	0.01 (ns)	0 (ns)	0 (ns)	0 (ns)
Φ_{ST}	0.14***	0.00 (ns)	0.04 (ns)	0.0 (ns)	0.02 (ns)	0.01 (ns)

Mitochondrial DNA haplotype (H_d) and nucleotide (π) diversities were calculated for each group of humpback whales using the program DnaSP, V.5.10.01 (Librado & Rozas 2009). Genetic differentiation between groups was estimated for all pairs of groups by calculating four indices, the χ^2 and S_{nn} (calculated using DnaSP, V.5.10.01, Librado & Rozas 2009), the F_{ST} and Φ_{ST} (calculated using Arlequin, Excoffier & Lischer 2010). Significant values ($p < 0.05$) are in bold, with '*' $p < 0.05$, '**' $p < 0.01$ and '***' $p < 0.001$. 'ns' $p \geq 0.05$.

All four indices indicate a strong genetic differentiation between Karaginsky and Commander samples.

The mtDNA haplotypes identified during this study and those from the SPLASH program (Baker et al. 2013) overlapped at 472 bp. The truncated alignment of 472 bp involved the loss of only 1 SPLASH haplotype (haplotypes A+ and A- were no more distinguished, Table S2). Including the SPLASH samples to our data increased our samples to $n=68$ for Karaginsky Gulf and $n=102$ for Commander Islands (Table 1). All of the haplotypes determined in this study had a 100% identity with one of the SPLASH haplotype, although some of them were not previously sampled in the Russian feeding ground (Table S2). Haplotype MnBer9_3, which was identical to the haplotypes A+/A- of Baker et al. (2013) for the truncated alignment, was the most represented in the Commander samples (it was found in 46% of the samples), followed by haplotype MnBer9_2, identical to E1 (18% of the samples), while the same MnBer9-2/E1 haplotype accounted for 50% of the Karaginsky samples, followed by haplotype MnBer8_2, identical to E6 (24% of the Karaginsky samples, Table S2). This extended dataset provided results consistent with the ones obtained with the 2008-2016 only samples, and strongly confirmed the genetic differentiation observed between Karaginsky and Commander (table S3). For the combined datasets, all four indices calculated were strongly significant ($p < 0.001$) between the two locales, while all other calculations (between males and females, between years) were non significant.

mtDNA differentiation with other feeding grounds

Pairwise comparisons of Commander DNA haplotypes with those of all other Pacific feeding grounds, as represented in SPLASH (Tables 4 and S4) provided strongly significant differentiations with five out the nine regions, Northern Gulf of Alaska (NGOA), Southeast Alaska (SEA), Northern British Columbia (NBC), Southern British Columbia - Washington (SBC-WA) and California-Oregon (CA/OR) (Table 4). No differences between Commander and Western Gulf of Alaska (WGOA) and Western Aleutians (WAL) were detected (all indices non significant), and only Φ_{ST} detected a low but significant difference between Commander and Eastern Aleutians (EAL). Bering Sea (BS) and Commander comparison provided significant values of differentiation for Snn , Φ_{ST} and χ^2 tests (Tables 4 and S4).

Table 4. Pairwise F_{ST} and Φ_{ST} calculated among the 2004-2016 Commander and Karaginsky samples and all North Pacific feeding grounds

	Western Aleutians (WAL)	Bering Sea (BER)	Eastern Aleutians (EAL)	Western Gulf of Alaska (WGOA)	Northern Gulf of Alaska (NGOA)	Southeast Alaska (SEA)	Northern British Columbia (NBC)	Southern British Columbia - Washington (SBC-WA)	California-Oregon (CA/OR)
vs Commander ($N_{Com}=102$)									
F_{ST}	0 (ns)	0.01 (ns)	0.01 (ns)	0 (ns)	0.04 ***	0.31 ***	0.22 ***	0.02 *	0.12 ***
Φ_{ST}	0 (ns)	0.04 **	0.05 **	0 (ns)	0.03 **	0.15 ***	0.09 ***	0.02 *	0.26 ***
vs Karaginsky ($N_{Kar}=68$)									
F_{ST}	0.09 (ns)	0.22 ***	0.22 ***	0.16 ***	0.33 ***	0.69 ***	0.59 ***	0.23 ***	0.15 ***
Φ_{ST}	0.18 *	0.22 ***	0.27 ***	0.15 ***	0.21 ***	0.60 ***	0.48 ***	0.16 ***	0.34 ***

Genetic differentiation of mitochondrial DNA between regional feeding groups and, respectively, Commander and Karaginsky samples was estimated for all pairs of groups of humpback whales by calculating two indices, the F_{ST} and Φ_{ST} (calculated using Arlequin, Excoffier & Lischer 2010). Significant values ($p<0.05$) are in bold, with ‘*’ $p<0.05$, ‘**’ $p<0.01$ and ‘***’ $p<0.001$. ‘ns’ $p\geq 0.05$.

Commander samples presented no differentiations with WAL and WGOA, a low differentiation with BER and EAL, and higher differentiations with all other feeding regions (all indices strongly significant, see also table S4). Karaginsky samples were highly differentiated from all other feeding area excepted WAL (Φ_{ST} significant)

Karaginsky samples appeared as highly differentiated from all other feeding grounds (Table 4), all four indices of differentiation were significant for all pairwise comparisons, excepted with the WAL (F_{ST} and Snn non significant). The highest differentiations were observed between Karaginsky and NGOA, SEA, NBC (Tables 4 and S4).

It is to note that for all pairwise comparisons with the north Pacific feeding grounds, all the differentiation indices had higher values for Karaginsky than for Commander.

mtDNA differentiation with breeding grounds

When differentiation indices were calculated with breeding grounds, as represented by the SPLASH program (Tables 5 and S4), Commander samples appeared as differentiated from all North Pacific breeding grounds for most of the indices. A notable exception was Mexico-Revillagigedo and the Mexico mainland grounds, which did not differ for F_{ST} (Table 5). By comparison, the Karaginsky sample showed significant differentiation from all breeding grounds except the Philippines (which have only a small sample size, Tables 5 and S4). Indices of differentiation were generally marked, except for Okinawa, which was weak but significant.

Table 5. Pairwise F_{ST} and Φ_{ST} calculated among the 2004-2016 Commander and Karaginsky samples and all North Pacific breeding grounds

	Philippines (PHI)	Okinawa (OK)	Ogasawara (OG)	Hawaii (HI)	Mexico- Revillagigedo (MX-AR)	Mexico-Baja California (MX-BC)	Mexico- Mainland (MX-ML)	Central America (CENAM)
vs Commander ($N_{Com}=102$)								
F_{ST}	0.16 ***	0.15 ***	0.04 ***	0.09	0.01 (ns)	0.01 *	0.01 (ns)	0.17 ***
Φ_{ST}	0.02 (ns)	0.11 ***	0.03 **	0.04 **	0 (ns)	0.02 *	0.06 ***	0.32 ***
vs Karaginsky ($N_{Kar}=68$)								
F_{ST}	0.02 (ns)	0.02 *	0.08 ***	0.43	0.14 ***	0.13 ***	0.14 ***	0.12 ***
Φ_{ST}	0.04 (ns)	0.03 **	0.06 ***	0.25	0.14 ***	0.13 ***	0.18 ***	0.43 ***

Genetic differentiation of mitochondrial DNA between regional breeding groups and, respectively, Commander and Karaginsky humpback whales was estimated for all pairs of groups by calculating two indices, the F_{ST} and Φ_{ST} (calculated using Arlequin, Excoffier & Lischer 2010). Significant values ($p < 0.05$) are in bold, with ‘*’ $p < 0.05$, ‘**’ $p < 0.01$ and ‘***’ $p < 0.001$. ‘ns’ $p \geq 0.05$.

Commander samples presented the lower differentiations with the Mexican breeding grounds, particularly MX-AR and MX-ML, while Karaginsky presented no differentiation with PHI and low differentiation with OK (see also table S4).

Discussion

Our study is one of the first targeting humpback whales in their Russian feeding grounds from a genetic point of view. Previous studies pooled all samples from the various Russian sites as one unit for comparison due to the low sample size, and revealed a significant divergence between the Russian and most of other North Pacific feeding regions (Baker et al. 2013). Here, we provide analysis on a finer scale with larger sample size, allowing us to distinguish between two feeding sites, spaced around 500 km in the Russian feeding ground. We observed a significant maternal lineage divergence between the two feeding sites. Thus, we brought new pieces of evidence for the fidelity of humpback whales to their feeding sites, as revealed by genetic differences between groups, in agreement with the observation of Baker et al. (2013), but at a finer geographical scale.

Mitochondrial DNA population structure leads to hypothesis of fine-scale, maternally directed fidelity to feeding sites

Analysis of microsatellite polymorphism did not detect strong genetic differences between humpback whales feeding in the two study sites ($F_{ST} = 0.004$, $p < 0.1$). In the whole group of samples, microsatellite polymorphisms met the expectation of the Hardy-Weinberg equilibrium. As a first hypothesis, our samples might therefore come from a non-isolated population of sufficient size to avoid inbreeding, and presenting *a priori* no strong population subdivision. A moderate differentiation exists between males and females ($F_{ST} = 0.0034$, $p < 0.05$, $R_{ST} = 0.007$, $p < 0.1$), regardless of locale and years considered. This differentiation between males and females was not found with mtDNA haplotypes.

In contrast, a highly significant mitochondrial DNA difference was observed with all four calculations (F_{ST} , Φ_{ST} , χ^2 and S_{nn}) between humpback whales sampled at the two feeding sites. Such mitochondrial divergences have often been explained, at larger geographic scales, by the fidelity of humpback whales to feeding grounds (*i.e.* Baker et al. 1990, 1993, 2013; Palsbøll et al. 1995; Larsen et al. 1996). Humpback whales show different feeding strategies in the two studied feeding sites. In the coastal waters around Karaginsky Island, they forage most likely on schooling fishes, while they eat more

euphausiids off Commander Islands (Filatova et al. 2013). Yet humpback whales are known to be opportunistic predators, consuming available prey (Filatova et al. 2013). Thus, the fidelity for each site highlighted in our study may be less linked to a foraging preference, than to a particular migratory destination. Here, we suggest that the significant mtDNA difference between Karaginsky and the Commanders may be representative of a maternal lineage differentiation, between two feeding sites on what has been considered the same feeding ground.

In fact, the average length of time of lactation for humpback whales was first estimated at 10.5 months by Chittleborough (1958) with some observations suggesting that the separation between calf and mother happens after the return to the breeding ground (Baker et al. 1987). Even though Baraff and Weinrich (1993) observed that the separation can occur already on the feeding ground, calves may learn from their mother the migration route on their first trip between their calving ground and the feeding ground. The mtDNA differentiation between Karaginsky and the Commanders could therefore be explained by a cultural transmission of the migration route leading to a fidelity over generations to a specific feeding site within a particular feeding ground. Other results suggest that similar divisions of humpback whale groups might be found elsewhere in the North Pacific (Wright et al. 2015). It should be determined if fidelity to specific feeding sites, at small geographic scales, sometimes linked to specific feeding behaviours, maternally learned and corresponding to a cultural transmission between generations, is a more common situation than previously suspected for humpback whales.

No significant temporal variations were observed, although the samples have been taken over a 13-year period (2004-2016) when including data from the SPLASH program. We just observed a low and slightly significant (only for F_{ST} , R_{ST} was non significant) nuclear difference between individuals sampled in Commander in 2011 and in 2013, suggesting that a temporal effect might exist. For instance, we could speculate that most individuals biopsied in 2011 do not breed on the same ground(s) as most of the individuals biopsied between in 2013. More research could clear up this uncertainty.

How do Karaginsky and Commander humpback whales compare themselves to distant North Pacific feeding and breeding grounds?

The availability of mtDNA haplotypes determined in the whole North Pacific during the SPLASH program allowed us to compare mtDNA haplotype distributions at a large geographic scale. We followed the SPLASH program for the naming of North Pacific grounds (Barlow et al., 2011). This large-scale comparison strongly reinforced the differences between Commander and Karaginsky.

Commander samples appeared as closely related to WAL (Western Aleutians), EAL (Eastern Aleutians) and WGOA (Western Gulf Of Alaska) feeding grounds (no significant differentiation indices were calculated with these three feeding grounds), and different from all others. The higher differences were determined with all the northeast Pacific feeding grounds. When compared to breeding grounds, Commander is different from all North Pacific breeding grounds, but the weaker or non-significant values of the differentiation indices were calculated with Mexican mainland grounds, particularly with MX-AR (Mexico-Revillagigedo) and MX-ML (Mexico-Mainland). The higher values of differentiation indices were determined with OK (Okinawa), HI (Hawaii) and CENAM (Central America). As already demonstrated by Baker et al. (2013), these observations confirm that, in the North Pacific, there is no simple one to one correlation between the geographical distance from a feeding to a breeding ground and humpback whale genetic closeness in the two grounds (*i.e.*, Mexican mainland breeding grounds are more distant to Commander islands than HI and OK).

Karaginsky samples appeared as highly differentiated from almost all other North Pacific feeding grounds, with differentiation indices having higher values in all pairwise comparisons than those performed with Commander samples. WAL presented the lower indices values, but the low number of WAL samples precludes drawing a clear conclusion. Karaginsky samples are highly different from all North Pacific breeding grounds except two, the higher differences occurring with HI, CENAM and the three Mexican mainland grounds (these latter contrasting greatly with Commander samples). Indices of low values, less significant, were determined with the OK breeding ground (not with OG (Ogasawara)). No differences were detected with PHI (the Philippines, all indices non significant), but here again a caution must be taken because of a low number of samples ($n=13$), although χ^2 and S_{nn} are powerful indicators for low number samples (Hudson et al. 1992, Hudson 2000).

It can be noted that the four differentiation indices calculated between Karaginsky and Commander have values that can be compared to the ones determined with more distant feeding grounds. The mtDNA difference that we determined between the two sites is therefore linked to a genetic difference between two groups of humpback whales that can be compared to differences between the major grounds of the North Pacific, at a strongly larger geographic scale.

With the exception of PHI and Karaginsky, all pairwise comparisons between one of the two feeding sites and all the North Pacific breeding grounds have at least two differentiation indices with significant values over the four calculated. Karaginsky and Commander appear therefore to represent mixed feeding sites, where humpback whales from different breeding grounds mix. If the low number of PHI samples ($n=13$) does not preclude the detection of an actual genetic differentiation, the absence of differentiation could nevertheless indicate a direct link between Karaginsky and PHI, as it is the case in the northeast Pacific between CENAM and CA-OR (Baker et al. 2013). But the more or less low values of differentiation indices between Karaginsky and OK also suggest the existence of some migratory connections between the two sites. Commander samples appear to be more closely linked to the Mexican mainland grounds, particularly two of them (MX-AR and MX-ML). In contrast to mtDNA, nuDNA polymorphisms revealed a very low genetic differentiation between Karaginsky and Commander, if any, significant only at $p<0.1$. It can therefore be hypothesized that humpback whales from different breeding grounds must share fidelity to the two feeding sites. PHI and OK could represent good candidates for these breeding grounds.

Implications for management

Baker et al. (2013) discussed the importance of considering feeding regions when defining units to conserve, in particular because of the maternally inherited traditions of migration, depicted through the divergence of mtDNA. In our study we have added one more level of detail, as we have distinguished two groups within one feeding region, *i.e.* the Russian feeding region (Baker et al. 2013). During the SPLASH study, the areas surrounding the Commander Islands and Karaginsky Gulf were thought to be hosting different humpback whales, because of the lack of photo-ID recapture between the two sites (Calambokidis et al. 2008). More recently, Filatova et al. (2013) proposed, on the basis of different ecological characteristics, the existence of two different feeding sites

for humpback whales in these two areas. We reinforce this proposal by adding a genetic basis to the ecological and behavioural differences. We have identified fidelity to specific feeding sites within what has been considered the same feeding ground, reflected in mtDNA polymorphisms, and therefore hypothetically due to a cultural transmission. We have thus revealed a significant maternal lineage divergence between the two Russian sites and that appears to be of similar magnitude as the mtDNA divergences observed by Baker et al. (2013) between feeding regions (i.e. feeding grounds). Conservation policies should take this diversity into account, to preserve feeding grounds to the same extent as breeding grounds, since the loss of a feeding ground, even partial, would also correspond to the loss of genetic heritage, and maybe the loss of an optimal habitat (Baker et al. 2013).

In the Bering Sea, some humpback whale feeding grounds overlap with potentially detrimental human activities including shipping routes and fishing activities, such as in Karaginsky Gulf. Humpback whales will likely be exposed in the coming years to increasing anthropogenic disturbances, elevating conservation concerns (Alter et al. 2010; Christiansen et al. 2014; Smith and Stephenson 2013; Van Waerebeek et al. 2007). The Commander Islands have been largely protected since 1993 within the Commander Islands *zapovednik* (IUCN Category Ia) in order to preserve the birds and marine mammals in its waters. This marine protected area was then classified as the Commander Islands State Biosphere Reserve in 2002 (Hoyt, 2011). In contrast, Karaginsky Gulf is not a marine protected area; there is considerable fishing activity and potential hydrocarbon development, as well as shipping activity. Having baseline information that highlights the diversity and present status of the Karaginsky and Commander Island humpback whales will enable future comparisons related to the influence of shipping and fishing activities between the two areas and the potential value of extending habitat protection to Karaginsky and indeed other areas of the Russian Far East.

Fundings

This work was supported by a Pew Marine Conservation Fellowship to OF, the Litowitz Foundation, and the Tides Foundation, facilitated by Whale and Dolphin Conservation. Laboratory analyses were financed by the Université de Bretagne Occidentale (France) in the framework of the 'ERCS' (Equipe reconnue par le Conseil Scientifique) programme for the BioGEMME laboratory.

Acknowledgments

The authors warmly thank all of the field workers from the Far East Russia Orca Project (FEROP) and the Russian Cetacean Habitat Project for their effort to collect the data. Biopsy samples were taken as part of permits granted by the Russian Ministry of the Natural Resources. We thank C.S. Baker and the members of the SPLASH Steering Committee for facilitating access to the mtDNA haplotypes from this ocean-wide study. In addition, C.S. Baker provided highly valuable inputs on the redaction of this manuscript.

We also wish to thank people who contributed to the lab work and data analyses, especially I. Meschersky, F.-G. Carpentier, E. Alfonsi and E. Méheust. A special thanks to J.-M. Filloque (UBO).

References

- Alexander A, Steel D, Hoekzema K, Mesnick SL, Engelhaupt D, Kerr I, Payne R, Baker CS (2016) What influences the worldwide genetic structure of sperm whales (*Physeter macrocephalus*)? *Mol Ecol*. doi:10.1111/mec.13638
- Alfonsi E, Hassani S, Carpentier F-G, Le Clec'h J-Y, Dabin W, Van Canneyt O, Fontaine MC, Jung J-L (2012) A european melting pot of harbour porpoise in the French Atlantic coasts inferred from mitochondrial and nuclear data. *PLoS ONE* 7:e44425
- Alter ES, Simmonds MP, Brandon JR (2010) Forecasting the consequences of climate-driven shifts in human behavior on cetaceans. *Mar Policy* 34:943–954
- Baker CS, Palumbi S, Lambertsen R, Weinrich M, Calambokidis J, Obrien S (1990) Influence of seasonal migration on geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in humpback whales. *Nature* 344:238–240
- Baker CS, Perry A, Bannister JL, Weinrich MT, Abernethy RB, Calambokidis J, Lien J, Lambertsen RH, Ramírez JU, Vasquez O (1993) Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales. *Proc Natl Acad Sci* 90:8239–8243
- Baker CS, Perry A, Herman (1987) Reproductive Histories of Female Humpback Whales *Megaptera Novaeangliae*. *Mar Ecol Prog Ser* 41:103–114.
- Baker CS, Steel D, Calambokidis J, Falcone E, González-Peral U, Barlow J, Burdin A, Clapham P, Ford J, Gabriele C, Mattila D, Rojas-Bracho L, Straley J, Taylor B, Urbán J, Wade P, Weller D, Witteveen B, Yamaguchi M (2013) Strong maternal fidelity and natal philopatry shape genetic structure in North Pacific humpback whales. *Mar Ecol Prog Ser* 494:291–306
- Baraff L, Weinrich MT (1993) Separation of Humpback Whale Mothers and Calves on a Feeding Ground in Early Autumn. *Mar Mam Sci* 9:431–434.
- Barlow J, Calambokidis J, Falcone EA, Baker CS, Burdin AM, Clapham PJ, Ford JKB, Gabriele CM, LeDuc R, Mattila DK, Quinn TJ, Rojas-Bracho L, Straley JM, Taylor BL, Urbán J, Wade RP, Weller D, Witteveen BH, Yamaguchi M (2011) Humpback whale abundance in the North Pacific estimated by photographic capture-recapture with bias correction from simulation studies. *Mar Mam Sci* 27:793–818.
- Bérubé M, Jørgensen H, McEwing R, Palsbøll PJ (2000) Polymorphic di-nucleotide microsatellite loci isolated from the humpback whale, *Megaptera novaeangliae*. *Mol Ecol* 9:2181–2183
- Bettridge S, Baker CS, Barlow J, Clapham PJ, Ford M, Gouveia D, Mattila DK, Pace III RM, Rosel PE, Silber GK, others (2015) Status review of the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) under the endangered species act. NOAA Technical Memorandum NMFS-SWFSC-540. California: U.S. Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, Southwest Fisheries Science Center.
- Calambokidis J, Falcone EA, Quinn TJ, Burdin AM, Clapham PJ, Ford JKB, Gabriele CM, LeDuc R, Mattila DK, Rojas-Bracho L, Straley JM, Taylor BL, Urbán J, Weller D, Witteveen BH, Yamaguchi M, Bendlin A, Camacho D, Flynn K, Havron A, Huggins J and Maloney N (2008). SPLASH: Structure of Populations, Levels of Abundance and Status of Humpback Whales in the North Pacific. Final report for Contract AB133F-03-RP-00078, U.S. Dept of Commerce, Western Administrative Center, Seattle, Washington.
- Carroll EL, Baker CS, Watson M, Alderman R, Bannister J, Gaggiotti OE, Gröcke DR, Patenaude N, Harcourt R (2015) Cultural traditions across a migratory network shape the genetic structure of southern right whales around Australia and New Zealand. *Sci Rep* 5:16182

- Chapuis M-P, Estoup A (2007) Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Mol Biol Evol* 24:621–631
- Chittleborough R (1958) The Breeding Cycle of the Female Humpback Whale, *Megaptera nodosa* (Bonnaterre). *Mar Freshwater Res* 9:1–18
- Christiansen JS, Mecklenburg CW, Karamushko OV (2014) Arctic marine fishes and their fisheries in light of global change. *Glob Change Biol* 20:352–359
- Decker C, Hassani S, Jezequel M, Rault C, Dumas C, Meheust E, Alfonsi E, Jung J-L (2017) Mitochondrial DNA reveals historical maternal lineages and a postglacial expansion of the grey seal in European waters. *Mar Ecol Prog Ser*. doi: 10.3354/meps12003
- Engelhaupt D, Hoelzel AR, Nicholson C, Frantzis A, Mesnick S, Gero S, Whitehead H, Rendell L, Miller P, De Stefanis R et al (2009) Female philopatry in coastal basins and male dispersion across the North Atlantic in a highly mobile marine species, the sperm whale (*Physeter macrocephalus*). *Mol Ecol* 18:4193–4205
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Res* 10: 564–567
- Filatova OA, Witteveen BH, Goncharov AA, Tiunov AV, Goncharova MI, Burdin AM, Hoyt E (2013) The diets of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on the shelf and oceanic feeding grounds in the western North Pacific inferred from stable isotope analysis. *Mar Mam Sci* 29:E253–E265
- Fontaine MC, Roland K, Calves I, Austerlitz F, Palstra FP, Tolley K, Ryan S, Ferreira M, Jauniaux T, Llavona A et al (2014) Postglacial climate changes and rise of three ecotypes of harbour porpoises, *Phocoena phocoena*, in western Palearctic waters. *Mol Ecol* 23:3306–3321
- Foote AD, Vilstrup JT, De Stephanis R, Verborgh P, Abel Nielsen SC, Deaville R, Klaivane L, Martin V, Miller PJO, Øien N et al (2011) Genetic differentiation among North Atlantic killer whale populations. *Mol Ecol* 20:629–641.
- Foote AD, Vijay N, Avila-Arcos M, Baird RW, Durban JW, Fumagalli M, Gibbs RA, Hanson MB, Korneliussen TS, Martin MD et al (2016) Genome-culture coevolution promotes rapid divergence in the killer whale. *BioRxiv*, DOI 10.1101/040295
- Ford JKB, Ellis GM, Barrett-Lennard LG, Morton AB, Palm RS, Balcomb KC (1998) Dietary specialization in two sympatric populations of killer whales (*Orcinus orca*) in coastal British Columbia and adjacent waters. *Can. J. Zool.* 76:1456–1471.
- Garrigue C, Dodemont W, Steel D, Baker CS (2004) Organismal and “gametic” capture-recapture using microsatellite genotyping confirm low abundance and reproductive autonomy of humpback whales on the wintering grounds of New Caledonia. *Mar Ecol Prog Ser* 274:251–262
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.htm>
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98
- Hoffman JI, Dasmahapatra KK, Amos W, Phillips CD, Gelatt TS, Bickham JW (2009) Contrasting patterns of genetic diversity at three different genetic markers in a marine mammal metapopulation. *Mol Ecol* 18, 2961–2978.
- Hoyt E (2011) Marine protected areas for whales, dolphins and porpoises: A world handbook for cetacean habitat conservation and planning. 2nd Edition, revised. Earthscan, London and New York. 477pp
- Hudson RR (2000) A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* 155:2011–2014
- Hudson RR, Boos DD, Kaplan NL (1992) A statistical test for detecting geographic subdivision. *Mol Biol Evol* 9:138–151
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16:1099–1106

- Kopps AM, Ackermann CY, Sherwin WB, Allen SJ, Bejder L, Krützen M (2014) Cultural transmission of tool use combined with habitat specializations leads to fine-scale genetic structure in bottlenose dolphins. *Proc. R. Soc. B* 281:20133245
- Lambertsen RH (1987) A biopsy system for large whales and its use for cytogenetics. *J Mammal* 68:443-445
- Larsen AH, Sigurjonsson J, Oien N, Vikingsson G, Palsboll P (1996) Populations genetic analysis of nuclear and mitochondrial loci in skin biopsies collected from central and northeastern north Atlantic humpback whales (*Megaptera novaeangliae*): population identity and migratory destinations. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 263:1611–1618
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452
- Louis M, Viricel A, Lucas T, Peltier H, Alfonsi E, Berrow S, Brownlow A, Covelio P, Dabin W, Deaville R et al (2014) Habitat-driven population structure of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the North-East Atlantic. *Mol Ecol* 23:857-874
- Mendez M, Subramaniam A, Collins T, Minton G, Balwin R, Berggren P, Särnblad A, Amir OA, Peddemors VM, Karczarnski L et al (2011) Molecular ecology meets remote sensing: environmental drivers to population structure of humpback dolphins in the Western Indian Ocean. *Heredity* 107, 349-361.
- Morin PA Archer FI, Foote AD, Vilstrup J, Allen EE, Wade P, Durban J, Parsons K, Pitman R, Li L et al (2010) Complete mitochondrial genome phylogeographic analysis of killer whales (*Orcinus orca*) indicates multiple species. *Genome Res.* 20:908-916
- Moritz C (1994) Defining “Evolutionarily Significant Units” for conservation. *Trends Ecol Evol* 9:373–375
- Palsboll PJ, Berube M, Larsen AH, Jorgensen H (1997) Primers for the amplification of tri- and tetramer microsatellite loci in baleen whales. *Mol Ecol* 6:893–895
- Palsbøll PJ, Clapham PK, Mattila DK, Larsen F, Sears R, Siegismund HR, Arctander P (1995) Distribution of mtDNA haplotypes in North Atlantic humpback whales: the influence of behaviour on population structure. *Mar Ecol Prog Ser* 116:1-10
- Palumbi SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annu Rev Ecol Syst* 25:547–572
- Palumbi SR, Baker CS (1994) Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Mol Biol Evol* 11:426–435
- Pomilla C, Rosenbaum HC (2005) Against the current: an inter-oceanic whale migration event. *Biol Lett* 1:476–479
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959
- Smith LC, Stephenson SR (2013) New Trans-Arctic shipping routes navigable by midcentury. *Proc Natl Acad Sci* 110:E1191–E1195
- Stone G, Florez-Gonzalez L, Katona S (1990) Whale migration record. *Nature* 346:705–705
- Thompson J, Higgins D, Gibson T (1994) Clustal-W - Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Valsecchi E, Amos W (1996) Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Mol Ecol* 5:151–156
- Van Waerebeek K, Baker AN, Félix F, Gedamke J, Iñiguez M, Sanino GP, Secchi E, Sutaria D, Van Helden A, Wang Y (2007) Vessel collisions with small cetaceans worldwide and with large whales in the Southern Hemisphere, an initial assessment. *Lat Am J Aquat Mamm* 6:43-69
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370
- Wright DL, Witteveen B, Wynne K, Horstmann-Dehn L (2015) Evidence of two subaggregations of humpback whales on the Kodiak, Alaska, feeding ground revealed from stable isotope analysis. *Mar Mam Sci* 31:1378–1400

Saint-Pierre-et-Miquelon, un site de nourrissage des baleines à bosse de l'Atlantique Nord à préserver

L'hypothèse d'une population panmictique en Atlantique Nord, longtemps acceptée, est actuellement remise en question.

Le cas de l'Atlantique Nord semble *a priori* plus simple que celui du Pacifique Nord. Les Antilles, du nord des Bahamas jusqu'à l'île d'Aruba au large du Venezuela (Figure 26) offrent sur plus de 2000 km une succession d'habitats favorables pour la reproduction des baleines à bosse (eaux peu profondes, souvent côtières, de température supérieure à 20°C, Trudelle et al. 2016). Cette zone est considérée depuis vingt ans comme abritant une seule population panmictique de baleines à bosse, estimée à presque 11 000 individus (Stevick et al. 2003). Des liens ont été trouvés avec les principales zones d'alimentation de l'Atlantique Nord, qui se distribuent de manière discontinue à l'est en Islande, Norvège et dans la mer de Barents, et à l'ouest dans le golfe du Maine, le golfe du Saint-Laurent, Terre-Neuve et le Labrador, et l'ouest du Groenland (Palsboll et al. 1997). Une deuxième zone de reproduction a été identifiée en Atlantique Nord Est, autour des Iles du Cap Vert, très minoritaire en termes d'abondance (260 individus estimés autour de l'île de Boa Vista, Ryan et al. 2014). Plusieurs baleines à bosse du cap Vert ont été identifiées dans les zones d'alimentation d'Atlantique Nord Est (Wenzel et al. 2009).

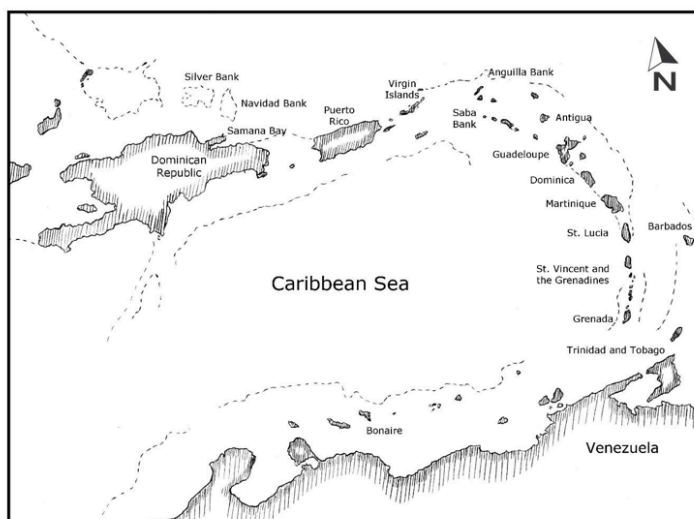


Figure 26 : Carte des Antilles (tirée de Stevick et al. 2015, IWC, SC/66a/AWMP/2).

Stevick et al. 2015 émettent l'hypothèse de deux zones de reproduction adjacentes pour les baleines à bosse, l'une au nord d'Antigua et l'autre au sud.

Pourtant, l'homogénéité de la zone de reproduction des Antilles a été récemment remise en question (Stevick et al. 2015 ; 2016). En se basant sur des photoidentifications d'individus, sur des différences de période de fréquentation de la zone de reproduction et sur la présence de cicatrices laissées par des attaques d'orques, Stevick et al. (2015) ont émis l'hypothèse que les Antilles abriteraient deux zones de reproduction distinctes, l'une correspondant globalement aux grandes Antilles (Stevick et al. (2015) fixent la limite au nord de l'île d'Antigua) et l'autre aux petites Antilles, comprenant notamment les îles Françaises de la Guadeloupe et de la Martinique. Les baleines à bosse se reproduisant aux grandes Antilles, notamment en République Dominicaine, possèderaient une fidélité plus marquée pour les zones d'alimentation de l'ouest de l'Atlantique Nord (Stevick et al. 2003), alors que celles des petites Antilles seraient retrouvées plus fréquemment dans les aires d'alimentation du nord est de l'Atlantique (Stevick et al. 2015). Des échanges directs d'une zone de reproduction à l'autre ont aussi été mis en évidence entre les petites Antilles et les Îles du Cap Vert (4 baleines à bosse différentes recapturées par photo-identification dans les deux zones). Néanmoins, des exemples de mouvements entre les grandes Antilles et les zones d'alimentation de l'est de l'Atlantique Nord existent (voir par exemple la baleine K Figure 13 ; Kennedy et al. 2014). L'hypothèse de l'existence de deux zones de reproduction adjacentes dans les Antilles est donc posée depuis les résultats récents de Stevick et al. (2015, 2016), mais elle n'est clairement pas définitivement prouvée.

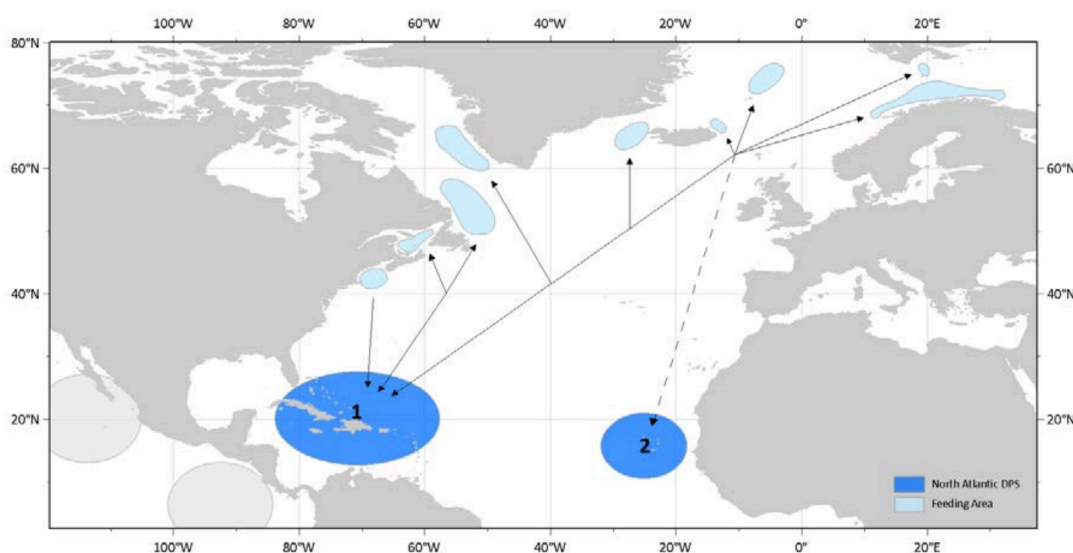


Figure 27 : Répartition des zones de reproduction et d'alimentation en Atlantique Nord selon Bettridge et al. 2015. Cette carte ne prend pas en compte l'hypothèse d'une double zone de reproduction dans les Antilles

Les études génétiques des baleines à bosse de l'Atlantique Nord ne sont pas exhaustives

Aucune étude comparable à celle menée dans le cadre du programme SPLASH, qui a permis de réaliser une caractérisation génétique globale des baleines à bosse des différentes zones de reproduction et d'alimentation du Pacifique Nord, n'a été menée en Atlantique Nord. Néanmoins, plusieurs études génétiques ont pu être menées en Atlantique Nord, notamment dans le cadre du programme *YoNAH* (*Years of the North Atlantic Humpback*, Smith et al. 1999). Une différence génétique significative, reflétée par une disparité de distribution des haplotypes d'ADN mitochondrial, a été retrouvée entre les zones d'alimentation de l'est et de l'ouest de l'Atlantique Nord (Palsboll et al. 1995, Larsen et al. 1996). La diversité génétique a aussi été montrée comme étant moins grande en Atlantique Nord Est qu'en Atlantique Nord Ouest, les haplotypes du clade CD étant notamment absents des aires d'alimentation de l'est (Palsboll et al. 1995, Baker & Medrano-Gonzalez, 2002). Une différence génétique faible mais significative a été identifiée par l'analyse de l'ADN nucléaire (4 loci contenant des microsatellites étudiés) entre Atlantique Nord Est et Atlantique Nord Ouest par Valsecchi et al. (1997), venant contredire une étude précédente similaire qui n'avait pas détecté de différences (6 loci contenant des microsatellites étudiés, Larsen et al. 1996).

L'existence de deux zones de reproduction des baleines à bosse en Atlantique Nord, amenant des différences génétiques potentiellement identifiables par l'étude du génome nucléaire, est l'hypothèse qui semble la plus réaliste, que la distinction se situe dans les Antilles (Stevick et al. 2015) ou entre les Antilles et le Cap Vert (Bettridge et al. 2015 ; Figure 27). Des fidélités pour des zones d'alimentation différentes, en Atlantique Nord Ouest ou en Atlantique Nord Est, transmises au fil des générations par l'apprentissage, seraient à l'origine des différences de distribution des haplotypes d'ADN mitochondriaux observées (Palsboll et al. 1995 ; Larsen et al. 1996).

Les eaux de l'archipel de Saint-Pierre-et-Miquelon sont un site d'alimentation récurrent des baleines à bosse.

L'archipel de Saint-Pierre-et-Miquelon (SPM) est un territoire français situé à l'embouchure du fleuve Saint-Laurent à quelques dizaines de kilomètres au sud de l'île de Terre-Neuve (province canadienne de Terre-Neuve-et-Labrador). Les eaux de Saint-Pierre-et-Miquelon abritent de nombreux mammifères marins, migrants ou sédentaires. Les baleines y ont été chassées par les premiers baleiniers français qui utilisaient déjà l'archipel comme base au XVII^e siècle (Desmartis, 2002). Actuellement, l'abondance totale des baleines à bosse de l'ouest du Canada (Golfe du Saint-Laurent, Terre-Neuve – dont SPM est très proche - et

Labrador) a été estimée comme étant légèrement supérieure à 2000 individus (Lawson & Gosselin, 2009).

Mysticètes	
Baleine à bosse <i>Megaptera novaeangliae</i>	1638
Petit Rorqual <i>Balaenoptera acutorostrata</i>	154
Rorqual boréal <i>Balaenoptera borealis</i>	26
Rorqual commun <i>Balaenoptera physalus</i>	356
Odontocètes	
Dauphin à bec blanc <i>Lagenorhynchus albirostris</i>	685
Dauphin à flanc blanc <i>Lagenorhynchus acutus</i>	1177
Dauphin commun <i>Delphinus delphis</i>	2316
Globicéphale noir <i>Globicephala melas</i>	112
Orque <i>Orcinus orca</i>	210
Baleine à bec commune <i>Hyperoodon ampullatus</i>	2
Marsouin commun <i>Phocoena phocoena</i>	75
Tableau 7 : Cétacés observés dans l’archipel de Saint-Pierre-et-Miquelon entre 2009 et 2013 par les membres de l’association FNE-SPM. Source : Caudal & Hacala (2016) Rapport sur les bases de données de mammifères marins Les observations ont été réalisées lors de sorties de terrain dédiées. Le nombre d’individus de chaque espèce identifiés à chaque sortie a été répertorié, et les données intégrées sur la période 2009-2013. Ce Tableau ne tient pas compte des identifications individuelles, un même cétacé peut donc être répertorié à plusieurs reprises.	

Depuis plus de dix ans, une association de science participative, anciennement appelée Frag’Ile, actuellement France Nature Environnement – Saint-Pierre-et-Miquelon (FNE-SPM) étudie les mammifères marins de l’archipel. Cette association travaille en lien avec les services de l’état (la Direction des Territoires, de l’Alimentation et de la Mer de Saint-Pierre-et-Miquelon) pour dresser des catalogues de diversité spécifique et suivre leurs changements éventuels, particulièrement dans le milieu marin (Tableau 7).

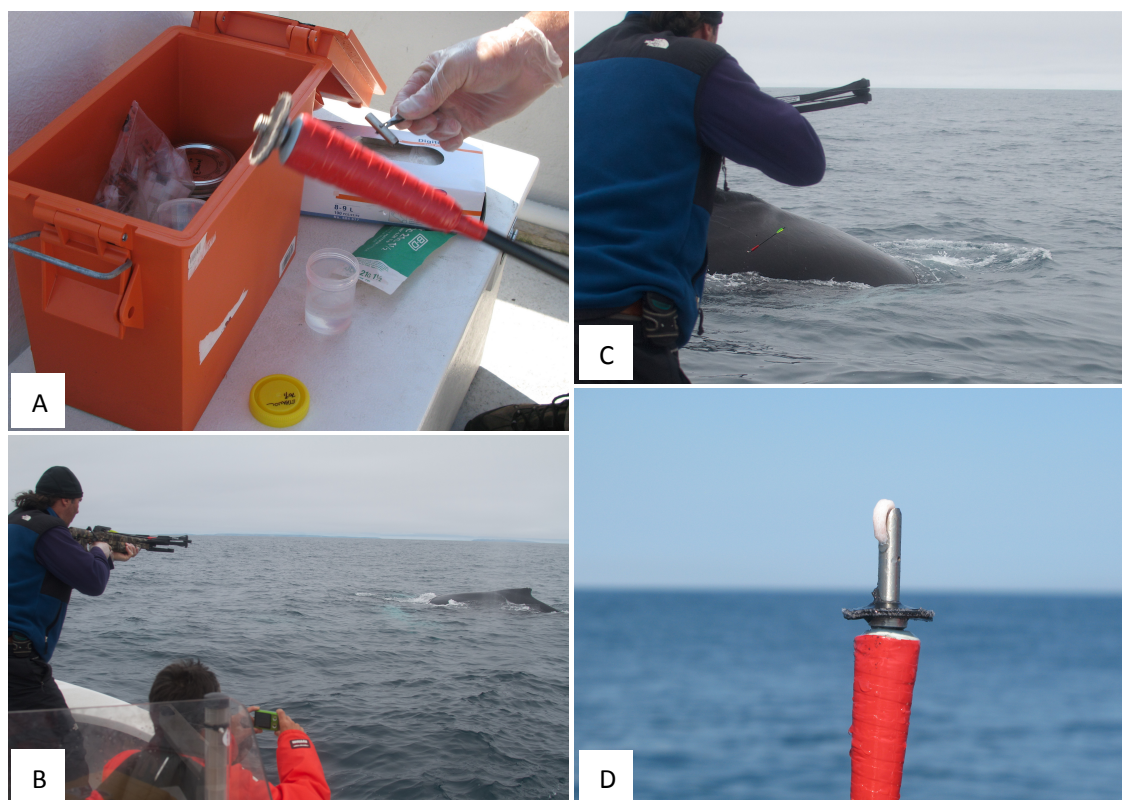


Figure 28 : Prise de biopsie d'une baleine à bosse à Saint-Pierre-et-Miquelon à l'aide d'une arbalète et d'une flèche dédiées. Le protocole suit Lambertsen et al. 1987, et est détaillé dans le matériel et méthodes de la publication 1.

La flèche comporte un embout en métal, démontable et stérilisé avant chaque utilisation (A). La flèche est tirée lorsque le bateau est à distance pertinente de la baleine à bosse (B, C). L'embout prélève un petit fragment de peau et de tissu adipeux sous-cutané et se détache de la baleine. Il peut alors être rattrapé depuis le bateau (D).

Photographies : ©FNE-SPM – Joël Detcheverry

Concernant spécifiquement les cétacés, l'UMR 9197 NeuroPsi (Université Paris Sud, CNRS) porte depuis plusieurs années des projets pluridisciplinaires d'étude des baleines à bosse à SPM, auxquels je suis associé pour le laboratoire BioGeMME (Université de Brest) pour leur volet génétique.

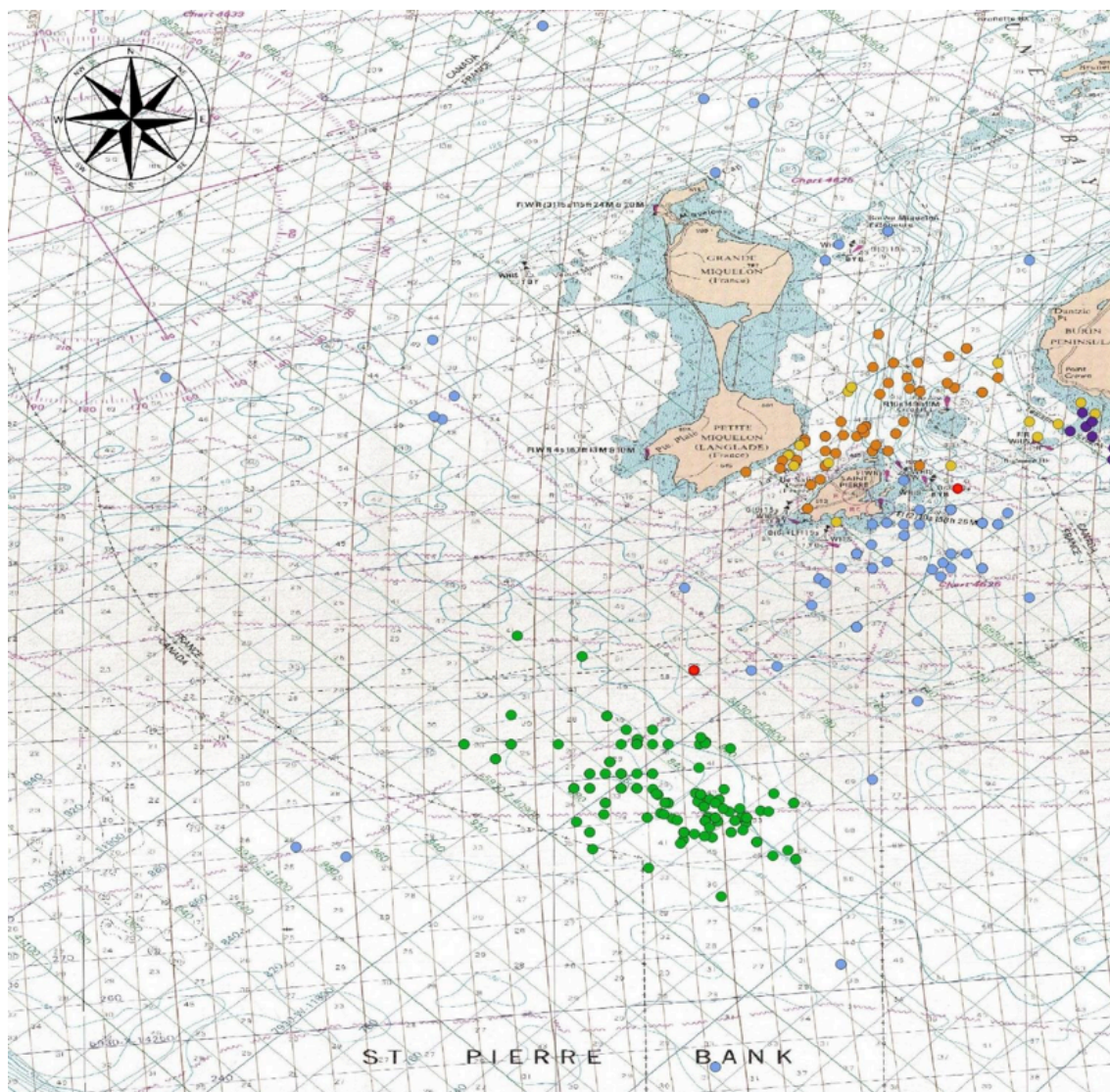


Figure 29 : Mise en évidence de trois zones de concentration de baleines à bosse proches de Saint-Pierre-et-Miquelon (chaque point marque une observation, Figure et données tirées de Caudal & Hacala, 2016).

Durant la période 2011 – 2013, les baleines à bosse ont été observées principalement dans trois zones, l'une au sud de l'archipel (points verts), l'autre entre les îles de Saint-Pierre et de Miquelon (orange) et le long des côtes du Canada (Violet). Seuls deux individus (points rouges) ont été observés à la fois dans les zones « Sud » et « Inter-îles », alors que les échanges entre la zone proche du Canada et la zone « Inter-Îles » sont plus fréquents (points jaunes).

Référence de la biopsie	Sexe	Latitude	Longitude	Site	Date de la biopsie
MnSPM13-01	M	46,76293	-56,02311	HZ (1)	08/06/2013
MnSPM13-02	M	46,7637	-55,88138	S3 (1)	08/06/2013
MnSPM13-03	M	46,52158	-56,37384	HZ (1)	20/06/2013
MnSPM13-04	M	46,52362	-56,37991	HZ (1)	20/06/2013
MnSPM13-05	M	46,5374	-56,36622	HZ (1)	20/06/2013
MnSPM13-06	M	46,57579	-56,37999	HZ (1)	20/06/2013
MnSPM13-07	M	46,82294	-56,24691	S1 (2)	25/06/2013
MnSPM13-08	M	46,81992	-56,21311	S1et3 (4)	28/06/2013
MnSPM13-09	M	46,83075	-56,2056	S1 (1)	28/06/2013
MnSPM13-10	M	46,82238	-56,26226	S1 (1)	28/06/2013
MnSPM13-11	M	46,81367	-56,26467	S1 (1)	28/06/2013
MnSPM13-12	M	46,84315	-56,23831	S1 (1)	03/07/2013
MnSPM13-13	M	ND	ND		03/07/2013
MnSPM13-14	F	46,8096,1	-56,30097	S1 (1)	06/07/2013
MnSPM13-15	M	46,44887	-56,32408	S2 (1)	07/07/2013
MnSPM13-16	F	46,42367	-56,27681	S2 (1)	07/07/2013
MnSPM13-17	M	46,37339	-56,27223	S2 (1)	07/07/2013
MnSPM13-18	M	46,39558	-56,34481	S2 (1)	07/07/2013
MnSPM13-19	M	46,42693	-56,32506	S2 (1)	13/07/2013
MnSPM13-20	F	46,38079	-56,46351	S2 (2)	13/07/2013
MnSPM13-21	M	46,41183	-56,48063	S2 (1)	13/07/2013
MnSPM13-22	M	46,44904	-56,39963	S2 (1)	13/07/2013
MnSPM13-23	M	46,38322	-56,77831	HZ (1)	14/07/2013
MnSPM13-24	M	46,37206	-56,72521	HZ (1)	14/07/2013
MnSPM13-25	F	46,42031	-56,45166	S2 (1)	14/07/2013
MnSPM13-26	M	46,35951	-56,40413	S2 (1)	23/07/2013
MnSPM13-27	M	46,32703	-56,4232	S2 (2)	23/07/2013
MnSPM13-28	M	46,41549	-56,37862	S2 (1)	23/07/2013
MnSPM13-29	M	46,79493	-56,2319	S1 (1)	07/08/2013
MnSPM13-30	M	46,80109	-56,22198	S1 (1)	07/08/2013
MnSPM13-31	M	46,8513	-56,19749	S1 (1)	07/08/2013
MnSPM13-32	M	46,42171	-56,39133	S2 (1)	08/08/2013
MnSPM13-33	M	46,39168	-56,36717	S2 (4)	08/08/2013
MnSPM13-34	M	46,3873	-56,3702	S2 (1)	08/08/2013
MnSPM13-35	M	46,65807	-56,23105	HZ (1)	08/08/2013
MnSPM13-37	M	46,44362	-56,39584	S2 (5)	01/10/2013
MnSPM13-38	M	46,44248	-56,39423	S2 (4)	01/10/2013
MnSPM13-39	M	46,43357	-56,38669	S2 (2)	01/10/2013
MnSPM13-40	M	46,42049	-56,38802	S2 (4)	01/10/2013
MnSPM13-41	M	46,58389	-56,29513	HZ (1)	07/10/2013
MnSPM11-1	M	46,50562	-56,4158	S2 (1)	29/07/2011
MnSPM11-2	F	46,50562	-56,4158	ND	29/07/2011
MnSPM11-3	F	46,54808	-56,50488	ND	21/08/2011
MnSPM11-4	F	46,44304	-56,34886	S2 (3)	13/09/2011
MnSPM11-5	M	46,41376	-56,3737	S2 (4)	19/09/2011

Tableau 8 : Liste des 45 échantillons de baleines à bosse de SPM analysés dans le cadre de cette étude.

Le sexe a été déterminé par analyse moléculaire. Les latitudes, longitudes et dates correspondent à la prise de chaque biopsie. Les sites sont indiqués (S1 : site « inter-iles », S2 site « sud », S3 : côtes du Canada, HZ : hors zone. Le nombre de recaptures par photo-identification dans chaque site est indiqué entre parenthèses (Données extraites de El Moussaoui, 2017 et Caudal & Hacala, 2016).

FNE-SPM est particulièrement investie dans les campagnes de terrain de ces projets, qui comportent des suivis et observations en mer, des campagnes de photoidentification, des suivis acoustiques et la mise en œuvre d'études de génétique. Notamment, FNE-SPM a été habilitée pour prélever des biopsies de baleines à bosse (Figure 28). En 2011 et 2013, 45 biopsies de baleines à bosse ont été prélevées à SPM par Joël Detcheverry, membre de l'association FNE-SPM, dans le but de permettre leur caractérisation génétique.

A priori, cet échantillonnage devrait montrer une proximité génétique des baleines à bosse de SPM avec celles de la zone d'alimentation du golfe du Saint-Laurent et avec les autres sites de l'Atlantique Nord Ouest, ainsi qu'une différence avec les baleines à bosse de l'Atlantique Nord Est. Mais notre étude réalisée dans le Pacifique Nord a montré que la fidélité des baleines à bosse pour leur zone d'alimentation peut s'exercer à une échelle géographique très précise. Trois sites de concentrations de baleines à bosse proches de SPM ont été identifiés par l'observation, l'un situé entre l'île de Saint-Pierre et l'île de Miquelon, un autre étant proche des côtes Canadiennes, et un troisième à une trentaine de kilomètres au sud (Figure 29). Les recaptures par photoidentification des mêmes individus entre deux des deux sites sont rares, (Joël Detcheverry, Roger Etcheberry communication personnelle ; Caudal & Hacala, 2016), rendant une analyse génétique comparative des deux sites pertinente.

Caractérisation génétique des baleines à bosse de l'archipel de Saint-Pierre-et-Miquelon

Les biopsies ont été prélevées en majorité dans les sites « inter-îles » et « sud » (Tableau 8, Figure 29). Le sexe de chaque individu a été déterminé par amplification spécifique d'une partie du chromosome Y selon le protocole décrit dans les publications 1 et 3. Notre échantillonnage comporte une grande majorité de mâles (38 mâles pour 7 femelles, ratio mâles/femelles supérieur à 5/1). Ceci est étonnant par rapport aux données de la bibliographie (Palsboll et al. 1997a ; Smith et al. 1999). Pour Palsboll et al. (1997a) par exemple le ratio mâles/femelles est de 1/1 dans le golfe du Saint-Laurent et à Terre-Neuve.

Les polymorphismes de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial ont révélé une diversité haplotypique assez élevée ($Hd=0,947$). Les valeurs de D de Tajima et de F_s de Fu sont non significatives, ne mettant donc en évidence ni goulot d'étranglement ni expansion marquée. Néanmoins, la valeur de F_s de Fu, connue pour être plus sensible pour détecter des cas d'expansion récente (Decker et al. 2017), est assez négative ($F_s = -3,37$) est à la limite de la significativité, ce qui correspond bien à l'hypothèse de Jackson et al. (2014) d'une expansion spatiale lente du clade IJ (Baker & Medrano-Gonzalez, 2002) dans l'Atlantique Nord.

Aucune différenciation significative n'a été mise en évidence entre les deux sites « inter-iles » et « sud », mais seules 8 séquences d'ADN mitochondrial provenaient de baleines à bosse échantillonnées dans le premier des deux (entre Saint-Pierre et Miquelon).

Les polymorphismes de l'ADN nucléaire ont été étudiés pour 12 *loci* contenant des microsatellites (Ev1, Ev37, Ev49 et Ev96, Valsecchi et al. 1997 ; GATA028, GATA053 et GATA417, Palsbøll et al. 1997b; 199-200 et 417-418, Schlötterer et al. 1991 ; GT023, GT211 et GT575, Bérubé et al. 2000). Mais contrairement à l'ADN extrait de biopsies provenant de Madagascar ou du Pacifique Nord, les échantillons de SPM se sont révélés techniquement particulièrement difficiles à analyser, produisant un taux important de *loci* non amplifiés chez certains individus et d'allèles nuls. Six *loci* ont quand même pu être étudiés à partir d'une majorité d'échantillons. Le F_{IS} déterminé est positif et significatif ($F_{IS} = 0.09$, $p=0,004$), reflète soit d'un déficit en hétérozygotes soit d'un taux d'allèles nuls trop important provenant des problèmes techniques rencontrés.

Les haplotypes d'ADN mitochondrial déterminés à SPM ont pu être comparés à ceux déterminés par Palsboll et al. (1995) dans les Golfes du Maine du Saint-Laurent, à l'ouest du Groenland ainsi qu'en Islande. Des haplotypes déterminés en République Dominicaine sont aussi disponibles (Palsboll et al. 1995 ; Jackson et al. 2009) et ont permis une comparaison entre les baleines à bosse de SPM et leur zone de reproduction hypothétique. Aucune

Groupes comparés	Nombre d'échantillons	S_{nn}	F_{ST}	ϕ_{ST}
SPM vs GSL	$N_{SPM}=43$ $N_{GSL}=25$	0.52 (ns)	0 (ns)	0 (ns)
SPM vs GM	$N_{SPM}=43$ $N_{GM}=23$	0.61*	0.02 (ns)	0 (ns)
SPM vs OG	$N_{SPM}=43$ $N_{OG}=44$	0.54*	0.006 (ns)	0.02 (ns)
SPM vs IL	$N_{SPM}=43$ $N_{IL95}=13$	0.73**	0.07**	0.11*
SPM vs RD (Palsboll et al. 1995)	$N_{SPM}=43$ $N_{RD}=20$	0.56 (ns)	0 (ns)	0.007(ns)
SPM vs RD (Jackson et al. 2009)	$N_{SPM}=43$ $N_{RD}=25$	0.48 (ns)	0 (ns)	0 (ns)

Tableau 9 : Indices de différenciation génétique calculés sur la base des polymorphismes de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial, entre les baleines à bosse de SPM et celles du golfe du Saint-Laurent (GSL), du Golfe du Maine (GM) de l'ouest du Groenland (OG), d'Islande (IL) et de République Dominicaine (RD). Les données de séquences proviennent de cette étude pour SPM, de Palsboll et al. (1995) pour les 5 zones géographiques, et de Jackson et al. (2009) pour un deuxième échantillonnage de République Dominicaine. Trois indices ont été calculés, S_{nn} (Hudson et al. 2000), F_{ST} et ϕ_{ST} (Excoffier et al. 1992) comme décrit dans le matériel et Méthode de la publication 1). Aucune différence n'est détectée entre SPM et le GSL, une différence minimale est détectée uniquement par le S_{nn} de Hudson et al. (2000) entre SPM et le GM d'une part, et l'OG d'autre part. Une différenciation forte existe avec l'IL, détectée par les trois indices. Aucune différence n'est déterminée avec la RD. Données tirées de El Moussaoui, rapport de Master 2 (2017).

différence n'a été détectée entre les baleines à bosse de SPM et celles de République Dominicaine. La possibilité d'un lien direct entre le site d'alimentation de SPM et la zone de

reproduction de République Dominicaine est donc renforcée. Une différence génétique forte, reflétée par les trois indices génétiques calculés, est par contre mise en évidence entre SPM et l'Islande, confirmant bien les résultats obtenus précédemment (Palsboll et al. 1995, Larsen et al. 1996). Les baleines à bosse de SPM sont proches de celles des différents sites de l'ouest de l'Atlantique Nord. Néanmoins, le S_{nn} de Hudson et al. (2000) détecte une différenciation génétique faible mais significative avec à la fois le Golfe du Maine et l'Ouest du Groenland (mais pas avec le Golfe du Saint-Laurent). Cette différenciation est cohérente géographiquement (SPM se situe dans l'embouchure du Saint-Laurent, et est à presque 1000 km du Golfe du Maine et à plus de 2000 km des côtes du Groenland), mais jusqu'à présent, aucune différence génétique n'avait été mise en évidence entre le Golfe du Saint-Laurent et les autres zones d'alimentation de l'Atlantique Nord Ouest.

Cette étude tend aussi à montrer une grande stabilité chronologique, puisque les échantillonnages ont été réalisés par Palsboll et al. (1995) dans le Saint-Laurent en 1990-1991, et ceux effectués à SPM en 2011 et 2013. Il y a donc plus de 20 années d'écart entre ces deux campagnes de prélèvements, et pourtant aucune différence génétique n'est détectée.

Perspectives et ouvertures de l'étude des baleines à bosse de Saint-Pierre-et-Miquelon

Cette première caractérisation génétique des baleines à bosse de SPM a permis de confirmer certaines hypothèses généralement admises (proximité génétique des baleines à bosse de SPM avec celles de la République Dominicaine d'une part et avec celles du golfe du Saint-Laurent d'autre part). Elle a aussi détecté pour la première fois une différenciation possible entre des zones d'alimentation voisines du Nord Ouest de l'Atlantique, ce qui est tout à fait possible si le cas du Pacifique Nord est pris en exemple (Baker et al. 2013 ; publication 1). Une collaboration est en construction avec le professeur Per Palsboll, de l'Université de Groningen (Pays-Bas) qui mène actuellement une nouvelle étude génétique exhaustive des baleines à bosse à l'échelle de l'Atlantique Nord. Les résultats obtenus à SPM seront intégrés dans cette étude, et permettront de mieux conclure sur d'éventuelles différences génétiques entre sites d'alimentation du Nord Ouest de l'Atlantique.

Une question clé en Atlantique Nord concerne les zones de reproduction, et notamment la pertinence de la remise en question de l'homogénéité de la zone des Antilles (Stevick et al. 2015). Dans le cadre de l'Observatoire Homme Milieu (OHM) « Port Caraïbe » (Labex DRIIHM, CNRS), j'ai pu initier un programme, en collaboration avec l'Université des Antilles, dans le but notamment d'obtenir des échantillons de baleine à bosse de Guadeloupe (Programme GenMamGua, <http://ohm-port-caraibe.in2p3.fr/projets/>). Comparer les

caractéristiques génétiques des échantillons qui seront obtenus avec celles des baleines à bosse de SPM, et plus largement, avec l'étude globale menée à l'Université de Groningen permettra d'avoir des premiers éléments de réponse à cette question clé.

Nous essayerons aussi dans les années à venir, dans le cadre des programmes collaboratifs avec l'Université Paris XI, FNE SPM et la DTAM de SPM, de poursuivre et si possible d'accroître l'effort de biopsies des baleines à bosse à SPM, afin de pouvoir augmenter la puissance statistique de notre étude concernant les deux sites voisins (« Inter-Iles » et « Sud ») de SPM afin de savoir si une fidélité pourrait s'exercer à cette échelle géographique. Dans le Pacifique Nord, une fidélité précise à quelques dizaines de km près a été mise en évidence (Wright et al. 2015).

Etude des baleines à bosse de Saint-Pierre-et-Miquelon			
Etudiants ayant participé à cette étude			
Zeinab El Moussaoui	Janvier – Juin 2017	Stage de Master 2 GGB de l'Université de Brest	Co-encadrement Carole Decker / Jean-Luc Jung
Axel Hacala	Juillet aout 2016	Stage facultatif de Master, FNE-SPM - Université de Brest	Co-encadrement Morgane Detcheverry (FNE-SPM) / Jean-Luc Jung
Pascaline Caudal	Juillet aout 2016		
Projet mené en collaboration avec			
Joël Detcheverry, Roger Etcheberry	FNE SPM		
Frank Urtizberea	DTAM SPM		
Olivier Adam	Institut des Neurosciences Paris-Saclay (Neuro-PSI), UMR 9197, CNRS Université Paris Sud		
Tableau 10 : Collaborations et étudiants encadrés pour l'étude des baleines à bosse de Saint-Pierre-et-Miquelon			

Les études menées en parallèle sur les trois sous-espèces de baleines à bosse mettent en évidence des différences de structuration génétique

La comparaison des résultats obtenus dans les trois bassins océaniques, donc portant sur les trois sous-espèces de baleines à bosse, permet de mettre en évidence des différences globales de niveaux de structuration génétique dans chacun des bassins océaniques. Les indices de différenciation génétique calculés dans nos trois études présentent des valeurs très différentes. Par exemple, entre Madagascar et la Colombie (les plus fortes différences génétiques que nous avons calculées dans l'hémisphère sud, HS), le F_{ST} mitochondrial a une valeur de $F_{ST}=0,056$. Amaral et al. (2016) ont calculés des valeurs de F_{ST} encore inférieures à cela entre les différentes aires d'alimentation de l'HS. Saint-Pierre-et-Miquelon et l'Islande présentent les plus fortes différenciations de l'Atlantique Nord, et le F_{ST} est égal à $F_{ST}=0,070$. Entre les baleines à bosse des îles du Commandeur et de Karaginsky, les valeurs de différenciation sont plus fortes ($F_{ST}=0,18$) et peuvent monter largement au dessus de ces valeurs en comparaison avec d'autres aires d'alimentation (publication 1).

Le Pacifique Nord (PN) présente donc les différenciations génétiques les plus fortes entre zones de concentrations de baleines à bosse, d'alimentation comme de reproduction. Cela avait été montré par les résultats du programme *SPLASH* (Baker et al. 2013), et remarqué par Bettridge et al. (2015). Nos résultats mettant en évidence la différence génétique forte entre les baleines à bosse de Karaginsky et des îles du Commandeur démontrent de plus que ces différences peuvent survenir à de très faibles distances géographiques, et que, dans le PN, l'isolation par la distance n'est visiblement pas le facteur majeur influant sur les structurations de populations. Les résultats de Baker et al. (2013) montraient aussi que les différenciations génétiques entre zones de reproduction n'étaient pas liées à la distance géographique dans le PN. Notre étude a mis en évidence le fait que, si pendant la période d'alimentation les baleines à bosse de Karaginsky et des îles du Commandeur sont distantes les unes des autres approximativement de 500 km, elles rejoignent probablement des aires de reproduction distantes de presque 15 000 km, entre l'ouest du PN (Philippines et Japon) et le Mexique (Publication 1).

Globalement, la fidélité pour les zones d'alimentation et de reproduction est donc plus marquée dans le PN que dans l'HS. Les valeurs des indices de différenciation génétique, globalement beaucoup plus fortes dans le PN que dans l'HS reflètent ces différences, de même, certainement, que les valeurs de diversité génétique, largement inférieures dans le PN qu'en AN et dans l'HS (nos résultats, Baker et al. 2013 ; Jackson et al. 2014 ; Bettridge et al.

2015 ; Rosenbaum et al. 2017). Une hypothèse est que des valeurs de diversité haplotypique faibles pourraient refléter des impacts plus marqués de la chasse industrielle (Jackson et al. 2014 ; Cypriano-Souza et al. 2016). Une autre hypothèse est que l'existence de groupes possédant des fidélités spécifiques pourrait se traduire par des diversités génétiques moins fortes (Whitehead, 2017).

Pourtant, les indices de différenciation génétique significatifs démontrent bien que la fidélité pour les zones de reproduction existe chez les baleines à bosse dans l'HS aussi, même si leurs valeurs plus faibles indiquent que cette fidélité est globalement moins marquée que dans l'hémisphère nord. L'isolation par la distance est un (le ?) facteur majeur influant sur la structure génétique de l'espèce dans l'HS (nos résultats, Olavarria et al. 2007 ; Kershaw et al. 2017), même si des particularités existent néanmoins à l'échelle de l'HS. La Colombie, la Polynésie Française et les Iles Cook accueillent des groupes de baleines à bosse présentant des diversités génétiques moindres et des différences plus marquées avec les autres zones de reproduction de l'HS. Les baleines à bosse de Madagascar semblent par contre être très mobiles, localement et à l'échelle régionale (Stevick et al. 2010 ; Cerchio et al. 2016 ; Trudelle et al. 2016 ; Dulau et al. 2017) et les flux de gènes sont clairement importants avec les autres zones de reproduction (nos résultats, Kershaw et al. 2017 ; Rosenbaum et al. 2017).

Les zones d'alimentation de l'HS se distinguent de celles de l'AN et du PN. Les eaux de l'archipel de Saint-Pierre-et-Miquelon ou des Iles Karaginsky et du Commandeur accueillent par exemple de manière récurrente les baleines à bosse année après année. Une fidélité pour ces zones géographiques précises, offrant un habitat et des ressources alimentaires semblables à peu près au même endroit géographique peut donc s'installer au fil des générations. Sous réserve bien sûr que le changement global n'influe pas la distribution des proies dans ces endroits particuliers.

Dans l'HS, les baleines à bosse se nourrissent de krill et vont tendre à s'agréger autour des zones d'abondance de leur proie (Kawamura 1994 ; Friedlaender et al. 2006 ; Santora et al. 2010 ; Nowacek et al. 2011). Les emplacements de ces zones d'agrégation de krill dépendent de conditions environnementales et sont donc susceptibles de varier au cours de l'année ainsi que d'une année sur l'autre, notamment avec les limites de la banquise (Friedlander et al. 2006 ; Lawson et al. 2008 ; Tarling et al. 2009). Des déplacements actifs des baleines à bosse sur leurs zones d'alimentation antarctiques sont donc très probables, à la recherche de zones d'agrégation du krill. Même si des aires de concentration des baleines à bosse sont retrouvées

pendant l'été austral (Fleming et al. 2011) et que des différences génétiques peuvent être retrouvées entre certaines grandes zones d'alimentation, ce n'est pas une règle générale (Engel et al. 2008 ; Amaral et al. 2016). Il est donc fort possible que les baleines à bosse soient contraintes à plus de mobilité dans leur recherche de proies dans l'HS que dans le PN ou l'AN (Cypriano-Souza et al. 2017). Des échanges entre zones de reproduction pourraient résulter de cette mobilité plus grande en zone d'alimentation, entraînant ainsi des flux de gènes accrus dans l'HS.

Une intensification des études, notamment génétiques, des baleines à bosse dans leurs zones d'alimentation de l'HS pourra aider à résoudre ces questionnements.

Compréhensions nouvelles et réflexions en termes de conservation des baleines à bosse

Il est maintenant bien reconnu que les réflexions et actions visant à la conservation de la biodiversité doivent se situer au niveau des populations, et pas uniquement à celui des espèces (Purvis & Hector 2000 ; Baker et al. 2013 ; Bettridge et al. 2015 ; Attard et al. 2016). Le décryptage de la biodiversité intraspécifique, l'identification, le degré de connectivité et si possible l'explication des causes de l'existence des différentes populations d'une espèce sont donc un préalable à tout effort de conservation, et serviront à la définition d'unités de gestion (Palsboll et al. 2007 ; Bettridge et al. 2015).

Comprendre la structure des populations des mammifères marins, et notamment des différentes espèces de rorquals, est un challenge à cause de leur nature pélagique et très mobile (Hoelzel 1998), associée de plus à la difficulté d'obtention des échantillons.

Les résultats décrits dans ce mémoire enrichissent la compréhension de la biodiversité intraspécifique des baleines à bosse, et mettent encore plus en évidence des différences marquées entre les sous-espèces, tout particulièrement entre le Pacifique Nord (PN) et l'Hémisphère Sud (HS). Bettridge et al. (2015) ont mené une réflexion globale concernant la conservation des baleines à bosse, en considérant de manière similaire les trois sous-espèces et se focalisant sur les zones de reproduction. Cette approche avait pour but l'identification de DPS (*Distinct Population Segments*), définis comme représentant des populations à la fois différentes du reste de l'espèce (ou de chaque sous-espèce dans le cas de la baleine à bosse) mais significatives (importantes) pour la sous-espèce. Bettridge et al. (2015) ont ainsi défini 15 DPS dans le monde, dont plusieurs présentant des risques d'extinction : la population du Nord de l'Océan Indien en premier lieu, puis les zones de reproduction situées dans le Pacifique Nord, à l'est (Okinawa et Philippines) et à l'ouest (Amérique Centrale).

Concernant l'HS, et en mettant à part le cas de la population isolée du Nord de l'Océan Indien, les préoccupations majeures en termes de conservation telles que suggérées par les résultats des études génétiques (diversité génétique élevée, différences entre groupes existantes mais modérées, nos résultats ; Olavarria et al. 2007 ; Engel et al. 2008 ; Cypriano-Souza et al. 2017 ; Rosenbaum et al. 2017 ; Kershaw et al. 2017) pourraient bien être globales. Un des principaux facteurs de risque à venir dans l'HS pour les baleines à bosse pourrait bien être représenté par une baisse de disponibilité du krill en Antarctique. La hausse des températures a entraîné une réduction de la surface de la banquise en Antarctique, ce qui a été lié à une baisse de densité du

krill (*Euphausia superba* ; Atkinson et al. 2004). L'acidification de l'océan amène aussi des conditions moins favorables au krill (Kawagushi et al. 2011). Les prévisions du GIEC (2013) suggèrent que ces deux facteurs – augmentation de la température et acidification des océans – pourraient bien s'amplifier dans les années à venir. L'impact direct de ces phénomènes sur la densité du krill sera à évaluer.

Les autres préoccupations en termes de conservation des populations naturelles de baleines à bosse de l'HS sont plus locales, et liées aux dérangements potentiellement induits par l'homme, en termes d'urbanisation et d'industrialisation des espaces côtiers, et d'utilisation perturbantes des ressources naturelles du milieu (par exemple Cerchio et al. 2014).

Dans le PN, les études génétiques ont par contre révélé une diversité génétique globale plus faible que dans l'HS et des différences entre groupes plus marquées. La fidélité pour les zones d'alimentation et de reproduction y est beaucoup plus importante (Baker et al. 2013 ; publication 1). Nos résultats ont montré de plus que des groupes génétiquement très différents pouvaient partager des espaces géographiques « voisins », comme entre Karaginsky et les Iles du Commandeur (Publication 1). Ces différences proviennent d'une fidélité spécifique à chaque groupe, transmise de manière transgénérationnelle, et représentant donc une culture propre à chaque groupe (Baker et al. 2013 ; Carroll et al. 2016 ; Whitehead 2017 ; publication 1). La caractéristique migratoire des baleines à bosse, comprenant une double fidélité potentielle pour des zones de reproduction et d'alimentation, de degré variable, rend très complexe la structuration génétique de chaque groupe. La nature mixte des zones d'alimentation, rassemblant des baleines à bosse de différentes zones de reproduction, semble assez générale (Baker et al. 2013 ; Smith et al. 2014 ; Amaral et al. 2016 ; publication 1). Les essais de définition d'unités de gestion des baleines à bosse reposent donc en général sur les zones de reproduction caractérisées, et ne prennent pas, ou peu, en compte les zones d'alimentation (Bettridge et al. 2015). Il ressort pourtant clairement de nos résultats que des zones d'alimentation, parfois très localisées, peuvent abriter des groupes de baleines à bosse génétiquement différents, et possédant une culture particulière. Ces groupes pourraient donc bien répondre à la définition des *DPS* (Bettridge et al. 2015), en étant différents génétiquement et culturellement du reste de la sous-espèce, et importants puisque possédant une culture unique. La situation dans les eaux russes du Pacifique Nord apparaît dès lors très préoccupante en termes de conservation. Le groupe de baleines à bosse de l'île Karaginsky est génétiquement très différent de toutes les autres zones d'alimentation du PN, et semble correspondre au moins en partie, aux zones de reproduction des Philippines et d'Okinawa (publication 1). Ces deux zones de reproduction représentent une *DPS* identifiée comme en danger d'extinction

(Bettridge et al. 2015). Les abondances estimées sont faibles, en dessous de 1000 baleines à bosse (Calambokidis et al. 2008 ; Barlow et al. 2011). L'île du Commandeur abrite par contre des baleines à bosse présentant des ressemblances génétiques avec d'autres zones d'alimentation du PN, et se reproduisant certainement dans les aires mexicaines, possédant des nombres d'individus estimés largement supérieurs (Calambokidis et al. 2008 ; Barlow et al. 2011). Des efforts particuliers de conservation des baleines à bosse de l'île Karaginsky semblent donc très souhaitables.

Actuellement, si les îles du Commandeur sont protégées dans le cadre d'une réserve du « programme sur l'Homme et la Biosphère » de l'Organisation des Nations Unies (<http://www.unesco.org/mabdb/br/brdir/directory/biores.asp?code=RUS+26&mode=all>), les Îles Karaginsky ne font l'objet d'aucune mesure particulière (E. Hoyt, Whale and Dolphin Conservation, communication personnelle).

Dans l'HS par contre, les fidélités qui semblent moins marquées et les différences génétiques atténuées permettent certainement de faire reposer de manière plus pertinente la définition des unités de gestion sur des zones de reproduction. Les découpages proposés par Bettridge et al. (2015), qui identifient 8 *DPS* dans l'HS, semblent plus pertinents que les stocks et sous-stocks définis par l'IWC (2011), qui sont certainement trop restreints géographiquement dans certains cas (les différents sous-stocks du stock C par exemple).

Dans tous les cas, que ce soit à Madagascar, en mer de Béring ou à Saint-Pierre-et Miquelon, la construction de programmes de recherche permettant de pérenniser des prises de prélèvements sur plusieurs années successives et donc de réaliser des séries temporelles offrira des moyens fin de détecter, si elles existent, des variations interannuelles. Les baleines à bosse représentent dans ce cas des espèces sentinelles particulièrement pertinentes de la qualité du milieu marin, permettant de détecter d'éventuelles variations du milieu, d'origine anthropique ou non.

Chapitre IV.

Mouvements et populations chez le marsouin commun (*Phocoena phocoena*) le long des côtes atlantiques françaises

Le marsouin commun (*Phocoena phocoena*) est l'un des plus petits cétacés. Il est aussi le plus abondant dans l'Atlantique Nord où il a fait récemment l'objet de plusieurs études qui ont mis en évidence des changements extrêmement marqués de sa distribution globale (Hammond et al. 2013).

A partir des années 1940, des observations de terrain ont montré que le marsouin commun, très fréquent dans les eaux de la mer du Nord et le long des côtes Atlantiques, de l'Espagne au Danemark, était devenu soudainement rare. Plus récemment, des campagnes d'observation de grande ampleur, sous financements Européens, SCANS I en 1994 et SCANS II en 2005 ont permis d'estimer un nombre total de 385 000 marsouins communs en Atlantique nord-est (Hammond et al. 2013). Mais ces deux campagnes d'observation ont aussi mis en évidence un déplacement global de l'espèce durant cette période : en 1994, le marsouin commun était plus fréquent dans la partie Nord de la Mer du Nord, alors qu'en 2005, il a été retrouvé plus au Sud, notamment en mer Celtique, et dans le sud-est du Royaume-Uni (Figure 30 ; Hammond et al. 2013). Ces observations, confirmées par plusieurs études locales (Publication 2 ; Camphuysen 2004 ; Siebert et al. 2006 ; Thomsen et al. 2006), ont clairement mis en évidence un déplacement marqué du marsouin commun à l'échelle de l'Atlantique nord.

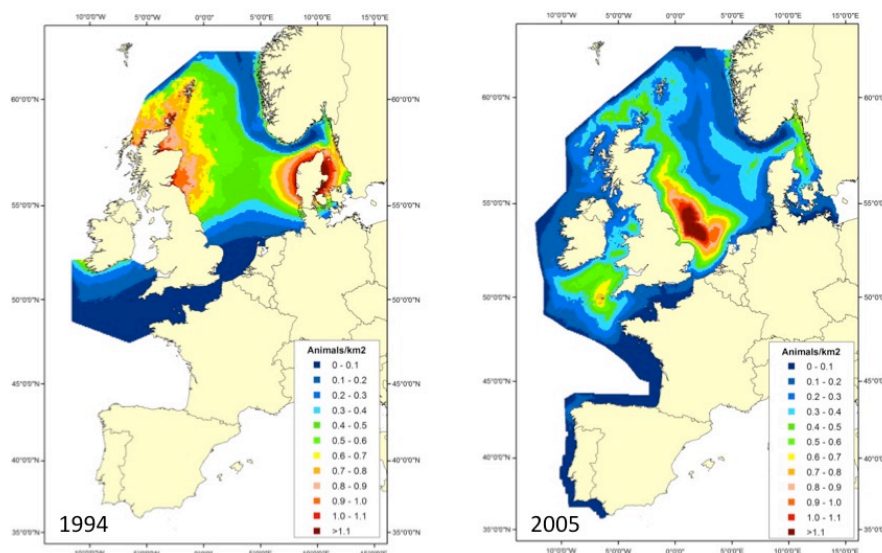


Figure 30 : Représentation des densités de marsouins communs en Atlantique Nord estimées par les programmes d'observation SCANS I (en 1994) et SCANS II (en 2005). Les couleurs représentent les densités estimées, du bleu (densité la plus faible) au rouge foncé (densité la plus forte). La comparaison de ces deux cartes met en évidence un déplacement global des marsouins vers le sud de l'Atlantique Nord entre 1994 et 2005.

La troisième étape des programmes d'observation, SCANS III vient de livrer ses premiers résultats, et les zones d'abondances des marsouins communs confirment ce déplacement vers le

sud, mais elles semblent s'être à nouveau modifiées au moins partiellement, les côtes du Danemark accueillant, comme en 1998, les plus fortes densités (<https://synergy.st-andrews.ac.uk/scans3>).

Plusieurs études ont aussi essayé de décrypter la structure de la population de marsouins communs d'un point de vue génétique. Lorsque j'ai débuté mes travaux sur cette espèce, la compréhension était qu'il existait une population plus ou moins homogène répartie dans l'Atlantique nord, mais présentant quand même des structurations génétiques liées à la distance (Tolley et al. 2001 ; Tolley & Rosel 2006 ; Fontaine et al. 2007 ; Fontaine et al. 2010 ; Wiemann et al. 2010). Par contre, il semblait que le golfe de Gascogne représentait une barrière naturelle aux déplacements de l'espèce, et que les populations Ibériques étaient génétiquement différentes de celle(s) du reste de l'Atlantique nord-est (Fontaine et al. 2007). Cette différence génétique avait été constatée uniquement grâce à des marqueurs nucléaires (des polymorphismes de microsatellites).

En 2009, sur la base d'une collaboration entre l'Université de Brest, Océanopolis (CCSTI de la mer) et le Parc Naturel Marin d'Iroise, nous avons construit un projet de recherche visant notamment à décrypter la structuration génétique de l'espèce le long de la façade Atlantique française. Ce projet incluait un financement CIFRE de thèse. Eric Alfonsi a été recruté pour effectuer sa thèse dans ce cadre, sous la direction conjointe d'Yves-Marie Paulet (taux d'encadrement 10%) et de moi-même (90%). Dans l'entreprise (Océanopolis), Eric était encadré par Sami Hassani. Nous avons tout d'abord étudié un échantillonnage spécifique de marsouins communs échoués ou capturés accidentellement le long des côtes atlantiques françaises, en Gironde et en Bretagne dans les dernières années (c'est-à-dire depuis que le retour du marsouin commun avait été prouvé dans cette zone). Ces échantillons provenaient du Réseau National Echouage et de Pelagis (La Rochelle). Nous avons mis en évidence deux groupes génétiques bien distincts grâce à l'analyse des génomes mitochondriaux au sein de cet échantillonnage. Ces deux groupes ont pu être liés aux marsouins de la péninsule Ibérique d'une part, et du reste de l'Atlantique nord-est d'autre part en comparant nos données avec celles de la littérature. Par contre, l'analyse de polymorphismes de marqueurs microsatellites, et leur exploitation statistique, n'ont pas permis de mettre en évidence de structuration génétique au sein de notre échantillonnage. Des tests de puissance statistique ont bien montré que cette absence de structuration n'était pas liée à un trop faible nombre d'échantillons par exemple, mais bien à une réelle absence de différenciation génétique.

Ces résultats ont permis une nouvelle compréhension de la complexité des flux de déplacement du marsouin commun :

- le long des côtes atlantiques françaises, il y a clairement deux flux concomitants de déplacements d'animaux de la même espèce, l'un vers le sud et concernant des animaux provenant de la Manche ou/et de la mer Celtique, et l'autre, dirigé vers le nord, et impliquant des animaux de la péninsule Ibérique. Ces marsouins communs peuvent être discriminés en fonction de leur génome mitochondrial.
- Ces animaux se croisent librement, et actuellement, on retrouve essentiellement des descendants des migrants des deux populations d'origine, comme en témoigne l'absence de discrimination par l'étude du génome nucléaire.

Ces flux de déplacement datent donc de quelques années seulement et sont certainement encore en cours. Leurs limites géographiques doivent encore être déterminées, aussi bien vers le sud que vers le nord.

Les côtes atlantiques françaises sont donc clairement une zone d'importance majeure pour l'espèce à l'heure actuelle, aussi bien en termes de compréhension écologique que de conservation.

Les forces écologiques à l'origine de ces déplacements, qu'elles soient d'origine anthropique ou non, doivent être recherchées, et cela constitue aussi une des poursuites de ce travail. L'étude des régimes alimentaires, et de différents traceurs écologiques pourra certainement être à même de mettre en évidence des différences supplémentaires.

Une question majeure concerne aussi les limites géographiques de ces flux de populations, et tout spécialement l'identité génétique des marsouins communs des côtes Mauritanienues en limite sud de l'espèce, qui pour l'instant sont considérés comme faisant partie d'un groupe, constituant une sous-espèce hypothétique, incluant aussi les marsouins de la péninsule Ibérique (Fontaine et al. 2014).

Deux publications qui décrivent ces résultats ont été rédigées, et sont présentées dans les pages suivantes. La publication 2 (« Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in north-western France: aerial survey, opportunistic sightings and strandings monitoring ») décrit les mouvements des marsouins communs le long des côtes atlantiques françaises, et y démontre le retour du marsouin commun depuis les années 2000. La publication 3 (« A European melting pot of harbour porpoise in the French Atlantic coasts inferred from mitochondrial and nuclear data ») décrit l'analyse génétique, réalisée dans le cadre de la thèse d'Eric Alfonsi, qui a permis de mettre en évidence le double flux de marsouins communs le long des côtes françaises.

Etude des marsouins communs de la façade atlantique française			
Etudiants ayant participé à cette étude			
Eric Alfonsi	2009-2013	Master 2 puis Thèse	Co-encadrement en Doctorat Yves-Marie Paulet / Jean-Luc Jung et Sami Hassani pour la partie entreprise (finacement Cifre)
Benedetta Fradusco	novembre 2014 - juin 2015	Master 2, Université d'Ancône, Italie	Encadrement Jean-Luc Jung
Projet mené en collaboration avec			
Sami Hassani	Océanopolis		
Philippe Le Niliot, Cécile Lefeuvre	Parc Naturel Marin d'Iroise		
Michael Fontaine	Université de Groeningen		
Willy Dabin, Olivier Van Canneyt, Vincent Ridoux	Observatoire PELAGIS, Réseau National Echouage		
Tableau 11 : Collaborations et étudiants encadrés pour l'étude des marsouins communs de la façade atlantique française			

**Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in north-western France:
aerial survey, opportunistic sightings and strandings monitoring**

Jung J.-L*., Stéphan E, Louis M, Alfonsi E, Liret C, Carpentier F-G & Hassani, S
Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom
Vol 89, p. 1045–1050

2009

* corresponding author

Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in north-western France: aerial survey, opportunistic sightings and strandings monitoring

J.-L. JUNG¹, E. STÉPHAN², M. LOUIS², E. ALFONSI¹, C. LIRET², F.-G. CARPENTIER¹ AND S. HASSANI²

¹Laboratoire de Toxicologie Alimentaire et Cellulaire, Université Européenne de Bretagne & Université de Bretagne Occidentale, UFR Sciences et Techniques, 6 Avenue Victor Le Gorgeu, CS93837, 29238 Brest Cedex 3, France, ²Laboratoire d'Etude des Mammifères Marins, Océanopolis, Port de Plaisance, BP 91039, 29210 Brest Cedex 1, France

The harbour porpoise (Phocoena phocoena) is one of the common small cetaceans of European waters. This discreet and undemonstrative species is strongly represented throughout the cold waters of the northern hemisphere, and is the most abundant cetacean in the North Sea. In the last few years, some observations and studies indicate a shift of harbour porpoise distribution in European waters, from northern regions of the North Sea to the southern North Sea, English Channel and Celtic Sea. This shift may include a comeback around the coasts of France. Harbour porpoises inhabit shelf-waters and are often observed in shallow waters, conditions offered for instance by the coasts of Brittany in north-western France. We used opportunistic sightings, aerial survey and a ten-year strandings database to study the presence of harbour porpoises along the coasts of Brittany. Opportunistic sightings made by non-specialists did not confirm a strong presence of harbour porpoises along the Brittany coasts, most probably because of the undemonstrative behaviour of this cetacean. However, aerial survey and stranding analysis indicate that harbour porpoises have become natural inhabitants of the Brittany coasts once more: 68.6% of cetacean school sightings made during a 1578 km aerial survey of the Brittany coasts concerned harbour porpoises, with an encounter rate of 1.5 individuals per 100 km that peaked to 5.8 per 100 km to the top of the shallow waters of the south-western Western English Channel. The number of harbour porpoise strandings increased each year from 1997 to 2007, making a total of 135 along the coasts of Brittany. Other cetaceans did not show such an increase during the same period. Strandings of harbour porpoises were also characterized by an apparent increase as a proportion in relation to all the cetacean strandings during the months of September to January, by a marked impact of by-catch during winter, and by an almost total absence of stranded calves. The comeback of the harbour porpoise along Brittany coasts is clearly confirmed by our data, and a stable population seems to be established again along the coasts of Brittany. This tends to confirm the shift of the distribution of the species in certain European waters. Long term monitoring, diet and genetic studies are now planned for a better understanding of this shift, and for the effective implementation of a conservation plan.

Keywords: harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, aerial survey, stranding monitoring, opportunistic sightings, Brittany coasts, north-western France

Submitted 31 July 2008; accepted 29 December 2008; first published online 20 April 2009

INTRODUCTION

The harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) is one of the smallest cetaceans, and has a large geographical range in cold coastal waters of the northern hemisphere (Read, 1999). In the north-eastern Atlantic and the North Sea, harbour porpoises are more or less continuously distributed, and the existence of sub-populations or of a continuous population with a significant isolation by distance is still under study (e.g. Rosel *et al.*, 1999; Tolley *et al.*, 1999; Andersen *et al.*, 2001; Fontaine *et al.*, 2007).

Knowledge of the abundance and population structure of such species is essential for any conservation efforts

(Tregenza *et al.*, 1997; Hammond *et al.*, 2002). For some years, there has been growing concern about the size of harbour porpoise populations and their localization, and this has led to the formation of ASCOBANS (Agreement on the Conservation of Small Cetaceans in the Baltic and the North Seas). Some human activities are thought likely to have contributed to a decrease in the harbour porpoise population, especially in the south of the North Sea and management measures for porpoise conservation have been sought (ASCOBANS, 2008). Area specific analyses are required, as local specificities can be found. For instance, Tregenza *et al.* (1997) estimated the impact of by-catch in set gillnets to be worrying for the Celtic Sea harbour porpoise population, and Northridge & Hammond (1999) evaluated the mortality caused by by-catch in the North Sea and West Scotland waters.

In 1994, harbour porpoises were shown to be strongly present in the northern part of the North Sea, whilst the

Corresponding author:
J.-L. Jung
Email: jung@univ-brest.fr

Channel and the southern part of the North Sea had few sightings (Hammond *et al.*, 2002). Since then, work has shown that porpoise abundance has shifted markedly from the north to the south (Macleod *et al.*, 2006), and the Celtic Sea has become a region where harbour porpoises are commonly encountered. This new distribution has been confirmed by several local studies (e.g. Camphuysen, 2004; Kiska *et al.*, 2004, 2007; Thomsen *et al.*, 2006).

A strong effort is being made in the French region of Brittany (north-western France) to monitor the local populations of marine mammals. Among these, the return of the harbour porpoise around the French Channel coast merits special attention. Since 1997 aerial survey, opportunistic sightings made by volunteer sea users, and stranding counts and analyses undertaken by a network of correspondents have been organized. These approaches have enabled us to monitor the local harbour porpoise population.

MATERIALS AND METHODS

Aerial survey and opportunistic sightings

In 2005, the LEMM (Laboratoire d'Etude des Mammifères Marins—Océanopolis, Brest, France) conducted an aerial survey along Brittany coasts (north-western France) according to standard line-transect methodology. Tracklines were surveyed following a saw-tooth pattern (Figure 1) designed for a high-winged twin engine aircraft (Partenavia P68C) flying at an altitude of 600 ft (182 m) at a speed of 100

knots. Bubble windows allowed the two lateral observers to see directly below the aircraft, while a third person noted the observation data. Encounter rates were calculated as $(n/l) \times 100$ (n , number of encounters; l , total distance surveyed, in km).

Since 2002, the collection of opportunistic sightings of marine mammals has been organized by the LEMM along Brittany coasts, in the framework of a dedicated regional scheme called 'Observons la mer'. In addition to accredited observers, data were also recorded by different kinds of marine observers and users, such as ornithologists, fishermen, and sailors who were invited to collect data through the distribution of sightings reporting forms and posters in 1300 coastal locations around Brittany.

The LEMM regrouped and analysed all the data. Precise species were assigned only when sighting descriptions, and if available, pictures, were judged to be correct and sufficiently accurate. In this paper, only those reports of sightings of the harbour porpoise with a certain species identification collected between 2002 and 2007 are considered.

Stranding data

Since the beginning of the 1970s, the CRMM (Centre de Recherche sur les Mammifères Marins, La Rochelle, France) has coordinated a national marine mammal strandings recording programme. With the help of field correspondents, from organizations or volunteers, it has set out to collect data on marine mammal strandings originating from all over the French coastline.

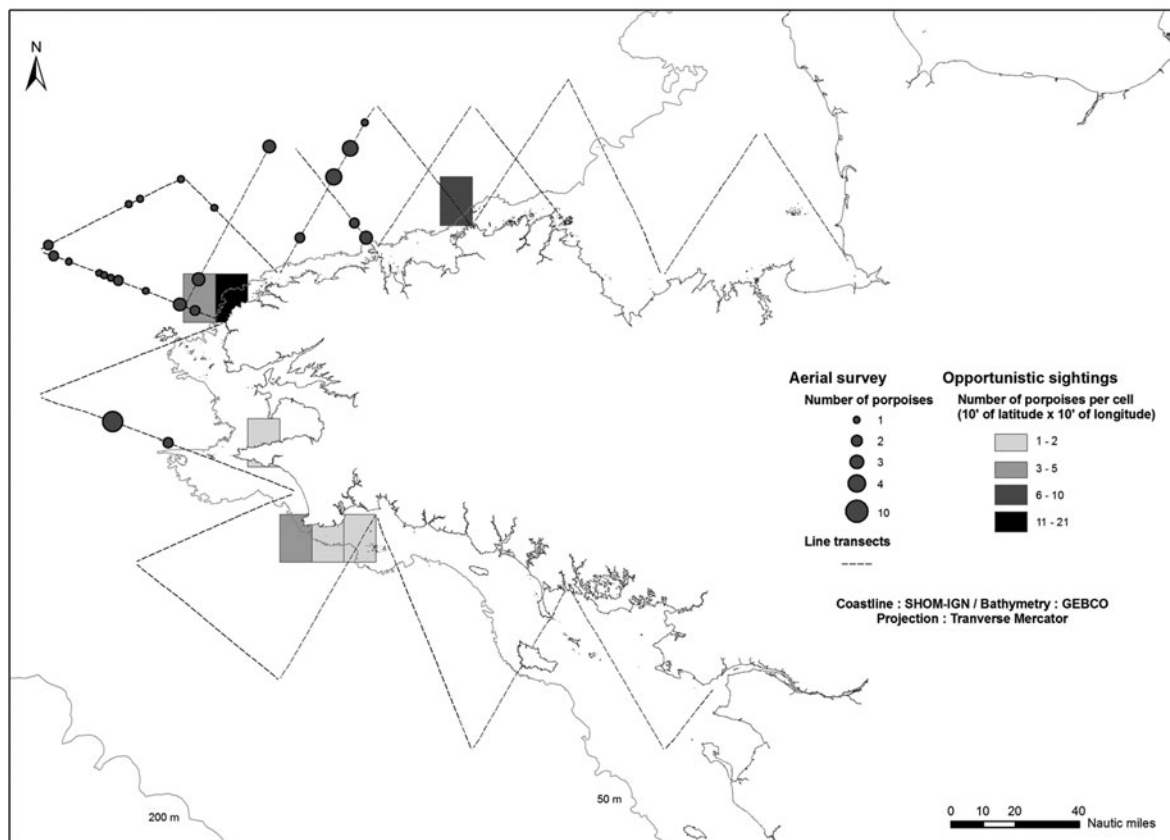


Fig. 1. Distribution of harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) sightings around the Brittany coastline (north-western France) from aerial survey (2005) and opportunistic sightings (2002–2007).

Since 1995, the LEMM (Océanopolis, Brest, France) has coordinated this network at a regional scale, and collected data from Brittany coasts before sending them to the CRMM. The Brittany coasts have been divided into 18 sections extending to cover the whole of the coastline (Figure 2). In each of these areas, correspondents are trained in the analysis of stranded marine mammals: species identification, characteristic measurements and tissue sampling. The data collection effort followed a standard procedure in order to minimize possible variations between months or years. Species identification, sex determination and lengths of the animals were collected whenever possible. By-catch casualties were diagnosed following the criteria proposed by Kuiken (1994). This network allowed the LEMM to compile valid data on a large proportion of cetaceans stranded on the Brittany coasts.

RESULTS

Aerial and opportunistic sightings of the harbour porpoise

The aerial survey of the coasts of the French region of Brittany was conducted during the summer of 2005, from 9–11 August. It covered 1578 km and enabled coverage of the whole of the Brittany coastline (Figure 1). Sightings of all cetaceans were recorded. A total of 24 schools of harbour porpoises (54 individuals) were observed, which represented 68.6% of the total cetacean schools sightings (34.6% of the individual sightings). The average porpoise group size was 2.25 individuals per group ($SD = 1.92$), and the encounter rate was 1.5 sightings per 100 km throughout the area studied. All the sightings were concentrated in waters around the western part of Brittany, and particularly on the north-western coast. This area corresponded to the shallow waters of the south-west waters of the western English Channel. In this area (377 km of aerial survey), the encounter rate peaked at 5.8 sightings per 100 km.

Between 2002 and 2007, 821 opportunistic cetacean sightings were reported, representing 11,419 individual animals. Among those, certain species identification was assigned to 222 reports, which included 3225 individuals in total.

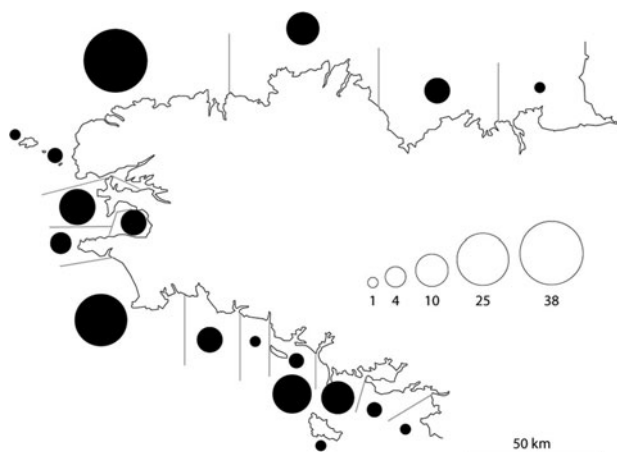


Fig. 2. Distribution of harbour porpoise stranding events along the Brittany coastline (north-western France) between 1997 and 2007. Numbers and surfaces of the circles represent the numbers of stranded porpoises.

Harbour porpoise sightings were relatively rare, and represented only 9 reports (4% of the 222 cetacean reports) and 44 individuals (only 1.4% of the individuals sighted). For the most part, these observations were made in the same area where the aerial survey recorded harbour porpoise sightings, and during the same period (August), although some sightings were also localized in the south of Brittany (Figure 1).

Counting and analysis of stranding events

Between 1997 and 2007, the stranding data collection effort followed a standardized procedure, with a total of 135 harbour porpoises stranded along the north-western coasts of France being recorded. The region sampled included all French Brittany coastal areas, and a higher frequency of stranding was clearly observed in the western part of the area (Figure 2). Sex data were available for 80 individuals: 45 were identified as females, 35 as males.

Figure 3 shows the inter-annual distribution of the number of harbour porpoise strandings. An increase was observed from 1997 to 2007 (Figure 3A). This time-dependent increase is significant, as confirmed by the product-moment correlation calculation ($r = 0.72$, $df = 9$, $P < 0.05$). The same observation was made when the proportions of porpoises, among all stranded cetaceans, were determined for each year (Figure 3B): a clear increase was seen ($r = 0.71$, $df = 9$, $P < 0.05$). Conversely, stranding of cetaceans in general did not increase during the same period, and no correlation was observed between time and the numbers of stranded cetaceans recorded ($r = -0.21$, $df = 9$, $P > 0.05$). The classification of stranded porpoises on the basis of length more or less reflects their maturity status (Read, 1999). The majority, almost three-quarters of all stranded porpoises, were longer than 130 cm, and can be classified as adults (Figure 3C). During the 11-year monitoring period, only six calves (smaller than 100 cm) were found stranded.

Cetacean strandings, and especially those of harbour porpoises, occurred over the whole year. However, porpoise strandings were not uniformly distributed over the year (Figure 4A). More stranding events were recorded from the period extending from the start of winter to the beginning of spring (December–April). In fact, the distribution of porpoise strandings differed significantly from a 12-part uniform distribution ($\chi^2(11) = 46.95$, $P \ll 0.01$).

Figure 4B shows that there was an increase in the number of porpoises as a proportion of all cetacean stranding events in the period extending from September to January, as compared with the rest of the year: 12.7% of stranding events concerned porpoises between September and January, and only 6.7% during the remainder of the year. These proportions differed significantly ($Z = 3.81$, $P \ll 0.01$).

For some stranded individuals, a by-catch prior to stranding can be proved by typical criteria (Figure 4A). Here, the winter months from December to February revealed higher proportions of proved by-catch (32.7% of porpoises stranding events) than during other months of the year (12.8%), and these differences appeared significant ($\chi^2(1) = 6.50$, $P = 0.0108$).

DISCUSSION

From the 1940s onwards, harbour porpoises have become scarce in the southern part of the North Sea, and around a

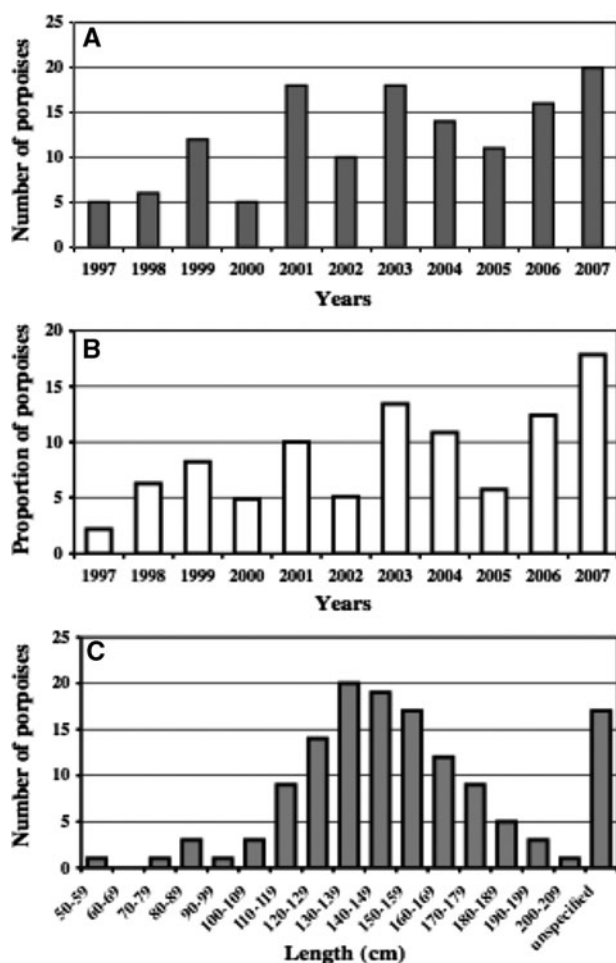


Fig. 3. Inter-annual distribution of harbour porpoise stranding events along the Brittany coastline (north-western France), and length distribution of stranded individuals. (A) Numbers of stranded porpoises from 1997 to 2007; (B) proportion of porpoises among all the stranded cetaceans, from 1997 to 2007; (C) length distribution of the porpoises stranded between 1997 and 2007.

very large zone of the European mainland coast, including the whole of Brittany (Duguy, 1977; Reijnders, 1992). Recently, Scans-I and Scans-II (Hammond *et al.*, 2002; Macleod *et al.*, 2006) have detected a large-scale north to south shift of the harbour porpoise in the North Sea, and stable populations appear to be established again, as can be judged by sightings and stranding monitoring (e.g. Camphuysen, 2004; Siebert *et al.*, 2006; Thomsen *et al.*, 2006). Around the Brittany coast, it has been noted by some sea users that harbour porpoises can now be observed once more (Kiska *et al.*, 2004). In this study, we have tried to describe the occurrence of the harbour porpoise around the Brittany coast, and to confirm its comeback using different sources of data collected recently or currently in Brittany.

Occurrence of the harbour porpoise around the Brittany coastline

In Brittany, the regional scheme of opportunistic sightings, called 'Observons la mer', has been active since 2002, but when applied to harbour porpoises, it was not very productive. Between 2002 and 2007, 222 cetacean sighting forms with certain species identification have been filled in, and only 9 of them concerned harbour porpoises. In fact, the harbour porpoise is a very inconspicuous species, its behaviour is undemonstrative, and, moreover, it is much less well-known than other more popular species strongly represented around Brittany coasts, such as the common dolphin (*Delphinus delphis*) and the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Furthermore, these observations were made only by accredited naturalists, and were therefore relatively rare events. As already pointed out (e.g. Siebert *et al.*, 2006), opportunistic sightings are therefore not very useful when it comes to determining porpoise distribution patterns. We can nevertheless note that six opportunistic sightings out of the nine concerning harbour porpoises were made during the month of August, which perhaps represented a favourable month, in particular as regards the weather conditions for porpoise sighting along the Brittany coasts.

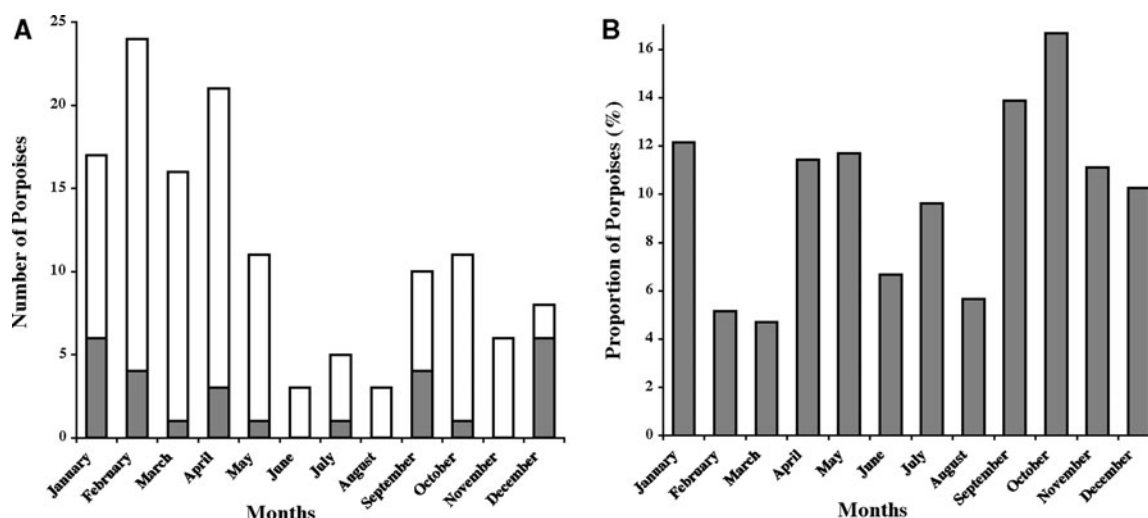


Fig. 4. Intra-annual distribution of porpoise stranding events along the Brittany coastline (north-west of France) between 1997 and 2007. (A) Cumulated numbers of stranded porpoises for each month of the year. Greyed parts represent those porpoises for which a prior by-catch has been proved; (B) monthly proportions of porpoises among all the stranded cetaceans.

Standard line transect aerial surveys have been used on many different occasions to investigate porpoises and have proven to be efficient (e.g. Hammond *et al.*, 2002; Scheidat *et al.*, 2004; Siebert *et al.*, 2006; Thomsen *et al.*, 2006). Harbour porpoises are believed to spend nearly half of their life in the surface metre (i.e. from 0–1 m depth) of the water column (Westgate *et al.*, 1995), which clearly represented a characteristic consistent with an efficient aerial observation. In fact, aerial survey allowed us to count a much more widespread distribution of harbour porpoises around the Brittany coast, as this species represented the majority of all the cetacean schools sightings (68.6%).

Encounter rates were of the order of 1.5 per 100 km along the whole of the Brittany coastline, which is consistent with results obtained before 2002 in the same area and at the same time of year using a ferry-based survey in the English Channel and the Bay of Biscay (Kiska *et al.*, 2007). Almost all the harbour porpoise sightings we detected were restricted to shallow waters in the south-west of the western English Channel. Harbour porpoises generally formed groups of a few individuals (Kiska *et al.*, 2004; Siebert *et al.*, 2006; Thomsen *et al.*, 2006; Kiska *et al.*, 2007). Here again, with good consistency, we determined an average of 2.25 individuals per group with a high SD ($SD = 1.92$).

The aerial survey was conducted during the month of August 2005 only. It would be useful to repeat this type of monitoring at other periods in order to look at the seasonal distribution. In fact, harbour porpoise sightings have been shown to vary markedly all year round, with low occurrence months that can alternate with high occurrence months in the southern North Sea (e.g. Siebert *et al.*, 2006; Thomsen *et al.*, 2006). Finally, because of the low number of sightings made during this aerial survey, density estimation was not calculated (Buckland *et al.*, 2001).

For its part, the monitoring of strandings was conducted continuously over ten years. A total of 135 stranded harbour porpoises was recorded and analysed. Strandings occurred around the whole of the Brittany coastline, and in every year since 1997. Autumn and winter months seemed to lead to an increase of strandings that could be explained by weather conditions. But harbour porpoises were distinguished from the other cetaceans as they were found more frequently—in proportion among all the cetaceans—stranded between September and January. This monthly distribution of strandings appeared to be very different from the summer peaks detected, for instance, in the Baltic and the North Sea (Hasselmeier *et al.*, 2004; Siebert *et al.*, 2006). Seasonal movement of the species that could approach the coasts and variations in the total distribution of the different cetacean species could be at the origin of this characteristic.

By-catch in fishing nets can lead to the death of harbour porpoises (e.g. Tregenza *et al.*, 1997; Northridge & Hammond, 1999; Siebert *et al.*, 2006). In the Celtic Sea, the impact of fisheries using set gillnets on porpoise populations has been shown to be not negligible (Tregenza *et al.*, 1997). During winter months, more than 30% of the porpoises stranded around the coasts of Brittany exhibited signs typically resulting from a by-catch incident (Kuiken, 1994) prior to, and most probably the reason for, the stranding.

The local specificities highlighted by our study—an increased frequency of stranding during autumn and winter months and a strong impact of by-catch on stranding numbers during winter months—need further study.

Harbour porpoises are known to be metabolically very active animals, and require significant daily food intakes (Evans, 1987). The availability of foods, as well as interactions with other species in competing for the same food source, will also need to be studied during these periods of the year.

Harbour porpoise comeback in Brittany

Our study strongly confirms the comeback of the harbour porpoise around the Brittany coast. In fact, a yearly increase in the numbers of porpoise strandings has been observed, and the significance of this increase was reinforced by finding that the proportion of porpoises among all the cetaceans increased similarly. The standardized organization of the stranding data collection strengthens the validity of our analysis, by avoiding monthly or yearly variations in effort. Thus, if strandings are more or less representative of a given population for marine mammals, this stranding increase also reflects the comeback of harbour porpoises along the Brittany coast. In fact, stranding data represent a first step in detecting variations in the cetacean population abundance (Evans & Hammond, 2004). The harbour porpoise is known to be a shelf-water inhabitant, and is often observed in shallow waters. The French coasts of the south-west of the western English Channel offers these types of conditions, and a stable population of harbour porpoise could be established again. But a feature of our analysis is the almost total absence of stranded calves, strongly differing from other studies (e.g. Hasselmeier *et al.*, 2004; Siebert *et al.*, 2006), and this raises in particular questions about breeding sites.

A new aerial survey has now to be planned, covering the whole of the year, and with the major aims of calculating harbour porpoise densities, detecting potential seasonal movements, especially those concerning the average distances from the coasts, and searching for mother–calf pairs. A genetic analysis of the stranded individuals has also been planned for some years, and the samples are in the course of being studied (Hassani *et al.*, 2008). Comparison with other porpoise populations is in progress, in order to look for the possible existence of local sub-populations.

These long term monitoring, diet and genetic studies are required for a better understanding of the local porpoise population, and for the effective implementation of a conservation plan.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to all members of the Brittany Stranding Network for their help in collecting data and samples. Special thanks are extended to all the members of the Océanopolis marine mammals team, to Sandra Fuchs, and Vincent Kerviel. We are also indebted to Gilles Couix, who drew the map of the harbour porpoise strandings along the Brittany coastline, and to two anonymous referees whose comments significantly helped to improve the manuscript.

REFERENCES

- Andersen L.W., Ruzzante D.E., Walton M., Berggren P., Bjørge A. and Lockyer C. (2001) Conservation genetics of the harbour porpoises,

- Phocoena phocoena*, in eastern and central North Atlantic. *Conservation Genetics* 2, 309–324.
- ASCOBANS (2008) *Recovery plan for harbour porpoise (Phocoena phocoena) in the North Sea*. Document 14 AC 15 (www.ascobans.org).
- Buckland S.T., Anderson D.R., Burnham K.P., Laake J.L., Borchers D.L. and Thomas L. (2001) *Introduction to distance sampling: estimating abundance of biological populations*. Oxford: Oxford University Press.
- Camphuysen K. (2004) The return of the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in Dutch coastal waters. *Lutra* 47, 113–122.
- Duguy R. (1977) Notes on the small cetaceans off the coasts of France. *Report of the International Whaling Commission* 27, 500–501.
- Evans P.G.H. (1987) *The natural history of whales and dolphins*. London: Christopher Helm, 343 pp.
- Evans P.G.H. and Hammond P. (2004) Monitoring cetaceans in European waters. *Mammal Review* 34, 131–156.
- Fontaine M.C., Baird S.J.E., Piry S., Ray N., Tolley K.A., Duke S., Birkun A., Ferreira M., Jauniaux T., Llavona A., Öztürk B., Öztürk A.A., Ridoux V., Rogan E., Sequeira M., Siebert U., Vikingsson G.A., Bouqueneau J.-M. and Michaux J.R. (2007) Rise of oceanographic barriers in continuous populations of a cetacean: the genetic structure of harbour porpoises in Old World waters. *BioMed Central Biology* 5, 30–46.
- Hammond P.S., Berggren P., Benke H., Borchers D.L., Collet A., Heide-Jorgensen M.P., Heimlich S., Hiby A.R., Leopold M.F. and Øien N. (2002) Abundance of porpoise and other cetaceans in the North Sea and adjacent waters. *Journal of Applied Ecology* 39, 361–376.
- Hassani S., Kerviel V., Le Borgne G. and Jung J.L. (2008) Homogeneity of stranded common dolphin and porpoise along Brittany coasts: a preliminary molecular analysis. *Proceedings of the XXII Annual Conference of the European Cetacean Society*, San Sebastian, Spain, 22–25 April 2007.
- Hasselmeier I., Abt K.F., Adelung D. and Siebert U. (2004) Stranding patterns of harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in the German North and Baltic Sea; when do the birth period occur? *Journal of Cetacean Research and Management* 6, 259–263.
- Kiska J., Hassani S. and Pezeril S. (2004) Distribution and status of small cetaceans along the French Channel coasts: using opportunistic records for a preliminary assessment. *Lutra* 47, 33–46.
- Kiska J., MacLeod K., Van Canneyt O., Walker D. and Ridoux V. (2007) Distribution, encounter rates, and habitat characteristics of toothed cetaceans in the Bay of Biscay and adjacent waters from platform-of-opportunity data. *International Council for the Exploration of the Sea Journal of Marine Science* 64, 1033–1043.
- Kuiken T. (1994) Review of the criteria for the diagnosis of by-catch in cetaceans. In Kuiken T. (ed.) *Proceedings of the second European Cetacean Society Workshop, Faculté des Sciences, Montpellier, France, 2 March 1994*, European Cetacean Society Newsletter, No. 26, pp. 38–43.
- MacLeod K., Scheidat M. and Hammond P. (2006) *Taking stock of European cetaceans: the SCANS-II surveys*. Presentation to the 20th Annual Conference of the European Cetacean Society, Poland, April 2006.
- Northridge S. and Hammond P. (1999) *Estimation of porpoise mortality in UK gill and tangle net fisheries in the North Sea and West Scotland*. Paper presented to the Scientific Committee of the International Whaling Commission. SC/51/SM42 Grenada, WI.
- Read A.J. (1999) Harbour porpoise—*Phocoena phocoena* (Linnaeus, 1758). In Ridgway S.H. and Harrison S.R. (eds) *Handbook of marine mammals: the second book of dolphins and porpoises*. Volume 6. San Diego, CA: Academic Press, pp. 323–356.
- Reijnders P.J.H. (1992) Harbour porpoises *Phocoena phocoena* in the North Sea: numerical responses to changes in environmental conditions. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 26, 75–85.
- Rosel P.E., Tiedemann R. and Walton M. (1999) Genetic evidence for limited trans-Atlantic movements of the harbour porpoise *Phocoena phocoena*. *Marine Biology* 133, 583–591.
- Scheidat M., Kock K.-H. and Siebert U. (2004) Summer distribution of harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in the German North and Baltic Sea. *Journal of Cetacean Research and Management* 6, 251–257.
- Siebert U., Gilles A., Lucke K., Ludwig M., Benke H., Kock K.-H. and Scheidat M. (2006) A decade of harbour porpoise occurrence in German waters—analyses of aerial surveys, incidental sightings and strandings. *Journal of Sea Research* 56, 65–80.
- Thomsen F., Laczny M. and Piper W. (2006) A recovery of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in the southern North Sea? A case study off Eastern Frisia, Germany. *Helgolander Marine Research* 60, 189–195.
- Tolley K.A., Rosel P.A., Walton M., Bjørge A. and Øien N. (1999) Genetic population structure of harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in the North Sea and Norwegian waters. *Journal of Cetacean Research and Management* 1, 256–274.
- Tregenza N.J.C., Berrow S.D., Hammond P.S. and Leaper R. (1997) Harbour porpoise (*Phocoena phocoena* L.) by-catch in set gillnets in the Celtic Sea. *International Council for the Exploration of the Sea Journal of Marine Science* 54, 896–904.
- and
- Westgate A.J., Read A.J., Berggren P., Koopman H.N. and Gaskin D.E. (1995) Diving behaviour of harbour porpoises, *Phocoena phocoena*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 52, 1064–1073.

Correspondence should be addressed to:

J.-L. Jung
Laboratoire de Toxicologie Alimentaire et Cellulaire
Université Européenne de Bretagne & Université de Bretagne Occidentale
UFR Sciences et Techniques, 6 Avenue Victor Le Gorgeu,
CS93837, 29238 Brest Cedex 3, France
email: jung@univ-brest.fr

Publication 3.

**A European Melting Pot of Harbour Porpoise in the French Atlantic Coasts
Inferred from Mitochondrial and Nuclear Data**

Alfonsi E, Hassani S, Carpentier F-G, Le Clec'h J-Y, Dabin W, Van Canneyt O, Fontaine[&] M
& Jung J.-L^{&*}.

PLoS ONE - 7: e44425

2012

* corresponding author

A European Melting Pot of Harbour Porpoise in the French Atlantic Coasts Inferred from Mitochondrial and Nuclear Data

Eric Alfonsi^{1,2,3}, Sami Hassani², François-Gilles Carpentier¹, Jean-Yves Le Clec'h², Willy Dabin⁴, Olivier Van Canneyt⁴, Michael C. Fontaine^{5,6}, Jean-Luc Jung^{1*}

1 Laboratoire BioGEMME (Biologie et Génétique des Mammifères Marins dans leur Environnement), Université Européenne de Bretagne & Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, **2** Laboratoire d'Etude des Mammifères Marins, Océanopolis, Brest, France, **3** LEMAR, Université Européenne de Bretagne & Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, **4** Observatoire PELAGIS, UMS 3462, CNRS-Université de La Rochelle, La Rochelle, France, **5** Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution, Université Paris-Sud – CNRS, Orsay, France, **6** Ecoanthropologie et d'Ethnobiologie, UMR 5145, CNRS-MNHN-Université Paris 7 Musée de l'Homme, Paris, France

Abstract

Field surveys have reported a global shift in harbour porpoise distribution in European waters during the last 15 years, including a return to the Atlantic coasts of France. In this study, we analyzed genetic polymorphisms at a fragment of the mitochondrial control region (mtDNA CR) and 7 nuclear microsatellite loci, for 52 animals stranded and by-caught between 2000 and 2010 along the Atlantic coasts of France. The analysis of nuclear and mitochondrial loci provided contrasting results. The mtDNA revealed two genetically distinct groups, one closely related to the Iberian and African harbour porpoises, and the second related to individuals from the more northern waters of Europe. In contrast, nuclear polymorphisms did not display such a distinction. Nuclear markers suggested that harbour porpoises behaved as a randomly mating population along the Atlantic coasts of France. The difference between the two kinds of markers can be explained by differences in their mode of inheritance, the mtDNA being maternally inherited in contrast to nuclear loci that are biparentally inherited. Our results provide evidence that a major proportion of the animals we sampled are admixed individuals from the two genetically distinct populations previously identified along the Iberian coasts and in the North East Atlantic. The French Atlantic coasts are clearly the place where these two previously separated populations of harbour porpoises are now admixing. The present shifts in distribution of harbour porpoises along this coast is likely caused by habitat changes that will need to be further studied.

Citation: Alfonsi E, Hassani S, Carpentier F-G, Le Clec'h J-Y, Dabin W, et al. (2012) A European Melting Pot of Harbour Porpoise in the French Atlantic Coasts Inferred from Mitochondrial and Nuclear Data. PLoS ONE 7(9): e44425. doi:10.1371/journal.pone.0044425

Editor: Sharyn Jane Goldstien, University of Canterbury, New Zealand

Received: March 8, 2012; **Accepted:** August 2, 2012; **Published:** September 12, 2012

Copyright: © 2012 Alfonsi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Eric Alfonsi is supported by a grant "Cifre" of the ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, <http://www.anrt.asso.fr>). MCF is currently a post-doc supported by the ANR NUTGENEVOL research project. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Competing Interests: EA, JYLC and SH are affiliated to "Océanopolis" (<http://www.oceanopolis.co.uk>), a public attraction (a "Centre de Culture Scientifique Technique et Industrielle") which belongs to the town of Brest and is managed by Brest'aim (<http://www.brestaim.fr>), a public-private company. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: jung@univ-brest.fr

‡ Current address: Department of Biological Sciences, University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana, United States of America

§ These authors contributed equally to this work.

Introduction

The harbour porpoise (*Phocoena phocoena*), one of the smallest cetaceans, is widely distributed in the cold to temperate coastal waters of the northern hemisphere. The species occurs in three major areas, the North Pacific, the North Atlantic and the Black Sea [1,2]. In the North Atlantic Ocean, it is the most common cetacean species [3]. The North Atlantic population of harbour porpoise has recently been the subject of several studies, that focused mainly on its spatial and temporal distribution [3–8]. From the 1940s onwards, field observations (based on strandings, by-catch and sightings) reported that harbour porpoises, commonly encountered in the southern North Sea and off the coasts of the European mainland from Spain to Denmark, declined abruptly [9,10]. More recently, the large scale field surveys

SCANS I, performed in 1994 [3] and SCANS II performed in 2005 [5], estimated a constant abundance of about 385,000 harbour porpoises in the eastern part of the North Atlantic [5]. However, a comparison of these survey results also highlighted a marked shift in distribution range of the species in the European waters during a 10-year period. More commonly distributed in the northern part of the North Sea in 1994, the surveys conducted in 2005 detected higher abundances of harbour porpoises along the south-east coast of the United Kingdom and in the Celtic Sea. In the eastern part of the North Atlantic, the harbour porpoises clearly experienced a global southward shift going on for some years.

Local studies confirmed this shift in distribution, and the return of harbour porpoises have been clearly documented along Dutch [11], German [6,12], Southwest Britain [13] and French coasts

[8]. However, the reasons for these global movements are not clearly understood. Reijnders [10] argued that a mix of environmental changes and of direct anthropogenic impacts could be involved (*e.g.* variations in the availability of prey, especially herring and mackerel, and by-catch in fishing nets). Indeed, the repartition of harbour porpoises is expected to be strongly tied to variation in the primary and secondary productivity that provides the basis for apex consumers [14–16]. Harbour porpoises display an energy demanding reproductive schedule [14], as females are often gestating and lactating at the same time and parturition occurs shortly before mating [17]. Their small body size also limits their ability to store energy [18]. Taken together, these factors suggest that harbour porpoises must feed frequently without prolonged periods of fasting. Relatively continuous accessibility to adequate prey is therefore critical, and any changes in prey availability may affect energy stores, and ultimately survival [19]. Thus, temporary shortages in prey availability can have negative impacts on these animals and are likely to be responsible for changes in their distribution [20–23].

Harbour porpoises also suffer considerable mortality due to accidental by-catches in certain commercial fisheries. For instance, a clear increase in the proportion of by-catch among the stranded harbour porpoises along the coasts of Brittany in North West of France has been observed in the winter months [8]. Although the population of harbour porpoise in the North Atlantic is relatively large, area-specific studies have demonstrated that the impact of by-catch may be worrying [24–27]. Moreover, the impact of environmental changes on marine mammal species has also become a major, if not the first preoccupation [16,28–30]. The changes in the distribution patterns of harbour porpoises, which occurred on a very short and recent time scale, certainly illustrate this problem. However, any assessment and conservation efforts require a detailed knowledge of the species abundance and population structure.

Consequently, there has been a growing interest in studying the population structure of the harbour porpoise in recent decades [31–34], especially in the North Atlantic waters. In the eastern part of the North Atlantic, previous genetic studies have shown that some genetic differentiation existed between local groups of harbour porpoises [35–38], but at the eastern North Atlantic scale most of the species' distribution range behaved as a continuous population with the genetic differentiation between individuals increasing with the geographic distance (*i.e.* Isolation by distance pattern) [15,39]. However, this continuum is limited to the south of the Bay of Biscay by marked oceanographic changes, with deep warm waters deviating from the harbour porpoise habitat requirements [15,16]. Harbour porpoises also occur further south along the Iberian coasts. Fontaine *et al.* [15,16] showed that Iberian porpoises were a population genetically distinct from the one found further north.

Harbour porpoises are increasingly sighted and stranded over the last 11 years along the French Atlantic coast [8], but at present their origins are unclear. They could originate from the north with a southward shift of porpoises from the Irish Seas, Celtic Seas, and the English Channel. Alternatively, harbour porpoises could have originated from the Iberian population and have crossed the unsuitable habitat conditions in the south of the Bay of Biscay, or form a mixture from these two putative source populations.

In this study, we investigated the genetic compositions of harbour porpoises stranded or by-caught over the last ten years along the coasts of France. We analyzed the genetic polymorphism of these individuals at a fragment of the mtDNA control region and at 7 autosomal microsatellite loci. The maternally inherited mtDNA provides a maternal view of the population structure and

diversity. Furthermore, this mtDNA marker has been widely used to study harbour porpoises genetic structure in Europe [31,32,38–41]. This enabled us to place our local study in a global context. On the other side, fast-evolving bi-parentally inherited microsatellite loci provide a complementary perspective to the mtDNA. These type of markers were also shown to be highly informative to discriminate the Iberian harbour porpoises from those further North [15,16]. The complementarity between mtDNA and microsatellite loci thus provides a suitable approach to investigating the genetic composition of harbour porpoises increasingly found along the Atlantic coasts of France.

Results

Tissue samples were collected from 52 harbour porpoises, stranded or by-caught along the French coasts between 2000 and 2010 (Figure 1). None of the samples were included in previous studies (W. Dabin, S. Hassani, personal communication). Two groups of samples were *a priori* defined, depending on the locations of the stranding or catching (Figure 1): one group included the samples of the North of France (group BEC for “Brittany and English Channel”) and the other one those of the south of France (group BOB, “Bay of Biscay”). The two groups were of comparable size, 21 individuals for the BOB group (7 females, 14 males), and 31 individuals for the BEC group (16 females, 15 males) (Table S1).

Analysis of mtDNA Control Region Sequences

Fifty samples were sequenced for a 581 bp fragment of mtDNA Control Region (mtDNA CR) including also the tRNA-pro and part of the tRNA-thr. Twenty-four variable sites (21 transitions, 1 transversion and 2 deletions) defined 15 unique haplotypes (named from FrA to FrO, GenBank Accession Numbers: HQ412579–HQ412587 and JF461056–JF461061; Table S2). Eleven were found in the BEC samples and 8 in the BOB ones. The haplotypes FrM ($n = 15$), FrL ($n = 10$), and FrE ($n = 10$) were the three most common and were found in the two groups of samples (BOB and BEC). Eleven haplotypes were found only once, and the FrG haplotype was identified in 4 individuals of the BEC ($n = 3$) and the BOB ($n = 1$) groups. Haplotype (H) and nucleotide (π) diversities overall the sampling were $H_{All} = 0.84$ (95Confidence Interval (CI): [0.53–0.91]) and $\pi_{All} = 0.00638$ (95CI:[0.00155–0.0162]) and were comparable in the two geographic groups ($H_{BOB} = 0.85$ (95CI:[0.46–0.92]) and $H_{BEC} = 0.84$ (95CI:[0.50–0.92]) and $\pi_{BOB} = 0.00620$ (95CI:[0.00121–0.0150]) and $\pi_{BEC} = 0.00666$ (95CI:[0.00167–0.0171]).

Phylogenetic relationships between the 15 haplotypes are displayed on an unrooted Maximum Likelihood (ML) tree (Figure 2a) and on a minimum spanning network (Figure S1a). No obvious geographic partitioning of haplotypes was identified. Haplotypes carried by the harbour porpoises from the two geographic groups (BEC and BOB) appeared to be distributed randomly across both the tree and the network. This is consistent with the non-significant value obtained for both measures of genetic differentiation at the haplotypic level (H_{ST} estimator of Hudson *et al* [42]) and at the nucleotide level (Hudson's nearest neighbor distance, Snn , [43]) between the two groups tested (BEC and BOB, $H_{ST} = -0.011$, $p = 0.863$; $Snn = 0.464$, $p = 0.989$). Although no geographic partitioning was observed, two groups of haplotypes can be identified in the haplotype network and in the ML tree. The first group (hereafter called α) displayed a “star-like” topology composed of 6 haplotypes surrounding a dominant haplotype (in blue on the ML tree, Figure 2). This topology was also captured by a significant Tajima's D ($D = -1.88$ (95CI:

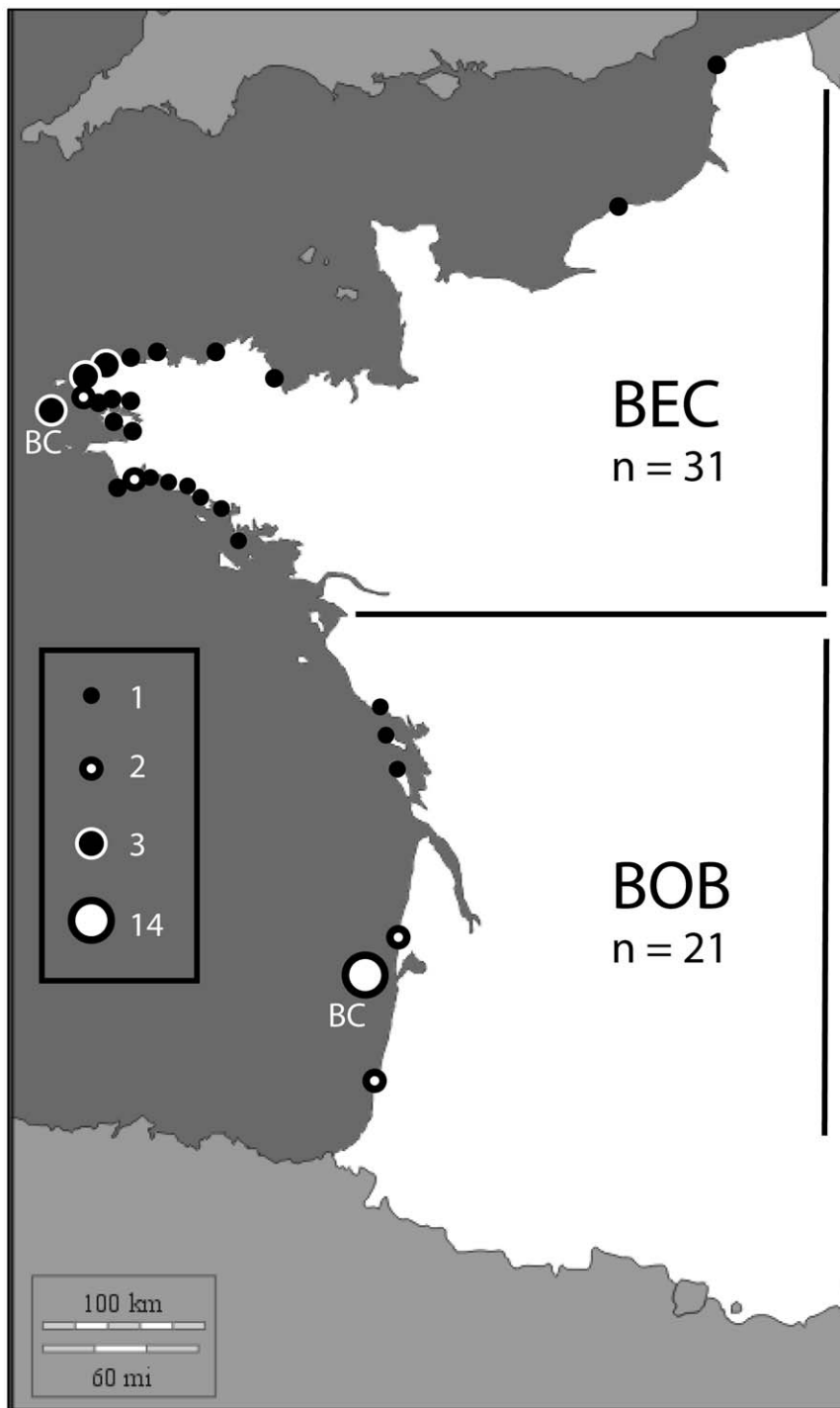


Figure 1. Geographic repartition of sampling sites of harbour porpoises. Samples were taken from 52 stranded or by-caught (BC) harbour porpoises. Dots indicate the places of sampling, and numbers of individuals for each site are indicated. Samples have been arbitrarily named following their place of sampling, either as BOB (Bay Of Biscay) or BEC (Brittany and English Channel).
doi:10.1371/journal.pone.0044425.g001

$[-1.69-1.84]$, $P < 0.05$). It comprised 16 individuals, 10 of the group BEC and 6 of the group BOB. The second group (β) was composed of 27 individuals, 11 from BOB region and 16 from BEC region, with two dominant haplotypes separated by only one mutation in position 126 and two single individual haplotypes (represented in red, Figure 2). The value of the Tajima's D was non-significant ($D = -0.80$ (95CI: $[-1.57-1.77]$), $P > 0.10$). The

remaining 4 haplotypes (encompassing 7 individuals) are at least at 2 substitutions distant from the nearest haplotype (Figure 2, and Figure S1). The groups α and β were highly supported on the ML tree with branch supports of 76% and 77%, respectively. This separation in two haplogroups α and β was also clearly visualized by the non-metric multi-dimensional scaling (nMDS). Haplotypes from the group α (in blue on Figure 3a) clustered at the right part

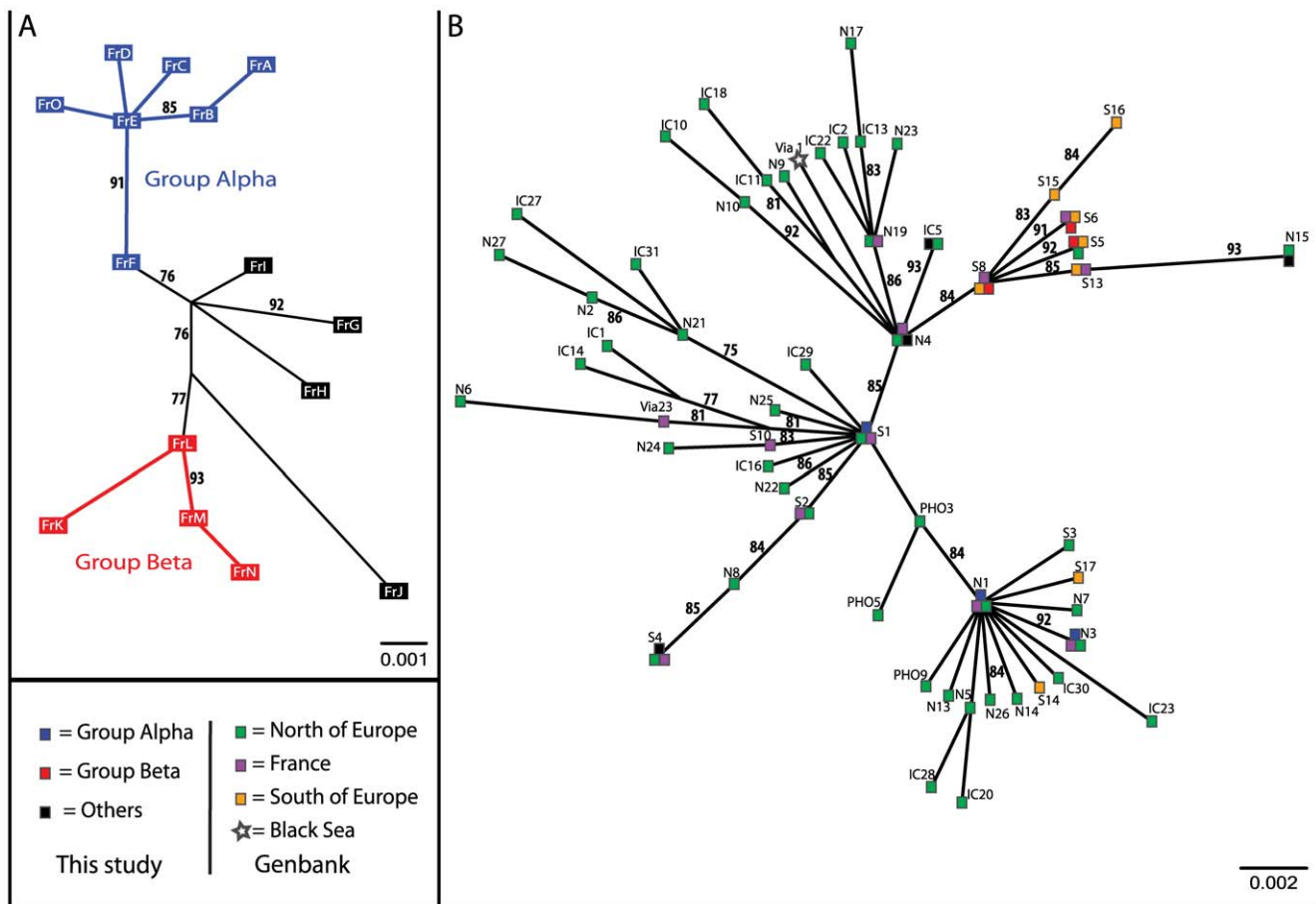


Figure 2. Maximum likelihood trees reconstructed using mtDNA control region haplotypes. A. Maximum likelihood tree obtained for the 581 bp mtDNA control region sequences determined in this study. Supports for the nodes were determined by an approximate likelihood-ratio test, and values are represented in %. Two groups, possessing high branch support values, appeared from the tree analysis (represented as **group α** and **group β**), each of the two mixing individuals of the two arbitrary geographic groups BEC and BOB. B. Maximum likelihood tree obtained for the 56 haplotypes defined from the common 334 bp fragment of the harbour porpoise mtDNA control region determined during this study and previous ones (listed on Table S3). Supports for the nodes were determined by an approximate likelihood-ratio test, and values are represented in %. The sequence of the mtDNA control Region of an harbour porpoise coming from black sea (EF063646, [15,40]), was included in the analysis. Geographic origins of the samples can be seen on the plot. Except 2, all haplotypes found on individuals sampled at positions south of France in previous studies (*i.e.* Iberian and African coasts) are clustered in a group together with the 4 haplotypes of the group β characterized in this study. The group is supported by high value tested by the approximate likelihood-ratio method.
doi:10.1371/journal.pone.0044425.g002

of the figure, while haplotypes from the group β (in red, Figure 3a) all group together on the left part. Unassigned haplotypes were distributed in between those two groups.

We found no significant correlations between haplogroup membership (α and β) and the sex of the animals ($\chi^2 = 0.65$, $p = 0.42$, $df = 1$), nor with the year of stranding or by-catch ($\chi^2 = 4.04$, $p = 0.77$, $df = 7$) nor the season ($\chi^2 = 2.38$, $p = 0.50$, $df = 3$).

In order to obtain a European-wide picture of the mtDNA structure, we combined our mtDNA dataset with eighty-two previously published mtDNA sequences, all coming from harbour porpoises collected along the East side of the North Atlantic (see Table S3). These data overlap on a 334 bp fragment. Truncating our sequence data set removed 9 polymorphic positions (*i.e.* at position 13 and positions 447 to 569; Table S2), but still defined 10 distinct haplotypes (out of the 15), which matched with those previously published, themselves truncated to the 334 bps overlapping part (Table S4). Similarly, truncating the 82 haplotypes from Genbank eliminated some variable positions and reduced the

number of haplotypes identified to 56. The final data set comprised 44 polymorphic sites defining 56 haplotypes coming from Genbank sequences including 10 haplotypes common with our sampling.

The nMDS analysis on this dataset displayed a strongly organized plot depicting a clear geographic structure (Figure 3b). All but two of the haplotypes (S14 et S17, [39]) found in porpoises from the south of the Bay of Biscay clustered on the lower left corner of the plot (orange triangles, Figure 3b). Unambiguously, this cluster also included all the haplotypes of our previously defined group β (red dots, Figure 3b), as well as some haplotypes from individuals from French coasts (purple triangles, Figure 3b). More precisely, this cluster included haplotypes VIA26, VIA27, VIA28, VIA30 and VIA31 [40], found on individuals from the Spanish and French coasts, haplotypes S6, S8, S9, S13, S15 and S16 sampled on French, Portuguese and African coasts [39] together with the truncated form of our haplotypes FrK, FrL, FrM and FrN. Also, this cluster included the haplotype S5, sampled in the North Sea by Tolley & Rosel [39] (green triangle, Figure 3b).

The haplotypes from all other porpoises were distributed on the remainder of the plot, and mixed all the animals sampled from geographic positions located to the north of the English Channel (green triangles, Figure 3b). Only two exceptions occurred: haplotypes S14 and S17, sampled respectively along Portuguese and African coasts [39], were clearly visible as 2 orange triangles in the lower right part of the plot (Figure 3b). Also, some individuals stranded or by-caught along the French coasts, especially all novel haplotypes defined in this study and not attributed to the group β were scattered on the rest of the plot (purple triangles, black and blue dots, Figure 3b).

Figure 2b and Figure S1b show the unrooted ML tree and the MJ network for the combined dataset, including the 56 haplotypes. The two analyses depicted a rather shallow phylogeny as observed in previous studies [35,39], but clearly highlighted the grouping observed with the nMDS analysis. All the haplotypes found in porpoises from African, Portuguese and Spain coasts (orange squares, Figure 2B) grouped together with the haplotypes from group β identified in the present study (red squares, Figure 2B), jointly with some haplotypes coming from French samples of previous studies [39,40]. Branch support for this group was particularly high (84%).

Microsatellite Variation Analysis

Seven microsatellite loci, previously identified by Rosel *et al.* [41] and genotyped here were all polymorphic and showed between 7 and 15 alleles in our samples (Table 1, and Table S5). Allelic richness varied from 5.81 (PPHO131) to 10.56 (PPHO130), and observed and expected heterozygosity ranged from $H_o = 0.457$ to $H_o = 0.913$ and $H_e = 0.670$ to $H_e = 0.885$. No evidence of linkage disequilibrium was found in any pairwise locus comparison ($p > 0.05$ for all pair-wise comparisons). Allelic frequencies displayed no significant departure from Hardy-Weinberg expectations in the global sample ($F_{IS} = 0.01$ (95CI: [-0.08–0.12]), $p = 0.314$), nor for each sub-grouping we considered based on mitochondrial haplogroup (haplogroup α , $F_{IS} = 0.08$ (95CI: [-0.05–0.21]), $p = 0.061$ and β , $F_{IS} = -0.02$ (95CI: [-0.11–0.08]), $p = 0.743$), nor for sub-grouping based on

geography (BEC, $F_{IS} = 0.02$ (95CI: [-0.10–0.17]), $p = 0.304$ and BOB, $F_{IS} = -0.01$ (95CI: [-0.07–0.07]), $p = 0.596$). However, one locus (PPHO102) displayed a significant deficit of heterozygosity in the global sample ($F_{IS} = 0.321$, $p < 0.05$) and within the group BEC ($F_{IS} = 0.388$, $p < 0.05$). All other F_{IS} values were non-significant (Table S5). In agreement with the absence of departure from HW expectations, we did not detect any significant differences in allelic frequencies between the two geographic groups (BEC *versus* BOB, $F_{ST} = 0.01$ (95CI: [-0.01–0.03]), $p = 0.065$) nor between the two mtDNA haplogroups (α *versus* β , $F_{ST} = -0.01$ (95CI: [-0.02–0.00]), $p = 0.929$).

The analysis of allelic richness, private alleles and expected heterozygosity are presented in Table 1 for the BOB and the BEC groups. Group BOB displayed higher values of private alleles than group BEC, as well as higher levels of heterozygosity and allelic richness (Wilcoxon signed ranked (WSR) test, $p = 0.05$). The groups α and β did not display such difference (WSR test, $p > 0.05$).

We further investigated potential population subdivision by conducting a Bayesian clustering analysis using the program Structure V2.3 [44–46]. All the model settings we tested, *i.e.* with or without admixture and using the standard or the *locprior* model, returned comparable results: the data did not contain any evidence of population subdivision. The number of groups (K) that best explained the data was $K = 1$ with a posterior probability for this value of $p > 0.99$ (Figure S2). Therefore, the analysis of microsatellite variation did not reveal any evidence of population subdivision within our global sample, in contrast to the results obtained based on the mtDNA control region sequence polymorphisms.

To ensure that such lack of significant differentiation is not the result from a low power, we evaluated the statistical power that can be achieved using our microsatellite dataset, representative of the animal sampling and of the loci number and polymorphisms, using Powsim [47]. Fontaine *et al.* [16] estimated effective population sizes for both Iberian and northern Bay of Biscay harbour porpoise populations as, respectively, $n = 79$ and $n = 353$, and a splitting time between the two populations of at least 35

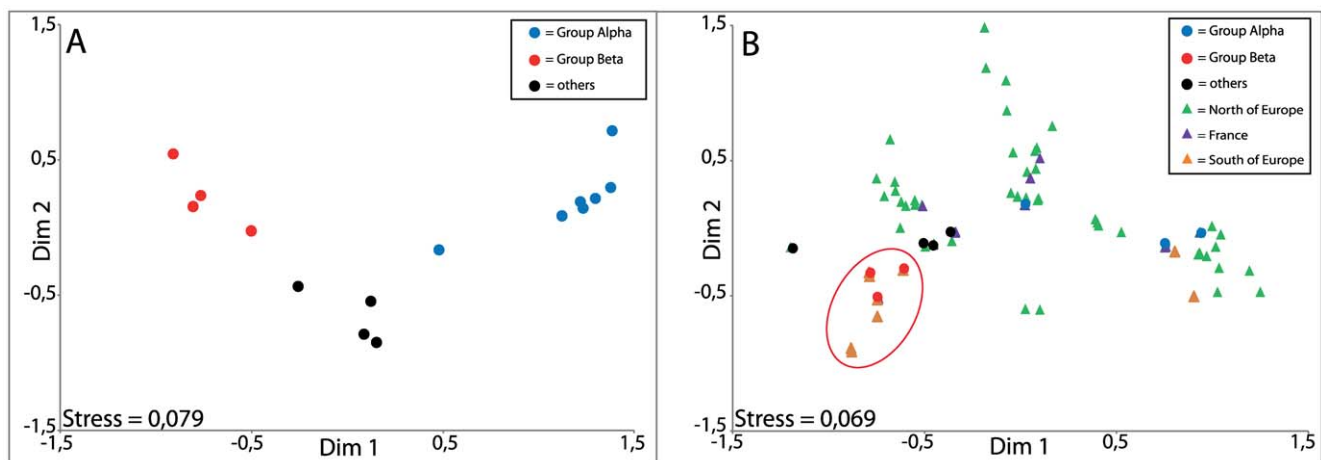


Figure 3. Multidimensional Scaling plots representative of distance between mtDNA control region sequences. **A.** Distances between the harbour porpoise samples analyzed in this study. Individuals attributed to group α by the maximum likelihood analysis are represented as blue dots, to group β as red dots, and individuals unassigned as black dots. Individuals of each group are clearly clustered together, thus highlighting the discrimination between the two groups. **B.** Distances between the 56 haplotypes defined from the common 334 bp sequenced during this study and previous ones (listed on Table S2 and S3). Geographic origins of the samples can be seen on the plot. Except 2, all the haplotypes determined from samples coming from areas localized south to France (Spain, Portugal or African coasts) and from samples of the group β of this study are clustered together.

doi:10.1371/journal.pone.0044425.g003

Table 1. Summary statistics for the 7 microsatellite loci analyzed.

All samples							
Locus	N	nA	range	He	Ho	A	Fis
PPHO110	46	9	124–146	0.795	0.891	6.35	−0.122
PPHO130	45	15	113–143	0.834	0.844	10.56	−0.013
PPHO137	45	15	159–189	0.885	0.756	10.24	0.148
PPHO102	46	10	176–198	0.670	0.457	7.48	0.321*
PPHO142	46	15	174–208	0.789	0.826	9.60	−0.048
PPHO104	46	13	193–233	0.860	0.891	9.30	−0.037
PPHO131	46	7	110–130	0.809	0.913	5.81	−0.130
All	46	12		0.806	0.797	8.48	0.011
Group BEC (Britanny and English Channel)				Group BOB (Bay Of Biscay)			
Locus	A	npA	He	A	npA	He	
PPHO110	5.52	0.04	0.783	7.71	3.11	0.822	
PPHO130	10.03	2.44	0.808	10.53	2.97	0.859	
PPHO137	8.39	1.66	0.825	11.55	5.41	0.892	
PPHO102	7.59	1.87	0.686	7.34	1.37	0.654	
PPHO142	9.95	2.38	0.753	10.03	2.61	0.836	
PPHO104	8.97	1.55	0.826	9.91	2.50	0.895	
PPHO131	5.54	0.04	0.814	6.38	1.21	0.818	
All	8.00	1.42	0.785	9.06	2.74	0.825	

Data are expressed for each locus and as the average of all loci for all samples, and for arbitrary geographic groups BEC and BOB.

N = sample size, nA = number of alleles, range = range of allele sizes in bp, He = non biased expected heterozygosity, Ho = observed heterozygosity, A = allelic richness (estimated for a sample size of 14 individuals), npA = number of private alleles (estimated for a sample size of 19 individuals), F_{IS} = value F_{IS} calculated after Weir and Cockerham. Asterisks mark significant departure from HWE after the Bonferroni correction (*: $p < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0044425.t001

generations. On this basis, we used the most stringent values, an effective population size of 353 individuals and a number of generations (t) set to 35, and the genetic differentiation was quantified as $F_{ST} = 0.049$. A higher number of generations, or a lower population size such as the one calculated for the Iberian population would have lead to a higher genetic differentiation. Fisher's exact test and Chi-square estimated that, using our sampling ($n_a = 14$ and $n_b = 21$), such level of genetic differentiation would have been detected, if existing, in all cases (100% probability).

Rather than being the result of a low statistical power due to small sample size, the lack of genetic differentiation detected by microsatellite polymorphisms is instead likely to reflect actual genetic admixture between harbour porpoises along the French Atlantic coast.

Discussion

Duguay observed that, having once been one of the most common cetacean species, the harbour porpoise had become rare along the French Atlantic coasts [9]. It is only since the mid-1990s that a recovery of the species has been confirmed in this area [8]. It was believed that the abundance recovery was simply related to a general southward shift of the species detected in European waters by the two SCANS campaigns [3,5] and by local studies on European mainland coasts north to the English Channel [6,11–13]. However, biological interactions between Iberian and French harbour porpoises have long been hypothesized [48]. In fact, although recent genetic studies identified two distinct populations

surrounding the Bay of Biscay, they also detected northward migrants from the Iberian population to the North East Atlantic [15,16]. Thus, the population structure of the harbour porpoise along the French coasts needed to be elucidated to properly understand the change in the species' distribution.

Dual Geographic Origin of French Harbour Porpoises

Both the haplotype networks and ML phylogenetic trees highlighted the existence of two mitochondrial haplogroups in the harbour porpoises found along the French Atlantic coasts. The nMDS analysis provided a particularly clear-cut picture of the genetic distinction between groups of harbour porpoises both at a local scale in the Bay of Biscay and at the eastern North Atlantic scale, when we compared our new data with those previously published [31,32,36,39,40]. One of the haplogroups (*i.e.* β) clustered with the haplotypes found in Iberian and African harbour porpoises, together with some French individuals previously analysed [39,40]. This “South cluster” appeared very clearly on the ML tree, and contained only one exception, an individual sampled in the North Sea [39]. Only two haplotypes sampled from Iberian and African harbour porpoises by Tolley & Rosel [39] are missing from the “South cluster”. The second haplogroup (*i.e.* α) corresponded to harbour porpoises originating from North East Atlantic, including the North Sea, the English Channel and the French coasts [31,32,39,40]. Haplotypes previously identified for French harbour porpoises could either belong to one of the two groups.

The mtDNA data thus clearly revealed that harbour porpoises found along the French Atlantic coasts display a dual genetic

origin. This result is consistent with previous observations of Tolley & Rosel [39] who documented genetic structuring in the harbour porpoise population along the European coasts. However, the nMDS analysis performed in this study provided an even higher resolution. The two genetic haplogroups defined on the basis of mtDNA variation thus have a geographic explanation, and enabled us to distinguish between the African-Iberian population and individuals originating from North East Atlantic waters.

Accordingly, the co-existence of these two haplogroups along the French coasts shows that some individuals migrated southward from the northern waters, or were the offspring of such migrants. Their movement can partially explain the recovery of the harbour porpoise along the coasts of France, and certainly correspond with the more global southward shift in the species distribution in the eastern North Atlantic waters [5]. However, it is also clear that some harbour porpoises originated from the Iberian population and crossed the putative environmental barrier to dispersal presented by the Capbreton canyon and migrated northwards to the Bay of Biscay and further north to the coasts of Brittany. They, or their offspring, account for more than the half of the harbour porpoises of our sampling. This phenomenon is clearly recent, as suggested by the increased observations of harbour porpoises along the French coasts in the last ten years after their quasi-disappearance from the same geographic area [8,9].

The Lack of Genetic Structure in Autosomal Microsatellite Loci

The analysis of microsatellite polymorphism provided a distinct perspective from the mtDNA one. The seven loci analyzed were highly polymorphic, but they did not reveal any evidence of genetic subdivision in our sampling. We detected no departure from Hardy-Weinberg expectations and none of our analyses based on allelic frequency or on the Bayesian clustering detected any population subdivisions. Even the new algorithm of Structure 2.3.3 (the “*locprior*” model, [46]) designed to detect weak genetic structure did not help in recovering any population subdivision.

Evaluation of the statistical power of our analysis using the simulation-based procedure of Powsim showed that the lack of genetic structure detection is not caused by low statistical power. Indeed, the statistical power of detecting a significant F_{ST} value, given the effective population sizes of the Iberian population and the northern Biscayan population estimated in [16], the number of loci and the sample size we have analysed here, reached about 100%. This indicates that only biological process can explain this lack of population structure at autosomal loci. It is to note that the simulation of the genetic drift between the Iberian and the population further north using Powsim led to F_{ST} values remarkably close to the observed values, calculated by Fontaine et al. [15], still reinforcing the significance of this evaluation.

The fact that microsatellite allele frequencies do not depart from HW expectations clearly suggests that, at this geographic scale, harbour porpoises in the Bay of Biscay and along the coasts of Brittany behave as a randomly mating unit. On the other hand, mitochondrial data show that harbour porpoises in this area are a mixture from the two populations surrounding the Bay of Biscay. One hypothesis is that admixture between two genetically distinct populations can explain such combination of results. Hardy Weinberg equilibrium can be restored after just one generation, if the populations truly behave as a global random mating unit [49]. This could thus explain why we observed no departure from HW expectations along the Atlantic coasts of France. Female harbour porpoises reach sexual maturity at 3–4 years of age [17], and thus only a few years are needed to generate hybrid offspring. Therefore, this would imply that a significant proportion of the

animals sampled constitute admixed individuals derived from the two genetically distinct populations previously identified along the Iberian coasts and in the North East Atlantic [15]. However, quantifying the exact proportions of admixture will require more detailed sampling of source populations.

The only signal of genetic structure that we detected in the nuclear markers was the significantly higher value of allelic richness and private allelic richness in samples coming from the Bay of Biscay (group BOB) compared to those of the Brittany and English Channel (group BEC). As these groups were defined on a geographic basis, this result could be explained by the isolation by distance pattern demonstrated for the harbour porpoise in North East Atlantic waters [15]. But the absence of significant differences in allelic frequencies between the two groups, combined with the relatively small distance and absence of any natural barrier between the two geographic areas, leads us to believe that, if it does exist, this genetic difference is very weak. The proportion of animals coming from the Iberian waters should be higher in the group BOB, closer to the Capbreton canyon than the group BEC, thus leading to this higher genetic diversity.

Implications in Terms of Conservation

The French Atlantic coast clearly appears to be an area of contact and probably admixture between two previously separated populations of harbour porpoises. Harbour porpoises had almost totally disappeared in this area by the mid 1990s, but they have made, and continue to make, a strong recovery, with increasing number of sightings and strandings [8]. This suggests that habitat conditions are becoming more suitable to sustain the return of harbour porpoises along the French coast. Attention should be paid to this specific area in the future both in terms of conservation and further study. As recommended [50], the by-catch of harbour porpoises will have to be carefully evaluated, and campaigns to number individuals will have to be planned in order to evaluate the percentage of the population impacted by by-catch. The recent creation of the first French Marine Park in the Iroise Sea (official site: <http://www.parc-marin-iroise.gouv.fr>) will obviously help in this required conservation effort. A program of scientific studies, named “INPECMAM”, has been defined, with the aim of following the small cetacean by-catch events in the Iroise Sea, and the harbour porpoise will be an important component of this study.

What are the Possible causes of the Harbour Porpoise Shifts?

Besides being informative for conservation efforts, our results underline the value of studying the changes in distribution of the harbour porpoise in European waters, with a special focus on the French coasts. The Bay of Biscay and the waters off the coasts of Brittany deserve special attention, as this area represents a well-known biogeographic transition zone between temperate species and subtropical species [51]. The impact of climate change could hence be more visible here [52]. The harbour porpoise was almost absent from this area until recently, but a genetic signal of migration between the two populations surrounding it was already detected previously [16]. Our study strongly suggests that most of these migration events could have occurred in the last few years. Shifts in harbour porpoise distribution are thus ongoing in European waters, and the French coast is particularly significant because there are two concomitant shifts occurring, one southward and the other northward. The geographic limits of the northward migration of the Iberian population will have to be determined in the coming years, as well as the limits of the southward shift of the North East Atlantic population.

Habitat changes, especially ones potentially affecting the food availability, are suspected to be the cause for marine predator displacements. Such changes would be significant for harbour porpoises, because they have only limited energy storage capacity [18]. Climate change has been shown to affect fish distributions [52,53], but except for some specific cases, its effects on cetaceans, often highly mobile, have been difficult to study [19,29,54]. Fontaine *et al.* [16] hypothesized that the northward migration of the Iberian harbour porpoise population could be interpreted as a response to ocean warming, as might be expected for a temperate predator in the Northern hemisphere. Our results may well support this theory.

The complementary use of nuclear and mitochondrial markers has enabled us to uncover that the harbour porpoises found along the coasts of France have a dual origin, and that the two populations are currently hybridizing. The coasts of France therefore appear to be an area of major significance for Atlantic harbour porpoises, and may provide a key to understanding the range shift of a marine apex predator in response to a changing environment.

Materials and Methods

DNA Extraction and PCR-based Sex Determination

Samples were derived from different organs (skin, blubber, muscle, kidney and liver) and all kept either at room temperature in 95° ethanol or frozen at −20°C. Total genomic DNA was extracted from all types of samples using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) following the manufacturer recommendations. The quality of the extracted DNA was estimated by agarose gel electrophoresis and concentrations were determined using a Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). The sex of each animal was determined as described [55,56].

Amplification, Sequencing and Analysis of the Mitochondrial DNA Control Region

A fragment of 623 bp, from position 15375 to 15997 on the *P. phocoena* complete mitochondrial genome sequence (Genbank ref. AJ554063.1), including the mitochondrial control region, was amplified using two primers: mcrf (5'-acctcggtcttgtaaacc-3') and mcr (5'-accacaaatgaatgaaatctcag-3'), derived from primers L15928 and HOOO34 [33,57]. The polymerase chain reactions (PCR) were carried out in 50 µl of final volume containing around 50 ng of genomic DNA, 1 µM of each primer in the Hotgoldstar master mix x1 (Eurogentec) with a final concentration of MgCl₂ of 2.5 mM. After an initial denaturation step of 10 min at 95°C, the cycling parameters were: 5 cycles of 95°C for 30 s, 46°C for 30 s and 72°C for 60 s each, followed by 35 cycles consisting 95°C for 30 s, 53°C for 30 s and 72°C for 60 s. Reactions were ended by a final extension step of 10 min at 72°C.

The PCR products were purified using the Quick Clean 5M PCR purification Kit (Genscript) and sequenced on an ABI3730XL sequencer by Macrogen (Korea), in presence of one of the primers used for DNA amplification. Each haplotype was sequenced on both directions, *i.e.* in forward and reverse sense, at least one time. Results of the sequence reactions were analyzed using the Sequence Scanner software (Applied Biosystem). Consensus sequences and alignments were produced using Bioedit [58].

In addition to these new data, a total of eighty two sequences of mitochondrial control region of European and African harbour porpoises were found in Genbank by a key-word search, using “D-Loop” or “Control region” restricted to the *Phocoena phocoena* species, and then excluding Pacific, East Atlantic and Black Sea

samples (Table S3). All the data overlapped for a 334 bps length fragment of the D-loop region starting at the position 15477 of the complete mitochondrial genome (Genbank ref. AJ554063.1). All the sequences including the new ones uncovered in this study were truncated to this common 334 bps part to produce a second dataset combining local data with European ones on which the analyses were replicated (Table S6).

Data Analyses

For population genetic analysis, we used Arlequin 3.11 [59] in order to identify the different haplotypes and DnaSP V.5.10 to calculate haplotype and nucleotide diversities and Tajima's *D* statistics [60,61]. Phylogenetic relationships among haplotypes were depicted using a median joining network of haplotypes using Network 4.6 (www.fluxus-engineering.com). We also used a maximum-likelihood (ML) approach to construct the phylogenetic trees using an online phylogeny pipeline [62]. Sequences were aligned using MUSCLE [63], a ML tree was built using PhyML with a HKY85 model of sequence evolution and the gamma correction [64]. The tree was drawn using TreeDyn [65]. Branch supports were tested using the approximate likelihood-ratio method [66]. We also tested a parsimony approach (TNT, [67]) and neighbor-joining distance-based methods (BIONJ, [68]) to check for the consistency of the results.

We used a multi-dimensional scaling (MDS) approach in order to graphically represent genetic distances between haplotypes. The model used is an ordinal (non metric) nMDS using monotone regression and rank images. This method display each haplotype sequence in a n-dimensional geometric space so as to respect as much as possible the rank order of the calculated genetic distances between each pair of sequences. We computed the distance matrix using DNAdist [69] the F84 models and similarities table parameters being both tested. Distances matrix or 1-similarity matrix were then analyzed by nMDS using Statistica (Statsoft, 2005).

Genetic differentiation between subpopulations was tested at both the haplotype frequency level using the *H_{ST}* statistics [42] and at the nucleotidic level using the *S_{nn}* statistic [43], both implemented in the DnaSP v5.10 software [60].

Microsatellite Analysis

We screened 7 nuclear microsatellite loci for 46 harbour porpoises. We first established new reaction conditions based on the published sequences of microsatellite-containing loci [41] and a three primers-reaction approach that use an universal primer linked to the fluorochrome and a couple of primers specific to the locus, one of which is extended at its 5'-end by the universal primer sequence [70]. PCR were carried out in presence of these three primers, with a molar ratio between the 3 primers of 1/100/100 (specific-tailed, reverse, universal), in order to allow a progressive incorporation of the universal primer in new amplicons, thus labeling PCR products after only few cycles. This protocol facilitates use of one universal primer per each fluorescent dye, instead of linking the dye to one of the locus-specific primer. All primers were designed on the basis of the published sequences with the help of the OligoAnalyser tool (V. 3.1 on line at <http://eu.idtdna.com>). The Table S7 provides the Genbank references of the published loci [41], the sequences of the specific primers for each locus, and the sequences of the two universal primers used in this study.

PCR reactions (25 µl of final volumes) contained around 10 ng of genomic DNA, 10 pmole of universal and reverse primers, 0.1 pmole of specific-tailed primer, 2.5 mM of MgCl₂, 200 µM of each dNTP and 1 unit of TAQ polymerase (Eurogentec, Belgium)

in the standard reaction buffer. Cycling profiles consisted in an initial denaturation step at 94°C for 10 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 30 s at 55°C and 72°C for 30 s, and ended with a final extension step of 15 min at 72°C. One μ l of each reaction was diluted in water, mixed with 0.25 μ l of GENESCAN 500 ROX (Applied Biosystem), and analyzed on an Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer after a 5 min. denaturation at 95°C.

The Peak Scanner software (Applied Biosystems) was used to determine the quality of the reactions and the lengths of the amplified fragments. Allele sizes were then defined on the basis of these results, genotyping values were grouped in an Excel spreadsheet (Microsoft), and converted to the required formats for further analysis using PGDSpider [71].

Genetic polymorphism at each locus was quantified using allelic richness (A) and private allelic richness (pAr) measures calculated using ADZE [72], observed and unbiased expected heterozygosities (H_o and H_e) and fixation indexes (F_{IS}) were calculated using FSTAT 2.9.3.2 [73]. Departures from Hardy-Weinberg expectations were tested using exact tests with the sequential Bonferroni correction for multiple comparisons [74]. Linkage disequilibrium among loci was tested using a permutation test (10^5) implemented in FSTAT 2.9.3.2 [73]. Differences in allelic frequencies between groups of porpoises were tested using exact tests implemented in GENEPOP 4.0 [75] and quantified using the Weir and Cockerham estimator of F_{ST} [76].

We assessed the statistical power of our microsatellite data set using Powsim [47]. Powsim simulates genetic drift between two independent populations of given sizes and for a specified number of generations. The effective population sizes (N_e) and the number of generations (t) were taken from Fontaine *et al.* [16], and allowed Powsim to simulate genetic drifts between the Iberian and the northern bay of Biscay populations since the time of splitting, and to estimate the resulting genetic differentiation quantified as F_{ST} . Present numbers of samples were then used to calculate the proportion of significant outcomes among 1000 repetitions using chi-square and Fisher's exact tests, leading to an evaluation of the relevance of the sample sizes and genetic markers used in this study to detect the expected genetic differentiation.

We further investigated the population structure using the Bayesian model-based clustering algorithm implemented in Structure 2.3.3 [44–46]. This analysis partitions multilocus genotypes into clusters, while minimizing departure from Hardy Weinberg and linkage equilibrium (HWLE) among loci, and estimates the ancestry proportions to the different populations. We conducted the analyses on the multilocus microsatellite genotypic dataset. The analysis was performed using the “standard model” of population admixture and allele frequencies correlated among populations, and also with a no admixture model. A second series of analysis was performed using the new « *locprior* » model recently developed by Hubisz *et al.* [46] designed to detect weak population structure by making explicit use of sampling location information. To that aim, we made use of an *a priori* assumption that porpoises from the genetic haplogroups described in this manuscript came from two distinct populations by modifying the prior on individual origin in the model. Other settings for the model simulations were as follow. We conducted a series of independent runs with different proposals for the number of clusters (K), testing all values from 1 to 5. Each run used 500,000 iterations after a burn-in of 50,000 iterations. To ensure convergence of the Markov Chain Monte Carlo (MCMC), we performed 5 independent replicates for each value of K. The number of clusters that best explains the data was tested by computing the posterior probability of the data for

a given number of clusters tested, $P(X|K)$ and by computing the rate of change of this value as K is increased [77].

Ethics Statements

The study was entirely based on samples collected from cetacean carcasses found stranded or accidentally by-caught along the French coasts and did not involve observation or experimentation on captive animals by any mean.

The University of La Rochelle is the institution permanently in charge of running the French marine mammal stranding network under the decree of 10 November 2010, jointly taken by the Ministry in charge of the Environment and the Ministry in charge of Fisheries, regarding the use of biological data and samples collected on stranded marine mammals for scientific research and monitoring purposes.

Supporting Information

Figure S1 Mitochondrial haplotype networks. **A.** Haplotype network depicting the relationships between the 15 harbour porpoises mtDNA control region haplotypes determined in this study. **B.** Haplotype network of the 56 truncated haplotypes of mtDNA control region of harbour porpoise determined in this study and in previous ones. (TIF)

Figure S2 Mean probabilities [$\text{LnPr}(X|K)$] of the data as a function of the fixed number of clusters (K). (DOC)

Table S1 List of the 52 harbour porpoises sampled. (DOCX)

Table S2 Variable sites in the 15 mtDNA control region haplotypes defined in this study. (DOCX)

Table S3 List of the mtDNA control regions haplotypes previously determined by other authors on harbour porpoises and used in this study. (DOCX)

Table S4 Haplotype data sets analyzed. (DOCX)

Table S5 Summary statistics for the 7 microsatellite loci analyzed and for each group of samples. (DOCX)

Table S6 Correspondances between truncated haplotypes and their coding on ML phylogenetic tree and on haplotype networks. (DOCX)

Table S7 Primer sequences for the seven microsatellites loci analyzed in this study. (DOCX)

Acknowledgments

The samples used in this study were collected by the French Stranding Network and stored at Oceanopolis (Brest) and at the CRMM (La Rochelle). Namely, were involved in the sampling: Jean-Jacques Boubert (RN banc d'Arguin); Alain Beauvils (CHENE); Alexandre Dewez (GEFMA); Jérémy Kiska, Eric Poncet, Jérôme Spitz (CRMM/ULR); Philippe Clavier, Jacques Lesueur (ONCFS 33); Nadine Rigadeau (LPO ile grande); Julien Huteau (mairie de Crozon); Michael Buannic (PNMI), Roland Mirtain, Jean-Roch Meslin, Nicolas Brun and Jacques Garreau; as well as the associations and professional and administrative structures “APECS”, “ONCFS 56”, “comité local des pêches d'Arcachon”, “RN de la baie de St-Brieuc”, “CMNF “and the “Pingloise” project. We

especially thank all the members of the LEMM (Oceanopolis) and of “The Parc Naturel Marin d'Iroise”.

The microsatellite analysis was performed with the help of Joelle Creff, Cédric Le Maréchal and Claude Ferec (INSERM U 613, UBO, Brest). We thank Michael M. Hansen (Aarhus University, Denmark) for suggesting us the use of *Powstat* to assess the statistical power of our microsatellite analysis.

We are grateful to Yves-Marie Paulet (IUEM, UBO) for his continuous encouragements. We also thank FP Palstra for his constructive comments and English editing of the MS.

References

- Gaskin DE (1984) The harbour porpoise *Phocoena phocoena* (L.): Regional populations, status, and information on direct and indirect catches. Rep Int Whal Comm 34: 569–586.
- Read A (1999) Harbour porpoise - *Phocoena phocoena* (Linnaeus, 1758). In: Ridgway S, Harrison S, editors. Handbook of marine mammals: the second book of dolphins and porpoises. San Diego, CA: Academic Press, Vol. 6. 323–356.
- Hammond P, Berggren P, Benke H, Borchers D, Collet A, et al. (2002) Abundance of harbour porpoise and other cetaceans in the North Sea and adjacent waters. J App Ecol 39: 361–376.
- Kiska S, Hassani S, Pezeril S (2004) Distribution and status of small cetaceans along the French Channel coasts: using opportunistic records for a preliminary assessment. Lutra 47: 33–46.
- Anonymous (2006) Small cetaceans in the European Atlantic and North Sea (SCANS-II). LIFE Project No. LIFE04NAT/GB/000245. University of St Andrews, Fife, Scotland, UK. Available at <http://biologist-andacuk/scans2/inner-finalReport.html>: 1–55.
- Thomsen F, Laczny M, Piper W (2006) A recovery of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in the southern North Sea? A case study off Eastern Frisia, Germany. Helgol Mar Res 60: 189–195. doi:10.1007/s10152-006-0021-z.
- Van Der Meij S, Camphuysen K (2006) The distribution and diversity of whales and dolphins (Cetacea) in the southern North Sea: 1970–2005. Lutra 49: 3–28.
- Jung JL, Stéphan E, Louis M, Alfonsi E, Liret C, et al. (2009) Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in north-western France: aerial survey, opportunistic sightings and strandings monitoring. J Mar Biol Ass 89: 1045–1050. doi:10.1017/S0025315409000307.
- Duguy R (1977) Notes on the small cetaceans off the coasts of France. Rep Int Whal Comm 27: 500–501.
- Reijnders P (1992) Harbour porpoises *Phocoena phocoena* in the North Sea: Numerical responses to changes in environmental conditions. Neth J Aquat Ecol 26: 75–85.
- Camphuysen K (2004) The return of the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in Dutch coastal waters. Lutra 47: 113–122.
- Siebert U, Gilles A, Lucke K, Ludwig M, Benke H, et al. (2006) A decade of harbour porpoise occurrence in German waters - Analyses of aerial surveys, incidental sightings and strandings. J Sea Res 56: 65–80. doi:10.1016/j.seares.2006.01.003.
- Pikesley S, Witt M, Hardy T, Loveridge J, et al. (2011) Cetacean sightings and strandings: evidence for spatial and temporal trends? J Mar Biol Ass DOI:10.1017/S0025315411000464.
- Lockyer C (2007) All creatures great and smaller: a study in cetacean life history energetics. J Mar Biol Ass 87: 1035–1045. doi:10.1017/S0025315407054720.
- Fontaine MC, Baird SJ, Piry S, Ray N, Tolley KA, et al. (2007) Rise of oceanographic barriers in continuous populations of a cetacean: the genetic structure of harbour porpoises in Old World waters. BMC Biol 5: 30. doi:10.1186/1741-7007-5-30.
- Fontaine MC, Tolley KA, Michaux JR, Birkun A, Ferreira M, et al. (2010) Genetic and historic evidence for climate-driven population fragmentation in a top cetacean predator: the harbour porpoises in European water. P Roy Soc Lond B 277: 2829–2837. doi:10.1098/rspb.2010.0412.
- Lockyer C (2003) Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in the North Atlantic: Biological parameters. NAMMCO Sci Publ 5: 71–90.
- Koopman H, Pabst D, McLellan W, Dillaman R, Read A (2002) Changes in Blubber Distribution and Morphology Associated with Starvation in the Harbor Porpoise (*Phocoena phocoena*): Evidence for Regional Differences in Blubber Structure and Function. Physiol Biochem Zool 75: 498–512.
- MacLeod CD, Santos MB, Reid RJ, Scott BE, Pierce GJ (2007) Linking sandeel consumption and the likelihood of starvation in harbour porpoises in the Scottish North Sea: could climate change mean more starving porpoises? Biol Letters 3: 185–188. doi:10.1098/rsbl.2006.0588.
- Santos M, Pierce G, Learmonth J, Reid R, Ross H, et al. (2004) Variability in the diet of harbor porpoises (*phocoena phocoena*) in scottish waters 1992–2003. Mar Mammal Sci 20: 1–27.
- Johnston DW, Westgate AJ, Read AJ (2005) Effects of fine-scale oceanographic features on the distribution and movements of harbour porpoises *Phocoena phocoena* in the Bay of Fundy. Mar Ecol Prog Ser 295: 279–293.
- Santos MB, Pierce GJ (2003) The diet of harbour porpoise (*phocoena phocoena*) in the northeast atlantic. Oceanogr Mar Biol: Ann Rev 41: 335–390.
- Herr H, Fock HO, Siebert U (2009) Spatio-temporal associations between harbour porpoise *Phocoena phocoena* and specific fisheries in the German Bight. Biol Conserv 142: 2962–2972. doi:10.1016/j.biocon.2009.07.025.
- Tregenza N, Berrow S, Hammond P, Leaper R (1997) Harbour porpoise (*Phocoena phocoena* L.) by-catch in set gillnets in the Celtic Sea. ICES J Mar Sci 54: 896–904.
- Northridge S, Hammond P (1999) Estimation of porpoise mortality in UK gill and tangle net fisheries in the North Sea and west of Scotland. Paper presented to the Scientific Committee of the international whaling Commission Paper SC/51/SM42.: Grenada, WL.
- Berggren P, Wade P, Carlström J, Read A (2002) Potential limits to anthropogenic mortality for harbour porpoises in the Baltic region. Biol Conserv 103: 313–322.
- Stenson G (2003) Harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in the North Atlantic: Abundance, removals, and sustainability of removals. In: Haug T, Desportes G, Vikingsson G, Witting L, editors. Harbour porpoises in the North Atlantic. NAMMCO Sci Pub, Vol. 5. 271–302.
- Gambaiani DD, Mayol P, Isaac SJ, Simmonds MP (2008) Potential impacts of climate change and greenhouse gas emissions on Mediterranean marine ecosystems and cetaceans. J Mar Biol Ass 89: 179–201. doi:10.1017/S0025315408002476.
- Simmonds MP, Elliott WJ (2009) Climate change and cetaceans: concerns and recent developments. J Mar Biol Ass 89: 203–210. doi:10.1017/S0025315408003196.
- Fontaine MC, Snirc A, Frantzis A, Koutrakis E, Öztürk B, Öztürk AA, Austerlitz F (2012) History of expansion and anthropogenic collapse in a top marine predator of the Black Sea estimated from genetic data. Proc Natl Acad Sci USA. In press.
- Walton MJ (1997) Population structure of harbour porpoises *Phocoena phocoena* in the seas around the UK and adjacent waters. Proc R Soc Lond B 264: 89–94.
- Tiedemann R, Harder J, Gmeiner C, Haase E (1996) Mitochondrial DNA sequence patterns of Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the North and the Baltic sea. Zeit Saugtierkunde 61: 104–111.
- Rosel PE, Dizon AE, Haygood MG (1995) Variability of the mitochondrial control region in populations of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, on interoceanic and regional scales. Canadian J Fish Aquat Sci 52: 1210–1219.
- Chivers SJ, Dizon AE, Gearin PJ, Robertson KM (2002) Small-scale population structure of eastern North Pacific harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) indicated by molecular genetic analyses. J Cetacean Res Manage 4: 111–122.
- Tolley KA, Rosel PE, Walton M, Bjørge A, Øien N (2001) Genetic population structure of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in the North Sea and Norwegian waters. J Cetacean Res Manage 1: 265–274.
- Tolley KA, Vikingsson GA, Rosel PE (2001) Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeographic patterns in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the North Atlantic. Conserv Genet 2: 349–361.
- Andersen LW, Ruzzante DE, Walton M, Berggren P, Bjørge A, et al. (2001) Conservation genetics of harbour porpoises, *Phocoena phocoena*, in eastern and central North Atlantic. Conserv Genet 2: 309–324.
- Wiemann A, Andersen LW, Berggren P, Siebert U, Benke H, et al. (2010) Mitochondrial Control Region and microsatellite analyses on harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) unravel population differentiation in the Baltic Sea and adjacent waters. Conserv Genet 11: 195–211. doi:10.1007/s10592-009-0023-x.
- Tolley KA, Rosel PE (2006) Population structure and historical demography of eastern North Atlantic harbour porpoises inferred through mtDNA sequences. Mar Ecol Prog Ser 327: 297–308.
- Viaud-Martinez KA, Vergara MM, Gol'din PE, Ridoux V, Öztürk AA, et al. (2007) Morphological and genetic differentiation of the Black Sea harbour porpoise *Phocoena phocoena*. Mar Ecol Prog Ser 338: 281–294.
- Rosel PE, France SC, Wang JY, Kocher TD (1999) Genetic structure of harbour porpoise *Phocoena phocoena* populations in the northwest Atlantic based on mitochondrial and nuclear markers. Mol Ecol 8: S41–S54.
- Hudson RD, Boos DB, Kaplan NL (1998) A Statistical Test for Detecting Geographic Subdivision. Mol Biol Evol 9: 138–151.
- Hudson RD (2000) A New Statistic for Detecting Genetic Differentiation. Genetics 155: 2011–2014.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. Genetics 155: 945–959.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JIJ SH EA. Performed the experiments: EA FGC JIJ. Analyzed the data: EA SH FGC MCF JIJ. Contributed reagents/materials/analysis tools: EA SH JYLC WD OVC JIJ. Wrote the paper: EA FGC MCF JIJ. Organized the stranding networks and the storage of the animal samples: EA SH JYLC WD OVC.

45. 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.
46. Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Res* 9: 1322–1332. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x.
47. Ryman N, Palm S (2006) Powsim: a computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. *Mol Ecol* 6: 600–602. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.01378.x.
48. Donovan GP, Bjørge A (1995) Harbour porpoises in the North Atlantic. In: Bjørge A, Donovan GP, editors. *Biology of the Phocoenids*. Rep Int Whal Comm, Vol. Special Issue 16. 3–25.
49. Hartl DL, Clark AG (2007) *Principles of Population Genetics*. Sunderland, MA: Sinauer and Associates. 652 p.
50. Reijnders PJH, Donovan GP, Bjørge A, Koch K-H, Eisfeld S, et al. (2009) ASCOBANS Conservation Plan for Harbour Porpoises (*Phocoena phocoena* L.) in the North Sea. Report presented to the 16th Advisory Committee meeting 16, Bruges, Belgium, 20–24 April 2009, AC16/Doc.21.
51. Southward AJ, Hawkins SJ, Burrows MT (1995) Seventy years' observations of changes in distribution and abundance of zooplankton and intertidal organisms in the western English Channel in relation to rising sea temperature. *J Therm Biol* 20: 127–155.
52. Poulard J, Blanchard F (2005) The impact of climate change on the fish community structure of the eastern continental shelf of the Bay of Biscay. *ICES J Mar Sci* 62: 1436–1443. doi:10.1016/j.icesjms.2005.04.017.
53. Perry AL (2005) Climate Change and Distribution Shifts in Marine Fishes. *Science* 308: 1912–1915. doi:10.1126/science.1111322.
54. Palacios DM, Salazar SK, Vargas FH (2011) Galápagos Marine Vertebrates: Responses to Environmental Variability and Potential Impacts of Climate Change. In: Larrea I, Di Carlo G, editors. *Climate Change Vulnerability Assessment of the Galápagos Islands*. USA: WWF and Conservation International. 69–80.
55. Rosel P (2003) PCR-based sex determination in Odontocete cetaceans. *Conserv Genet* 4: 647–649.
56. Jayasankar P, Anoop B, Rajagopalan M (2008) PCR-based sex determination of cetaceans and dugong from the Indian seas. *Current Sci* 94: 1513–1516.
57. Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, et al. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6196–6200.
58. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95–98.
59. Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47–50.
60. Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452. doi:10.1093/bioinformatics/btp187.
61. Tajima F (1989) Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123: 585–595.
62. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, et al. (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36: W465–W469. doi:10.1093/nar/gkn180.
63. Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32: 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340.
64. Guindon S, Gascuel O (2003) A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst Biol* 52: 696–704. doi:10.1080/10635150390235520.
65. Chevenet F, Brun C, Bañuls A-L, Jacq B, Christen R (2006) TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 7: 439–448. doi:10.1186/1471-2105-7-439.
66. Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative. *Systematic Biology* 55: 539–552. doi:10.1080/10635150600755453.
67. Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774–786. doi:10.1111/j.1096-0031.2008.00217.x.
68. Gascuel O (1998) BIONJ: An Improved Version of the NJ Algorithm Based on a Simple Model of Sequence Data. *Mol Biol Evol* 14: 685–695.
69. Felsenstein J (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164–166.
70. Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18: 233–234.
71. Lischer H (2009) PGDSpider v1.0.1.4. University of Bern, Bern, Switzerland.
72. Szpiech ZA, Jakobsson M, Rosenberg NA (2008) ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. *Bioinformatics* 24: 2498–2504. doi:10.1093/bioinformatics/btn478.
73. Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available at <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
74. Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223–225.
75. Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered* 86: 248–249.
76. Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
77. Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611–2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.

Chapitre V.

Le phoque gris en limite sud de sa répartition, diversité génétique, histoire ancestrale et régime alimentaire

Le phoque gris est retrouvé dans l'Atlantique Nord, jusque dans les régions subpolaires (Harkonen et al. 2007). La mer d'Iroise et la colonie de l'archipel de Molène représentent la limite sud de sa répartition géographique. La structure globale de l'espèce à l'échelle des eaux de l'Atlantique (métapopulation, populations séparées géographiquement mais avec des échanges importants, vagues de déplacements, de migrations, ...) est encore largement à préciser, seule la mer Baltique et les côtes est et nord-est des Îles Britanniques ayant été étudiées (Klimova et al. 2014). Des études génétiques extrêmement poussées ont été réalisées sur les liens génétiques entre animaux d'une même colonie, mais très peu ont abordé la structuration globale de la métapopulation Européenne (Pomeroy et al. 2000). En particulier, les liens entre les phoques gris retrouvés en France et ceux des Îles Britanniques ne sont pas connus, bien que des mouvements d'individus aient été démontrés grâce à des balises Argos (Vincent et al. 2005).

La colonie de l'archipel de Molène est en croissance démographique constante depuis une quarantaine d'années, alors que relativement peu de naissances sont constatées sur place. Un point particulièrement intéressant porte sur la spécificité de ce peuplement, tant en termes de génétique que d'utilisation de l'habitat.

Comme pour tous les mammifères marins, initier une étude de génétique, qui implique de posséder des échantillons biologiques, nécessite de mettre en œuvre une stratégie dédiée. Océanopolis possède un centre de soins pour les phoques gris. Une vingtaine d'animaux, âgés de quelques mois au maximum, en très mauvais état physiologique, sont recueillis chaque année dans la période d'hiver, soignés lorsque cela est possible, puis relâchés. Des prises de sang sont effectuées dans un but thérapeutique sur tous les animaux, et conservées à -20°C. Une banque de plus de 250 échantillons, prélevés sur une période de 10 années, existe à Océanopolis. En parallèle, nous avons travaillé aussi sur des échantillons d'animaux échoués morts, prélevés dans le cadre du Réseau National Echouage, ainsi que sur quelques animaux capturés accidentellement dans les filets de pêche. Une analyse génétique de cet échantillonnage a été initiée, en collaboration avec Océanopolis. Plusieurs étudiants que j'ai encadrés ou co-encadrés ont participé à ces travaux (Eric Alfonsi dans le cadre de sa thèse ; Eléonore Méheust, Charlène Hamm, Anais Rey et Maeva Thomas lors de leurs stages de Master), ainsi que Carole Decker pendant son année d'ATER.

Les résultats obtenus jusqu'à maintenant démontrent la grande diversité génétique des phoques gris fréquentant les côtes de la Bretagne, suggérant fortement leur origine géographique large. La comparaison avec des données issues de travaux menés sur des phoques gris de mer Baltique et le long des côtes est et nord du Royaume-Uni a permis de mettre en évidence des

différences génétique très fortes, mais aussi d'émettre des hypothèses solides sur l'histoire ancestrale de l'espèce et son expansion en Atlantique Nord à la fin de la dernière période glaciaire.

Les résultats de ces travaux sont décrits dans la publication 4, intitulée « *Mitochondrial DNA reveals historical maternal lineages and a postglacial expansion of the grey seal in European waters* »

Pour certains phoques gris capturés accidentellement ou échoués, nous avons pu travailler sur les contenus stomacaux, et aborder ainsi l'analyse de leur régime alimentaire. Nous avons pour cela utilisé conjointement des techniques d'analyse classique de contenus stomacaux par détermination de pièces dures de proies, réalisées à Océanopolis, et une approche de type "code-barre ADN" (voir Chapitre VI) sur des restes de tissus mous de proies. Cette étude faisait partie du programme *INPECMAM* (Interactions Pêcheurs Mammifères Marins), portée par le Parc Naturel Marin d'Iroise.

Nous avons ainsi confirmé qu'il existait un régime alimentaire spécifique de l'espèce en mer d'Iroise, qui reste à expliquer puisque des proies habituelles du phoque gris sont aussi présentes. La publication 5 (« DNA barcoding for the identification of soft remains of prey in the stomach contents of grey seals (*Halichoerus grypus*) and harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) ») présente ces résultats.

Etude des phoques gris de la façade atlantique française			
Etudiants ayant participé à cette étude			
Eric Alfonsi	2009-2013	Master 2 puis Thèse	Co-encadrement en Doctorat Yves-Marie Paulet / Jean-Luc Jung et Sami Hassani pour la partie entreprise (finacement Cifre)
Eléonore Méheust	Janvier-juin 2011	Master 2, Université de Brest	Co-Encadrement Jean-Luc Jung / Sami Hassani
Charlène Hamm	Janvier-juin 2013	Master 2, Université de Strasbourg	Co-Encadrement Jean-Luc Jung / Sami Hassani
Célia Rault	janvier 2015-juin 2015	Master 2, Université de la Côte d’Opale	Co-Encadrement Jean-Luc Jung / Carole Decker
Projet mené en collaboration avec			
Sami Hassani	Océanopolis		
Philippe Le Niliot, Cécile Lefeuvre Claire Laspougeas	Parc Naturel Marin d’Iroise		
Jacky Karzopoulos	CMNF		
Willy Dabin, Olivier Van Cenney, Vincent Ridoux	Observatoire PELAGIS, Réseau National Echouage		
Tableau 12 : Collaborations et étudiants encadrés pour l’étude des phoques gris de la façade atlantique française			

Publication 4.

Mitochondrial DNA reveals historical maternal lineages and a postglacial expansion of the grey seal in European waters

Decker C, Hassani S, Jezequel M-D, Rault C, Dumas C, Méheust E, Alfonsi E, **Jung J-L***

Marine Ecology Progress Series

566, 217+227

2017

* corresponding author

Mitochondrial DNA reveals historical maternal lineages and a postglacial expansion of the grey seal in European waters

Carole Decker¹, Sami Hassani², Marie-Dominique Jezequel¹, Célia Rault^{1,3},
Christine Dumas², Eléonore Méheust^{1,2}, Eric Alfonsi^{1,2}, Jean-Luc Jung^{1,*}

¹BioGeMME (Biologie et Génétique des Mammifères Marins dans leur Environnement), 6 avenue le Gorgeu, Université de Bretagne Occidentale, CS 93837, 29238 Brest Cedex 3, France

²Laboratoire d'Etude des Mammifères Marins, Océanopolis, Port de Plaisance du Moulin Blanc, 29210 Brest, France

³CMNF (Coordination Mammalogique du Nord de la France), 806 Rue Haute, 62850 Alembon, France

ABSTRACT: Three different evolutionarily significant units (ESU) can be discerned in the grey seal *Halichoerus grypus*: in the northwest Atlantic, the northeast Atlantic and the Baltic Sea. The northeast Atlantic population has been strongly affected by hunting around the European mainland, where it is only in the last decades that breeding colonies have reappeared. The southernmost settlement of the northeast Atlantic ESU is found in the Molène archipelago, northwest France. We studied polymorphisms of the mitochondrial control region (MCR) in grey seals sampled along the Atlantic coast of France for over a decade. MCR polymorphisms highlighted the existence of 4 major MCR haplogroups. Comparison of MCR sequences with those in the GenBank database yielded highly significant differentiation between grey seals sampled in France and grey seals originating from the North Sea and the north and east of the British Isles, as well as from the Baltic Sea. MCR haplogroups were also identified in Baltic Sea grey seals, with some being in common with our samples, while others were not. The times of separation between the MCR haplogroups were estimated to be between 84 000 and 20 500 years ago, and differentiation between Baltic Sea and French coast haplotypes was estimated to have occurred approximately 8000 years ago. These data, added to positive expansion signals, suggest that MCR haplogroups correspond to ancestral maternal lineages, isolated in different grey seal refugia during the last ice age and prior to the expansion of the species in the North Atlantic and the separation between the East Atlantic and the Baltic Sea ESUs.

KEY WORDS: Grey seals · Genetic diversity · Marine mammals · Mitochondrial control region · Population divergence time

— Resale or republication not permitted without written consent of the publisher —

INTRODUCTION

Marked intraspecific genetic structure exists in various marine mammal species (Palsbøll et al. 1995, Hoffman et al. 2009, Alfonsi et al. 2012, Fontaine et al. 2014, Louis et al. 2014). This may be caused by historical or present environmental

variation (Fontaine et al. 2010, Jackson et al. 2014, Hobday et al. 2015), food availability, food preference and habitat use (Foote et al. 2011, Louis et al. 2014). Anthropogenic activities also have direct effects on the intraspecific genetic diversity of, for instance, hunted or by-caught marine mammal species (Mendez et al. 2010, Palsbøll et al. 2013,

Ruegg et al. 2013). Fidelity to particular geographic sites used for breeding, feeding, or as migratory routes also shapes population structure. Natal philopatry (defined as fidelity to birthplace) and/or fidelity to feeding sites are well known in different species of actively swimming large marine vertebrates (Palsbøll et al. 1995, Bowen & Karl 2007, Jorgensen et al. 2010, Baker et al. 2013). Often, females tend to be more philopatric, while males can travel long distances for breeding or foraging, thus leading to higher differences between populations in the maternally inherited mitochondrial DNA (mtDNA) when compared to bi-parentally inherited nuclear DNA (Bowen & Karl 2007, Baker et al. 2013). In some species, males may also exhibit site fidelity (Louis et al. 2014). Female philopatry and male-mediated gene flow are often encountered in pinnipeds. Southern elephant seals *Mirounga leonina* (Fabiani et al. 2003), walrus *Odobenus rosmarus* (Andersen et al. 1998) and harbor seals *Phoca vitulina* (Burg et al. 1999) show greater population structure for mtDNA than for nuclear DNA markers.

The ability of long-distance travel has been demonstrated in the grey seal *Halichoerus grypus* (e.g. Vincent et al. 2005), which is widely distributed in the North Atlantic Ocean and in the Baltic Sea (Härkönen et al. 2007, Klimova et al. 2014). Philopatric behavior has also been reported (Pomeroy et al. 2000, 2001). Three geographically isolated evolutionarily significant units (ESU), presenting differences in body size, breeding periods and DNA polymorphisms, are assumed to exist (1) in the northwestern North Atlantic along the Canada and north USA coasts, (2) in the Baltic Sea and (3) in the eastern part of the North Atlantic from Iceland to the European mainland and British Isles coasts (Bonner 1981, Boskovic et al. 1996, Klimova et al. 2014).

Subfossil remains confirm the occurrence of the grey seal 5000 years ago (ya) along the European mainland and, in particular, in the southernmost part of its range (Brittany coast in northwest France, Pailler et al. 2004, Härkönen et al. 2007). The species declined and almost disappeared because of hunting before the second part of the 20th century along the European mainland (Härkönen et al. 2007). Breeding sites reappeared at the end of the 1970s on the Dutch and German coasts and subsequently in northwest France in the Molène and Sept-Iles archipelagos (Duguy & Hussenot 1991). Today, east Atlantic grey seals can mainly be found along the UK coast and in the Wadden Sea. Breeding colonies can be found along the mainland from the Molène archipelago in

the south to the Kola peninsula (Russia) in the north (Vincent et al. 2005, Härkönen et al. 2007).

Previous studies in the Baltic Sea and in neighboring Atlantic waters have highlighted contrasting patterns between nuclear and mitochondrial loci (Allen et al. 1995, Graves et al. 2009, Fietz et al. 2013, Klimova et al. 2014). Both markers suggested genetic exchanges between adjacent colonies in the eastern part of the UK or in the Baltic Sea (Fietz et al. 2013, Klimova et al. 2014). On a larger scale, genetic differentiation has been observed between geographically distant colonies (e.g. the colonies of northwest Scotland and northeast England) with mitochondrial but not with microsatellite markers (Klimova et al. 2014). On the other hand, a larger influence of the habitat type, rather than geographical closeness, has been demonstrated in the genetic diversity of the major histocompatibility complex immune system gene family (Cammen et al. 2011). All these studies supported a major influence of the fidelity to pupping sites in the shaping of grey seal populations.

In northwest France, satellite-tracking studies have demonstrated grey seal movements from the Iroise Sea to the British colonies, and several authors have therefore suggested the existence of a meta-population at the scale of an area extending from the west coast of France to the southwest British Isles (Vincent et al. 2002, 2005, Gerondeau et al. 2007, Härkönen et al. 2007).

Here, we genetically analyzed a sample of 222 individuals collected by the seal care center of Océanopolis (Brest, France) and by the French Stranding Network (Pelagis, UMS 3462, CNRS, Université de la Rochelle, France) since the 2000s (see Fig. 1). We performed the first genetic study of the grey seal around the coast of Brittany in northwest France, with a special emphasis on maternally inherited mtDNA. We then placed this French population in a wider geographic context, including previously published data from other European and Baltic colonies (Graves et al. 2009, Fietz et al. 2013, Klimova et al. 2014, van Bleijswijk et al. 2014).

MATERIALS AND METHODS

Specimen and sample collections

This study used samples from 222 grey seals. Of these, blood samples were obtained from a total of 168 juvenile grey seals stranded alive along French coasts between 2002 and 2012, which were all taken

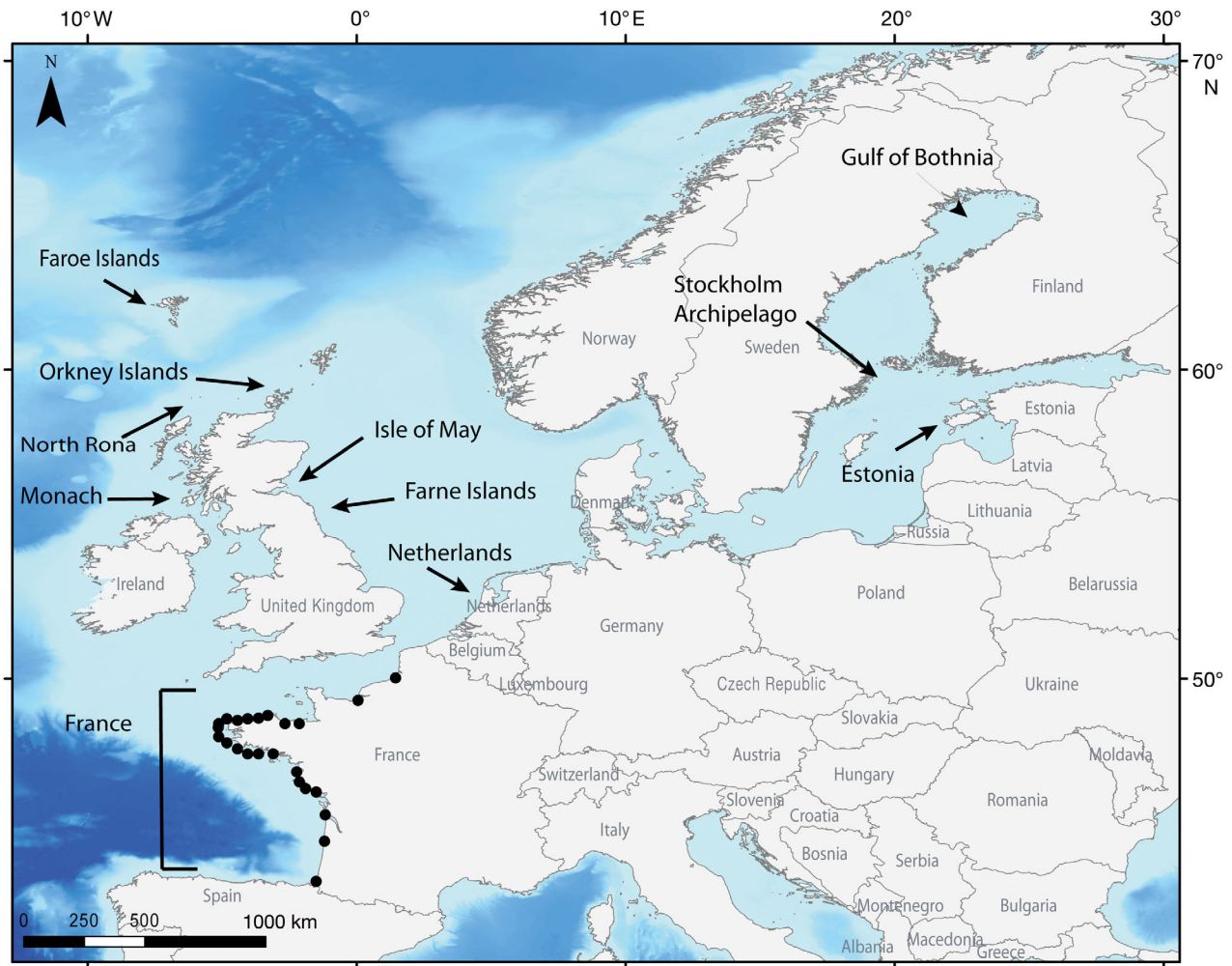


Fig. 1. Location of sampled stranded grey seals on the French coast (black dots) and other European colonies (arrows) compared in this study

in and nursed by the Laboratoire d'Etude des Mammifères Marins (LEMM) at a care center localized at Océanopolis, Brest, France (Fig. 1; Table S1 in the Supplement at www.int-res.com/articles/suppl/m566p217_supp.pdf). For each grey seal, blood samples were collected for veterinary use and subsamples were kept at -20°C for later genetic analyses (Table S1). Samples were named 'Hgc' followed by a number corresponding to a care center identification number (Hgc 227 to 460 in ascending chronological order but not necessarily successive). Additionally, 54 dead stranded grey seals (juveniles and adults) were biopsied in the framework of the French Stranding Network (described in Jung et al. 2009), and skin and muscle samples were used for this study (Table S1). These samples were called 'Hgs' followed by a number.

DNA extraction, PCR amplification and sequencing of MCRs

Total DNA was extracted from blood and tissue samples using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. Purified DNA was eluted in Tris HCl-EDTA buffer (pH 7.5) and stored at -20°C . The quality of the extracted DNA was checked by agarose gel electrophoresis, and DNA concentrations were determined using a NanoDrop 100 spectrophotometer (Thermo Scientific). Pinniped-specific primers LMCRRHgem and HMCRRHgem were used to amplify a 692 bp fragment of the mitochondrial control region (MCR) using the conditions described in Alfonsi et al. (2013). PCR products were purified using the MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) and sequenced (GATC Biotech) in the pres-

Table 1. GenBank references of grey seal MCR sequences used for comparisons at the north European scale by geographic localization (Dataset_2). For the east Atlantic and Baltic Sea, 'colonies' are defined according to Klimova et al. (2014). All Orkney Islands colonies (13; Klimova et al. 2014) were grouped as 1 colony

Colonies or region	No. of haplotypes	Length (bp)	GenBank accession nos.	Total no. of specimens	No. of haplotypes (l = 317 bp)	References
French Atlantic coasts						
Northwest France (Brittany)	34	493	KT247900 to –933	222	33	This study
North Sea						
Netherlands	14	374	KM053398, –399, –402, KM066993, –995, –998, –003, –012, –017, –023, –027, –059, –067, –081	98	13	van Bleijswijk et al. (2014)
Northeast Atlantic						
Monach	134	350	KJ769328 to –461	28	15	Klimova et al. (2014)
North Rona				48	15	
Orkney Islands				1245	104	
Isle of May				54	11	
Farne Islands				49	15	
Faroe Islands				31	11	
Baltic Sea						
Estonia	38	435	KF483184 to –221	36	21	Fietz et al. (2013), Klimova et al. (2014)
Stockholm Archipelago				28	14	
Gulf of Bothnia				39	24	

ence of one of the PCR primers. Each haplotype was sequenced at least once in both directions. The GenBank accession numbers are from KT247900 to KT247933 (Table S2 in the Supplement).

Sequence analyses

Sequences were manually edited and aligned with Geneious Pro v.7.1 (Biomatters; Kearse et al. 2012) to produce Dataset_1. To estimate saturation of the MCR, comparison of uncorrected pairwise genetic distances and model-corrected genetic distance (Tamura-Nei [TrN]; see 'Bayesian analysis of population divergence' for model choice) was used as proposed by Philippe et al. (1994) on our total MCR dataset.

All sequences were compared to those available in GenBank using BLAST (Altschul et al. 1997). A total of 186 haplotypes of 350–435 bp in length (Table 1) from grey seals sampled from 10 different colonies of the northeast Atlantic (Monach Islands, North Rona, Orkney Islands, Isle of May, Farne Islands and Faroe Islands, described in Klimova et al. 2014), North Sea (Netherlands; van Bleijswijk et al. 2014) and the Baltic Sea (Estonia, Stockholm Archipelago and Gulf of Bothnia; Fietz et al. 2013) were discernible (Fig. 1). This Dataset_2 had a 317 bp common region and was composed of 276 haplotypes (Table 1). As Klimova et

al. (2014) made available the sequence data per specimen, we were able to calculate genetic differentiation indices.

We also constructed Dataset_3 by grouping our sequences plus those from the Baltic Sea. All these haplotypes overlapped on a 399 bp fragment.

Data analyses and mitochondrial haplogroup characterization

For each dataset, the number of haplotypes (Nh), number of polymorphic sites (k), haplotype diversity (*H*) and nucleotide diversity (π) were determined using DnaSP 5.10 software (Librado & Rozas 2009). This program was also used to estimate Fu's *F_s* (Fu 1996) and Tajima's *D* (Tajima 1989) to assess changes in population sizes such as expansions or bottlenecks. To analyze and illustrate the relationships among haplotypes, median-joining networks were constructed with the number of mutations as distances using Network 4.6 software (www.fluxus-engineering.com).

For Dataset_1 (French samples), mitochondrial haplogroups were first detected on the haplotype network and confirmed using (1) a nonmetric multi-dimensional scaling (nMDS) approach to graphically represent genetic distances among haplotypes, (2) a hierarchical cluster analysis, performed with the free

open-source R v.3.1 (R Core Team 2014), using the Analyses of Phylogenetics and Evolution (APE) and Modern Applied Statistics with Sand (MASS) libraries for distance matrix and nMDS, respectively, and (3) as clades on BEAST trees (see next subsection). For Dataset_3, haplogroups were characterized on the BEAST tree (see next subsection) and on the haplotype network. The haplogroups were also identified on the network constructed with all the available European data (Dataset_2; see Fig. 2).

Possible correlations between mtDNA haplogroups and biological (sex and age of animals), chronological (year of stranding) or geographical (place of stranding) parameters were tested using a χ^2 test.

Genetic differentiation among groups and among colonies was tested using a χ^2 test based on haplotype frequencies (Hudson et al. 1992) and the nearest-neighbor statistic (*Snn*) index based on a sequence distance matrix (Hudson 2000). Random permutations ($n = 1000$) were used to assess the statistical significance of *Snn* (Hudson 2000).

Bayesian analysis of population divergence

Bayesian estimation of divergence time between mtDNA haplogroups and between French and Baltic Sea MCR haplotypes was done using BEAST v.2.1.3 (Drummond & Bouckaert 2015). The relevant mutation rate for grey seals varies depending on the authors. Boskovic et al. (1996) used a standard rate of mtDNA evolution, probably not appropriate for grey seals, and which can lead to an overestimation of time. Klimova et al. (2014) used a mutation rate of 2.75×10^{-7} substitutions per site per year, evaluated for the MCR of the Steller sea lion (Phillips et al. 2009), and determined times of divergence in better accordance with nuclear DNA-based studies (Graves et al. 2009). No other improved evaluation of the mutation rate, specific to the grey seal, is presently available. A strict clock with a rate of 2.75×10^{-7} substitutions per site per year was therefore imposed.

Akaike's information criterion (AIC) (Akaike 1973), implemented in Modeltest v.3.7 (Posada & Crandall 1998), was used to determine the evolutionary model that best fit the data (TrN + I and TrN + I + G, where G is the shape parameter of the gamma distribution and I is the proportion of invariable sites). Three coalescent models for 3 priors were tested (constant size, expansion and logistic growth). Analyses were performed with 10 million generations, sampling every 1000 generations with 10% discarded as burn-in. Posterior parameter distributions were examined

using Tracer v.1.6 to ensure that effective sample size (ESS) values were above 200 for all of them. Bayes factors (BFs) were then calculated in Tracer to ascertain the best-fit population model.

RESULTS

MCR polymorphisms and haplogroup characterization in the French sample

Analysis of the 222 samples (168 Hgc and 54 Hgs) allowed the determination of 222 MCR sequences of 493 bp each. No significant genetic differences were observed between Hgc and Hgs ($\chi^2 = 32.01$, $df = 33$, $p = 0.52$; *Snn* = 0.64, $p = 0.64$). Consequently, all sequences were grouped into Dataset_1 for further analyses. No saturation of the MCR was observed according to the relationships between uncorrected and model-corrected (TrN) genetic distance (slope = 0.97, data not shown). Haplotype and nucleotide diversities were calculated (Table 2), and 34 haplotypes were observed, as defined by 37 polymorphic sites (Table S2 in the Supplement at www.int-res.com/articles/suppl/m566p217_supp.pdf). Values of Tajima's *D* and Fu's *Fs* were both negative, and only Fu's *Fs* was significant ($D = -0.95$, $p > 0.10$; $Fs = -11.09$, $p = 0.008$).

The haplotype network captured 4 haplogroups, each of which was separated by at least by 3 mutations, named haplogroups F1, F2, F3 and F4 (Fig. S1 in the Supplement). The nMDS analysis (Fig. S2), a hierarchical cluster analysis (data not shown), and the phylogenetic analysis performed using BEAST (see 'Mitochondrial haplogroup divergence time' below), all confirmed the haplogroup separation. No significant correlation was observed between haplogroup members and the age or sex of the animals, nor with the year or the place of stranding (all χ^2 tests with $p > 0.05$).

Table 2. mtDNA diversity statistics from grey seals stranded alive (juvenile, Hgc) and dead (juveniles and adults, Hgs) in northwest France. n: sample size, l: sequence length (bp), k: no. of polymorphic sites, Nh: no. of haplotypes, H: haplotype diversity, π : nucleotide diversity

Samples	n	l	k	Nh	H	π
Hgc	168	493	35	31	0.92	0.0081
Hgs	54	493	24	16	0.91	0.0076
Dataset_1 (Hgc and Hgs)	222	493	37	34	0.92	0.0080

Table 3. Pairwise χ^2 and nearest-neighbor statistic (*Snn*) values estimated from MCR polymorphisms among grey seals sampled off the northwest coast of France and other European colonies. All tests were highly significant (France to Monach: $p < 0.05$, France to all other locations: $p < 0.01$)

Statistic	Genetic differentiation between France and:									
	Nether-lands	Monach	North Rona	Orkney Islands	Isle of May	Farne Islands	Faroe Islands	Gulf of Bothania	Estonia	Stockholm Archipelago
χ^2	116.22	54.61	93.53	323.22	82.81	79.94	87.5	245.95	249.86	230.77
<i>Snn</i>	0.7	0.82	0.78	0.78	0.76	0.76	0.84	0.98	0.98	0.97

Larger geographic-scale analysis

The MCR sequences determined during this study (no. of specimens = 222, $N_h = 34$) and those from north European and Baltic Sea grey seals (no. of specimens = 1656, $N_h = 186$; Graves et al. 2009, Fietz et al. 2013, Klimova et al. 2014, van Bleijswijk et al. 2014; Table 1) overlapped on a 317 bp fragment. The truncated alignment of 317 bp involved the loss of 1 MCR_Fra haplotype, 2 haplotypes from the Isle of May and 3 haplotypes from the Orkney Islands colonies. This Dataset_2 was composed of 1878 sequences and revealed 155 different haplotypes defined by 85 polymorphic sites, and had large haplotype and nucleotide diversities ($H = 0.93$, $\pi = 0.012$). Values of Tajima's D and Fu's F_s were both negative and highly significant ($D = -1.77$, $p < 0.01$; $F_s = -193.4$, $p < 0.001$). Pairwise comparisons of all French MCR sequences with those of other areas provided strongly significant *Snn* values among all pairs (Table 3). The highest *Snn* values were observed between France and the Baltic Sea. The χ^2 tests also revealed significant differences (Table 3). A lower but significant genetic difference was observed between France and the Monach Isles (*Snn* = 0.82, $\chi^2 = 54.61$, $p < 0.05$ for both tests).

The network constructed with Dataset_2, grouping all data available from the Baltic Sea and the north-east Atlantic, allowed the identification of 4 different major haplogroups (named HA, HB, HC and HD), including 6 sub-haplogroups (HA1, HA2, HB1, HB2, HC1, HC2; Fig. 2). The central part of the network was composed of the bulk of the haplotypes from all the regions (Fig. 2). All major haplotypes were shared among several regions, and only 1 haplotype was shared among all regions. Many private haplotypes were observed in the Baltic Sea colonies ($n = 34$), in the Orkney Islands ($n = 77$), and in the French region ($n = 10$). All were minor haplotypes, shared by only a few individuals, except one from France found in 20 samples.

Mitochondrial haplogroup divergence time

Among the 3 coalescent models tested, BF supported the constant size model ($\log BF > 1.3$). In the French sample, haplogroups F2, F3 and F4 were supported by posterior probabilities of 0.99 and 1 (Fig. S3 in the Supplement). Haplogroup F4 was estimated to be the first to diverge, at approximately 43 100 ya (see Table S3 in the Supplement for all 95 % posterior interval [PI] values). The divergence time between haplogroups F1 and F2 was estimated to have occurred approximately 26 100 ya, while haplogroup F3 was estimated to have diverged approximately 19 500 ya from haplogroup F1 (Table S3).

The MCR haplotypes determined during this study ($n = 34$) and the ones deduced from Baltic Sea grey seals ($n = 38$; Graves et al. 2009, Fietz et al. 2013) overlapped on a 399 bp fragment. This combined dataset (Dataset_3) of $n = 72$ haplotypes presented a large haplotype diversity ($H = 0.99$), defined by 47 polymorphic sites, with only 4 shared haplotypes between the 2 locales. Nucleotide diversity was high ($\pi = 0.016$), superior to the one of the French-only sample (Table 2). Six haplogroups, observed on the global network as haplogroups or sub-haplogroups (Figs. 2 & 3), were discernible in this new haplotype network (Fig. S4). The majority of the groups included haplotypes from both geographic regions (e.g. HC, HA2, HB1). In contrast, 2 haplogroups contained only Baltic haplotypes (HB2 and HA1), whereas 1 haplogroup was formed only by French haplotypes (HC2).

The haplotypes of all 6 groups and subgroups identified on the network were also clustered on the BEAST tree (Fig. 3). The French haplotypes belonging to haplogroups F2, F3 and F4 were clearly grouped in, respectively, haplogroups HC, HB and HA (Fig. 3).

Haplogroup HC was estimated as being the first to diverge, at approximately 84 000 ya, followed by haplogroups HA and HB at approximately 60 000 ya (see Table S3 for 95 % PI values). The sub-haplogroups were individualized approximately between 44 700 and 20 500 ya (Table S3).

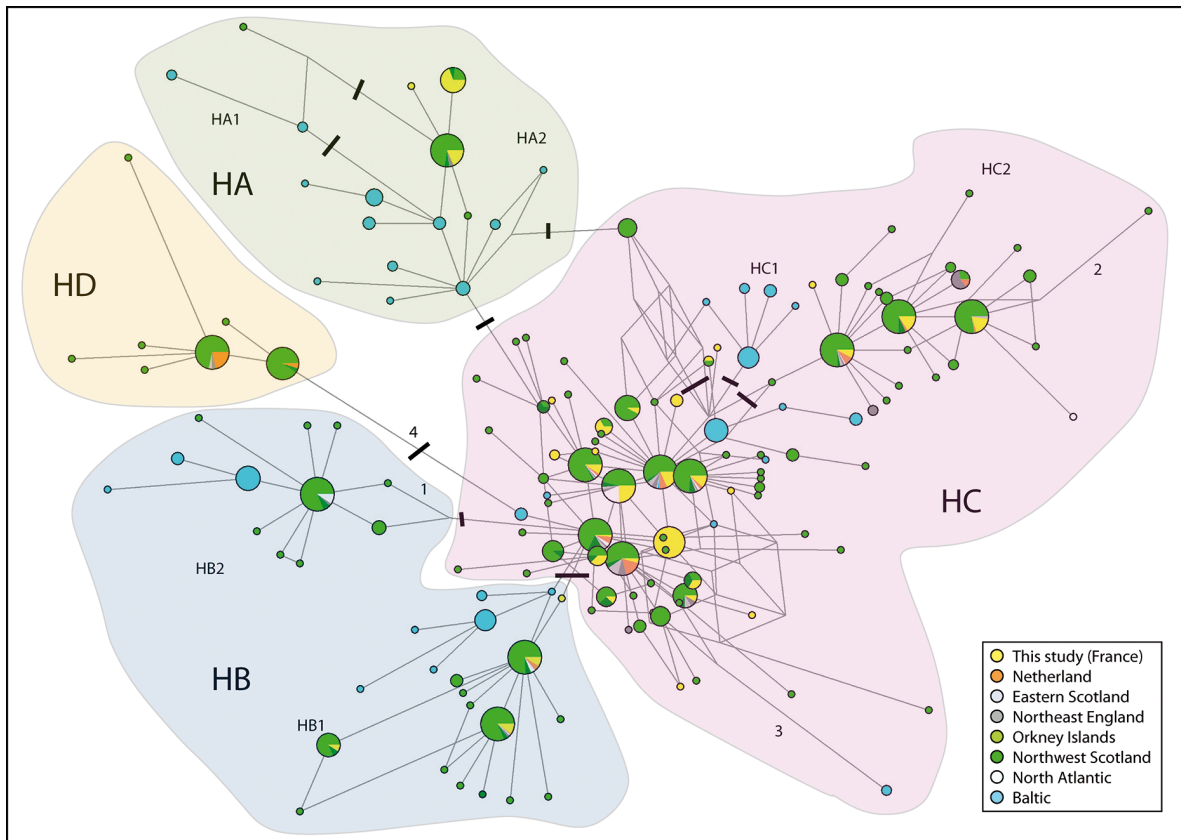


Fig. 2. Haplotype network representation of MCR polymorphisms of grey seal specimens from north Europe and the Baltic Sea (this study, Klimova et al. 2014, van Bleijswijk et al. 2014). All available data (1878 DNA sequences defining 155 haplotypes; Table 1) were used. Numbers above a link indicate number of mutations between haplotypes. The 4 colored areas highlight the 4 haplogroups (HA, HB, HC, HD), and black bars crossing links mark borders between groups and/or subgroups. Colors of the haplotypes represent the geographic regions as defined in Klimova et al. (2014)

In groups HA2 and HB1, groups formed by haplotypes from France have estimated divergence times from the Baltic haplotypes of, respectively, 8500 and 8000 ya (Fig. 3; Table S3).

DISCUSSION

With the exception of newborn whitecoats, grey seals can travel long distances (Stobo et al. 1990, Vincent et al. 2005), and no difference can be made *a priori* between the origin of adults and that of juveniles. Our samples can therefore be considered as representative of a geographic area larger than just the French Atlantic coast. Haplotype and nucleotide diversity were high in our samples, and a genetic structure of 4 MCR haplogroups was discernible. No correlations among these haplogroups and biological, temporal or geographical parameters (age and sex of animals, date and place of stranding) were found, raising questions about their origin.

Comparisons at the European scale

Genetic differentiation indices all highlighted marked differences between French grey seals and those from all other locations. The largest differences were observed between the French and Baltic populations, in agreement with the existence of different ESUs, one in the northeast Atlantic, including the French samples, and another in the Baltic Sea. Other studies also emphasized genetic differentiation, according to distance between colonies, using mitochondrial and/or microsatellite markers (Allen et al. 1995, Boskovic et al. 1996, Graves et al. 2009, Klimova et al. 2014). No DNA sequence data is currently available for grey seals sampled in the south of England, in Ireland or in Wales. Studies including grey seals from these locations will help estimate the actual level of differentiation, and determine whether the British grey seal metapopulation (Gaggiotti et al. 2002) could extend up to the Brittany coasts in France, as hypothesized by Gerondeau et

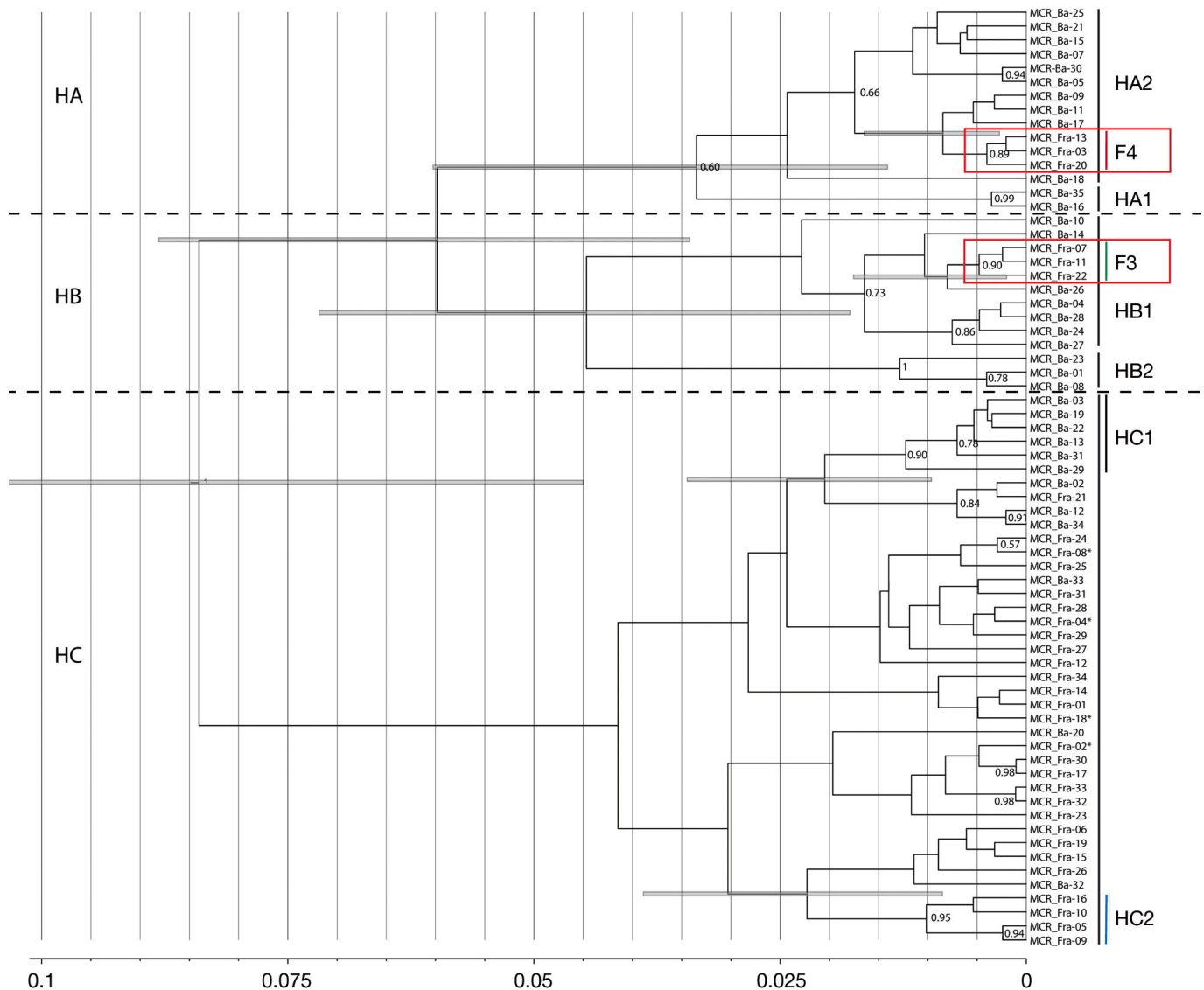


Fig. 3. Bayesian divergence and radiation tree of grey seals from French (this study) and Baltic (Graves et al. 2009, Fietz et al. 2013) coasts based on MCR polymorphisms. Baltic haplotypes were named according to GenBank information. *Haplotypes shared between French and Baltic populations. Posterior probabilities are provided above branches and clades. see Table S3 in the Supplement at www.int-res.com/articles/suppl/m566p217_supp.pdf for divergence time estimates. Grey lines show 95% posterior intervals of key divergence times. The scale axis is in millions of years before the present. Green and red bars show groups formed by French haplotypes F3 and F4 (red boxes) in, respectively, haplogroups HB1 and HA2 and black and blue bars HC1 and HC2, respectively

al. (2007). However, the 10 private haplotypes found in the French samples, as well as the Hudson *Snn* calculation (Hudson 2000), yielded a somewhat high level of genetic differentiation among our samples and those of the north and east British colonies, a result which does not support this hypothesis. Gene flow occurring at a lower geographical scale, among colonies located along the Brittany coast in France, the south of England and Wales, may appear more likely.

The global European network highlights the existence of different haplogroups, some of which are also found in the French samples. It is notable that Baltic haplotypes are distributed in all the haplogroups (with the exception of the sub-haplogroup HC2), suggesting an ancestral origin of our haplogroups older than the separation between the 2 ESUs (between the Baltic Sea and the east Atlantic).

We estimated that the divergence between the Baltic Sea and French coast populations occurred

approximately 8500 ya, a value very close to the estimations made by Klimova et al. (2014) using a different dataset and a different approach (Baltic and northeast Atlantic divergence time estimated between 7000 and 30 000 ya for Klimova et al. 2014, close to the lower estimate of Graves et al. 2009). Klimova et al. (2014) noted that this divergence time could correspond to a transient connection of the Baltic and the North Seas between 10 000 and 9000 ya (Sommer & Benecke 2003). The differences in haplogroup distribution between our samples and those of the Baltic Sea can be explained either by the absence of grey seals of a specific lineage during the colonization of a particular place, or by a more recent loss of the lineage, most likely during the active grey seal hunting periods.

MCR haplogroups and ancestral history in the east Atlantic and the Baltic Sea

Boehme et al. (2012) compared sea surface temperature and bathymetry during the last glacial period to present grey seal habitat preference, estimated from telemetry data. They hypothesized that fewer areas were suitable for the grey seal in the North Atlantic approximately 20 000 ya than at present. A strongly reduced number of grey seals would have occupied refugia, along the Bay of Biscay and Iberian coasts in the east Atlantic, near the Flemish Cap in the west Atlantic, and perhaps in the Mediterranean Sea (Boehme et al. 2012). We hypothesize that these refugia, separated from each other by large areas of unsuitable habitats, have hosted disconnected grey seal populations having no contact or gene flow with each other, and thus becoming genetically distinct.

At the end of the last glacial period, around 12 000 ya, large parts of the coasts of the northwest and northeast Atlantic again became appropriate for grey seals, thus leading to a clear expansion of the species from the different refugia. Such a scenario can explain the present situation, where we detected ancestral lineages older than the geographic separation between the present ESUs. These lineages could well be representative of the different last glacial period refugia.

The positive expansion signals found by Klimova et al. (2014), and also in our study (all the Tajima's D and Fu's F_s that we determined are negative, and significant for Fu's F_s , a more sensitive index to detect recent expansion), strengthen the hypothesis of a grey seal expansion in the North Atlantic. This is in agreement with the fact that other pinniped species

have shown positive expansion signals approximately 11 000 ya, at the end of the last glacial age (Westlake & O'Corry-Crowe 2002, Coltman et al. 2007, Dickerson et al. 2010).

Impacts of our results in terms of conservation

For a given species, conservation priorities are often defined at the level of the whole species. Nevertheless, the preservation of intraspecific diversity may be of primary importance (e.g. Baker et al. 2013, Mee et al. 2015). The demographic and genetic characteristics of the 3 grey seal ESUs vary. The interactions with anthropogenic activities and the local protection status contrast greatly between the east and west North Atlantic. Our study focused on a part of the northeast Atlantic grey seal ESU, and our results reinforce previous knowledge of the genetic heterogeneity of this ESU (Allen et al. 1995, Cammen et al. 2011, Klimova et al. 2014). They also highlight the requirement of an increased knowledge at the metapopulation level. Here, we confirmed that the grey seal is clearly a species undergoing a range expansion in the northeast Atlantic since its protection and the end of hunting. But direct and indirect interactions of the seals with fisheries and other threats of anthropogenic origin can have negative impacts (Cronin 2011). The mtDNA groups that we detected during our study should be taken into account in terms of conservation of the grey seal in northwest France and southwest England, as they represent historical maternal lineages whose possible differential presence between British colonies should be further examined.

The Molène archipelago represents the southernmost settlement of the grey seal in the east Atlantic. A particular grey seal diet in this geographic area has been detected by 2 independent studies (Ridoux et al. 2007, Méheust et al. 2015), but whether it reflects opportunistic behavior linked to difference in prey availability or to population specificity has yet to be determined. Further studies to characterize the Molène archipelago grey seals from a genetic point of view, and to determine their possible specificity in a larger metapopulation, are thus warranted.

Acknowledgements. The samples used in this study were collected by the French Stranding Network and by the seal care center of Oceanopolis (Brest). We therefore thank the UMS Pelagis (Université de la Rochelle, CNRS) and all the field correspondents. This work is part of a collaboration with The Parc Naturel Marin d'Iroise and was supported by

the Conseil Régional de Bretagne in the frame of the INPEC-MAM work project. We also thank Anais Rey and Maeva Thomas, who participated in some experiments during their internships at BioGeMME, and Julie Tourolle (Ifremer), who helped to draw the general map of Fig. 1. Special thanks go to Chantal Hily-Maze. We have had exciting and helpful discussions in the past couple of years about grey seal genetics and would especially like to thank Joe Hoffman (Bielefeld, Germany), Morten Tange Olsen (Copenhagen, Denmark), Cecile Vincent and Benoit Simon Bouhé (Chizé, France), and Jacky Karpouzopoulos (Alembon, France) for useful discussions and advice. We warmly thank Prof. Michael Dubow (I2BC, ORSAY, FRANCE) for his careful English editing of the manuscript.

LITERATURE CITED

- Akaike H (1973) Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov BN, Csaki F (eds) 2nd Int Symp Inf Theory. Akademiai Kiado, Budapest, p 267–281
- Alfonsi E, Hassani S, Carpentier FG, Le Clec'h JY and others (2012) A European melting pot of harbour porpoise in the French Atlantic coasts inferred from mitochondrial and nuclear data. PLOS ONE 7:e44425
- Alfonsi E, Meheust E, Fuchs S, Carpentier FG and others (2013) The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast. ZooKeys 365:5–24
- Allen PJ, Amos W, Pomeroy PP, Twiss SD (1995) Microsatellite variation in grey seals (*Halichoerus grypus*) shows evidence of genetic differentiation between two British breeding colonies. Mol Ecol 4:653–662
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389–3402
- Andersen LW, Born EW, Gjertz I, Wiig O, Holm LE, Bendixen C (1998) Population structure and gene flow of the Atlantic walrus (*Odobenus rosmarus rosmarus*) in the eastern Atlantic Arctic based on mitochondrial DNA and microsatellite variation. Mol Ecol 7:1323–1336
- Baker CS, Steel D, Calambokidis J, Falcone E and others (2013) Strong maternal fidelity and natal philopatry shape genetic structure in North Pacific humpback whales. Mar Ecol Prog Ser 494:291–306
- Boehme L, Thompson D, Fedak M, Bowen D, Hammill MO, Stenson GB (2012) How many seals were there? The global shelf loss during the last glacial maximum and its effect on the size and distribution of grey seal populations. PLOS ONE 7:e53000
- Bonner WN (1981) Grey seal, *Halichoerus grypus*. In: Ridgway SH, Harrison RJ (eds) Handbook of marine mammals. Academic Press, London, p 111–144
- Boskovic R, Kovacs KM, Hammill MO, White BN (1996) Geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in grey seals (*Halichoerus grypus*). Can J Zool 74:1787–1796
- Bowen BW, Karl SA (2007) Population genetics and phylogeography of sea turtles. Mol Ecol 16:4886–4907
- Burg T, Trites AW, Smith MJ (1999) Mitochondrial and microsatellite DNA analyses of harbour seal population structure in the northeast Pacific Ocean. Can J Zool 77:930–943
- Cammen K, Hoffman J, Knapp LA, Harwood J, Amos W (2011) Geographic variation of the major histocompatibility complex in Eastern Atlantic grey seals (*Halichoerus grypus*). Mol Ecol 20:740–752
- Coltman DW, Stenson G, Hammill MO, Haug T, Davis CS, Fulton TL (2007) Panmictic population structure in the hooded seal (*Cystophora cristata*). Mol Ecol 16:1639–1648
- Cronin MA (2011) The conservation of seals in Irish waters: how research informs policy. Mar Policy 35:748–755
- Dickerson BR, Ream RR, Vignieri SN, Bentzen P (2010) Population structure as revealed by mtDNA and microsatellites in northern fur seals, *Callorhinus ursinus*, throughout their range. PLOS ONE 5:e10671
- Drummond AJ, Bouckaert RR (2015) Bayesian evolutionary analysis with BEAST 2. Cambridge University Press, Cambridge
- Duguy R, Hussenot E (1991) Le statut du phoque gris (*Halichoerus grypus*) sur les côtes de France. ICES/CIEM CM1991/N:8. ICES, Copenhagen
- Fabiani A, Hoelzel AR, Galimberti F, Muelbert MMC (2003) Long-range paternal gene flow in the southern elephant seal. Science 299:676
- Fietz K, Graves JA, Olsen MT (2013) Control control control: a reassessment and comparison of GenBank and chromatogram mtDNA sequence variation in Baltic grey seals (*Halichoerus grypus*). PLOS ONE 8:e72853
- Fontaine MC, Tolley KA, Michaux JR, Birkun A Jr and others (2010) Genetic and historic evidence for climate-driven population fragmentation in a top cetacean predator: the harbour porpoises in European water. Proc R Soc B 277:2829–2837
- Fontaine MC, Roland K, Calves I, Austerlitz F and others (2014) Postglacial climate changes and rise of three ecotypes of harbour porpoises, *Phocoena phocoena*, in western Palearctic waters. Mol Ecol 23:3306–3321
- Foote AD, Vilstrup JT, De Stephanis R, Verborgh P and others (2011) Genetic differentiation among North Atlantic killer whale populations. Mol Ecol 20:629–641
- Fu YX (1996) New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. Genetics 143:557–570
- Gaggiotti OE, Jones F, Lee WM, Amos W, Harwood J, Nichols RA (2002) Patterns of colonization in a metapopulation of grey seals. Nature 416:424–427
- Gerondeau M, Barbraud C, Ridoux V, Vincent C (2007) Abundance estimate and seasonal patterns of grey seal (*Halichoerus grypus*) occurrence in Brittany, France, as assessed by photo-identification and capture-mark-recapture. J Mar Biol Assoc UK 87:365–372
- Graves J, Helyar A, Biuw M, Jüssi M, Jüssi I, Karlsson O (2009) Microsatellite and mtDNA analysis of the population structure of grey seals (*Halichoerus grypus*) from three breeding areas in the Baltic Sea. Conserv Genet 10:59–68
- Härkönen TJ, Brasseur S, Teilmann J, Vincent C, Dietz R, Abt K, Reijnders P (2007) Status of grey seals along mainland Europe from the Southwestern Baltic to France. NAMMCO Sci Publ 6:57–68
- Hobday AJ, Arrizabalaga H, Evans K, Nicol S, Young JW, Weng KC (2015) Impacts of climate change on marine top predators: advances and future challenges. Deep-Sea Res II 113:1–8
- Hoffman JI, Dasmahapatra KK, Amos W, Phillips CD, Gelatt TS, Bickham JW (2009) Contrasting patterns of genetic diversity at three different genetic markers in a marine mammal metapopulation. Mol Ecol 18:2961–2978

- Hudson RR (2000) A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* 155:2011–2014
- Hudson RR, Boos DD, Kaplan NL (1992) A statistical test for detecting geographic subdivision. *Mol Biol Evol* 9: 138–151
- Jackson JA, Steel DJ, Beerli P, Congdon BC and others (2014) Global diversity and oceanic divergence of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *Proc R Soc B* 281:20133222
- Jorgensen SJ, Reeb CA, Chapple TK, Anderson S and others (2010) Philopatry and migration of Pacific white sharks. *Proc R Soc B* 277:679–688
- Jung JL, Stéphan E, Louis M, Alfonsi E, Liret C, Carpentier FG, Hassani S (2009) Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in north-western France: aerial survey, opportunistic sightings and strandings monitoring. *J Mar Biol Assoc UK* 89:1045–1050
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S and others (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649
- Klimova A, Phillips CD, Fietz K, Olsen MT, Harwood J, Amos W, Hoffman J (2014) Global population structure and demographic history of the grey seal. *Mol Ecol* 23: 3999–4017
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452
- Louis M, Viricel A, Lucas T, Peltier H and others (2014) Habitat-driven population structure of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the North-East Atlantic. *Mol Ecol* 23:857–874
- Mee JA, Bernatchez L, Reist JD, Rogers SM, Taylor EB (2015) Identifying designatable units for intraspecific conservation prioritization: a hierarchical approach applied to the lake whitefish species complex (*Coregonus* spp.). *Evol Appl* 8:423–441
- Méheust E, Alfonsi E, Le Méné P, Hassani S, Jung JL (2015) DNA barcoding for the identification of soft remains of prey in the stomach contents of grey seals (*Halichoerus grypus*) and harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *Mar Biol Res* 11:385–395
- Mendez M, Rosenbaum HC, Wells RS, Stamper A, Bordino P (2010) Genetic evidence highlights potential impacts of by-catch to cetaceans. *PLOS ONE* 5:e15550
- Pailler Y, Sparfel Y, Tresset A, Dupont C and others (2004) Fouille d'un dépôt du Néolithique final à Beg ar Loued (Ile Molène, Finistère): premiers résultats (Excavation of a Neolithic deposit at Beg ar Loued, Island of Molène, Brittany, France: first results). *Bull Soc Préhist Fr* 101: 881–886
- Palsbøll PJ, Clapham PJ, Mattila DK, Larsen F and others (1995) Distribution of mtDNA haplotypes in North Atlantic humpback whales: the influence of behaviour on population structure. *Mar Ecol Prog Ser* 116:1–10
- Palsbøll PJ, Zachariah Peery M, Olsen MT, Beissinger SR, Berube M (2013) Inferring recent historic abundance from current genetic diversity. *Mol Ecol* 22:22–40
- Philippe H, Sörhannus U, Baroin A, Perasso R, Gasse F, Adoutte A (1994) Comparison of molecular and paleontological data in diatoms suggests a major gap in the fossil record. *J Evol Biol* 7:247–265
- Phillips CD, Trujillo RG, Gelatt TS, Smolen MJ and others (2009) Assessing substitution patterns, rates and homoplasy at HVRI of Steller sea lions, *Eumetopias jubatus*. *Mol Ecol* 18:3379–3393
- Pomeroy PP, Twiss SD, Redman P (2000) Philopatry, site fidelity and local kin associations within grey seal breeding colonies. *Ethology* 106:899–919
- Pomeroy PP, Wilmer JW, Amos W, Twiss SD (2001) Reproductive performance links to fine-scale spatial patterns of female grey seal relatedness. *Proc R Soc B* 268: 711–717
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817–818
- R Core Team (2014) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
- Ridoux V, Spitz J, Vincent C, Walton MJ (2007) Grey seal diet at the southern limit of its European distribution: combining dietary analyses and fatty acid profiles. *J Mar Biol Assoc UK* 87:255–264
- Ruegg K, Rosenbaum H, Anderson E, Engel M, Rothschild A, Baker CS, Palumbi S (2013) Long-term population size of the North Atlantic humpback whale within the context of worldwide population structure. *Conserv Genet* 14: 103–114
- Sommer R, Benecke N (2003) Post-glacial history of the European seal fauna on the basis of sub-fossil records. *Beitr Archäozool Prähist Anthropol* 6:16–28
- Stobo WT, Beck B, Horne JK (1990) Seasonal movements of grey seals (*Halichoerus grypus*) in the northwest Atlantic. In: Bowen WD (ed) Population biology of sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) in relation to its intermediate and seal hosts. *Can Bull Fish Aquat Sci* 222:199–213
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595
- van Bleijswijk J, Begeman L, Witte H, IJsseldijk L, Brasseur S, Grone A, Leopold M (2014) Detection of grey seal *Halichoerus grypus* DNA in attack wounds on stranded harbour porpoises *Phocoena phocoena*. *Mar Ecol Prog Ser* 513:277–281
- Vincent C, Ridoux V, Fedak MA, Hassani S (2002) Mark-recapture and satellite tracking of rehabilitated juvenile grey seals (*Halichoerus grypus*): dispersal and potential effect on wild populations. *Aquat Mamm* 28:121–130
- Vincent C, Fedak MA, McConnell BJ, Meynier L, Saint-Jean C, Ridoux V (2005) Status and conservation of the grey seal, *Halichoerus grypus*, in France. *Biol Conserv* 126: 62–73
- Westlake RL, O'Corry-Crowe GM (2002) Macrogeographic structure and patterns of genetic diversity in harbor seals (*Phoca vitulina*) from Alaska to Japan. *J Mammal* 83: 1111–1126

**DNA barcoding for the identification of soft remains of prey in the stomach
contents of grey seals (*Halichoerus grypus*) and harbour porpoises
(*Phocoena phocoena*)**

Méheust E, Alfonsi E, Le Méné P, Hassani S & Jung J-L*

Marine Biology Research

11, 385-395

2015

* corresponding author



ORIGINAL ARTICLE

DNA barcoding for the identification of soft remains of prey in the stomach contents of grey seals (*Halichoerus grypus*) and harbour porpoises (*Phocoena phocoena*)

ELÉONORE MÉHEUST^{1,2}, ERIC ALFONSI^{1,2}, PATRICK LE MÉNEC², SAMI HASSANI² & JEAN-LUC JUNG^{1*}

¹Laboratoire BioGeMME, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, and ²Laboratoire d'Etude des Mammifères Marins, Océanopolis, Brest, France

Abstract

In recent decades, grey seals (*Halichoerus grypus*) and harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) have become more numerous along the coasts of Brittany in northwestern France. Their interactions with fisheries are of increasing concern and diet analyses are becoming a requirement to determine the actual overlap between species targeted by fisheries and marine mammal prey. However, as only a few stranded or by-caught animals are available to investigate the diet of these top predators, it is necessary to optimize the results obtained from each animal sampled by increasing the rate of prey species determination in stomach contents. We used a combined analysis of stomach contents, based on prey hard remains and, in parallel, a simple DNA barcoding approach to identify the soft remains. Seven grey seal stomachs and three harbour porpoise stomachs have been analysed. The combined approach, making use of visual observation as well as DNA analysis, increased the identification of prey items by around 32% for grey seal and by 21% for harbour porpoise. Fish species identified include Mediterranean and Atlantic horse mackerel (*Trachurus mediterraneus* and *Trachurus trachurus*), Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*), ballan and cuckoo wrasse (*Labrus bergylta* and *Labrus mixtus*), European seabass (*Dicentrarchus labrax*), Atlantic pollock (*Pollachius pollachius*), European conger (*Conger conger*) and garfish (*Belone belone*). One fish species (*L. bergylta*) was identified only with DNA methods. An area-specific diet for the grey seal in the Iroise Sea, proposed by others in a previous study, seems to be supported.

Key words: Diet, DNA barcoding, *Halichoerus grypus*, marine mammals, *Phocoena phocoena*

Introduction

Studies of foraging activities are useful to describe the ecology of marine mammal species, as well as for conservation efforts and the prevention of marine mammal by-catch by commercial fisheries (Herr et al. 2009). They can also help in understanding the compromises between behaviour, physiology and ecology that shape strategies of air-breathing predators exploiting marine food resources.

Marine top-predator diets can be estimated using different approaches (for a recent review, see Bowen & Iverson 2013). Long-term analyses are based on the determination of stable carbon and nitrogen isotopes or on fatty acid analysis in the predator tissues

(Iverson et al. 1997; Das et al. 2003; Iverson et al. 2004; Ridoux et al. 2007; Mèndez-Fernandez et al. 2010). These methods integrate the diet of the predators over weeks or months and can provide good estimates of food webs and relationships at high trophic levels. Information on the last few meals can be obtained by direct observation of feeding, stomach content analysis and prey hard part identification in the predator's stomachs and faeces (Bowen & Harrison 1994; Walker et al. 1998; Santos & Pierce 2003; Santos et al. 2004; De Pierrepont et al. 2005; Ridoux et al. 2007). In the stomach contents and faeces, fish and cephalopod species are deduced from the identification of otoliths and beaks, respectively,

*Correspondence: Jean-Luc Jung, Laboratoire BioGeMME, Université de Bretagne Occidentale, UFR Sciences et Techniques, 6 Av. Victor Le Gorgeu – CS93837 – 29238 Brest Cedex 3, France. E-mail: jung@univ-brest.fr

using reference material (Clarke 1986; Härkönen 1986). However, soft tissues are generally poorly preserved, difficult to identify, and remain generally unstudied.

The development of molecular biology techniques has led to new possibilities for diet analysis. The remaining DNA of the prey can be identified in the stomach (Jarman et al. 2004; Dunn et al. 2010; Marshall et al. 2010; Carreon-Martinez et al. 2011) or even in the faeces of the predators (Jarman et al. 2004; Casper et al. 2007; Dunshea 2009; Valentini et al. 2009; Bowles et al. 2011). The polymerase chain reaction (PCR) can be used to amplify the prey DNA, which can then be either directly sequenced if no mixed amplification products have been obtained, or cloned and then sequenced. Prey DNA has to be distinguished from predator DNA and, if possible, from secondary prey DNA (i.e. DNA from fish prey having fed on fish themselves). For herbivorous animals, chloroplast DNA can be effectively targeted (Valentini et al. 2009). For carnivores, taxon-specific primers have been used, although studies are then restricted to specific prey taxa (Jarman et al. 2004; Parsons et al. 2005; Casper et al. 2007; Marshall et al. 2010; Bowles et al. 2011). Dunshea (2009) proposed an elegant method for the analysis of cetacean prey, making use of a specific *PaqI* restriction site present in the mtDNA of most odontocetes and not in their prey mtDNA. Vestheim & Jarman (2008) developed a method using a blocking primer, strongly reducing predator DNA amplification. But these methods are restricted to some predator taxa. Recently, important results have been obtained using next-generation sequencing (NGS) technologies, producing a very large amount of DNA sequence data, and which have been shown to be applicable to diet analysis for both herbivorous and carnivorous animals (Deagle et al. 2009; Valentini et al. 2009; Pompanon et al. 2012; Thomas et al. 2014). NGS allows the determination of thousands of sequences per PCR-amplified DNA extract. Targeted on a specific DNA region (a DNA barcode), they can allow characterization of a large variety of prey species in complex samples, such as faeces or gut contents (for a review, see Pompanon et al. 2012).

All the DNA-based species identification approaches depend upon the sequences being compared to reference databases. The DNA barcoding approach (Hebert et al. 2003) has the goal for producing such a reference database. It targets the 5' region of a single mitochondrial gene, *cytochrome oxidase I* (*cox1*), which has been selected for its high interspecific and low intraspecific variability. This diversity allows an efficient identification at the species level in different animal taxa, such as birds

(Hebert et al. 2003), mammals (Borisenko et al. 2008) or fishes (Ward et al. 2005, 2009) even if, for some specific taxa, inter- and intraspecific variabilities can overlap (e.g. Viricel & Rosel 2012; Alfonsi et al. 2013). The Barcoding Of Life Data System has been designed to compile *cox1* sequence data (more than 144,000 animal species with barcodes in April 2014) and to provide a species identification tool (Ratnasingham & Hebert 2007). In many cases, and with a high probability of success, it is therefore possible to identify the species from a biological sample following a simple, cheap and standardized protocol of DNA extraction, PCR amplification and direct sequencing of a *cox1* fragment. Dunn et al. (2010) applied such a simple protocol to the identification of prey in the stomachs of deepwater sharks. They used semi-universal primers (Ward et al. 2005) to amplify the 5' part of *cox1* from DNA extracted from muscle samples of prey that could not be identified by observation. The use of DNA-based identification almost doubled the rate of prey determination for three shark species (Dunn et al. 2010), thus providing evidence of the effectiveness of the method.

Harbour porpoises and grey seals are natural inhabitants of the coasts of northwest France, in the region of Brittany (Vincent et al. 2005; Jung et al. 2009). The diet of harbour porpoises (Walker et al. 1998; Santos & Pierce 2003; Santos et al. 2004; De Pierrepoint et al. 2005; MacLeod et al. 2007) and grey seals (Bowen & Harrison 1994; Beck et al. 2005; Parsons et al. 2005; Ridoux et al. 2007; Lundström et al. 2010) have been analysed previously, but both species still deserve special attention in this particular geographic area. The harbour porpoise has clearly made a global southward shift for some years in the eastern part of the North Atlantic (Hammond et al. 2002; Hammond et al. 2013), including a comeback along the French Atlantic Coast since the 1990s (Reijnders 1992; Duguy 1977; Jung et al. 2009). Alfonsi et al. (2012) recently demonstrated that two previously separated populations of harbour porpoises are hybridizing in the Bay of Biscay and off the coasts of Brittany. The grey seal, a flagship species of marine mammals in Brittany, is distributed in the North Atlantic temperate to subpolar waters. The Molène archipelago in the Iroise Sea is at the southern limit of its distribution range (Vincent et al. 2005). The interactions of both marine mammal species with fisheries need to be specified in terms of by-catch and of competition for the fish resources. This is especially important in the context of the recent establishment of a marine park in the Iroise Sea where the two species show increasing abundance trends.

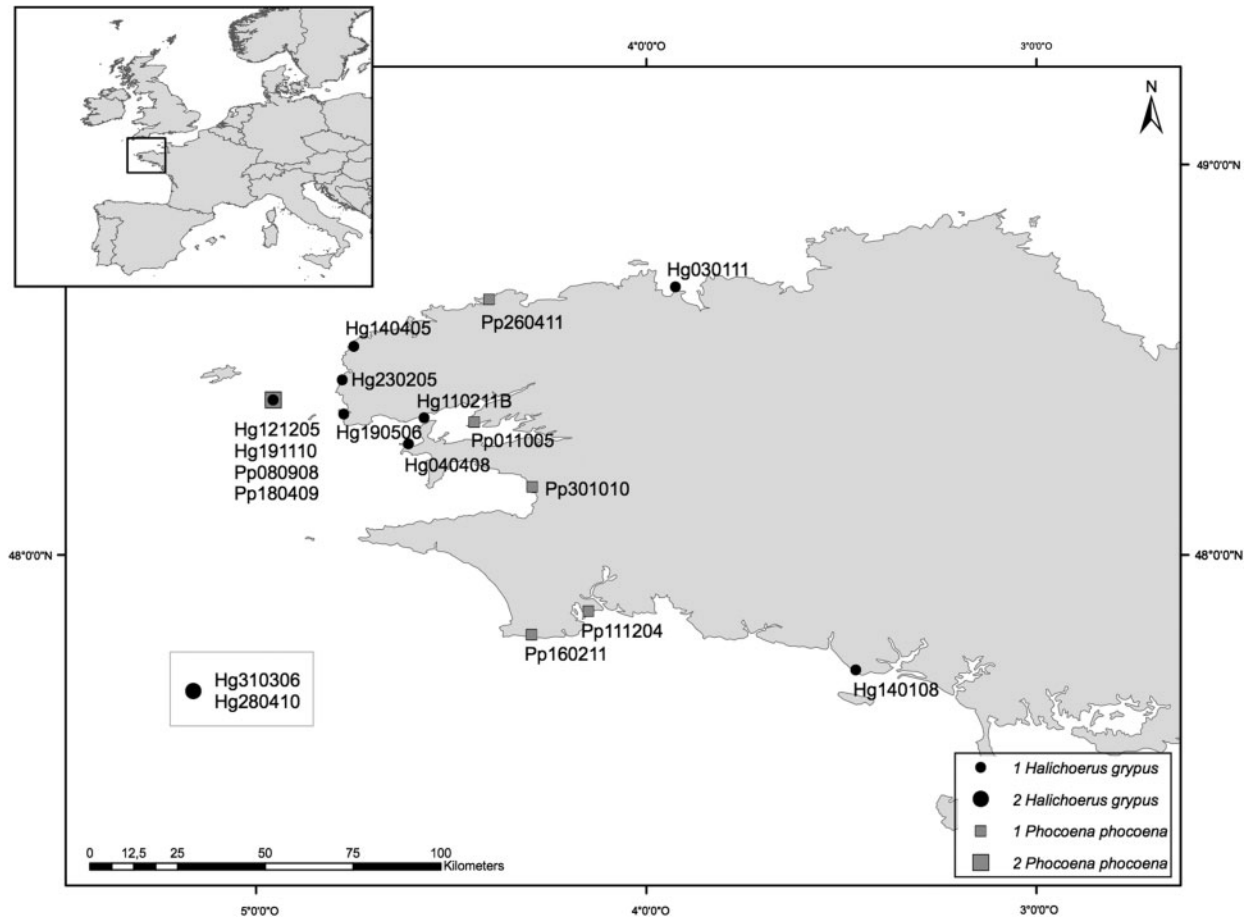


Figure 1. Geographical localization of the stranded and by-caught specimens used in this study. The exact localizations of the two individuals in the frame are unknown. The map was drawn using ArcGIS Desktop: Release 9.3.1 (Environmental Systems Research Institute, Redlands, CA, USA) with WGS 84 coordinates.

We tested whether the diet analysis of these two marine top-predator species could be improved by using a simple and economic method based on DNA barcoding. We studied the stomach contents of 11 grey seals and seven harbour porpoises stranded or by-caught along the coasts of Brittany since 2004, using two complementary methods: the classical method of observation and identification of prey hard remains in stomach contents, and a DNA-based identification of soft tissues using direct amplification with semi-universal primers and sequencing of the 5' region of the *cox1* gene, followed by identification on the BOLD system database. The increase in identification of prey items added by the DNA-based approach has been evaluated.

Material and methods

Sample collection

Stomachs were collected from seven harbour porpoises, *Phocoena phocoena* (Linnaeus, 1758), and 11 grey seals, *Halichoerus grypus* (Fabricius, 1791),

stranded or by-caught along the coasts of Brittany (northwest of France) between 2004 and 2011 (Figure 1 and Table I). The animals were examined by members of the French Stranding Network, and all the dissections were performed at Oceanopolis (Brest, France). The stomachs were removed, ligatured and stored at -20°C until further analysis.

Table I. Total numbers of stomach contents analysed and of prey identified using visual method and DNA-based analysis.

	<i>Halichoerus grypus</i>	<i>Phocoena phocoena</i>
Total number of samples	11	7
Non-empty stomachs	7	3
Number of prey	47	19
Number of prey identified		
by visual method	31 (66%)	14 (74%)
by DNA barcoding	15 (32%)	4 (21%)
Total number of prey identified	46 (98%)	18 (95%)

Stomach contents analyses

In the laboratory, the surfaces and equipment were cleaned with diluted hydrochloric acid (HCl) and rinsed with distilled water. Each stomach was thawed at ambient temperature, weighed, emptied into a tray and weighed again to estimate the mass of the stomach contents by difference. The stomach contents were then analysed: first, whole prey remains were removed, then hard parts were isolated from soft tissues and sorted by categories. Otoliths were stored dry whereas cephalopod beaks were kept in 90% ethanol.

Diagnostic parts (fish otoliths and cephalopod beaks) and whole prey items were identified to the lowest taxonomic level by using reference guides (Clarke 1986; Härkönen 1986) and a reference collection. For each prey species, individuals were then estimated: fish otoliths of similar sizes were matched and the number of individuals deduced from the number of pairs, and, for cephalopods, individuals were deduced from the number of unpaired structures (cephalopods upper or lower beaks).

DNA-based prey species determinations

Small samples of tissues were taken from all prey items that could not be identified with reference guides (absence of diagnostic parts), and from some well-individualized prey items possessing diagnostic parts to improve and validate the method (five samples marked by an * in Table II). Free-ranging bones and otoliths (i.e. not attached to remains of prey tissue) were treated separately.

Total genomic DNA was extracted from the samples using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. The quality of the extracted DNA was estimated by agarose gel electrophoresis, and concentrations were determined using a Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

A fragment of the 5' region of the *cox1* gene was amplified for each tissue sample using two primer pairs: HCO2198, 5'-TAAACTTCAGGGTGAC-CAAAAATCA-3' (Folmer et al. 1994) and either VF1i, 5'-TTCTCAACCAACCANAANGANATNG G-3' (Ivanova et al. 2006) or LCOIPem, 5'-CC ATCCTACCTGTGGCAATCAC-3', which was designed specifically for this study to target fish sequences. The two primer pairs were expected to amplify fragments of 709 and 741 bp, respectively, based on the complete *Trachurus trachurus* (Linnaeus, 1758) mitochondrial genome (Genbank reference: NC_006818.1). Polymerase chain reactions (PCR) were carried out in 50 µl of final volume containing genomic DNA extracts (between 0.13 and 4.0 ng/µl), 0.4 pmol/µl of each primer in the Hotgoldstar master

mix ×1 (Eurogentec) with a final concentration of MgCl₂ of 3 mM. After an initial denaturation step of 10 min at 95°C, the cycling parameters were: 35 cycles at 95°C for 30 s, 56°C for 30 s and 72°C for 60 s, followed by a final extension step of 10 min at 72°C.

PCR products were purified using the Quick Clean kit (Genscript) and sequenced on an ABI 3730XL sequencer (Applied Biosystem Inc.) by a provider (GATC, Germany or Macrogen, Korea). Electropherograms were analysed using the Sequence Scanner software (Applied Biosystem Inc.). Sequence reads were edited, aligned and consensus sequences were generated for each amplicon using BioEdit (Hall 1999).

Data analyses

All sequences were analysed using the Barcode of Life Data (BOLD) System interface, which collected the nearest neighbours of a query sequence and delivered a species identification level if less than 1% of divergence exists between the query and the closest reference sequences (Ratnasingham & Hebert 2007). All sequences were also compared to GenBank data using BLAST with default parameters optimized for highly similar sequences (Johnson et al. 2008).

The contribution of different prey items to the diet was determined by the percentage of occurrence of prey (%O), calculated as the number of stomachs in which the prey species was found divided by the total number of stomachs, and by the relative abundance of the prey by number (%N) for each species, calculated as the number of prey of each species divided by the total number of prey.

Results

A total of 18 stomachs of both species (11 grey seals, seven harbour porpoises) have been sampled, and seven non-empty grey seal stomachs and three non-empty harbour porpoise stomachs were analysed (Table I; Table SI, supplementary material). Fish otoliths ($n = 61$) and cephalopod beaks ($n = 8$) were collected from the samples, and represented seven species of fishes and one species of cephalopod (Table II). Green bones suggest the presence of a garfish in a grey seal stomach. Overall, 47 prey items for *Halichoerus grypus* (average: 6.7 items per stomach, minimum one item in the stomachs of Hg140405 and Hg121205 and maximum 31 items for Hg230205) and 19 prey items for *Phocoena phocoena* (average: 6.3 items per stomach, six items in the stomachs of Pp080908 and Pp180409 and seven items for Pp301010) were analysed. This allowed for, by either entire prey visual determination

Table II. List of the 47 grey seal prey and of the 19 harbour porpoise prey. Each line corresponds to a prey item. The identification method (classical or DNA barcoding method) and the diagnostic item (hard parts or tissue for DNA barcoding) are described for each prey. Tentative identifications by the visual method of samples marked by an * have been confirmed by DNA barcoding. Sequence lengths, identification on the Barcode Of Life Database (BOLD) and Genbank references of the sequences are given.

Predator	Prey references	Diagnostic item	Identification	Sequence (bp)	Identification	GenBank references
Hg230205	P1	Soft tissue		573	<i>Labrus mixtus</i>	JN231253
	P2	Soft tissue		572	<i>Labrus mixtus</i>	JN231252
	P3	Otoliths	<i>Labrus mixtus</i>			
	P4	Otoliths	<i>Labrus mixtus</i>			
	P5	Soft tissue		203	<i>Labrus bergylta</i>	JN231239
	P6	Soft tissue		310	<i>Labrus mixtus</i>	JN231251
	P7	Soft tissue		335	<i>Labrus mixtus</i>	JN231250
	P8	Otoliths	<i>Labrus mixtus</i>			
	P9	Soft tissue		573	<i>Labrus mixtus</i>	JN231249
	P10	Soft tissue		572	<i>Labrus mixtus</i>	JN231248
	P11	Soft tissue		573	<i>Labrus mixtus</i>	JN231247
	P12	Otoliths	<i>Labrus mixtus</i>			
	P13	Otoliths	<i>Labrus mixtus</i>			
	P14	Otoliths	<i>Labrus mixtus</i>			
	P15	Otoliths	<i>Pollachius pollachius</i>			
	P16	Otoliths	<i>Pollachius pollachius</i>			
	P17	Otoliths	<i>Pollachius pollachius</i>			
	P18	Otoliths	<i>Pollachius pollachius</i>			
	P19	Otoliths	<i>Pollachius pollachius</i>			
	P20	Otoliths	<i>Pollachius pollachius</i>			
	P21	Otoliths	<i>Pollachius pollachius</i>			
	P22	Otoliths	<i>Pollachius pollachius</i>			
	P23	Otoliths	<i>Pollachius pollachius</i>			
	P24	Otoliths	<i>Pollachius pollachius</i>			
	P25	Otoliths	<i>Pollachius pollachius</i>			
	P26	Otoliths	<i>Labrus mixtus</i>			
	P27	Otoliths	<i>Labrus mixtus</i>			
	P28	Otoliths	<i>Labrus mixtus</i>			
	P29	Otoliths	<i>Labrus mixtus</i>			
	P30	Otoliths	<i>Labrus mixtus</i>			
	P31	Otoliths	<i>Labrus mixtus</i>			
Hg140405	P1	Cephalopod gladius/pen	<i>Loligo vulgaris</i>			
Hg121205	P1	Cephalopod beak	<i>Loligo vulgaris</i>			
Hg190506	P1	Green bones and soft tissue	<i>Belone belone</i> *	572	<i>Belone belone</i>	JN231237
	P2	Otoliths and soft tissue	<i>Conger conger</i> *	621	<i>Conger conger</i>	JN231238
	P3	Soft tissue		627	<i>Labrus bergylta</i>	JN231241
		Soft tissue		204	<i>Labrus bergylta</i>	JN231240
	P4	Otoliths and soft tissue	<i>Dicentrarchus labrax</i>	-	-	
	P5	Soft tissue		-	-	
Hg140108	P6	Cephalopod beak	<i>Loligo vulgaris</i>			
	P1	Soft tissue		623	<i>Labrus bergylta</i>	JN231246
	P2	Soft tissue		626	<i>Labrus bergylta</i>	JN231245
	P3	Soft tissue		613	<i>Labrus bergylta</i>	JN231244
	P4	Soft tissue		626	<i>Labrus bergylta</i>	JN231243
Hg030111	P5	Soft tissue		625	<i>Labrus bergylta</i>	JN231242
	P1	Otoliths and soft tissue	<i>Pollachius pollachius</i> *	610	<i>Pollachius pollachius</i>	JN999701
Hg110211B	P1	Cephalopod beak	<i>Loligo vulgaris</i>			
	P2	Cephalopod beak	<i>Loligo vulgaris</i>			
Pp080908	P1	Soft tissue		573	<i>Trachurus trachurus</i>	JN231256
	P2	Soft tissue		572	<i>Trachurus trachurus</i>	JN231255
	P3	Soft tissue		371	<i>Trachurus</i> sp.	-
	P4	Otoliths	<i>Trachurus mediterraneus</i>			

Table II. (Continued)

Predator	Prey references	Diagnostic item	Identification	Sequence (bp)	Identification	GenBank references
Pp180409	P5	Otoliths	<i>Trachurus mediterraneus</i>			
	P6	Otoliths	<i>Trachurus mediterraneus</i>			
	P1	Soft tissue		591	<i>Phocoena phocoena</i>	-
	P2	Otoliths and soft tissue	<i>Trachurus trachurus</i> *	361	<i>Trachurus</i> sp.	JN231254
	P3	Soft tissue and vomer bone	<i>Labrus</i> sp.*	655	<i>Labrus bergylta</i>	JN999700
	P4	Otoliths	<i>Labrus mixtus</i>			
	P5	Otoliths	<i>Trachurus trachurus</i>			
Pp301010	P6	Otoliths	<i>Trachurus trachurus</i>			
	P1	Otoliths and soft tissue	<i>Scomber scombrus</i>	573	<i>Phocoena phocoena</i>	-
	P2	Otoliths	<i>Scomber scombrus</i>			
	P3	Otoliths	<i>Scomber scombrus</i>			
	P4	Cephalopod beak	<i>Loligo vulgaris</i>			
	P5	Cephalopod beak	<i>Loligo vulgaris</i>			
	P6	Cephalopod beak	<i>Loligo vulgaris</i>			
	P7	Cephalopod beak	<i>Loligo vulgaris</i>			

or by hard part analyses, the identification of 31 and 14 prey species, respectively (Table II).

DNA was successfully extracted from 27 soft tissue samples. Twenty samples came from grey seals, with up to eight samples from one individual (Hg200205), and seven samples from harbour porpoises (see Table II for a detailed list). Although the digestion process had clearly begun for all samples and although more or less degraded DNA extracts

were obtained (see Figure 2), this did not prevent the amplification of fragments of the expected sizes from all the DNA extracts using semi-universal primers, HCO2198 (Folmer et al. 1994) and VF1i (Ivanova et al. 2006). *Cox1* sequences of good qualities (i.e. having less than 1.5% of ambiguous sites) of 203–627 bp in length were identified from 21 of these amplicons. The six other sequences showed that at least two different DNA fragments had been

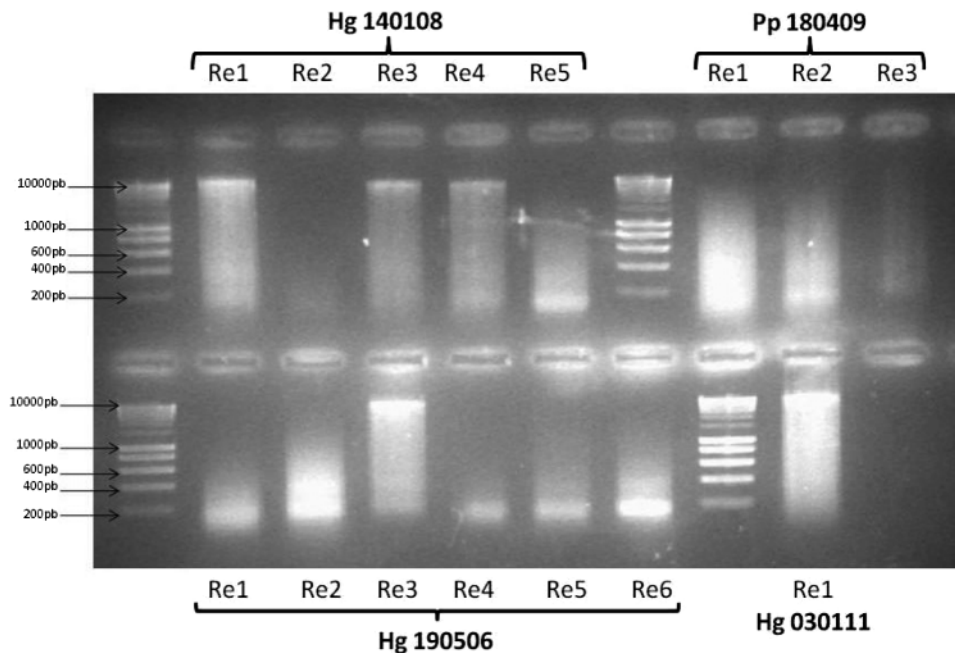


Figure 2. Analysis by agarose gel electrophoresis of prey genomic DNA extracts. Genomic DNA was extracted as described from 15 soft tissue remains sampled in four different predator stomachs (three grey seals and one harbour porpoise), and analysed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

amplified during the reaction. Three of these heterogeneous amplicons, coming from remains contained in a harbour porpoise stomach, matched the predator DNA sequence (Figure S1, supplementary material). When these DNA extracts were reamplified using another primer pair, where LCOIPem, designed in the lab to minimize the predator DNA amplification, was used instead of VF1i, two sequences of better quality (less than 4% of ambiguous sites) were obtained and corresponded to fish *cox1* sequences. Examples of both high-quality and contaminated sequence reads are shown in Figure S1 (supplementary material). Sequences of more than 500 nt were determined from traces having quality scores around 50, and shorter length sequences when trace quality scores were around 25–30.

In total, 23 *cox1* sequences ranging from 203 to 655 bp in length were identified (Table II). These 23 sequences all aligned with fish species commonly encountered in the Bay of Biscay and English Channel waters. Two samples were identified only to genus level (*Trachurus* sp. in a harbour porpoise stomach) and 21 samples were identified to species level by the 'BOLD Identification System' (Table II). Six different fish species were identified using DNA-based analysis: garfish *Belone belone* (Linnaeus, 1761), European conger *Conger conger* (Linnaeus, 1758), ballan wrasse *Labrus bergylta* (Ascanius, 1767), cuckoo wrasse *Labrus mixtus* (Linnaeus, 1758), Atlantic pollock *Pollachius pollachius* (Linnaeus, 1758), and Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus*. *Labrus bergylta* was only identified using the DNA-based approach. Among the prey tissues that remained unidentified by visual methods (16 for grey seals and five for harbour porpoises), 15 grey seal and four harbour porpoise prey were identified using the DNA-based approach. DNA barcoding identification thus allowed an increase of the number of prey species identified by 32% for grey seals and by 21% for harbour porpoises, leading to an almost complete identification of the different individual prey remains (Table I).

In our study, the grey seal diet was composed of fishes from six different species (87% N, Table III). The fish prey were predominantly Labridae, *L. mixtus* and *L. bergylta* (55% N), the species *L. bergylta* being the most common prey (43% O, Table III). *Dicentrarchus labrax*, *P. pollachius*, *B. belone* and *C. conger* were also found. Cephalopods, represented by *Loligo vulgaris* (Lamarck, 1798), were exclusively observed in a digested state. It should be noted that the grey seal diet showed a high variability of prey species among the seven individuals analysed, as shown in Figure S2 (supplementary material). The stomachs of some individuals may contain several different prey species (five species for Hg190506, three species for

Table III. Diet composition of three harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) and of seven grey seals (*Halichoerus grypus*) sampled along the coasts of Brittany, expressed in percentages of occurrence and relative abundance by number for items of each prey species.

(A) Prey of harbour porpoises		
	Occurrence (%)	Relative abundance (%)
Fishes	100	79.0
Carangidae		
<i>Trachurus mediterraneus</i>	66.7	15.8
<i>Trachurus trachurus</i>	66.7	26.3
<i>Trachurus</i> sp.	66.7	10.5
Labridae		
<i>Labrus mixtus</i>	33.3	5.3
<i>Labrus bergylta</i>	33.3	5.3
Scombridae		
<i>Scomber scombrus</i>	33.3	15.8
Cephalopods	33.3	21.0
Loliginidae		
<i>Loligo vulgaris</i>	33.3	21.0
(B) Prey of grey seals		
Fishes	57.1	87.2
Belonidae		
<i>Belone belone</i>	14.3	2.1
Congridae		
<i>Conger conger</i>	14.3	2.1
Gadidae		
<i>Pollachius pollachius</i>	28.6	25.5
Labridae		
<i>Labrus bergylta</i>	42.9	14.9
<i>Labrus mixtus</i>	14.3	40.4
Moronidae		
<i>Dicentrarchus labrax</i>	14.3	2.1
Cephalopods	57.1	10.6
Loliginidae		
<i>Loligo vulgaris</i>	57.1	10.6
Unidentified	14.3	2.1

Hg230205), or only one prey species, differing between each individual.

The harbour porpoise diet was mainly composed of five different fish species (79% N, Table III). The fish remains consisted predominantly of Carangidae of the *Trachurus* genus (53% N), although *Scomber scombrus* (Linnaeus, 1758) and two *Labrus* species (*L. mixtus* and *L. bergylta*) were also found. Cephalopods, represented by *L. vulgaris*, were exclusively observed in a digested state.

Discussion

Relevance of the DNA-barcoding approach for diet analysis

Sampling of stomach contents is opportunistic and requires that dead animals, either stranded or by-caught, can quickly be brought into the laboratory and a necropsy carried out. The stomachs can then

be removed, ligatured and frozen until further analysis. The available number of stomach contents is therefore clearly low. Grey seals are far fewer in number in the Molène archipelago than around the UK, for instance (Vincent et al. 2005; Ridoux et al. 2007), and some grey seal stomachs sampled in the Iroise Sea have been used in previous studies (Ridoux et al. 2007). Harbour porpoises, which seem to be moving along the French Atlantic coast (Jung et al. 2009; Alfonsi et al. 2012), are also not so numerous. Combining different approaches on the few available samples of such animals in a particular geographic area is, therefore, a prerequisite.

Here a conventional method of analysis and a simple DNA-based taxonomic identification were used in parallel. In particular, we took advantage of the DNA barcoding approach, targeted on the *cox1* gene (Hebert et al. 2003), and of the dedicated database Barcoding of Life Data (BOLD) system (Ratnasingham & Hebert 2007) to identify, whenever possible to species level, the prey corresponding to the remains found in the stomachs of the predators. The conserved regions of the *cox1* gene also allowed the use of semi-universal primers to amplify prey DNA, thus avoiding the need to predefine the prey species targeted, which is one of the advantages of our study compared to those targeted on specific taxa.

The first goal of our study was to determine if the combined use of this DNA-based method with morphological hard remains analysis would significantly increase the rate of data accumulation, as has been shown for other top predator marine species (Casper et al. 2007; Dunn et al. 2010; Marshall et al. 2010). In the conventional approach, the stomach – or the faeces – contents are analysed either by classic morphological criteria used for taxonomic identification of prey, or by hard remains (fish otoliths, cephalopod beaks) identification (Clarke 1986; Härkönen 1986). This approach allowed us to identify 45 prey items from nine different species (eight fish and one cephalopod species) in 10 non-empty stomachs of seven grey seals and three harbour porpoises, respectively.

The majority of soft remains are generally not identifiable. The easy and fast approach that we used relied on the selection of individual soft remains, followed by a simple DNA extraction step and the amplification of a part of the mitochondrial genome during a PCR reaction using semi-universal primers (Folmer et al. 1994; Ivanova et al. 2006) and followed by a sequencing reaction. We successfully extracted and amplified the DNA from 27 selected soft remains in both grey seal and harbour porpoise stomachs and DNA sequences of good quality were obtained from 23 of them. The size of the remains we sampled should avoid the problem that they may

correspond to secondary prey (prey of prey). The prey items were identified to the species level for 21, and to the genus level for 2. The predator DNA was found to contaminate only three of the 27 extracts at a detectable level, i.e. the resulting sequence matched that of the predator. The use of primers designed to target fish species allowed the identification of prey from one of these three extracts. The 23 DNA sequences identified matched sequences from six different fish species, one of which, *Labrus bergylta*, had not been identified by the first part of the analysis (the conventional approach). Grey seals sometimes swallow only fish bodies without the heads, therefore resulting in a lack of otoliths in the stomach contents. This could explain why no hard remains of *L. bergylta* were detected in stomach contents. The DNA-based identification of soft remains most likely represents the only way to identify these prey species.

Diet composition of the seven grey seals and three harbour porpoises analysed

A total of nine species of fishes and one species of cephalopod have been identified during this study. For both predator species, the results are consistent with previous studies in terms of prey composition in their diets. The different prey found in grey seal stomachs could suggest an area-specific diet of the species. Ridoux et al. (2007) showed that coastal demersal fish species like Labridae species, European seabass *Dicentrarchus labrax* or European conger *Conger conger* and pelagic species like garfish *Belone belone* are frequent prey for grey seals in the Molène archipelago. This differs from the diet observed in other geographic areas (off the coast of Scotland, in the Baltic sea, around Canada) where sandeels, *Ammodytes* spp., and some Gadidae like the Atlantic cod, *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758), or the European hake, *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758), are more frequent (Ridoux et al. 2007 and references therein; Lundström et al. 2010). The grey seal could therefore present a specific foraging strategy in the Iroise Sea, which could be explained by the rocky seabed and Laminaria fields that characterize the Molène archipelago. Although we analysed only seven grey seal stomachs, we observed a high interindividual variability of the diet, which may reflect individual foraging strategies (Vincent 2001; Ridoux et al. 2007).

Mediterranean and Atlantic horse mackerel (*Trachurus mediterraneus* (Steindachner, 1868) and *T. trachurus*), as well as Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) and European squid (*Loligo vulgaris*) are known to be part of the harbour porpoise diet (Santos & Pierce 2003; Santos et al. 2004; De

Pierrepont et al. 2005; Spitz et al. 2006). The two Labridae species are more unexpected, as there is no previous record of these species in other studies on harbour porpoise diet in Europe (Santos et al. 2004; Haelters et al. 2012). However, other demersal fish species like sandeels are frequently found in harbour porpoise food. Small schooling coastal and neritic species of fishes with high energetic value represented the majority of the diet of the harbour porpoise.

Both predator diets contain fish species also targeted by fisheries. Nevertheless, with the exception of seabass, none of these species are of a high commercial value. The Parc Naturel Marin d'Iroise is conducting a project 'INPECMAM' with the objective in studying the interactions between marine mammals and fisheries in the Iroise Sea. This programme will end in September 2014 and will provide valuable information, including the actual level of marine mammals by-caught by fisheries.

A summary of the benefits of the DNA-based identification of prey, and future developments

We confirm that the taxonomic identification of prey in the stomach contents of top predators, like the two marine mammal species studied here, strongly benefits from the parallel use of a classical approach and of a simple DNA-based analysis. The number of prey item species identified per predator increased by nearly a third for grey seal and by 21% for harbour porpoise, due to the use of the molecular analysis. Up to 98% of *Halichoerus grypus* prey and 94% of *Phocoena phocoena* prey remains were identified. Moreover, one fish species has been identified only by its DNA, maybe because of a real lack of hard remains due to a specific consumption of the prey body without the head. One hypothesis is that this could occur when grey seals consume fishes already caught on fishing hooks. Depredation behaviours of grey seals on commercial fisheries are well known, although their real levels of impact require targeted studies. This is one of the issues addressed by the INPECMAM project, and any gain of knowledge about the diet of grey seal, such as the one brought by our results, provide really valuable information.

Others (e.g. Casper et al. 2007; Dunn et al. 2010; Marshall et al. 2010) also noticed such an increase in the number of species identified using visual and DNA-based identification of marine top-predator species, and we believe that DNA barcoding should routinely be used for diet analysis of marine top predators. In recent years, next-generation sequencing has been used as a tool by molecular ecologists for diet analysis of some marine top predators (Deagle et al.

2009, 2013; Thomas et al. 2014). Diverse prey species have been identified simultaneously from complex samples, thus strongly reducing experimental costs and efforts, but also eliminating the need for using individualized prey items to extract the DNA. The targeted DNA region can be the 5' end of *cox1* (DNA barcoding *sensu stricto*, Hebert et al. 2003) or not (DNA barcoding *sensu lato*, Valentini et al. 2009; Pompanon et al. 2012). One of the major perspectives of our future work will focus on the use of NGS in order to increase our knowledge of the grey seal diet around the Iroise Sea.

Acknowledgements

We are grateful to all members of the French Stranding Network (coordinated by PELAGIS, UMS 3462, CNRS-Université de La Rochelle) for their help in collecting data and samples. Thanks are extended to all the members of the Océanopolis marine mammal team. We are also indebted to Sandrine Quemener who participated in laboratory experiments, and to Sandra Fuchs who drew the map for Figure 1. Special thanks go to Chantal Hily-Maze. This manuscript benefited from useful comments during the reviewing and editing process.

Funding

Eric Alfonsi was supported by a 'Cifre' grant of the ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, <http://www.anrt.asso.fr>). This work is part of a collaboration with the 'Parc Naturel Marin d'Iroise', and was supported by the Conseil Régional de Bretagne in the frame of the project 'INPECMAM'.

Supplementary material

Supplementary material for this article is available via the Supplemental tab of the article's online page at <http://dx.doi.org/10.1080/17451000.2014.943240>

References

- Alfonsi E, Hassani S, Carpentier F-G, Le Clec'h J-Y, Dabin W, Van Canneyt O, et al. 2012. A European melting pot of harbour porpoise in the French Atlantic coasts inferred from mitochondrial and nuclear data. *PLoS ONE* 7(9):e44425. 11 pages.
- Alfonsi E, Méheust E, Fuchs S, Carpentier F-G, Quillivic Y, Viricel A, et al. 2013. The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast. In: Nagy ZT, Backeljau T, De Meyer M, Jordaens K, editors. *DNA Barcoding: A Practical Tool for Fundamental and Applied Biodiversity Research*. ZooKeys 365:5–24.
- Beck CA, Iverson SJ, Bowen WD. 2005. Blubber fatty acids of gray seals reveal sex differences in the diet of a size-dimorphic marine carnivore. *Canadian Journal of Zoology* 83:377–88.
- Borisenko AV, Lim BK, Ivanova NV, Hanner RH, Hebert PDN. 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal

- communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Resources* 8:471–79.
- Bowen WD, Harrison GD. 1994. Offshore diet of grey seals *Halichoerus grypus* near Sable Island, Canada. *Marine Ecology Progress Series* 112:1–11.
- Bowen WD, Iverson SJ. 2013. Methods of estimating marine mammal diets: A review of validation experiments and sources of bias and uncertainty. *Marine Mammal Science* 29:719–54.
- Bowles E, Schulte PM, Tollit DJ, Deagle BE, Trites A. 2011. Proportion of prey consumed can be determined from faecal DNA using real-time PCR. *Molecular Ecology Resources* 11:530–40.
- Carreon-Martinez L, Johnson TB, Ludsins SA, Heath DD. 2011. Utilization of stomach content DNA to determine diet diversity in piscivorous fishes. *Journal of Fish Biology* 78:1170–82.
- Casper RM, Jarman SN, Gales NJ, Hindell MA. 2007. Combining DNA and morphological analyses of faecal samples improves insight into trophic interactions: A case study using a generalist predator. *Marine Biology* 152:815–25.
- Clarke MP. 1986. *A Handbook for the Identification of Cephalopod Beaks*. Oxford: Clarendon Press. 273 pages.
- Das K, Lepoint G, Leroy Y, Bouqueneau JM. 2003. Marine mammals from the southern North Sea: Feeding ecology data from $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ measurements. *Marine Ecology Progress Series* 263:287–98.
- De Pierrepont JF, Dubois B, Desormonts S, Santos MB, Robin JP. 2005. Stomach contents of English Channel cetaceans stranded on the coast of Normandy. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85:1539–46.
- Deagle BE, Kirkwood R, Jarman SN. 2009. Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces. *Molecular Ecology* 18:2022–38.
- Deagle BE, Thomas AC, Shaffer AK, Trites AW, Jarman SN. 2013. Quantifying sequence proportions in a DNA-based diet study using Ion Torrent amplicon sequencing: Which counts count? *Molecular Ecology Resources* 13:620–33.
- Duguy R. 1977. Notes on the small cetaceans off the coasts of France. Reports of the International Whaling Commission 27:500–01.
- Dunn MR, Szabo A, McVeagh MS, Smith PJ. 2010. The diet of deepwater sharks and the benefits of using DNA identification of prey. *Deep-Sea Research I* 57:923–30.
- Dunshea G. 2009. DNA-based diet analysis for any predator. *PLoS ONE* 4:e5252. 9 pages.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294–99.
- Haelters J, Kerckhof F, Toussaint E, Jauniaux T, Degraer S. 2012. The Diet of Harbour Porpoises Bycaught or Washed Ashore in Belgium, and Relationship with Relevant Data from the Strandings Database. Oostende: Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Marine Ecosystem Management Unit, p 1–48.
- Hall T. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95–98.
- Hammond PS, Berggren P, Benke H, Borchers DL, Collet A, Heide-Jørgensen MP, et al. 2002. Abundance of harbour porpoise and other cetaceans in the North Sea and adjacent waters. *Journal of Applied Ecology* 39:361–76.
- Hammond PS, Macleod K, Berggren P, Borchers DL, Burt L, Cañadas A, et al. 2013. Cetacean abundance and distribution in European Atlantic shelf waters to inform conservation and management. *Biological Conservation* 164:107–22.
- Härkönen TJ. 1986. *Guide to the Otoliths of the Bony Fishes of the Northeast Atlantic*. Hellerup: Danbui ApS. 256 pages.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270:313–21.
- Herr H, Fock HO, Siebert U. 2009. Spatio-temporal associations between harbour porpoise *Phocoena phocoena* and specific fisheries in the German Bight. *Biological Conservation* 142:2962–72.
- Ivanova NV, Dewaard JR, Hebert PDN. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 6:998–1002.
- Iverson SJ, Frost KJ, Lowry LF. 1997. Fatty acid signatures reveal fine scale structure of foraging distribution of harbor seals and their prey in Prince William Sound, Alaska. *Marine Ecology Progress Series* 151:255–71.
- Iverson SJ, Field C, Bowen WD, Blanchard W. 2004. Quantitative fatty acid signature analysis: A new method of estimating predator diets. *Ecological Monographs* 74:211–35.
- Jarman SN, Deagle BE, Gales NJ. 2004. Group-specific polymerase chain reaction for DNA-based analysis of species diversity and identity in dietary samples. *Molecular Ecology* 13:1313–22.
- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezukh Y, McGinnis S, Madden TL. 2008. NCBI BLAST: A better web interface. *Nucleic Acids Research* 36:W5–W9.
- Jung J-L, Stéphan E, Louis M, Alfonsi E, Liret C, Carpentier FG, et al. 2009. Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in north-western France: Aerial survey, opportunistic sightings and strandings monitoring. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 89:1045–50.
- Lundström K, Hjerne O, Lunneryd S-G, Karlsson O. 2010. Understanding the diet composition of marine mammals: Grey seals (*Halichoerus grypus*) in the Baltic Sea. *ICES Journal of Marine Science* 67:1230–39.
- MacLeod CD, Santos MB, Reid RJ, Scott BE, Pierce GJ. 2007. Linking sandeel consumption and the likelihood of starvation in harbour porpoises in the Scottish North Sea: Could climate change mean more starving porpoises? *Biology Letters* 3:185–88.
- Marshall HD, Hart KA, Yaskowiak ES, Stenson GB, McKinnon D, Perry EA. 2010. Molecular identification of prey in the stomach contents of harp seals (*Pagophilus groenlandicus*) using species-specific oligonucleotides. *Molecular Ecology Resources* 10:181–89.
- Méndez-Fernandez P, Bustamante P, Bode A, Chouvelon T, Ferreira M, López A, et al. 2010. Foraging ecology of five toothed whale species in the Northwest Iberian Peninsula, inferred using carbon and nitrogen isotope ratios. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 413:150–58.
- Parsons KM, Piattney SB, Middlemas SJ, Hammond PS, Armstrong JD. 2005. DNA-based identification of salmonid prey species in seal faeces. *Journal of Zoology* 266:275–81.
- Pompanon F, Deagle BE, Symondson WOC, Brown DS, Jarman SN, Taberlet P. 2012. Who is eating what: Diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology* 21:1931–50.
- Ratnasingham S, Hebert PDN. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7:355–64.
- Reijnders PJH. 1992. Harbour porpoises *Phocoena phocoena* in the North Sea: Numerical responses to changes in environmental conditions. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 26:75–85.
- Ridoux V, Spitz J, Vincent C, Walton MJ. 2007. Grey seal diet at the southern limit of its European distribution: Combining dietary analyses and fatty acid profiles. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 87:255–64.
- Santos MB, Pierce GJ. 2003. The diet of harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in the northeast Atlantic: A review. *Oceanography and Marine Biology* 41:335–90.

- Santos MB, Pierce GJ, Learmonth JA, Reid RJ, Ross HM, Patterson IAP, et al. 2004. Variability in the diet of harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) in Scottish waters 1992–2003. *Marine Mammal Science* 20:1–27.
- Spitz J, Rousseau Y, Ridoux V. 2006. Diet overlap between harbour porpoise and bottlenose dolphin: An argument in favour of interference competition for food? *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 70:259–70.
- Thomas AC, Jarman SN, Haman KH, Trites AW, Deagle BE. 2014. Improving accuracy of DNA diet estimates using food tissue control materials and an evaluation of proxies for digestion bias. *Molecular Ecology* 23:3706–18.
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P. 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution* 24:110–17.
- Vestheim H, Jarman SN. 2008. Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples – A case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Frontiers in Zoology* 5:12. 11 pages.
- Vincent C. 2001. Ecological Bases for the Conservation of the Grey Seal, *Halichoerus grypus*, in the Iroise Sea. PhD Thesis. Brest: Université de Bretagne Occidentale. 220 pages.
- Vincent C, Fedak MA, McConnell BJ, Meynier L, Saint-Jean C, Ridoux V. 2005. Status and conservation of the grey seal, *Halichoerus grypus*, in France. *Biological Conservation* 126:62–73.
- Viricel A, Rosel PE. 2012. Evaluating the utility of *cox1* for cetacean species identification. *Marine Mammal Science* 28:37–62.
- Walker WA, Bradley Hanson M, Baird RW, Guenther TJ. 1998. Food habits of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, and Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, in the inland waters of British Columbia and Washington. Alaska Fisheries Science Center Processed Report 98-10:1–14.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360:1847–57.
- Ward RD, Hanner R, Hebert PDN. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology* 74:329–56.

Editorial responsibility: Gavin Gours

Chapitre VI.

Outils moléculaires et étude de la biodiversité spécifique des mammifères marins

Identifier l'espèce à laquelle appartient un organisme grâce à son ADN n'est pas trivial. Cette démarche nécessite successivement (i) de définir préalablement une partie du génome à étudier, (ii) d'identifier les variations de cette partie du génome dans une collection la plus large possible d'espèces différentes, (iii) d'analyser de manière comparative les variations intraspécifiques et interspécifiques de cette séquence, et (iv) de s'assurer que les variations intraspécifiques sont nettement inférieures aux variations entre espèces. Il faut aussi créer une base de données qui regroupe les séquences d'ADN de cette zone spécifique déterminée chez le plus grand nombre possible d'organismes, dont l'identification taxonomique aura été validée.

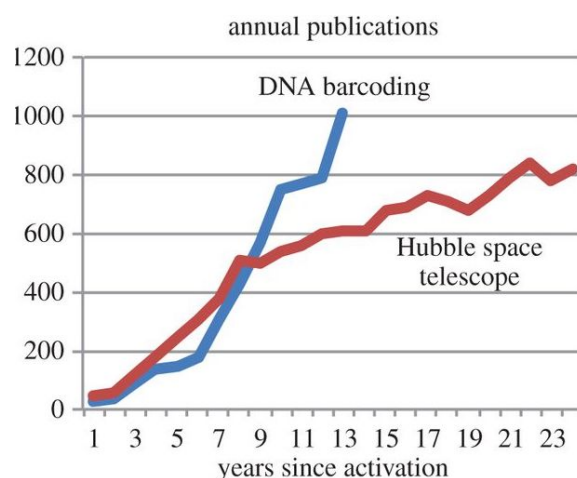


Figure 31 : Comparaison du nombre de publications annuelles résultant de deux grands projets scientifiques, le télescope Hubble et les codes-barre ADN. Les publications sont décomptées en années après le lancement de chacun des deux programmes. Sept ans après la définition du principe des codes-barre ADN, le nombre de publications dédiées aux codes-barre ADN a dépassé celui du télescope Hubble. Figure extraite de Hebert et al. 2016.

La démarche du code-barre ADN (« *DNA barcoding* ») a été construite sur ce modèle (Hebert et al. 2003). Pour les animaux, elle cible une portion de 500 pb approximativement du génome mitochondrial correspondant à l'extrémité 5' du gène codant pour la sous-unité 1 de la Cytochrome Oxydase (CO1). Les variations de cette séquence sont en général plus importantes entre espèces qu'entre différents individus d'une même espèce (Hebert et al. 2003), même si des contre-exemples existent (Wiemers & Fiedler 2007 ; publication 6). Une banque de donnée dédiée a été construite, qui regroupe à ce jour des séquences concernant presque 180 000 espèces animales (<https://www.boldsystems.org>, consultée le 15 septembre 2017). Des critiques, souvent inhérentes à la démarche elle-même existent (démarche monolocus, génome mitochondrial, possibilité d'hétéroplasmie, existence de copies nucléaires notamment), mais

l'utilisation des codes-barres ADN est devenue particulièrement généralisée (Figure 31). Valentini et al. (2009) ont étendu le concept en définissant les code-barres ADN *sensu stricto*, répondant à la définition d'Hébert et al. (2003) donc visant à l'identification d'une espèce grâce à la séquence de CO1 ; et *sensu lato*, permettant l'identification d'un niveau taxonomique (pas uniquement celui des espèces) grâce à une séquence d'ADN. C'est encore sur une nouvelle extension de cette démarche que repose le principe du *metabarcoding*, dans lequel l'ADN de différents organismes contenu dans un échantillon environnemental est étudié en parallèle (Pompanon et al. 2011 ; Valentini et al. 2016, voir aussi paragraphe sur l'ADN environnemental dans le Chapitre 1).

J'ai participé à la mise au point des code-barres ADN sur deux groupes de mammifères marins, les pinnipèdes et surtout les cétacés, grâce notamment aux échantillons récoltés par le Réseau National Echouage. Les résultats de cette mise au point, ainsi que l'analyse comparative des identifications d'espèces de manière classique et en utilisant les code-barres ADN, sont décrits dans la publication 6 « *The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast* ». Depuis trois ans, j'ai adapté cette approche à l'identification de spécimens très dégradés le long des côtes de Mauritanie, dans le cadre du programme de l'état Mauritanien « Biodiversité Gaz Pétrole ». Cette démarche nous a permis par exemple d'identifier pour la première fois en Atlantique l'espèce la moins connue de rorquals, *Balaenoptera omurai* (Wada et al. 2003). Ces résultats sont décrits dans la publication 7 « *Omura's whale off West Africa: autochthonous population or inter-oceanic vagrant in the Atlantic Ocean?* ».

Actuellement, les suivis d'échouages de mammifères marins en Mauritanie se poursuivent dans le cadre de la thèse de Oumar Ba de l'Université de Nouakchott que je co-encadre. Je travaille aussi, en collaboration avec le Docteur Tony Dejean (SPYGEN, Grenoble) à la mise au point pour les mammifères marins des analyses de type *metabarcoding* sur de l'ADN environnemental contenu dans des échantillons d'eau de mer.

Identification d'espèces et codes-barres ADN chez les mammifères marins			
Etudiants ayant participé à cette étude			
Eric Alfonsi	2009-2013	Master 2 puis Thèse	Co-encadrement en Doctorat Yves-Marie Paulet / Jean-Luc Jung et Sami Hassani pour la partie entreprise (financement Cifre)
Anaïs Rey	Janvier-juin 2015	Master 2, Université de Paris VI	Encadrement Jean-Luc Jung
Projet mené en collaboration avec			
Sami Hassani	Océanopolis		
Philippe Le Niliot, Cécile Lefeuvre	Parc Naturel Marin d'Iroise		
Koen Van Waerebeek	Corewam		
Willy Dabin, Olivier Van Canneyt, Vincent Ridoux	Observatoire PELAGIS, Réseau National Echouage		
Frédéric Marret Wim Mullié	Programme Biodiversité Gaz Pétrole, Mauritanie		
Tableau 13 : Collaborations et étudiants encadrés pour l'identification d'espèces et codes-barres ADN chez les mammifères marins			

Publication 6.

**The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity
along the French Atlantic coast**

Alfonsi E.[&], Méheust E.[&], Fuchs S., Carpentier F.-G., Quillivic Y., Viricel A., Hassani S. &
Jung J.-L.*

Zookeys

365, 5-24

2016

* Corresponding author
& : Co premiers auteurs

The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast

Eric Alfonsi^{1,2,*}, Eleonore Méheust^{1,2,*}, Sandra Fuchs², François-Gilles Carpentier¹, Yann Quillivic², Amélia Viricel^{3,4}, Sami Hassani², Jean-Luc Jung¹

1 Laboratoire BioGeMME (Biologie et Génétique des Mammifères Marins dans leur Environnement), Université Européenne de Bretagne & Université de Bretagne Occidentale, UFR Sciences et Techniques, 6 Av. Victor Le Gorgeu - CS93837 - 29238 Brest Cedex 3, France **2** Laboratoire d'Etude des Mammifères Marins (LEMM), Océanopolis, port de plaisance, BP 91039, 29210 Brest Cedex 1, France **3** Observatoire PELAGIS, UMS 3462, CNRS-Université de La Rochelle, Pôle analytique, 5 allée de l'océan, 17000 La Rochelle, France **4** Littoral, Environnement et Sociétés, UMR 7266, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France

Corresponding author: Jean-Luc Jung (jung@univ-brest.fr)

Academic editor: T. Backeljau | Received 28 June 2013 | Accepted 11 September 2013 | Published 30 December 2013

Citation: Alfonsi E, Méheust E, Fuchs S, Carpentier F-G, Quillivic Y, Viricel A, Hassani S, Jung J-L (2013) The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast. In: Nagy ZT, Backeljau T, De Meyer M, Jordaens K (Eds) DNA barcoding: a practical tool for fundamental and applied biodiversity research. ZooKeys 365: 5–24. doi: 10.3897/zookeys.365.5873

Abstract

In the last ten years, 14 species of cetaceans and five species of pinnipeds stranded along the Atlantic coast of Brittany in the North West of France. All species included, an average of 150 animals strand each year in this area. Based on reports from the stranding network operating along this coast, the most common stranding events comprise six cetacean species (*Delphinus delphis*, *Tursiops truncatus*, *Stenella coeruleoalba*, *Globicephala melas*, *Grampus griseus*, *Phocoena phocoena*) and one pinniped species (*Halichoerus grypus*). Rare stranding events include deep-diving or exotic species, such as arctic seals. In this study, our aim was to determine the potential contribution of DNA barcoding to the monitoring of marine mammal biodiversity as performed by the stranding network.

We sequenced more than 500 bp of the 5' end of the mitochondrial COI gene of 89 animals of 15 different species (12 cetaceans, and three pinnipeds). Except for members of the Delphininae, all species were unambiguously discriminated on the basis of their COI sequences. We then applied DNA barcoding to identify some “undetermined” samples. With again the exception of the Delphininae, this was successful using the BOLD identification engine. For samples of the Delphininae, we sequenced a portion of the

* These authors contributed equally to this work.

mitochondrial control region (MCR), and using a non-metric multidimensional scaling plot and posterior probability calculations we were able to determine putatively each species. We then showed, in the case of the harbour porpoise, that COI polymorphisms, although being lower than MCR ones, could also be used to assess intraspecific variability. All these results show that the use of DNA barcoding in conjunction with a stranding network could clearly increase the accuracy of the monitoring of marine mammal biodiversity.

Keywords

DNA barcoding, COI, control region, marine mammals, cetaceans, pinnipeds, biodiversity monitoring, stranding network

Introduction

The aim of DNA barcoding is to concentrate the efforts of molecular taxonomists on a single part of the mitochondrial genome, chosen because it presents portions conserved across taxa that are appropriate for primer design, while including polymorphism among and within species (Hebert et al. 2003, 2004). This DNA sequence, targeted as the 5' end of the gene coding for the subunit I of the cytochrome *c* oxidase subunit I (COI), is sufficiently diverse so as to allow the specific identification of a great majority of animal species. Numerous studies have proven the success of this approach in the animal kingdom, and using various sources of tissue samples (e.g. Lambert 2005, Clare et al. 2007, Dawnay et al. 2007, Hajibabaei et al. 2007, Borisenko et al. 2008, Ward et al. 2009, Shokralla et al. 2010). Today (June 2013), a database, accessible at <http://www.boldsystems.org>, groups DNA barcode sequence data for more than 133,000 animal species, and offers a powerful identification tool for new specimens (Ratnasingham and Hebert 2007).

DNA barcoding also possesses some inherent limitations (Valentini et al. 2009): it is based on a single locus on the mitochondrial genome so that it is only maternally inherited (Hartl and Clark 2007), it can show heteroplasmy (Kmiec et al. 2006, Vollmer et al. 2011) or may exist as nuclear copies. Some of these limitations have been well-exposed (Ballard and Whitlock 2004, Toews and Brelsford 2012). The use of DNA barcoding for species delimitation also requires that interspecific divergence is higher than the intraspecific divergence. Although this has been shown to be true in numerous taxonomic groups, opposite examples also exist (Amaral et al. 2007, Wiemers and Fiedler 2007, Viricel and Rosel 2012).

In the present study, we assess the contributions that DNA barcoding could provide to the monitoring of the marine mammal biodiversity along the coasts of Brittany, in the northwest of France. For almost 20 years, the stranding network has been collecting data and, when possible, sampling, each time a marine mammal stranding is reported. Field correspondents are organized in a geographical area covering the entire Brittany coasts. The network is coordinated regionally by Océanopolis (Brest, France), and nationally by *Pelagis* (La Rochelle, France).

DNA barcoding could be useful for the monitoring of marine mammal strandings at different levels. First, by confirming the quality and the reproducibility of a spe-

cies identification made by the field correspondents. Beside common species, which are often encountered and easily identified, exotic or deep living species represent rare stranding events. In such cases, DNA barcoding could provide a confirmation or an additional degree of precision of taxonomic determination (Thompson et al. 2012). Second, DNA barcoding can help specifying species identifications in those cases where the taxonomic identification was made only to the genus or family levels. This is often due to incomplete or highly degraded carcasses. DNA barcoding also is a valuable and cost effective alternative to the taking of the head or skull of the animals. Third, genetic data collected for DNA barcoding generally include intraspecific variation, which allows downstream population-level analyses including the detection of genetic structure and, in some cases, monitoring population movements. A long-term use of the barcoding approach would therefore clearly increase the significance and the precision of marine mammal stranding monitoring. Migration or movement of populations or groups of a particular species can be highlighted, thus revealing e.g. environmental changes leading to these movements (Pauls et al. 2012).

We evaluated the usefulness of DNA barcoding in the monitoring of marine mammal biodiversity along the coasts of Brittany at three levels: by confirming the taxonomic identification performed by field correspondents, by identifying degraded carcasses or parts of carcasses, and by determining intraspecific variations for two species commonly found off Brittany, the harbour porpoise and the grey seal. For this last part of our study, we also compared COI and the mitochondrial control region in terms of their effectiveness in species identification.

Methods

Collection of data and samples

The CRMM (Centre de Recherche sur les Mammifères Marins, La Rochelle, France), presently the Joint Service Unit PELAGIS, UMS 3462, University of La Rochelle-CNRS has created the French marine mammal stranding recording program at the beginning of the 70s. The network comprises about 260 field correspondents, members of organizations or volunteers (Peltier et al. 2013).

Since 1995, the LEMM (Laboratoire d'Etude des Mammifères Marins, Océanopolis, Brest, France) has coordinated this network at a regional scale in Brittany, North West of France. Data are collected from the Brittany coastlines, analyzed, and then added to the central database maintained in La Rochelle. The Brittany coasts have been divided into 18 sections covering the whole coastline (Jung et al. 2009). In each of these areas, correspondents are trained in the analysis of stranded marine mammals. Taxonomic identification and characteristic measurements are performed following a standard procedure. The LEMM therefore compiles standardized data on a large proportion of cetaceans stranded on the Brittany coasts on a yearly basis. Whenever possible, skin, blubber, muscle and teeth samples are also collected in the field from each

stranded animal. Samples are then kept in absolute ethanol or dry at -20 °C until analyses. Some harbour porpoise samples, described in the Appendix 1 and in Alfonsi et al. (2012), were stranded or by-caught in the Bay of Biscay (Atlantic coast of France).

Genomic DNA extraction, amplification and sequencing of COI and MCR (mitochondrial control region)

Genomic DNA was extracted from blood samples or from muscle and skin tissues using a standardized protocol and the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen), following the instructions of the manufacturer. The quality and the concentration of all the DNA extracts were estimated by agarose gel electrophoresis and by spectrophotometry using a Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

A 736 base-pair (bp) fragment of the 5' region of the COI fragment (position 5352 to 6087 of the complete mitochondrial genome of the harbour porpoise, GenBank acc. no. AJ554063), was amplified using two newly designed primers, LCOIlea (5'-tcggccattttacatatgttcata-3') and HBCUem (5'-ggtagccgaagaatcagaata-3'). The 50 µl PCR final volume included approximately 50 ng of genomic DNA, and 25 pmole of each primer in the Hotgoldstar master mix × 1 (Eurogentec) with a final concentration of MgCl₂ of 2.5 mM. After an initial denaturation step of 10 min at 95 °C, the thermocycle profile consisted of 32 cycles for cetaceans or 35 cycles for pinnipeds at 95 °C for 30 s, 53 °C for 30 s and 72 °C for 60 s, with a final extension at 72 °C for 10 min.

For some animals, we also amplified and sequenced another part of the mitochondrial genome including the control region (MCR). For cetaceans, the primers and reaction conditions are described in (Alfonsi et al. 2012). For pinnipeds, two newly designed primers LMCRRHgem 5'-tcataccattgccagcattat-3' and HMCRRHgem 5'-taccaaatgcacacacag-3' amplified a 693 bp fragment from position 16160 to 55 of the *Halichoerus grypus* complete mitochondrial genome sequence (GenBank acc. no. X72004). PCR reaction conditions were the same as described above for pinnipeds, with the hybridization temperature set to 53 °C. PCR products were purified using the "MinElute PCR Purification Kit" and sequenced by a commercial sequence facility (Macrogen, Korea).

Electropherograms were analyzed and edited manually using the Sequence scanner software (Applied Biosystems), and alignments were produced using CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) with default settings in Bioedit (Hall 1999). All sequences were analyzed using the Barcode of Life Data Systems (BOLD) interface (accessible at <http://www.boldsystems.org>), and were also compared to GenBank data using BLAST (Benson et al. 2010).

DNA sequences and specimen information have been added to two BOLD projects. The first project includes specimens for which the species had been identified without doubt using classical morphological identification, and is referred to as IMMB (Identified Marine Mammals in Brittany). The IMMB project is a part of the campaign "barcoding mammals of the world". The second project, UMMB (Unidentified Marine Mammals in Brittany), includes specimens only identified to the genus or to higher taxonomic levels. This second project is a part of the campaign "barcoding application".

Genetic distances (intraspecific, interspecific and minimal distance to the nearest neighbour) were calculated using the Kimura 2-parameter (K2P) model (Kimura 1980) and the MUSCLE alignment algorithm on the BOLD user interface or using the software MEGA5 (Tamura et al. 2011). Neighbour-Joining trees based on the K2P-model were built using the BOLD user interface. DnaSP v5.10 was used to calculate haplotype and nucleotide diversities (Librado and Rozas 2009). We used non-metric multidimensional scaling (nMDS) to represent MCR distances graphically and to discriminate closely related species within the *Stenella-Tursiops-Delphinus* complex (LeDuc et al. 1999, McGowen 2011, Perrin et al. 2013). Distance matrices were computed with the K2P-model using DNAdist (Felsenstein 1989) and were then analyzed by nMDS using Statistica (Statsoft 2005). Posterior probabilities were calculated by a LDA (linear discriminant analysis) on coordinates given by the nMDS. Phylogenetic relationships among COI sequences of harbour porpoise were depicted using a median joining network of haplotypes using Network v4.6 (www.fluxus-engineering.com).

Results

From 2003 to 2012, 1530 marine mammal strandings were recorded along the coastline of Brittany (Table 1). Fourteen species of cetaceans and five species of pinnipeds were identified. The most frequent cetaceans were six indigenous species of the Brittany waters, viz. five members of the Delphinidae (*Delphinus delphis*, *Tursiops truncatus*, *Stenella coeruleoalba*, *Globicephala melas*, *Grampus griseus*), and the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). Two members of the Zyphiidae (*Hyperoodon ampullatus* and *Ziphius cavirostris*), three other species of Delphinidae (*Lagenorhynchus acutus*, *Orcinus orca* and *Stenella frontalis*), one species of Physeteridae (*Physeter macrocephalus*) and two mysticete species (*Balaenoptera acutorostrata* and *Balaenoptera physalus*) were rare stranding events. *Halichoerus grypus* was by far the most commonly encountered pinniped, far before *Phoca vitulina*, and some uncommon arctic seals (*Phoca hispida*, *Cystophora cristata* and *Phoca groenlandica*). Between 9 and 12 different marine mammal species stranded each year (Figure 1).

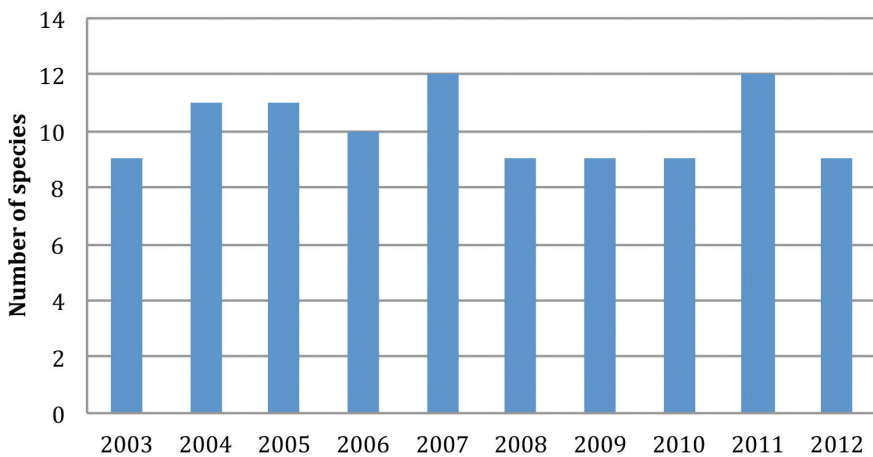
Members of the stranding network are trained to identify the stranded animals. Nevertheless, 258 animals (16.8% of the strandings) were not characterized to the species level, generally because of an advanced state of decomposition of the animal body, sometimes in conjunction with bad field-work conditions.

COI sequencing and analysis from different marine mammal samples

DNA was extracted from 92 stranded animals, i.e. from dead cetaceans and pinnipeds, but also from 40 grey seals stranded alive, which were treated in the care center of Océanopolis (Brest, France) and from which a small blood sample was taken and kept at -20 °C. All the samples came from animals stranded at the coasts of Brittany, except for one grey seal (Hgc406), which stranded alive in Spain in 2009 and which

Table I. Strandings of marine mammals along the coasts of Brittany, North West of France (2003–2012)

	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Total
Cetaceans											
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>								1	1		2
<i>Balaenoptera physalus</i>	1	2			2	3			4	2	14
Delphinidae (undetermined)	40	30	36	22	15	9	9	6	16	8	191
<i>Delphinus delphis</i>	56	61	109	53	51	56	40	39	72	57	594
<i>Globicephala melas</i>	6	5	7	1	1	2	1	2	1	2	28
<i>Grampus griseus</i>	2	1	7	3	1	7	2	1	2	4	30
<i>Hyperoodon ampullatus</i>									1		1
<i>Lagenorhynchus acutus</i>				1	2				1	1	5
<i>Orcinus orca</i>		1									1
<i>Phocoena phocoena</i>	18	13	12	15	20	23	9	10	15	11	146
<i>Physeter macrocephalus</i>		2			1						3
<i>Stenella coeruleoalba</i>	1		7	9	8	4	5	9	6	3	52
<i>Stenella frontalis</i>			1								1
<i>Tursiops truncatus</i>	6	2	7	6	4	5	3	8	3	3	47
<i>Ziphius cavirostris</i>					1		1				2
Mysticeti (undetermined)			1	4							5
Odontoceti (undetermined)	5	1	1	3	1						11
Cetacea (undetermined)				3	3	2			1		9
Pinnipeds											
<i>Cystophora cristata</i>			1	3							4
<i>Halichoerus grypus</i>	20	29	41	37	51	41	37	13	34	24	327
<i>Phoca groenlandica</i>		1									1
<i>Phoca vitulina</i>	1	1	2	1	1	1		2	3		12
<i>Pusa hispida</i>			1				1				2
Phocidae (undetermined)	5		7	4	13	4	5		2	1	41
Unknown										1	1
Total	161	149	240	165	175	157	113	91	162	117	1530

**Figure 1.** Numbers of different species of marine mammals stranded along the coasts of Brittany (North West of France) in the period 2003–2012.

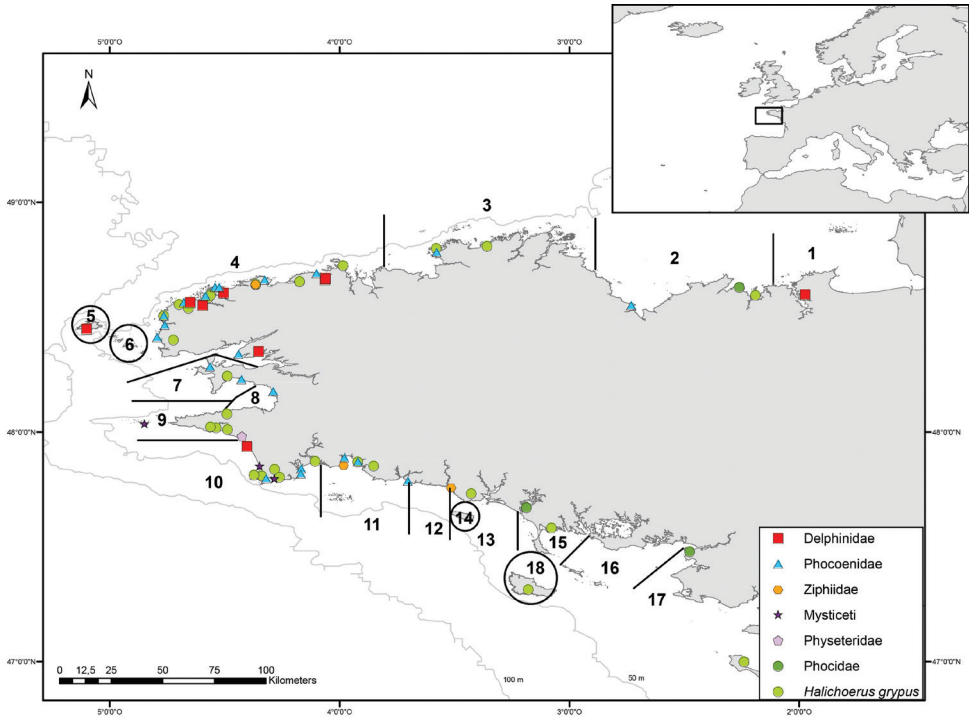


Figure 2. Organization of the stranding network in Brittany (North West of France) and localization of the stranded specimens used in this study. Numbers indicate the 18 geographic sections of the stranding network in this area. The map was drawn using ArcGIS Desktop: Release 9.3.1 (Environmental Systems Research Institute, Redlands, CA, USA) with WGS 84 coordinates.

was transported to the care center (Figure 2). Our sampling included 12 species of cetaceans, and three species of pinnipeds (Table 2). Two species were very common, the harbour porpoise (29 samples) and the grey seal (44 samples), thus allowing intraspecific distance analyses.

A COI amplicon was recovered from 89 samples, and good quality sequences of more than 500 bp were obtained for all samples (GenBank accession numbers KF281608–KF281697). The sequence alignment used in the analyses was 507 bp long. About 32% of the positions were polymorphic in the cetaceans and 13.1% in the pinnipeds (Table 3). The maximal intraspecific distance was 0.46% for the grey seal and 0.83% for the harbour porpoise. The COI sequences of three species of the Delphininae (*Stenella frontalis*, *Stenella coeruleoalba* and *Delphinus delphis*) showed very low interspecific distances (0.84% between *D. delphis* and the nearest species *S. frontalis*, and 1.18% between the two *Stenella* species). All other interspecific distances were above 3.9% for pinnipeds and above 6% for cetaceans. The Neighbour-Joining (NJ) tree built on the BOLD interface using K2P-distances (Figure 3) confirms that, except for of the Delphininae, all the cetacean and pinniped species analyzed are distinguished unambiguously.

Table 2. Numbers of samples included in the IMMB project

Cetaceans (12 species)	
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	1
<i>Balaenoptera physalus</i>	1
<i>Delphinus delphis</i>	1
<i>Grampus griseus</i>	3
<i>Hyperoodon ampullatus</i>	2
<i>Lagenorhynchus acutus</i>	2
<i>Phocoena phocoena</i>	29
<i>Physeter macrocephalus</i>	1
<i>Stenella coeruleoalba</i>	1
<i>Stenella frontalis</i>	1
<i>Tursiops truncatus</i>	1
<i>Ziphius cavirostris</i>	1
Pinnipeds (3 species)	
<i>Cystophora cristata</i>	2
<i>Halichoerus grypus</i>	44
<i>Phoca vitulina</i>	2
Total (15 species)	92

Table 3. Polymorphism levels of COI between 12 species of marine mammals stranded in Brittany, and comparison with intra-species variation for harbour porpoise and grey seal.

	Total	Cetaceans (12 species)	Pinnipeds (3 species)	Harbour porpoises	Grey seals
Number of species	14	11	3	1	1
Number of sequences	89	41	48	45*	44
Length (bp)	507	508	656	610	658
Polymorphic sites	186	163	86	8	7
Polymorphism (%)	36.7	32.1	13.1	1.3	1.06
Minimal distance to NN	-	0.84	3.9	13.46	3.9
Maximal distance to NN	-	17.3	11.2	-	-
Maximal intraspecific distance	-	-	-	0.83	0.46

*This sampling includes 28 harbour porpoises stranded along the coasts of Brittany, and 17 more samples, stranded or by-caught in the Bay of Biscay, included to better characterize intraspecific variation. NN: nearest neighbour.

Taxonomic identification of undetermined samples

We then determined COI sequences from 10 cetacean samples whose species could not be determined accurately using morphological characters (Figure 4), either because only parts of the animal were recovered (Figure 4A) or because of the highly degraded state of the carcasses (Figure 4C). COI sequences of good qualities were obtained from all these samples, and three of them were identified unambiguously using the BOLD identification engine: Ms250511 was identified as a *Balaenoptera physalus*, Ds160111

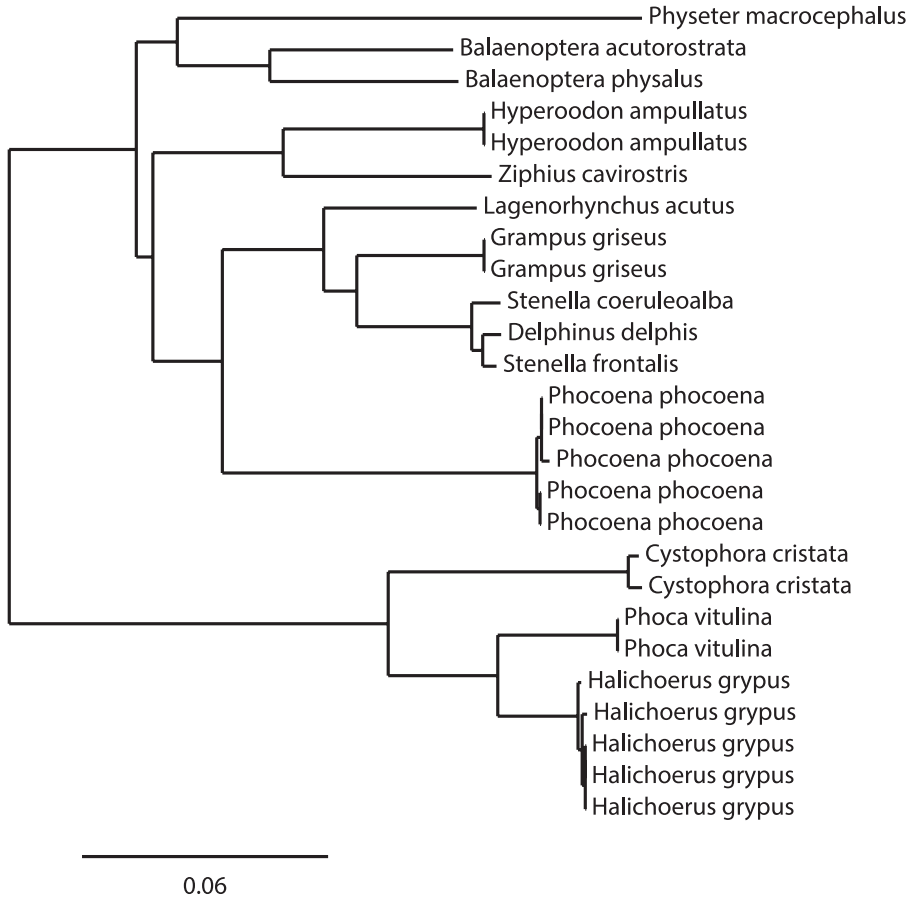


Figure 3. Neighbour-Joining tree of major species of marine mammals, based on K2P-distances calculated from 507 bp of COI. All sequences come from the IMMB project on BOLD, and only 5 harbour porpoise and 5 grey seal samples among those of the IMMB project have been included in the analysis.

as a *Grampus griseus* and Ds290811 as a *Phocoena phocoena*. The other seven samples were Delphininae, as confirmed by COI sequences. Yet, neither the BOLD identification engine, nor a BLAST search on GenBank allowed a more precise determination. We therefore sequenced MCR, which is more variable than COI, from six unidentified samples. BLAST searches on GenBank confirmed the COI results: all these samples were Delphininae, but a more precise identification could not be achieved.

We constructed a nMDS plot of the distances between MCR sequences of *S. coeruleoalba*, *S. frontalis* and *D. delphis* taken from GenBank: for *S. coeruleoalba*, we used sequences AM498725, AM498723, AM498721, AM498719, AM498717, AM498715, AM498713, AM498711, AM498709, AM498707 (Mace et al. unpublished), for *D. delphis* FM211560, FM211553, FM211545, FM211535, FM211527, FM211519, FM211511, FM211503, FM211495 (Mirimin et al. 2009) and DQ520121,

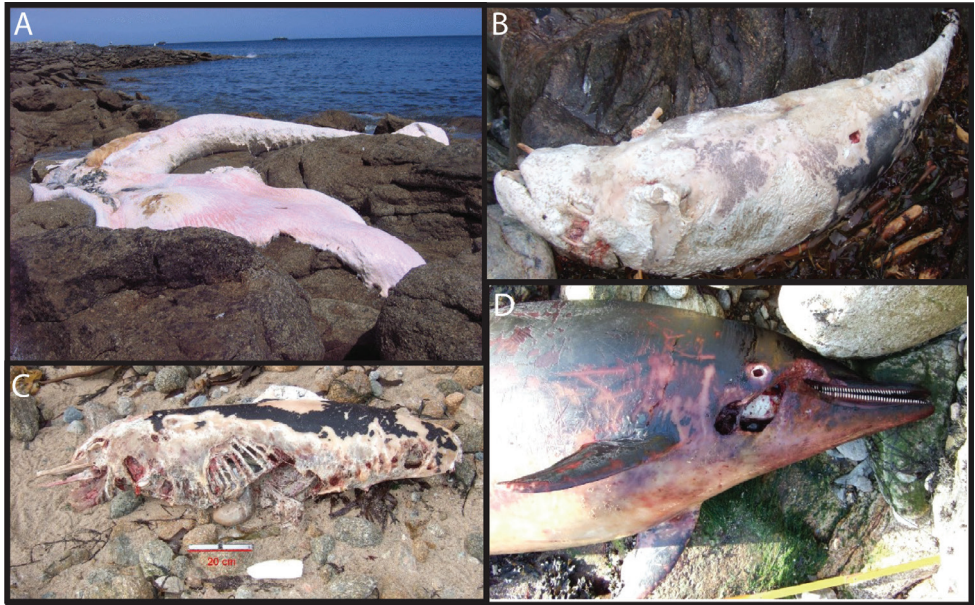


Figure 4. Examples of marine mammals stranded along the coasts of Brittany and the species-level identifications of which were determined or confirmed thanks to DNA barcoding. **A** Sample Ms250511, stranded on the “Île de Sein” during May 2011, and identified as a *Balaenoptera physalus* **B** Sample Ds160111, stranded on the Ushant Island during January 2011, and identified as a *Grampus griseus* **C** Sample Ds130211, stranded on the Ushant Island in February 2011, and identified as belonging to the Delphininae subfamily (putatively identified as a *D. delphis* on the nMDS plot in Figure 5) **D** Sample Ds080410 stranded on the Ushant Island during April 2010, and identified as belonging to the Delphininae (putatively identified as a *S. coeruleoalba* on the nMDS plot in Figure 5).

DQ520117, DQ520113, DQ520109, DQ520105 (Hildebrandt et al. unpublished) and for *S. frontalis* GQ5041986, GQ5041987, GQ5041988, GQ5041989, GQ5041990, GQ5041991, GQ5041992, GQ5041993, GQ5041994, GQ5041995 (Kingston et al. 2009).

The three species were clearly discriminated by the nMDS (Figure 5). The posterior probabilities are given in Appendix 2. This analysis suggests that five of our unidentified samples could belong to *D. delphis*, and one to *S. coeruleoalba*.

Intraspecific variation of COI and MCR in harbour porpoise and grey seal

For the intraspecific analysis of the harbour porpoise, we included 17 additional samples of animals stranded or by-caught from the Bay of Biscay (Appendix 1, Alfonsi et al. 2012). All in all, we compared 35 sequences of grey seals, and 45 of harbour porpoises. As expected, MCR sequences were more polymorphic than COI: in harbour porpoise,

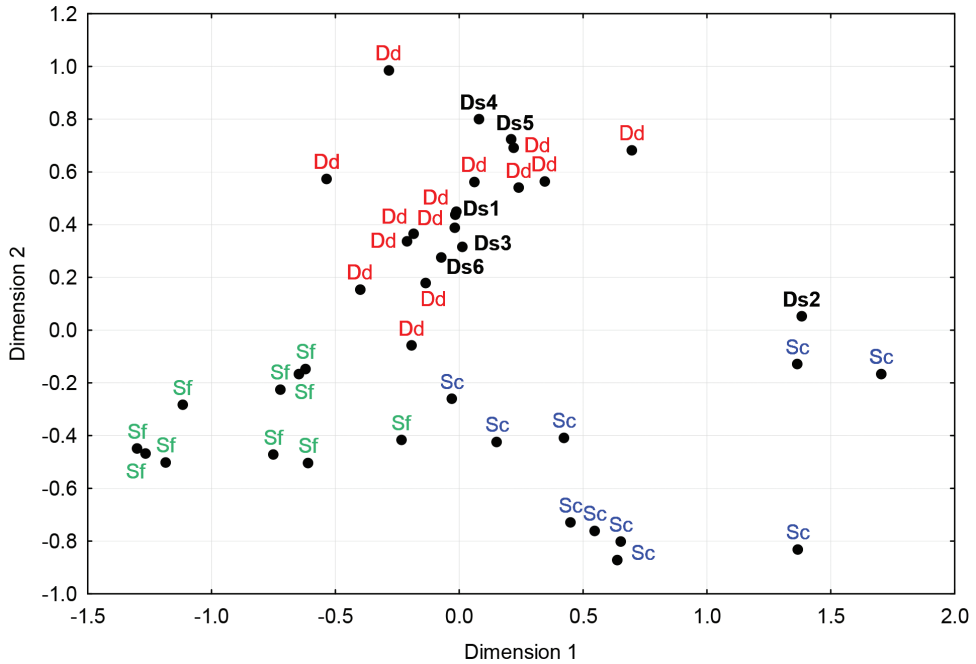


Figure 5. Non-metric Multidimensional Scaling plot of K2P-distance between MCR sequences of *S. coerulealba* (in blue), *D. delphis* (in red) and *S. frontalis* (in green). Individuals of each species are clearly clustered together, and unidentified samples (in black) stranded along the coasts of Brittany group with one of the three species. Dd280211A (Ds1), Ds130210 (Ds3), Ds230409 (Ds4), Ds250412 (Ds5) and Sc210910 (Ds6) are putatively identified as *D. delphis*, whereas Ds080410 (Ds2) would more likely belong to *S. coerulealba*.

Table 4. Comparison of intraspecific COI and MCR polymorphisms for grey seal and harbour porpoise

Markers	Harbour porpoise (<i>P. phocoena</i>)		Grey seal (<i>H. grypus</i>)	
	COI	MCR	COI	MCR
Number of sequences	45	45	35	35
Sequence length (bp)	610	579	658	482
Haplotypes	9	14	6	14
Polymorphic sites	8	22	5	23
Polymorphism	1.30%	3.80%	0.76%	4.77%
Haplotype diversity	0.695	0.832	0.553	0.935
Nucleotide diversity	0.00242	0.00632	0.00098	0.00945

3.8% of the MCR positions were polymorphic vs. 1.30% in COI, while 4.73% of the MCR positions in the grey seal were polymorphic vs. 0.75% in COI (Table 4). Hence, MCR was 3× more polymorphic than COI in harbour porpoise and 6× in grey seals. Haplotype and nucleotide diversities were also higher for MCR than for COI.

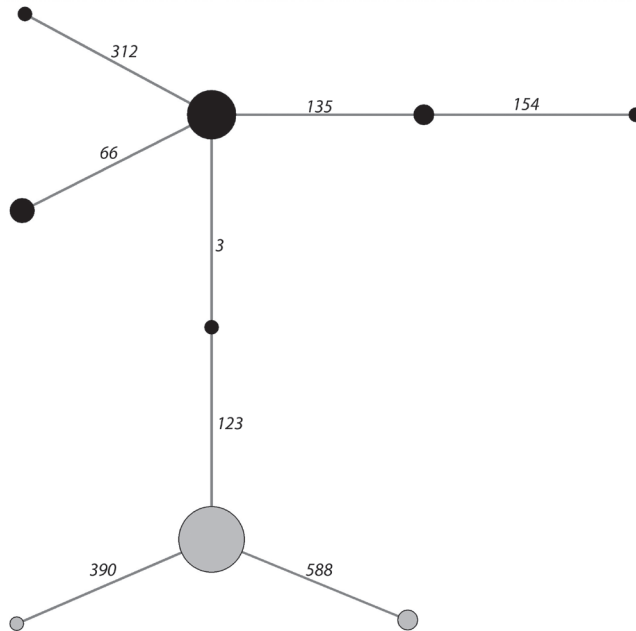


Figure 6. Haplotype network established from the COI sequences of 45 harbour porpoises stranded along the Atlantic coast of France (Appendix 1). Numbers on a line connecting two haplotypes correspond to the sequence position of the mutation differentiating these haplotypes. Two mitochondrial haplogroups appear (black circles - grey circles), that group the same individuals as the haplogroups alpha and beta determined using MCR polymorphisms and described in Alfonsi et al. (2012).

The haplotype network of the COI sequences in harbour porpoises clearly differentiated two haplogroups (Figure 6), that correspond perfectly to those described for MCR in Alfonsi et al. (2012).

Discussion

Stranding networks collect opportunistic data that are ecologically significant (Borsa 2006, Jung et al. 2009, Peltier et al. 2013), although, among other parameters, data quality control may deserve a special attention (Evans and Hammond 2004). Stranding networks can also collect skin and muscle samples that can be used for genetic analysis, therefore contributing to the construction of biological sample banks which are of high value when working with marine mammals.

The aim of this study was to evaluate the feasibility of a routine use of DNA barcoding in a stranding network; and to determine which gains this use could bring in terms of data relevance. The Brittany stranding network is a part of the French stranding network, and has to analyze an average of around 150 marine mammal strandings per year, with a high species biodiversity (19 species during 2003–2012).

Can COI be used as an appropriate species identification tool for marine mammals in the frame of a stranding network?

We obtained DNA sequences of good quality for almost all the samples studied, whatever their origin, their collectors, or even their state of degradation. This is consistent with the numerous molecular genetic studies that have used samples taken on stranded cetaceans or pinnipeds (e.g. Gaspari et al. 2006, Amaral et al. 2007, Fontaine et al. 2007, Mirimin et al. 2009, 2011, Alfonsi et al. 2012).

Viricel and Rosel (2012) previously demonstrated that COI sequences allowed identifying cetacean species, except for a few closely related Delphinidae species (see also Amaral et al. 2007). As expected, our NJ tree matched the overall classification, and the distance-based analysis identified correctly the sequences to the species levels for all cetaceans except within the Delphininae. The three species of pinnipeds analyzed were also unambiguously distinguished on the basis of their COI sequences.

The quality of the whole functioning and organization of the stranding network, from the field-work achieved by the correspondents to the preservation of the samples is therefore confirmed by our study. All the samples analyzed by DNA barcoding led to correct identification of the expected species with no exceptions.

We obtained COI good quality sequences for 10 unidentified animals, some of which were in a highly degraded body state. This showed that DNA barcoding can help to identify such specimens, which represent more than 16% of the stranded animals in the period 2003–2012. Hence, a routine use of DNA barcoding would noticeably decrease the proportion of unidentified animals.

The case of the Delphininae

Within the Delphininae, species are difficult to discriminate (Amaral et al. 2007, 2012, Viricel and Rosel 2012). In particular, *Delphinus delphis*, *Stenella coeruleoalba* and *Stenella frontalis* show very low interspecific COI distances, which do not allow distinguishing the species accurately. Other mitochondrial loci, such as MCR and *cyt b*, are neither very effective in this matter (Amaral et al. 2007, Viricel and Rosel 2012). This is attributed to recent and rapid radiation events in the subfamily, and it leads to problematic results in molecular taxonomic studies (Kingston et al. 2009, Amaral et al. 2012, Viricel and Rosel 2012, Perrin et al. 2013). In our case, these three species produced COI and MCR sequences that did not allow to associate samples with species names, neither with the identification engine on BOLD, nor with a distance tree or a BLAST search on GenBank. nMDS of genetic distances is known to uncover sample clustering (e.g. Geffen et al. 2004, Maltagliati et al. 2006, Alfonsi et al. 2012, Weckworth et al. 2012). As such, nMDS clustering of MCR sequence distances of *Delphinus delphis*, *Stenella coeruleoalba* and *Stenella frontalis*, chosen randomly on GenBank among Atlantic samples, showed that individuals of the three species formed separate groups. Moreover, each individual had a high posterior probability to belong to the

right group, except for one sample (i.e. 97.0% of the assignments were successful), so that all our unidentified samples could be putatively identified to the species level, based on the nMDS plot and its posterior probabilities.

Can DNA barcoding increase the accuracy of the data listed by the stranding network?

DNA barcoding is informative for animals that belong to species that infrequently strand along the coasts of Brittany, which can involve either species living far off the coasts or living in deep water, but also exotic species. Such species can be more difficult to identify by the field correspondents simply because of their scarcity. Along the coast of Brittany, we observed a *Stenella frontalis*, a temperate to tropical Atlantic Ocean inhabitant, and three species of arctic seals (*Phoca hispida*, *Cystophora cristata* and *Phoca groenlandica*). It is likely that other members of such rare species are listed among the “undetermined” species, just because their morphological characteristics are less well known by field correspondents. Additionally, a species that rarely strands along the French coast may be mistakenly identified as its more common sister-species. This issue can be illustrated by the case of the two pilot whale species: *Globicephala melas*, the long-finned pilot whale, commonly strands along the French Atlantic coast, while only a few stranding events of *G. macrorhynchus*, the short-finned pilot whale, have been reported (the Bay of Biscay is the northern limit of the geographical range of *G. macrorhynchus*). The two species have overlapping morphological characters, which adds to the difficulty of detecting rare stranding events of *G. macrorhynchus* based on morphological data only (Viricel and Sabatier unpublished data). A systematic use of DNA barcoding when morphological taxonomic characteristics are not straightforward, would clearly lower the percentage of exotic animals not listed. The existence of natural interspecific hybrids between the two *Globicephala* sister-species (Miralles et al. 2013), as between other cetacean species (e.g. Bérubé and Aguilar 1998, Willis et al. 2004) still reinforces the interest of such a monitoring based on molecular data.

It is important to note that a main limitation of DNA barcoding is the use of a single locus, leading to some problematic species identification such as within the Delphininae, but also to an inability to detect hybrids without complementary genetic studies. This limitation may well be removed in the near future thanks to next-generation sequencing, allowing the accumulation of large amount of DNA sequence data in a cost-effective manner. Multi-locus barcoding, including mitochondrial and nuclear polymorphic loci, will certainly represent a next step for the barcoding community.

A routine use of DNA barcoding could also allow monitoring the marine mammal biodiversity at intraspecific levels. For instance, global climate change has some effects on genetic diversity that must be studied and quantified (Pauls et al. 2012), in particular in the marine realm. Knowledge of the existence of distinct genetic groups or populations, of the history of their formation and of their movements are of a first importance to ecological understandings of natural populations, and also to the conservation efforts dedicated to them. Around the coast of Brittany, different species of marine mammals

have shown variations in abundance in the last decades (Vincent et al. 2005, Jung et al. 2009). Using samples from the French Stranding Network and MCR polymorphisms, we have recently shown that two previously separated, genetically distinct, populations of harbour porpoises are now admixing along the Atlantic coast of France (Alfonsi et al. 2012). These results were unexpected according to previous work (Tolley and Rosel 2006, Fontaine et al. 2007). In this study, we show that this genetic clustering would also have been detected using COI polymorphisms, thus reinforcing the interest of a routine use of DNA barcoding in conjunction with the stranding network.

Contributions of our study to the Barcoding of Life Database

This project is part of the collaboration between the Laboratory BioGeMME of the “Université de Bretagne Occidentale” (Brest, France), Océanopolis, a public private company (<http://www.oceanopolis.com>), the “Parc naturel marin d’Iroise” (<http://www.parc-marin-iroise.com>) and the French Stranding Network, coordinated by *Pelagis*, Université de La Rochelle, France. All the specimens and sequence data described in this manuscript are deposited in BOLD under the institution called “Oceanopolis-BioGeMME” in two projects, UMMB and IMMB. Our mixed institution became the first contributor to BOLD for the Cetacea, as well as for the Phocidae, and these two BOLD projects will be publicly available, and all the sequences published on GenBank.

Acknowledgements

The samples in this study were collected by the French Stranding Network and stored at Océanopolis (Brest) and at Pelagis (La Rochelle). We especially thank all the members of the LEMM, Christine Dumas who is in charge of the care center at Océanopolis and Willy Dabin and Olivier Van Canneyt from Pelagis. This work is part of a collaboration with “The Parc Naturel Marin d’Iroise”, and especially with Phillipe Le Niliot, Cécile Lefeuvre and all the technicians working on the field.

We are indebted to Paul Marec, who collected the samples and took the photographs of the stranded animals on Ushant Island. Loriane Mendez, Anne Moulinet, Sandrine Quemener participated to some experiments during their internships in BioGeMME. Special thanks go to Chantal Hily-Mazé.

This manuscript benefited from useful comments during the reviewing and editing process.

References

- Alfonsi E, Hassani S, Carpentier F-G, Le Clec’h J-Y, Dabin W, Van Canneyt O, Fontaine M C, Jung J-L (2012) A European Melting Pot of Harbour Porpoise in the French Atlan-

- tic Coasts Inferred from Mitochondrial and Nuclear Data. PLoS ONE 7: e44425. doi: 10.1371/journal.pone.0044425
- Amaral AR, Jackson JA, Möller LM, Beheregaray LB, Coelho MM (2012) Species tree of a recent radiation: The subfamily Delphininae (Cetacea, Mammalia). Molecular Phylogenetics and Evolution 64: 243–253. doi: 10.1016/j.ympev.2012.04.004
- Amaral AR, Sequeira M, Coelho MM (2007) A first approach to the usefulness of cytochrome c oxidase I barcodes in the identification of closely related delphinid cetacean species. Marine and Freshwater Research 58: 505–510. doi: 10.1071/MF07050
- Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. Molecular Ecology 13: 729–744. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW (2010) GenBank. Nucleic Acids Research 39 (Database), D32–D37. doi: 10.1093/nar/gkp1024
- Bérubé M, Aguilar A (1998) A new hybrid between a blue whale *Balaenoptera musculus* and a fin whale *B. physalus*: frequency and implications of hybridization. Marine Mammal Science 14: 82–98. doi: 10.1111/j.1748-7692.1998.tb00692.x
- Borisenko AV, Lim BK, Ivanova NV, Hanner RH, Hebert PDN (2008) DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. Molecular Ecology Resources 8: 471–479. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01998.x
- Borsa P (2006) Marine mammal strandings in the New Caledonia region, Southwest Pacific. Comptes Rendus Biologies 329: 277–288. doi: 10.1016/j.crv.2006.01.004
- Clare EL, Lim BK, Engstrom MD, Eger JL, Hebert PDN (2007) DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. Molecular Ecology Notes 7: 184–190. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01657.x
- Dawnay N, Ogden R, Mcewing R, Carvalho G, Thorpe R (2007) Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. Forensic Science International 173: 1–6. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.09.013
- Evans P, Hammond P (2004) Monitoring cetaceans in European waters. Mammal Review 34: 131–156. doi: 10.1046/j.0305-1838.2003.00027.x
- Felsenstein J (1989) PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). Cladistics 5: 164–166.
- Fontaine MC, Baird SJ, Piry S, Ray N, Tolley KA, Duke S, Birkun A, Ferreira M, Jauniaux T, Llavona Á, Öztürk BA, Öztürk A, Ridoux V, Rogan E, Sequeira M, Siebert U, Vikingsson GA, Bouqueneau J-M, Michaux J R (2007) Rise of oceanographic barriers in continuous populations of a cetacean: the genetic structure of harbour porpoises in Old World waters. BMC Biology 5: 30. doi: 10.1186/1741-7007-5-30
- Gaspari S, Airoidi S, Hoelzel AR (2006) Risso's dolphins (*Grampus griseus*) in UK waters are differentiated from a population in the Mediterranean Sea and genetically less diverse. Conservation Genetics 8: 727–732. doi: 10.1007/s10592-006-9205-y
- Geffen E, Anderson MJ, Wayne RK (2004) Climate and habitat barriers to dispersal in the highly mobile grey wolf. Molecular Ecology 13: 2481–2490. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02244.x
- Hajibabaei M, Singer GA, Clare EL, Hebert PDN (2007) Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. BMC Biology 5: 24. doi: 10.1186/1741-7007-5-24

- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hartl DL, Clark AG (2007) *Principles of Population Genetics*. Sinauer and Associates, Sunderland, MA.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 313–321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM (2004) Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology* 2: e312. doi: 10.1371/journal.pbio.0020312
- Jung J-L, Stéphan E, Louis M, Alfonsi E, Liret C, Carpentier F-G, Hassani S (2009) Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in north-western France: aerial survey, opportunistic sightings and strandings monitoring. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 89: 1045–1050. doi: 10.1017/S0025315409000307
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120. doi: 10.1007/BF01731581
- Kingston SE, Adams LD, Rosel PE (2009) Testing mitochondrial sequences and anonymous nuclear markers for phylogeny reconstruction in a rapidly radiating group: molecular systematics of the Delphininae (Cetacea: Odontoceti: Delphinidae). *BMC Evolutionary Biology* 9: 245. doi: 10.1186/1471-2148-9-245
- Kmiec B, Woloszyńska M, Janska H (2006) Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Current Genetics* 50: 149–159. doi: 10.1007/s00294-006-0082-1
- Lambert DM (2005) Is a Large-Scale DNA-Based Inventory of Ancient Life Possible? *Journal of Heredity* 96: 279–284. doi: 10.1093/jhered/esi035
- LeDuc RG, Perrin WF, Dizon AE (1999) Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome b sequences. *Marine Mammal Science* 15: 619–648. doi: 10.1111/j.1748-7692.1999.tb00833.x
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187
- Maltagliati F, Lai T, Casu M, Valdesalici S, Castelli A (2006) Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (IS-SRs). *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 626–634. doi: 10.1016/j.bse.2006.02.003
- McGowen MR (2011) Toward the resolution of an explosive radiation—A multilocus phylogeny of oceanic dolphins (Delphinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 60: 345–357. doi: 10.1016/j.ympev.2011.05.003
- Miralles L, Lens S, Rodriguez-Folgar A, Carrillo M, Martin V, Mikkelsen B, Garcia-Vazquez E (2013) Interspecific Introgression in Cetaceans: DNA Markers Reveal Post-F1 Status of a Pilot Whale. *PLoS ONE* 8: e69511. doi: 10.1371/journal.pone.0069511
- Mirimin L, Westgate A, Rogan E, Rosel P, Andrew R, Coughlan J, Cross T (2009) Population structure of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) in the North Atlantic Ocean as revealed by mitochondrial and nuclear genetic markers. *Marine Biology* 156: 821–834. doi: 10.1007/s00227-009-1147-8

- Mirimin L, Miller R, Dillane E, Berrow SD, Ingram S, Cross T, Rogan E (2011) Fine-scale population genetic structuring of bottlenose dolphins in Irish coastal waters. *Animal Conservation* 14: 342–353. doi: 10.1111/j.1469-1795.2010.00432.x
- Pauls SU, Nowak C, Bálint M, Pfenninger M (2012) The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Molecular Ecology* 22: 925–946. doi: 10.1111/mec.12152
- Peltier H, Baagøe HJ, Camphuysen KCJ, Czeck R, Dabin W, Daniel P, Deaville R, Haelters J, Jauniaux T, Jensen LF, Jepson PD, Keijl GO, Siebert U, Van Canneyt O, Ridoux V (2013) The Stranding Anomaly as Population Indicator: The Case of Harbour Porpoise *Phocoena phocoena* in North-Western Europe. *PLoS ONE* 8: e62180. doi: 10.1371/journal.pone.0062180
- Perrin WF, Rosel PE, Cipriano F (2013) How to contend with paraphyly in the taxonomy of the delphinine cetaceans? *Marine Mammal Science*. doi: 10.1111/mms.12051
- Ratnasingham S, Hebert PD (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7: 355–364. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x
- Shokralla S, Singer G, Hajibabaei M (2010) Direct PCR amplification and sequencing of specimens' DNA from preservative ethanol. *BioTechniques* 48: 233–234. doi: 10.2144/000113362
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673
- Thompson K, Baker CS, Van Helden A, Patel S, Millar C, Constantine R (2012) The world's rarest whale. *Current Biology* 22, R905–R906. doi: 10.1016/j.cub.2012.08.055
- Toews DPL, Brelsford A (2012) The Biogeography of Mitochondrial and Nuclear Discordance in Animals. *Molecular Ecology* 21: 3907–3930. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05664.x
- Tolley KA, Rosel PE (2006) Population structure and historical demography of eastern North Atlantic harbour porpoises inferred through mtDNA sequences. *Marine Ecology Progress Series* 327: 297–308. doi: 10.3354/meps327297
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution* 24: 110–117. doi: 10.1016/j.tree.2008.09.011
- Vincent C, Fedak M, McConnell B, Meynier L, Saintjean C, Ridoux V (2005) Status and conservation of the grey seal, *Halichoerus grypus*, in France. *Biological Conservation* 126: 62–73. doi: 10.1016/j.biocon.2005.04.022
- Viricel A, Rosel PE (2012) Evaluating the utility of COI for cetacean species identification. *Marine Mammal Science* 28: 37–62. doi: 10.1111/j.1748-7692.2010.00460.x

- Vollmer NL, Viricel A, Wilcox L, Moore MK, Rosel P (2011) The occurrence of mtDNA heteroplasmy in multiple cetacean species. *Current Genetics* 57: 115-131. doi: 10.1007/s00294-010-0331-1
- Ward RD, Hanner R, Hebert PDN (2009) The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology* 74: 329–356. doi: 10.1111/j.1095-8649.2008.02080.x
- Weckworth BV, Musiani M, Mcdevitt AD, Hebblewhite M, Mariani S (2012) Reconstruction of caribou evolutionary history in Western North America and its implications for conservation. *Molecular Ecology* 21: 3610–3624. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05621.x
- Wiemers M, Fiedler K (2007) Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology* 4: 8. doi: 10.1186/1742-9994-4-8
- Willis PM, Crespi BJ, Dill LM, Baird RW, Bradley Hanson M (2004) Natural hybridization between Dall's porpoises (*Phocoenoides dalli*) and harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *Canadian Journal of Zoology* 82: 828–834. doi: 10.1139/z04-059

Publication 7.

**Omura's whale off West Africa: autochthonous population or inter-oceanic
vagrant in the Atlantic Ocean?**

Jung J.-L.*, Mullié W.C.*, Van Waerebeek K.*, Wagne M.M., Samba Ould Bilal A., Ould Sidaty Z.A., Toomey L., Méheust E. & Marret F.

Marine Biology Research

12, 66-75

2016

* Co premiers auteurs



ORIGINAL ARTICLE

Omura's whale off West Africa: autochthonous population or inter-oceanic vagrant in the Atlantic Ocean?

Jean-Luc Jung^{a†}, Wim C. Mullié^{b†}, Koen Van Waerebeek^{c,d†}, Moulaye Mohamed Wagne^e, Abdellahi Samba Ould Bilal^e, Zein El Abidine Ould Sidaty^f, Lola Toomey^a, Eléonore Méheust^a and Frédéric Marret^b

^aLaboratoire BioGeMME, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France; ^bProgramme 'Biodiversité, Gaz, Pétrole', Nouakchott, Mauritania; ^cPeruvian Centre for Cetacean Research (CEPEC), Lima, Peru; ^dCOREWAM, Musée de la Mer de Gorée, Institut Fondamental d'Afrique Noir (IFAN), Université Cheikh Anta Diop (UCAD), Dakar, Senegal; ^eInstitut Mauritanien de Recherches Océanographiques et des Pêches (IMROP), Nouadhibou, Mauritania; ^fDirection du Parc National du Diawling (PND), Nouakchott, Mauritania

ABSTRACT

The surveillance of marine mammal strandings within the framework of a biomonitoring scheme for the Mauritanian coast led to the discovery in 2013 of a 3.98 m long, juvenile rorqual *Balaenoptera* sp. in an advanced state of decomposition near Chott Boul (16° 32.488'N, 016°27.0317'W). Photographs and skin samples were taken, but the specimen could not be collected. Based on limited morphological evidence, only *Balaenoptera edeni* and *B. omurai* were plausible. Sequences of three mtDNA regions, i.e. parts of the *cox1* and the *cytb* genes as well as the D-loop, for a total of 2636 bp (> 16% of the mitogenome) identified the specimen as an Omura's whale, *B. omurai*, the first record in the Atlantic Ocean and at least 11,400 km away from its closest known range in the SW Indian Ocean (Madagascar). The question of whether the specimen is a vagrant or belongs to an unrecognized Atlantic population is discussed. Advection by currents or transport on a ship's bow bulb following collision are discarded. Circumstances (juvenile status, great distance from Indo-Pacific, necessary inter-oceanic passage through cold temperate waters) may slightly favour the hypothesis that *B. omurai*, if rare, could be autochthonous in the Atlantic. Beach surveys remain a useful tool to assess trends in cetacean species composition, to detect unusual mortality events and to help assess the impacts of anthropogenic activities. This is particularly applicable to remote areas where the marine mammal fauna is poorly known and where fisheries effort is high, such as the Mauritanian coast.

ARTICLE HISTORY

Received 13 March 2015
Accepted 3 August 2015

RESPONSIBLE EDITOR

Rus Hoelzel

KEYWORDS

Balaenoptera omurai;
biodiversity monitoring;
DNA barcoding;
Mauritanian coast;
Programme 'Biodiversité,
Gaz, Pétrole'; rorqual

Introduction

The Canary Current is recognized as one of the four major eastern boundary upwelling areas of the world, located along the coasts of the Canary Islands, Morocco, Western Sahara, Mauritania, Senegal and The Gambia (Sherman 1995). Upwelled waters, rich in nutrients, lead to high primary productivity and consequently large stocks of fishes and cephalopods, attracting top predators. With cool coastal upwelling and offshore subtropical habitats juxtaposed, the cetacean fauna of Mauritania is highly diverse, consisting of at least 26 species, conservatively estimated from reported sightings and strandings (Maigret 1980; Robineau & Vély 1998; Perrin & Van Waerebeek 2012). This places Mauritania among West African coasts with the highest cetacean biodiversity immediately after Senegal and the Canary Islands (both 29 species). The biogeographical origin of this species assemblage

ranges from tropical to north temperate to cosmopolitan (Perrin & Van Waerebeek 2012).

Increasing use of the Mauritanian continental shelf by artisanal and industrial fisheries, as well as for oil and gas exploration and exploitation (IMROP 2013), but also increased maritime transport (Heij et al. 2013) with associated risks for the biodiversity, have led to the establishment in 2012 of the Programme 'Biodiversité, Gaz, Pétrole' (BGP), spearheaded by the Mauritanian Ministry of Environment in close cooperation with the Ministry of Fisheries and the Ministry of Oil. As a key component of the BGP Programme, an integrated marine and coastal biomonitoring project was launched in November 2012. Beach surveys are conducted every three months to monitor stranded cetaceans, turtles and birds along 390 km of the southern coast between the Senegalese border (16°6.4316'N, 016°30.6183'W) and Mamghar (19°21.2233'N, 016°30.8883'W), with less frequent

CONTACT Koen Van Waerebeek ✉ corewam@yandex.com ☎ Peruvian Centre for Cetacean Research, Museo de Delfines, Pucusana, Lima 20, Peru
†Co-first authors: Jean-Luc Jung, Wim C. Mullié, Koen Van Waerebeek.

visits to parts of the coast of the Banc d'Arguin National Park and limited transects along the Baie de Lévrier and the Atlantic coast of Cap Blanc, near Nouadhibou (Figure 1; Mullié et al. 2013). The remains of stranded cetaceans are most frequently found in an advanced state of decomposition and/or very incomplete or damaged, making species identification often difficult. Since August 2013, tissue or bone samples have been taken for molecular identification, using the DNA bar-coding approach as previously described (Alfonsi et al. 2013).

This paper describes a balaenopterid whale stranding on a South Mauritanian beach in 2013 that we have identified as an Omura's whale (*Balaenoptera omurai* Wada, Oishi & Yamada, 2003) based on mtDNA sequencing. Although Omura's whale was only recently described (Wada et al. 2003), its separate species status is now well established phylogenetically (Sasaki et al. 2006). Remarkably, the known distribution of Omura's whale was thought to be limited to the eastern Indian Ocean and the western Pacific Ocean

(Wada et al. 2003; Reilly et al. 2008), but recently a resident population was discovered off NW Madagascar (Cerchio et al. 2015). We discuss the key question of whether the Mauritanian specimen is a vagrant or whether *B. omurai* is also autochthonous in the Atlantic Ocean.

Materials and methods

Beach surveys

Beach surveys were conducted between Nouakchott and the Senegalese border (223 km) and between Nouakchott and Mamghar (165 km) in November 2012, February, April, August and November 2013 by two or three 4 × 4 vehicles.

The *Balaenoptera omurai* study specimen was found dead in an advanced state of decomposition on a public Mauritanian beach. A sample of the ventral skin was collected and stored in a cryo-vial with 90% ethanol for DNA analysis. It was shipped to France under CITES export permit no. 2014-001 of 27/03/2014 and CITES import permit no. FR1402900008-1 of 28/01/2014 provided by the designated authorities in Mauritania and France, respectively.

DNA-based analysis

All experiments were performed in a laboratory in which no previous work has been conducted on *Balaenoptera omurai* samples or DNA. The laboratory is organized in order to avoid cross-contamination between samples: DNA extractions and polymerase chain reaction (PCR) setups were performed, using sterile solutions and single-use plastic ware, in laminar flow hoods previously washed with 'DNA Away' solution (Molecular Bioproducts, San Diego, CA, USA) and regularly exposed to UV light. 'No DNA' controls were included in all PCR reactions. The risk of contamination by amplified PCR fragments was addressed by separating all pre-PCR and post-PCR experiments in different rooms. After PCR, the tubes were transported to another room and all following experiments (agarose gel electrophoresis, fragment purification, spectrophotometry dosing) were performed there. No material, plasticware, solutions or laboratory coats were shared between the two rooms. Genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen), following the instructions of the manufacturer. Two independent DNA extractions were realized from the MauBs sample. *Cox1* amplification was performed using the primers L5357 (5'cagtctaagcctactcgcc3')/H6090 (5'ggtagaattarratatavacttc3'; Viricel & Rosel 2012), the D-loop was amplified using primers L_Dlp1.5

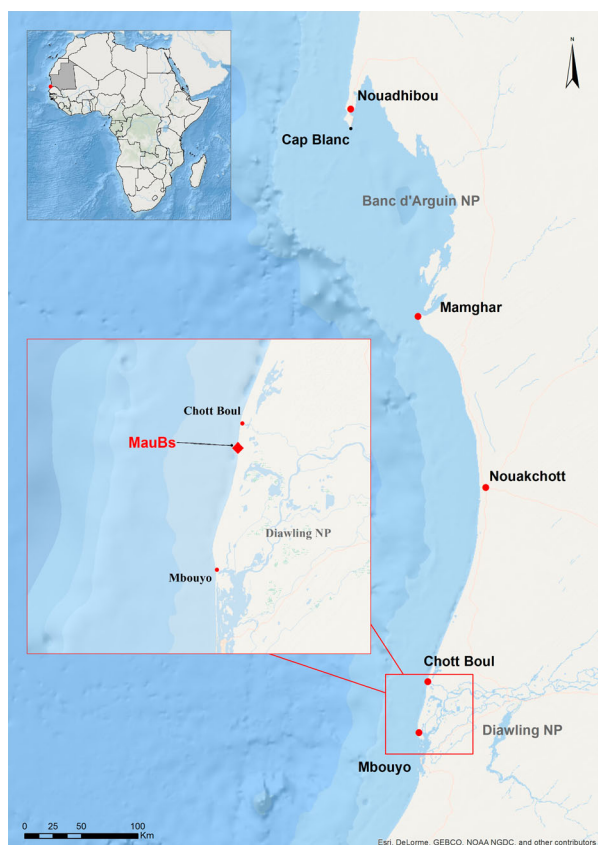


Figure 1. The coastal area of Mauritania covered by beach surveys. The coast was surveyed trimestrially from November 2012 until November 2013, from the Senegalese border to Mamghar, using four-wheel-drive vehicles and on foot for some hard-to-access zones. The position where specimen MauBs was found is marked.

(5'caccctaaagctgrattcta3')/H_Dlp8G (5'ggagtactatgtcctg taacca3'; Garrigue et al. 2004) and MCRf (5'acctcgtcttg taaacc3')/MCRr (5'taccaaataaatctcag3'; Alfonsi et al. 2012), and the *cytb* region was amplified using the primers *cytbs* (5'tgacttgaaraaccaycgttg3') and *cytbas* (5'ccttttcggtttacaagac3') described in LeDuc et al. (1999). All PCRs were performed in 50 µl reactions in the presence of 10 pmoles of each primer in the Hot-goldstar master mix ×1 (Eurogentec) with a final concentration of MgCl₂ of 2.5 mM. After an initial denaturation step of 10 min at 95°C, reactions comprised 35 cycles for MCRf–MCRr and L5357–H6090 and 40 cycles for L_Dlp1.5–H_Dlp8G and *cytbs*–*cytbas*. Each cycle was composed of three successive steps: denaturation for 30 s at 95°C; hybridization for 30 s at 50°C for L_Dlp1.5–H_Dlp8G and *cytbs*–*cytbas* and at 53°C for MCRf–MCRr and L5357–H6090; and extension at 72°C for 60 s. Reactions were ended by a final extension step of 10 min at 72°C. DNA sequencing was performed by a provider (GATC, Germany), using one of the PCR primers. All the fragments were sequenced on both strands. DNA fragments amplified from the two MauBs DNA extracts gave the same sequences.

Electropherograms were edited manually using the Sequence scanner software (Applied Biosystems) and sequences were grouped in a single Fasta file with Bioedit (Hall 1999). Similarity searches with databases of known sequences were performed for *cox1* using the Barcode of Life Data Systems (BOLD) interface (Ratnasingham & Hebert 2007), and for all three markers with the entire GenBank using BLAST searches (Johnson et al. 2008). We applied a maximum-likelihood (ML) approach to construct phylogenetic trees using an online phylogeny pipeline (Dereeper et al. 2008): DNA sequences were aligned using MUSCLE (Edgar 2004), ML trees were built with PhyML (Guindon & Gascuel 2003) using the default substitution model (HKY85) and the trees were drawn with TreeDyn (Chevenet et al. 2006). Support for the groupings was estimated with 100 bootstrap replications.

Results

Beach surveys, specimen analysis and sampling

On 3 November 2013 an unidentified juvenile baleen whale, *Balaenoptera* sp. (total length of 3.98 m), was found by two of the authors (WCM and ZAOS) some 7 km south of Chott Boul adjacent to the Diawling National Park (16°32.4883'N, 016°27.0317'W). Due to logistical limitations the specimen (referred to as MauBs) could neither be necropsied nor collected, hence no osteological study was possible. The

following *a posteriori* exclusion analysis of candidate rorqual species was based on photographs (Figure 2) and field notes.

With the carcass in an advanced decomposition (Code 4; Geraci & Lounsbury 1993), no colour pattern was discernible. Also, all baleen plates had detached from the palate and none were found at the stranding site, suggesting that the whale had washed ashore dead, possibly after floating for some time at sea. The anogenital area was damaged and sex could not be determined. The head showed a relatively narrow, pointed rostrum (Figure 2a,b), but less triangular than in minke whales. No head ridges were examined as the animal lay on its back. A minimum of 70 ventral pleats was estimated from the photos. The small body size and the non-U-shaped rostrum excluded *B. musculus* (Linnaeus, 1758) (neonatal SL 7–8 m), the small size and shape of the dorsal fin (Figure 2b) excluded *B. physalus* (Linnaeus, 1758) (neonatal SL 6–6.5 m), while size was also incongruent with *B. borealis* Lesson, 1828 (neonatal SL 4.5–4.8 m; Jefferson et al. 2008). A broad-based, more triangular than falcate dorsal fin (Figure 2d) was reminiscent of fins seen in some Bryde's whales. There was no indication of a conspicuously backwards-pointed dorsal fin, a feature Jefferson et al. (2008) and Cerchio et al. (2015) suggested as potentially characteristic for Omura's whale; however, this will require an (unavailable) intraspecific variation assessment. The apparently incomplete dorsal fin tip conceivably could have masked a more falcate shape.

The mandibles of MauBs appeared uncharacteristically slender for *B. brydei* (Sasaki et al. 2006). In addition, despite a body length compatible with *B. brydei* at a neonatal stage (4 m, Jefferson et al. 2008), the lack of a prominent umbilicus, suggesting post-neonatal status, also tended towards excluding this species.

The ventral pleats of MauBs extended far posteriad (Figure 2), beyond the tip of the flippers and probably beyond the umbilicus, in contrast with the very short pleats anteriad of the umbilicus in *B. borealis* (Jefferson et al. 2008) and probably also longer than the moderately short pleats in *B. acutorostrata* Lacépède, 1804 and *B. bonaerensis* Burmeister, 1867. While *B. acutorostrata* occurs at least as far south as Hann, Senegal (14°21'N, 17°27'W; Van Waerebeek et al. 1999), the most boreal record of Antarctic minke whale *B. bonaerensis* in the eastern Atlantic is a specimen from Togo, at 06°12.34'N, 01°29.64'E (Segniagbeto et al. 2014).

Despite the limited morphological evidence, only two rorqual species (*B. edeni* and *B. omurai*) remained



Figure 2. External morphology of rorqual specimen MauBs. (a) General view of carcass. (b) Detailed view of head. Note the elongated shape of the upper jaw, narrow at base, which differentiates it from the short, triangular and relatively wider-based upper jaw in minke whales. (c) Ventral view of flukes and tail stock. Note 3–4 deep transversal incisions with smooth borders on tail stock, evidently anthropogenic in origin. (d) Fairly triangular dorsal fin, long at insertion, reminiscent of some Bryde's whale fins. The fin tip appeared damaged and the original configuration remained unclear. (e) Detail view of numerous (minimum 70) long, ventral pleats, extending considerably posteriad of the flipper tips. The oval apertures in the integument were likely caused by ghost crab scavenging. Photograph: © Wim C. Mullié.

plausible candidates, both without known Atlantic distribution, thus pointing to a potentially unusual specimen.

Molecular identification of specimen MauBs

We amplified and sequenced three different mitochondrial regions from MauBs DNA: the 5' end of the *cox1* (cytochrome C oxidase subunit 1) gene (732 bp, GenBank accession number KM233839), part of the *cytb* (cytochrome b) gene (1106 bp, GenBank accession number KM233837) and 798 bp corresponding to the end of the tRNA-pro gene and to the D-loop (GenBank accession number KM233838). These three sequences represented a total of 2636 bp (more than 16% of the mitochondrial genome) and targeted the three most used markers in population genetics and species identification. 'No DNA' PCR controls were

always negative (no fragment amplified detected) and amplifications were reproducible between DNA extractions and between PCRs. The sequences were compared to the GenBank nucleotide database using a BLAST search (Johnson et al. 2008), and matched baleen whale sequences. For the three markers, results were unambiguous and gave a 99–100% match to *Balaenoptera omurai* sequences (Table I). All other tested mysticete sequences presented strong similarities, but clearly lower than with the *B. omurai* ones. We also used the identification engine of the Bar-coding of Life Database System, which made a species-level identification with a 100% probability of placement in the *B. omurai* species. We then reconstructed four maximum likelihood (ML) trees, based on *cox1*, *cytb*, D-loop and on the concatenation of the three regions, using GenBank sequences of one representative for each species of the rorqual family

Table 1. The sequences of the three markers determined from the MauBs specimen were blasted against the entire GenBank.

Sequences determined from Mauritanian specimen		Closest matches		Nearest neighbours, except the closest matches	
Marker	Length (bp)	Species (GenBank reference)	Identities (percentages)	Species (GenBank reference)	Average identity percentages
Cox1	732	<i>B. omurai</i> (AB201257.1, AB201256.1)	732/732 and 731/732 (100–99%), one non-synonymous transition	<i>B. edeni</i> (AB201258.1), <i>B. physalus</i> (KC572859.1), <i>B. musculus</i> (X72204.1), <i>B. borealis</i> (AP006470.1), <i>B. bonaerensis</i> (AP006466.1), <i>M. novaeangliae</i> (GQ353285.1)	93%
Cytb	1106	<i>B. omurai</i> (AB201257.1, AB201256.1)	1106/1106 and 1103/1106 (100–99%), 3 transitions, 2 synonymous and one non-synonymous	<i>B. borealis</i> (X75582.1), <i>B. edeni</i> (AB201258.1), <i>B. musculus</i> (X72204.1), <i>B. physalus</i> (KC572827.1)	91–92%
D-loop	798	<i>B. omurai</i> (AB201257.1, AB201256.1, AB116097.1, AB116096.1) 'B. edeni' (AF398372)	Between 798/798 and 706/710 (100–99%), 7 polymorphic positions (4 transitions, 2 transversions and 1 indel)	<i>B. edeni</i> (AB201258.1), <i>B. borealis</i> (AP006470.1), <i>B. brydei</i> (AP006469.1), <i>B. physalus</i> (AY582748.1)	91–92%

For the three markers, sequences of the complete mitochondrial genome of *Balaenoptera omurai* specimens gave the closest matches, with more than 99% of identities. The only exception was a D-loop sequence mislabelled as '*Balaenoptera edeni*' (AF398372), which was submitted in August 2001, before *B. omurai* was recognized, and has not been corrected. With the exception of these closest matches, the nearest neighbours (between 90% and 93% of identities) comprise the other members of the rorqual family (Balaenopteridae). One GenBank reference is given as an example for each species.

(Balaenopteridae, genera *Balaenoptera* and *Megaptera*). The four trees all formed a specific clade grouping MauBs and the *B. omurai* sequence, all supported by a 100% bootstrap (Figure 3). The BOLD identification engine, the BLAST search against GenBank and ML trees all produced very robust identifications of MauBs as a member of *B. omurai*. We also compared the sequence of MauBs to the diagnostic sites described by Rosel & Wilcox (2014) for a 305 bp fragment of the D-loop in the former Bryde's whale complex. All 13 diagnostic characters proposed for *B. omurai* share identical nucleotides with the MauBs sequence at these specific positions.

Discussion

Convincing comparative studies of a clade grouping the rorquals (Balaenopteridae), including the recently described *Balaenoptera omurai* (Wada et al. 2003), and the Eschrichtiidae, using mtDNA coding sequences and SINE (short interspersed repetitive element) insertions in nuclear DNA, led to the hypothesis of a separation in four lineages of the clade around 20 Mya (Sasaki et al. 2005, 2006; Nikaido et al. 2006). One of these lineages would comprise *B. omurai*, *B. edeni*, *B. brydei* (i.e. the former 'Bryde's whale complex'; Rice 1998; Sasaki et al. 2006), *B. musculus* and *B. borealis*. *B. omurai* diverged very early from the other species of the clade (around 17 Mya), making the history of the species ancient (Sasaki et al. 2006). All sequences of *B. omurai* contained in GenBank (holotype and all

other positively identified specimens (Wada et al. 2003, and see Sasaki et al. 2006 for a deciphering of samples before 2003) are almost identical, while at the same time markedly different from all other rorqual species sequences found in GenBank. Confident molecular identifications of *B. omurai* samples among all other species can therefore be performed relatively easily.

In contrast, *B. omurai* specimens are still difficult to identify morphologically as the current small sample of documented individuals does not yet allow an assessment of intraspecific variation. Small body size and the long ventral pleats of MauBs (Figure 2) helped to narrow down identification to two balaenopterid species (*B. edeni* and *B. omurai*), both unknown in the Atlantic Ocean. It is unclear whether a very falciform dorsal fin can help identify *B. omurai* specimens (Wada et al. 2003; Reilly et al. 2008). External (partially) diagnostic characters exist, with a dorsal fin and colouration pattern similar to the fin whale (Wada et al. 2003; Reilly et al. 2008; Cerchio et al. 2015), but the scarcity of the species may reinforce the difficulty of its identification in the field, either at sea or when stranded. The skull and postcranial skeleton offer additional clues, in particular the morphology of the synvertex, nasal area, maxillaries and mandibles (Wada et al. 2003).

The three mitochondrial markers analysed gave a 99% or greater match between the MauBs sample and *B. omurai*. The closer sequences found in other species presented more than 7% of divergence with

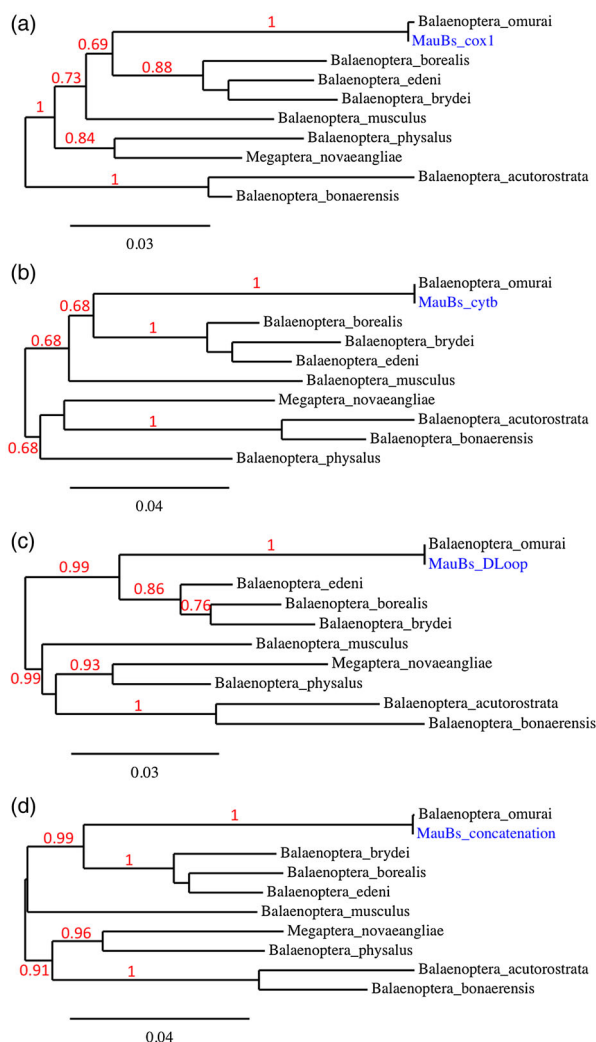


Figure 3. ML tree-based identification of specimen MauBs. Reference sequences were extracted from the complete mitochondrial genome sequences of *Balaenoptera omurai* (GenBank ref. AB201257.1), *B. borealis* (AP006470.1), *B. edeni* (AB201258.1), *B. brydei* (AP006469.1), *B. musculus* (X72204.1), *B. physalus* (KC572839.1), *B. acutorostrata* (AP006468.1), *B. bonaerensis* (AP006466.1) and *Megaptera novaeangliae* (AP006467.1). The sequences of three different markers (two partial coding sequences, *cox1* gene, 732 bp and the *cytb* gene, 1106 bp; and 798 bp comprising the D-loop) as well as their concatenation were aligned and ML trees constructed. The sequences of the specimen MauBs and of *B. omurai* group in monophyletic clades whichever marker is used. All these clades are supported by maxima bootstraps of 1. (a) ML tree based on *cox1* sequences, (b) ML tree based on *cytb* sequences, (c) ML tree based on D-loop sequences, (d) ML tree based on the concatenation of the three sequences. Bootstrap values superior to 0.65 are represented in red.

MauBs, whatever the region considered (at least 7% of divergence for the 5' part of *cox1* with the closest Balaenopteridae species, 8% for *cytb* and 9% for the D-loop). Phylogenetic trees based on each of the three markers and on their concatenation and, for

cox1, the use of the BOLD identification engine (Ratna-singham & Hebert 2007) also led to the unequivocal identification of MauBs as *B. omurai*. This was obviously strengthened by the use of the three targeted regions, providing a phylogenetic resolution that could be compared to the whole mitogenome (Duchêne et al. 2011). Thirteen diagnostic sites in the D-loop proposed for *B. omurai* by Rosel & Wilcox (2014) also confirm the identification. No *B. omurai* DNA has ever been manipulated or conserved in the BioGeMME laboratory in Brest (France) before the arrival of the MauBs sample, and no other laboratories in the building work with marine mammal DNA. For all practical purposes this ruled out the risk of contamination from exogenous sources of *B. omurai*.

Albeit highly unlikely, theoretically, interspecific introgression through hybridization between a female Omura's whale and another balaenopterid species might also explain *B. omurai* mtDNA. However, introgression is rarely documented in cetaceans (e.g. Miralles et al. 2013) and with the unique exception of blue whale × fin whale (Berubé & Aguilar 1998), hybrids in free-ranging cetaceans are exceptionally rare, if not unheard of, in most species. Specifically, there is no evidence that mid-sized balaenopterids, such as Bryde's, Eden's and Omura's whales, can hybridize and produce viable offspring. The sheer size of a hypothetical near-term foetus fathered by one of the three larger balaenopterids (blue, fin, sei) would most likely exceed the uterine capacity of a female Omura's whale, leading to abortion or premature parturition.

The known geographic range of *B. omurai*, based on limited data, was thought to be restricted to the tropical and subtropical waters between the eastern Indian Ocean and the western North Pacific Ocean (Wada et al. 2003; Yamada et al. 2006, 2008; Sasaki et al. 2006; Reilly et al. 2008). The species was described from specimens caught in the Sea of Japan (Wada et al. 2003), and molecular identification of archived specimens proved its presence in the Solomon Sea and around the Philippines (see Sasaki et al. 2006). *Balaenoptera omurai* specimens have also recently been observed with more or less confidence in the Komodo National Park (Jefferson et al. 2008), off the Cook Islands (WhaleResearch.org 2000), New Caledonia (Garrigue & Poupon 2013) and off North Australia (Wildlife Images 2009). Recently, Cerchio et al. (2015) studied and biopsied an apparently resident population of *B. omurai* off Madagascar, therefore extending the known range of the species into the SW Indian Ocean.

Specimen MauBs is the first *B. omurai* detected in the Atlantic Ocean and only two hypotheses can explain its presence. Either the whale was a long-

distance vagrant from the Indo-Pacific, or the species is autochthonous also in the Atlantic Ocean. The coasts of Mauritania are 11,400 km away from the closest determined geographical range, namely Madagascar (Cerchio et al. 2015). Long-range advection of a carcass carried by ocean currents can be confidently discarded, as well as a 'bow bulb draping' event following a ship strike. A global review showed that only larger cetaceans including blue, fin, sei, Bryde's and very rarely humpback whales occasionally become wedged across a ship's bow bulb following a direct collision and may thus be transported up to a few hundred kilometres from where it originated (Van Waerebeek et al. 2008). Significantly, no cases of bow bulb draping have been documented for minke whales nor for any other smaller cetacean (cf. 4 m of MauBs), presumably because short body length causes a carcass to slide off (Van Waerebeek et al. 2008). However, MauBs may still have died from a ship strike, but then in Mauritanian waters. Deep transversal incisions with smooth borders on the tail stock, evidently anthropogenic in origin, do not exclude that MauBs was a by-catch victim either.

Rorquals, being highly mobile animals, typically undertake seasonal migrations from cold waters where they focus on feeding to (sub)tropical waters used mainly for breeding and calving. *B. brydei* and *B. edeni* (Sasaki et al. 2006), although capable of moving over considerable distances, do not leave (sub)tropical waters. Whether *B. omurai* undertakes migration is unknown. Journeys of more than 8000 km are, for instance, demonstrated for humpback whales (Stone et al. 1990). However, these spectacular seasonal migrations occur most often along a north-south axis within the same ocean basin, although a few examples of interoceanic travels exist (Pomilla & Rosenbaum 2005).

While there are hardly any data about reproductive and growth parameters in *B. omurai*, such as size and age at weaning, the 3.98 m MauBs specimen was a juvenile which may or may not have been weaned, and a maternal female may have been present in the vicinity at the time of death. This age class or a mother-calf pair would seem unlikely candidates as long-distance vagrants. Moreover, an inter-oceanic migration would have required a cold-water passage either from the Indian Ocean (via Cape Agulhas) or the South Pacific (via Cape Horn) towards the North Atlantic Ocean. After an Arctic passage, a Cape Horn route is considered the least plausible, as it would assume crossing both the eastern Pacific and Atlantic Oceans. The sighting of a grey whale, *Eschrichtius robustus* (Lilljeborg, 1861), in the Mediterranean in

2010, for instance, suggests that long-distance Pacific-to-Atlantic baleen whale movements are possible (Scheinin et al. 2011). The very high level (99–100%) of sequence identities found in three mitochondrial markers (Table I) when comparing MauBs to *B. omurai* of the Indo-Pacific would be consistent, but not indicative, of vagrant status. In fact, the intraspecific level of mtDNA polymorphisms appears to be very low in *B. omurai*, as Cerchio et al. (2015) found only a single D-loop haplotype in 24 Omura's whales from Madagascar.

The alternative hypothesis, that MauBs might belong to an undescribed Atlantic population of *B. omurai*, may be at least as plausible as the vagrant explanation. Other individuals could have been encountered before, at sea or stranded, but were not recognized. The apparent scarcity of the species, its recent description, great morphological similarity to other small rorquals and its supposed Indo-Pacific range could all have contributed to making a positive identification difficult. The unexpected, simultaneous findings of *B. omurai* in Mauritania and Madagascar necessitate a profound critical revision of the global distribution and migratory behaviour of *B. omurai*. The Canary Current in general and the highly productive coasts of Mauritania in particular could represent a suitable year-round or occasional feeding and breeding ground.

The monitoring of marine mammal strandings continues to provide information of great value in regards to biodiversity. Local and global oceanographic and climatic events influence marine mammal stranding patterns, but accurate data can be obtained with appropriate protocols (Evans et al. 2005; Leeney et al. 2008; Jung et al. 2009; Camphuysen & Siemensma 2011; Mullié et al. 2013; Peltier et al. 2013). As suggested by several authors (Baker 2008; Alfonsi et al. 2013), DNA-based identifications of decomposed carcasses are highly relevant, especially for species that infrequently strand in remote locations and which are difficult to identify by field correspondents. Explorations of Mauritanian waters by oceanographic research vessels during the past decade have not only added many marine species new to science (e.g. De Matos-Pita & Ramil 2014), but even a completely unknown 400 km long cold-water coral ecosystem at a depth of 600 m (Colman et al. 2005). Therefore, the discovery of other species formerly not known to occur, such as Omura's whale, will undoubtedly follow and continue to highlight the exceptional biodiversity of the Canary Current ecosystem. Although a national stranding network does not exist in Mauritania, the trimestrial beach surveys of the BGP Programme have already

shown their use in cetacean biodiversity assessment and in documenting unusual mortality events (Mullié et al. 2013; Programme BGP, unpublished). Beach surveys, thanks to relatively simple logistics as compared to either aerial or ship-based surveys, will be maintained as a means of assessing temporal trends in the cetacean species composition, to detect unusually high mortality and to estimate the impacts of anthropogenic activities in Mauritanian waters.

Acknowledgements

We thank Jean-Philippe Gauthier-Placet-Nicolet for the preparation of Figure 1. WCM thanks Cherif Ahmed Ahmed Elmamy (ONISPA, Nouadhibou), Fatimatou Mint Yahya (ONISPA, Nouakchott), Oumar Ba (Nouakchott), Lematt Mint Hama (University of Tétouan, Morocco) Florence Dovillez and Younouss Kane (Programme BGP, Nouakchott) for their participation in the trimestrial monitoring missions. LJ thanks Marie-Dominique Jezequel for technical assistance in the laboratory, Sami Hassani and the marine mammal team of Océanopolis (Brest) for numerous discussions about cetaceans. Special thanks go to Chantal Hily-Mazé. We thank the Mauritanian government, and particularly the Ministry of Environment (Ministère de L'Environnement et du Développement Durable), the Ministry of Oil (Ministère du Pétrole de l'Energie et des Mines) and the Ministry of Fisheries (Ministère des Pêches et de l'Economie Maritime) for their joint initiative to promote sustainable development in the frame of the innovative Programme 'Biodiversité, Gaz, Pétrole'. Their efforts have been supported from the beginning by the German Cooperation GIZ (Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit GmbH), UNDP, IUCN and WWF, who also deserve our most sincere thanks. A special acknowledgement also goes to IMROP and ONISPA who, as national scientific institutions, are strongly committed to promoting biodiversity assessment and protection.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

The field costs were supported by the Mauritanian government using funds from GIZ and UNDP through the Programme 'Biodiversité, Gaz, Pétrole' (BGP) (www.programmebgbp.mr) (Project GIZ reference number 10.2044.5-005.00). Laboratory analyses were financed by the Université de Bretagne Occidentale (France) in the frame of 'ERCS' (Equipe reconnue par le Conseil Scientifique) programme for the BioGEMME laboratory.

References

Alfonsi E, Hassani S, Carpentier F-G, Le Clec'h J-Y, Dabin W, Van Canneyt O, et al. 2012. A European melting pot of harbour porpoise in the French Atlantic coasts inferred

from mitochondrial and nuclear data. PLoS ONE 7: e44425. doi:10.1371/journal.pone.0044425.t001. 11 pages.

Alfonsi E, Meheust E, Fuchs S, Carpentier FG, Quillivic Y, Viricel A, et al. 2013. The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast. ZooKeys 365:5–24. doi:10.3897/zookeys.365.5873.

Baker CS. 2008. A truer measure of the market: the molecular ecology of fisheries and wildlife trade. Molecular Ecology 17:3985–98.

Berubé M, Aguilar A. 1998. A new hybrid between a blue whale *Balaenoptera musculus* and a fin whale *B. physalus*: frequency and implications of hybridization. Marine Mammal Science 14:82–98.

Camphuysen K, Siemensma M. 2011. Conservation plan for the harbour porpoise *Phocoena phocoena* in The Netherlands: towards a favourable conservation status (No. 2011-07). Royal Netherlands Institute for Sea Research, Texel: NIOZ Report. p 1–186.

Cerchio S, Andrianantenaina B, Lindsay A, Rekdahl M, Andrianarivelo N, Rasoloarijao T. 2015. Omura's whales (*Balaenoptera omurai*) off northwest Madagascar: ecology, behavior and conservation needs. Royal Society Open Science 2:e150301. 19 pages.

Chevenet F, Brun C, Bañuls A-L, Jacq B, Christen R. 2006. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. BMC Bioinformatics 7:439–48.

Colman JG, Gordon DM, Lane AP, Forde MJ, Fitzpatrick JF. 2005. Carbonate mounds off Mauritania, Northwest Africa: status of deep-water corals and implications for management of fishing and oil exploration activities. In: Freiwald A, Roberts JM, editors. Cold-water Corals and Ecosystems. Berlin, Heidelberg: Springer, p 417–41.

De Matos-Pita SS, Ramil F. 2014. Squat lobsters (Crustacea: Anomura) from Mauritanian waters (West Africa), with the description of a new species of *Munidopsis*. Zootaxa 3765:418–34. doi:10.11646/zootaxa.3765.5.2

Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, et al. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Research 36:W465–W469. doi:10.1093/nar/gkn180.

Duchêne S, Archer FI, Vilstrup J, Caballero S, Morin PA. 2011. Mitogenome phylogenetics: the impact of using single regions and partitioning schemes on topology, substitution rate and divergence time estimation. PLoS ONE 6: e27138. doi:10.1371/journal.pone.0027138. 13 pages.

Edgar RC. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research 32:1792–97.

Evans K, Thresher R, Warneke RM, Bradshaw CJA, Pook M, Thiele D, et al. 2005. Periodic variability in cetacean strandings: links to large-scale climate events. Biology Letters 1:147–50.

Garrigue C, Poupon M. 2013. Guide d'identification des mammifères marins de Nouvelle-Calédonie. Nouméa: Opération cétacés. 128 pages.

Garrigue C, Dodemont R, Steel D, Baker SC. 2004. Organismal and 'gametic' capture-recapture using microsatellite genotyping confirm low abundance and reproductive autonomy of humpback whales on the wintering grounds of New Caledonia. Marine Ecology Progress Series 274:251–62.

- Geraci JR, Lounsbury VJ. 1993. Marine Mammals Ashore. A Field Guide for Strandings, 1st edition. Galveston, TX: Texas A&M University Sea, Grant College Program. 305 pages.
- Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52:696–704.
- Hall TA. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95–98.
- Heij C, Knapp S, Henderson R, Kleverlaan E. 2013. Ship incident risk around the heritage areas of Tubbataha and Banc d'Arguin. *Transportation Research Part D* 25:77–83.
- IMROP. 2013. Atlas maritime des zones vulnérables en Mauritanie, un appui à la gestion écosystémique et équitable. Nouadhibou, Institut Mauritanien de Recherches Océanographiques et des Pêches. Document Technique No. 8. 156 pages.
- Jefferson TA, Webber MA, Pitman RL. 2008. Marine Mammals of the World. A Comprehensive Guide to Their Identification. London: Academic Press, Elsevier. 573 pages.
- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research* 36(Suppl.2):W5–W9. doi:10.1093/nar/gkn201.
- Jung J-L, Stephan E, Louis M, Alfonsi E, Liret C, Carpentier FG, et al. 2009. Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in north-western France: aerial survey, opportunistic sightings and strandings monitoring. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 89:1045–50.
- LeDuc RG, Perrin WF, Dizon AE. 1999. Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full *cytochrome B* sequences. *Marine Mammal Science* 15:619–48.
- Leeney RH, Amies R, Broderick AC, Witt MJ, Loveridge J, Doyle J, et al. 2008. Spatio-temporal analysis of cetacean strandings and bycatch in a UK fisheries hotspot. *Biodiversity and Conservation* 17:2323–38.
- Maigret J. 1980. Les mammifères marins des côtes de Mauritanie. Etat des observations en 1980. *Bulletin du Centre National de Recherches Océanographiques et des Pêches, Nouadhibou* 10:81–85.
- Miralles L, Lens S, Rodriguez-Folgar A, Carrillo M, Martin V, Mikkelsen B, Garcia-Vasquez E. 2013. Interspecific introgression in cetaceans: DNA markers reveal post-F1 status of a pilot whale. *PLoS ONE* 8:e69511. doi:10.1371/journal.pone.0069511. 6 pages.
- Mullié WC, Wagne MM, Elmamry CAA, Yahya FM, Venn J, Van Waerebeek K. 2013. Large number of stranded harbour porpoises *Phocoena phocoena* as by-catch victims in Mauritania. International Whaling Commission, Jeju, Korea, Scientific Committee document SC/65a/HIM03. 5 pages.
- Nikaido M, Hamilton H, Makino H, Sasaki T, Takahashi K, Goto M, et al. 2006. Baleen whale phylogeny and a past extensive radiation event revealed by SINE insertion analysis. *Molecular Biology and Evolution* 23:866–73.
- Peltier H, Baagøe HJ, Camphuysen KCJ, Czeck R, Dabin W, Daniel P, et al. 2013. The stranding anomaly as population indicator: the case of harbour porpoise *Phocoena phocoena* in North-Western Europe. *PLoS ONE* 8:e62180. doi:10.1371/journal.pone.0062180. 14 pages.
- Perrin WF, Van Waerebeek K. 2012. The small-cetacean fauna of the west coast of Africa and Macaronesia: diversity and distribution. In: *Conserving Cetaceans and Manatees in the Western African Region*. CMS Technical Series 26: 7–17.
- Pomilla C, Rosenbaum HC. 2005. Against the current: an inter-oceanic whale migration event. *Biology Letters* 1:476–79.
- Ratnasingham S, Hebert PD. 2007. BOLD: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7:355–64.
- Reilly SB, Bannister JL, Best PB, Brown MJ, Brownell RL, Butterworth DS, et al. 2008. *Balaenoptera omurai*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. www.iucnredlist.org/details/136623/0 (accessed 26 July 2015).
- Rice DW. 1998. Marine Mammals of the World: Systematics and Distribution. Lawrence, KS: Society for Marine Mammalogy (Special Publication 4). 231 pages.
- Robineau D, V  ly M. 1998. Les cétacés des côtes de Mauritanie (Afrique du Nord-Ouest). Particularit  s et variations spatio-temporelles de répartition: role des facteurs oc  anographiques. *Revue Ecologique (Terre et Vie)* 53:123–52.
- Rosel PE, Wilcox AW. 2014. Genetic evidence reveals a unique lineage of Bryde's whales in the northern Gulf of Mexico. *Endangered Species Research* 25:19–34.
- Sasaki T, Nikaido M, Hamilton H, Goto M, Kato H, Kanda N, et al. 2005. Mitochondrial phylogenetics and evolution of mysticete whales. *Systematic Biology* 54:77–90.
- Sasaki T, Nikaido M, Wada S, Yamada TK, Cao Y, Hasegawa M, et al. 2006. *Balaenoptera omurai* is a newly discovered baleen whale that represents an ancient evolutionary lineage. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41:40–52.
- Scheinin AP, Kerem D, MacLeod CD, Gazo M, Chicote CA, Castellote M. 2011. Gray whale (*Eschrichtius robustus*) in the Mediterranean Sea: anomalous event or early sign of climate-driven distribution change? *Marine Biodiversity Records* 4:e28. 5 pages.
- Segniagbeto GH, Van Waerebeek K, Bowessidjaou JE, Ketoh K, Kpatcha TK, Okoumassou K, et al. 2014. Annotated checklist and fisheries interactions of cetaceans in Togo, with evidence of Antarctic minke whale in the Gulf of Guinea. *Integrative Zoology* 9:1–13.
- Sherman K. 1995. Achieving regional cooperation in the management of marine ecosystems: the use of the large marine ecosystem approach. *Ocean and Coastal Management* 29:165–85.
- Stone GS, Florez-Gonzalez L, Katona S. 1990. Whale migration record. *Nature* 346:705.
- Van Waerebeek K, André M, Sequeira M, Martín V, Robineau D, Collet A, et al. 1999. Spatial and temporal distribution of the minke whale, *Balaenoptera acutorostrata* (Lacépède, 1804), in the southern northeast Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea, with reference to stock identity. *Journal of Cetacean Research and Management* 1:223–37.
- Van Waerebeek K, Baker AN, Felix F, Gedamke J, Iniguez M. 2008. Vessel collisions with small cetaceans worldwide and with large whales in the Southern Hemisphere, an initial assessment. *Latin American Journal of Aquatic Mammals* 6:43–69.
- Viricel A, Rosel PE. 2012. Evaluating the utility of *cox1* for cetacean species identification. *Marine Mammal Science* 28:37–62.
- Wada S, Oishi M, Yamada TK. 2003. A newly discovered species of living baleen whale. *Nature* 426:278–81.

- Whaleresearch.org. 2000. Unidentified whale sighted 26 September, 2000, off the coast of Rarotonga, Cook Islands. http://www.whaleresearch.org/ourwork/mystery_whale.php (accessed 27 July 2015).
- Wildlife Images. 2009. Omura's whale. http://www.pbase.com/wildlifeimages/omuras_whale (accessed 27 July 2015).
- Yamada TK, Chou LS, Chantrapornsyl S, Adulyanukosol K, Chakravarti SK, Oishi M, et al. 2006. Middle sized balaenopterid specimens (Cetacea: Balaenopteridae) preserved at several institutions in Taiwan, Thailand and China. *Memoirs of the National Science Museum, Tokyo* 44:1–9.
- Yamada TK, Kakuda T, Tajima Y. 2008. Middle sized balaenopterid whale specimens in the Philippines and Indonesia. *Memoirs of the National Science Museum, Tokyo* 45:75–83.

Perspectives de mon travail de recherche

Les perspectives qui découlent de mes travaux de recherche se situent sur deux plans. Les études que j'ai menées en parallèle sur trois sites fréquentés par des baleines à bosse dans l'Hémisphère Sud, le Pacifique Nord et l'Atlantique Nord confirment bien que, malgré des efforts de recherche particulièrement importants conduits par la communauté scientifique internationale dans les dernières années, beaucoup reste à comprendre concernant la diversité génétique de l'espèce. Les nouvelles compréhensions concernant les relations entre culture et diversité génétique renforcent encore l'intérêt de ces études (Carroll et al. 2015 ; Whitehead 2017). Ma première perspective de travail se situe donc dans cet axe.

Les outils d'Ecologie Moléculaire que j'ai mis en œuvre pour analyser la biodiversité spécifique ouvrent la voie au deuxième volet de mes perspectives de travail. D'une part, le suivi de biodiversité des mammifères marins en Mauritanie se poursuit dans le cadre de la campagne globale du programme « *Biodiversité Gaz Pétrole* » selon les approches techniques déjà validées. D'autre part, je participe à deux collaborations mises en place récemment : l'une avec le Laboratoire SPYGEN (Le Bourget du Lac, France), spécialisé dans les suivis de biodiversité par des approches de type métabarcoding sur ADN environnemental (ADNe). Cette collaboration a pour but la mise au point de ces approches à l'étude des mammifères marins. D'autre part, mes thématiques de recherche me rapprochent naturellement de certaines études développées au Muséum National d'Histoire Naturelle, particulièrement de problématiques de systématique étudiées à la Station de Biologie Marine de Concarneau du MNHN par le Docteur Samuel Iglésias. Nous collaborons depuis deux années maintenant à l'étude de cas particuliers de taxonomie difficiles à résoudre de poissons osseux et cartilagineux.

Diversité intraspécifique des baleines à bosse.

La majeure partie de mon travail de mon travail actuel porte sur les baleines à bosse de Madagascar. Les échantillons récoltés lors des deux premières années du projet *Baobab* ont été complètement analysés, les résultats sont présentés dans ce mémoire. La partie expérimentale de l'analyse des autres échantillons est en voie d'achèvement, et l'exploitation génétique de ces résultats sera finalisée au courant de l'année 2018. En parallèle, les campagnes annuelles de biopsies sont prévues pour se poursuivre dans le canal de l'Ile Sainte-Marie de Madagascar et d'autres échantillons seront donc disponibles pour analyse dans les années à venir. De plus, des

protocoles optimisés de conservation des biopsies, incluant notamment l'utilisation de réactifs de stabilisation des tissus (type *RNAlater*, Qiagen, Valencia, Etat-Unis) ont été testés cette année (Elodie Labit, Laurène Trudelle, communication personnelle). Si ces tests sont fructueux, des projets incluant de l'analyse, ciblée ou globale, d'expression de gènes seront permis dans les prochaines années.

Récemment, une convention a été élaborée entre le Parc Naturel Marin de Mayotte et le Laboratoire BioGeMME dans le but de réaliser des campagnes de prélèvements non invasifs de squames de baleines à bosse (Figure 2). Ces prélèvements permettront d'estimer le degré de connexion effectif entre Madagascar et Mayotte. D'autres collaborations sont en cours de construction pour étendre les origines géographiques des prélèvements à d'autres régions voisines de Madagascar (notamment le Mozambique). Les résultats des analyses génétiques réalisées dans le cadre de ces études ont aussi pour but d'être comparés à ceux obtenus par d'autres groupes de recherche, et des collaborations sont en cours de construction, notamment avec la *Wildlife Conservation Society* (New York, Etats-Unis), très impliquée dans les études génétiques des baleines à bosse de l'Hémisphère Sud (Kershaw et al. 2017 ; Rosenbaum et al. 2017).

Au final, cette étude livrera une analyse génétique extensive, incluant plus de 500 biopsies de baleines à bosse réalisées dans un même site géographique très ciblé (Figure 19) plusieurs années consécutives, selon un protocole standardisé (les campagnes de prélèvements 2012 à 2017 sont d'ores et déjà réalisées). Après leur finalisation, les analyses génétiques livreront donc un état des lieux exhaustif, permettant d'estimer des taux de recapture génétique et donc de fidélité individuelle, les sex-ratios, les niveaux de diversité génétique, de réaliser des comparaisons à l'échelle de l'Hémisphère Sud grâce aux séquences publiées dans les banques de donnée. La série chronologique (six années successives déjà réalisées, plusieurs en prévision), associée au grand nombre de biopsies réalisées chaque année représente d'ores et déjà à ma connaissance la plus grande série temporelle de ce type réalisée.

Une autre exploitation des données de polymorphisme de l'ADN nucléaire sera réalisée : Contrairement aux orques ou aux cachalots par exemple (Whitehead, 2017), les baleines à bosse ne forment pas des groupes d'individus stables (Bettridge et al. 2015). Relativement peu d'études génétiques recherchent et analysent donc l'existence de liens de parentés entre baleines à bosse échantillonnées sur un même site. Lorsque cela a été réalisé, les résultats peuvent sembler contrastés : Pomilla & Rosenbaum (2006) et Cypriano-Souza et al. (2010) n'ont pas mis en évidence de relations familiales particulières dans des groupes sociaux des zones de reproduction au large, respectivement, du Gabon et du Nord du Madagascar ainsi que du Brésil. Par contre,

une fréquence élevée de relations parents/enfants a été mise en évidence dans un site d'alimentation intermédiaire de l'ouest de l'Afrique du Sud (Barendse et al. 2013) et dans un site de reproduction en Nouvelle Calédonie (Garrigue et al. 2004). Les données exhaustives et la série temporelle remarquable représentée par les prélèvements réalisés dans le cadre des programmes *Baobab* et *Generation* permettra de réaliser une recherche de liens de parentés sur un même site de reproduction présentant une forte diversité génétique, plusieurs années successives, et avec un nombre très significatif d'individus. Cela permettra d'estimer la fidélité pour la zone de reproduction transmise au travers des générations, et de détecter, si elles existent, des différences entre mâles et femelles (*i.e.*, les mâles présenteront-ils moins de liens familiaux que les femelles avec l'ensemble des baleines à bosse échantillonnées).

Un autre volet de la poursuite de ce travail pourra être représenté par la construction de nouveaux projets, successeurs de *Baobab* et *Generation*, visant à étudier les zones d'alimentation des baleines à bosse de Madagascar. Notamment, les îles Crozet ont été identifiées comme destination transitoire de baleines à bosse marquées à l'aide de balises Argos à Madagascar (Cerchio et al. 2016 ; Trudelle et al. 2016) et aux Comores (Fossette et al. 2014). La fidélité pour cette zone, son caractère transitoire ou non dans la migration, l'existence d'autres destinations plus antarctiques restent à déterminer.

Les travaux déjà menés à Saint-Pierre-et-Miquelon seront intégrés aux démarches globales menées par le Laboratoire du Professeur Per Palsboll (Université de Groningen, Pays-Bas) qui porte un projet d'étude génétique des baleines à bosse de l'Atlantique Nord. Un projet local incluant des campagnes récurrentes de prélèvements de biopsies de baleines à bosse à Saint-Pierre-et-Miquelon, porté par l'Institut des Neurosciences Paris-Saclay, a déjà été construit en collaboration avec le laboratoire BioGeMME, la DTAM (Direction des Territoires, de l'Alimentation et de la Mer) et les associations de science participative locales. Ce projet met en avant l'étude des baleines à bosse en tant qu'espèce indicatrice de changements potentiels du milieu marin, et il a donc particulièrement pour but d'identifier des impacts éventuels des activités anthropiques. Une première demande de financement n'a pas abouti et elle sera réitérée.

Les travaux menés dans le Pacifique Nord sont d'ores et déjà intégrés aux résultats globaux du programme *SPLASH*. D'autres cas potentiels de fidélité pour des sites géographiques très restreints et/ou d'associations récurrentes d'individus identiques ont déjà été mis en évidence dans d'autres régions du Pacifique Nord (Wright et al. 2015 ; Adam Pack, Université d'Hawaï, Etats-Unis, communication personnelle). Ces cas pourront faire l'objet d'études génétiques

spécifiques, afin de déterminer si des fidélités géographiques très ciblées peuvent représenter un cas plus répandu que pensé dans le Pacifique Nord.

Les analyses de parentés semblent aussi particulièrement pertinentes à réaliser dans ce cas là, par exemple entre les baleines à bosse échantillonnées à Karaginsky et aux îles Commandeur.

Etude de la diversité spécifique : listes de mammifères marins en Mauritanie, participation à la mise au point des approches d'ADNe pour les mammifères marins, et étude de problématiques taxonomiques particulières

Le programme « Biodiversité Gaz Pétrole » est un programme de l'Etat Mauritanien, financé par des fonds internationaux, notamment par la GIZ (« *Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit* », Agence de coopération internationale allemande). Un étudiant Mauritanien, Oumar Ba, effectue sa thèse à l'Université de Nouakchott (Mauritanie) dans le cadre de ce programme. Il est co-encadré par le Professeur Zeinebou Sidoumou (Université de Nouakchott) et par moi-même pour la partie moléculaire de son travail.

Oumar Ba a obtenu un soutien de Campus France pour effectuer des séjours au Laboratoire BioGeMME afin de mettre en œuvre les identifications d'échantillons de mammifères marins grâce à des approches de type « code-barre » ADN.

Des catalogues de diversité spécifique de mammifères marins tels que représentée par les événements d'échouages pourront donc être dressés sur une période de plusieurs années, permettant de mettre en évidence d'éventuelles variations de cette diversité spécifique, reflètes probables d'impacts d'activité humaine dans cette région fortement exploitée (Mullié et al. 2014).

Les approches de *metabarcoding* sont une extension des identifications d'espèces par code barre ADN *sensu lato* (Valentini et al. 2009), telle que nous les utilisons au Laboratoire BioGeMME pour l'identification des mammifères marins (Alfonsi et al. 2013 ; Jung et al. 2016, projet en cours en Mauritanie). Appliquées à l'analyse de prélèvements d'ADNe, elles représentent une méthode particulièrement efficace pour évaluer le nombre et la nature des espèces de différents taxons présentes dans un environnement donné (Taberlet et al. 2012). Rendre cette méthode applicable à l'étude des mammifères marins implique plusieurs étapes de mises au point, certaines portant sur les spécificités du milieu marin et sur le travail en conditions de terrain (volume, conditions, standardisation et stabilisation des prélèvements d'eau de mer), d'autres sur

les techniques d'analyse et de séquençage, et enfin sur la définition d'une banque de données de séquences de référence, dans laquelle seront représentées autant d'espèces de mammifères marins que possible. La possibilité d'identifier chaque espèce et de la distinguer de ses plus proches voisins devra avoir été estimée préalablement. Ce point risque d'être difficile à respecter pour un taxon de cétacés particulier, la sous-famille des Delphininae, au sein de laquelle les espèces sont difficiles à discriminer sur la base de différences de séquences d'ADN mitochondrial (Viricel & Rosel 2012 ; Alfonsi et al. 2013). Pour d'autres, par exemple les rorquals, les distinctions d'espèces seront certainement plus aisées (Jung et al. 2016).

La mise au point nécessitera aussi de définir des sites tests d'échantillonnage en milieu naturel, qui permettront de calibrer le protocole en entier et le valider.

Ce projet global fait l'objet d'une convention de collaboration scientifique entre le Laboratoire BioGeMME et le Laboratoire SPYGEN (Le Bourget du Lac, France). Ma participation à cette collaboration portera essentiellement sur l'étape d'obtention et de définition de la banque de séquences de références, sur l'identification des taxons difficiles à discriminer les uns des autres, et sur la proposition de sites tests d'expérimentation. Parmi d'autres sites possibles, le canal Sainte-Marie de Madagascar présente clairement un grand nombre d'avantages (présence de plusieurs espèces de mammifères marins confirmable par l'observation, faible profondeur de l'eau et bateau scientifique disponible sur place notamment), et pourra donc représenter un site test particulièrement pertinent.

Le troisième élément de perspective ouvert par cet aspect de mes travaux repose sur une collaboration avec la station de Biologie Marine du MNHN de Concarneau. Samuel Iglesias, Maître de Conférences au MNHN, est un spécialiste de la systématique des poissons osseux et cartilagineux. Il est le porteur du projet ICCANAM (« *Identification and Classification of Chondrichthyans and Actinopterygians from the North-eastern Atlantic and the Mediterranean* »). Les démarches moléculaires d'identification d'espèces et de génétique des populations que j'applique aux mammifères marins sont aussi pertinentes pour certaines des problématiques sur lesquelles il travaille. Un cas particulièrement intéressant est présenté par des espèces de poissons dites « amphiatlantiques », inféodées à leur substrat et pourtant distribuées à l'est et à l'ouest de l'Atlantique. Dans le genre *Abudefduf*, par exemple, *A. saxatilis* est retrouvé au Cap Vert et en Guadeloupe, et *A. hoefleri* est représenté au Cap-Vert. La limite d'espèces

entre *A. saxatilis* et *A. hoefleri* a été remise en question dans le cadre du projet ICCANAM.

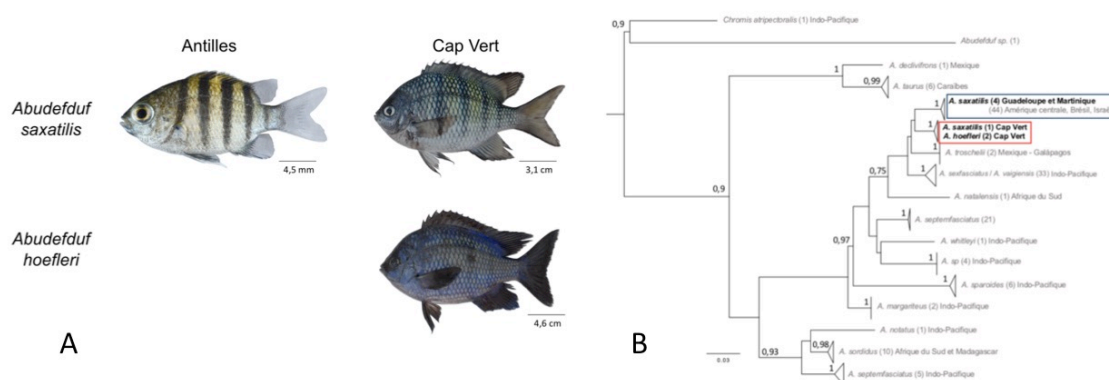


Figure 32 : (A) Photographie de spécimens utilisés lors de cette étude et (B) arbre phylogénétique établi par maximum de vraisemblance sur la base des polymorphismes de la séquence du gène mitochondrial codant pour la sous-unité 1 de la Cytochrome Oxydase (CO1). Figure extraite du rapport de master de Mathilde Martin, 2017

A. Les spécimens représentés ont été prélevés dans le cadre du programme ICCANAM dans le milieu naturel par Samuel Iglésias (MNHN). **B.** Les séquences de CO1 des différentes espèces du genre *Abudefduf* contenues dans les bases de données ont été comparées entre elles et avec celles déterminées dans le cadre de cette étude. Le cadre bleu met en évidence le clade formé par les *A. saxatilis* échantillonnés dans les Antilles (cette étude), au Brésil, en Amérique Centrale et en Israël. Le cadre rouge identifie le clade regroupant les *A. saxatilis* et *A. hoefleri* du Cap Vert.

Nous avons comparés entre eux et avec les données contenues dans la Genbank plusieurs marqueurs mitochondriaux et nucléaires chez des spécimens d'*A. saxatilis* collectés en Guadeloupe, en Martinique et au Cap Vert, et d'*A. hoefleri* prélevés au Cap Vert lors du projet ICCANAM. Une étudiante de Master 1, Mathilde Martin, a effectué ces comparaisons dans le cadre de son stage. Les résultats semblent montrer que les spécimens d'*A. saxatilis* et d'*A. hoefleri* du Cap Vert appartiendraient à un même clade, distinct de celui formé par les *A. saxatilis* de l'ouest de l'Atlantique. La remise en cause de la distinction d'espèces entre *A. saxatilis* et *A. hoefleri* apparaît donc comme particulièrement justifiée. La découverte de quatre *A. saxatilis*, prélevés près des côtes Israéliennes et dont la séquence du gène CO1 est publiée dans la Genbank, qui se retrouvent inclus dans le clade des *A. saxatilis* de l'ouest de l'Atlantique est particulièrement intéressante aussi. Leur présence à l'est de la Méditerranée peut être expliquée par une intervention humaine, certainement accidentelle, ou par un transport passif au stade larvaire.

Ce type de problématique rapproche naturellement mes thématiques de recherche de celles développées au MNHN, et la collaboration développée dans ce cadre se révèle très fructueuse. Elle sera, c'est mon souhait, amenée à se développer dans les années prochaines.

Références Bibliographiques

- Acebes JM, Darling JD, Yamaguchi M (2007) Status and distribution of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in northern Luzon, Philippines. *Journal of Cetacean Research and Management (Special Issue)*, **9**, 37–43.
- Aguilar A, Borrell A, Reijnders PJH (2002) Geographical and temporal variation in levels of organochlorine contaminants in marine mammals. *Marine Environmental Research*, **53**, 425–452.
- Alfonsi E, Hassani S, Carpentier F-G, Le Clec'h J-Y, Dabin W, Van Canneyt O, Fontaine MC, Jung J.-L. (2012) A European melting pot of harbour porpoise in the french Atlantic coasts inferred from mitochondrial and nuclear data *PLoS ONE*, **7**, e44425.
- Alfonsi E, Méheust E, Fuchs S, Carpentier F-G, Quillivic Y, Viricel A, Hassani S, Jung J-L (2013) The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast. *ZooKeys*, **365**, 5–24.
- Allen J, Weinrich M, Hoppitt W, Rendell L (2013) Network-based diffusion analysis reveals cultural transmission of lottail feeding in humpback whales. *Science* **340**: 485–488.
- Allendorf FW, Laikart G, Aitken SN (2013) *Conservation and the Genetics of Populations (second edition)*. Wiley-Blackwell Publishing, Chichester, UK
- Amaral AR, Loo J, Jaris H *et al.* (2016) Population genetic structure among feeding aggregations of humpback whales in the Southern Ocean. *Marine Biology*, **163**, 1–13.
- Andersen LW, Born EW, Gjertz O *et al.* (1998) Population structure and gene flow of the Atlantic walrus (*Odobenus rosmarus rosmarus*) in the eastern Atlantic Arctic based on mitochondrial DNA and microsatellite variation. *Molecular Ecology*, **7**, 1323–1336.
- Anderson MJ (2013) Genetic connectivity within Eastern Australian humpback whales and their relationship to adjacent South Pacific and Indian Ocean stocks. *PhD thesis, Southern Cross University, Lismore, NSW.*, 1–285.
- Andruszkiewicz EA, Starks HA, Chavez FP *et al.* (2017) Biomonitoring of marine vertebrates in Monterey Bay using eDNA metabarcoding. *PLoS ONE*, **12**, e0176343–20.
- Archer Fi, Morin Pa, Hancock-Hanser BI *et al.* (2013) Mitogenomic phylogenetics of fin whales (*Balaenoptera physalus* spp.): genetic evidence for revision of subspecies. *PLoS ONE*, **8**, e63396–10.
- Atkinson A, Siegel V, Pakhomov E, Rothery P (2004) Long-term decline in krill stock and increase in salps within the Southern Ocean. *Nature*, **432**, 100–103.
- Attard CRM, Beheregaray LB, Möller LM (2016) Towards population-level conservation in the critically endangered Antarctic blue whale: the number and distribution of their populations. *Scientific Reports*, **6**:22291, 1–11.
- Baker CS, Perry A, Herman LM (1987) Reproductive histories of female humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the North Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, **41**, 103–114.

- Baker CS, Palumbi SR, Lambersten RH *et al.* (1990) Influence of seasonal migration on geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in humpback whales. *Nature*, **344**, 238–240.
- Baker CS, Perry A, Bannister JL *et al.* (1993) Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 8239–8243.
- Baker CS, Florez-Gonzalez L, Abernethy RB *et al.* (1998) Mitochondrial DNA variation and maternal gene flow among humpback whales of the Southern Hemisphere. *Marine Mammal Science*, **14**, 721–737.
- Baker CS, Medrano-Gonzalez L (2002) World-wide distribution and diversity of humpback whale mitochondrial DNA lineages. Pages 84–99 in C.J. Pfeiffer, ed. *Cell and molecular biology of marine mammals*. Krieger Publishing Co., Inc, Melbourne, FL
- Baker CS, Lukoschek V, Lavery S *et al.* (2006) Incomplete reporting of whale, dolphin and porpoise “bycatch” revealed by molecular monitoring of Korean markets. *Animal Conservation*, **9**, 474–482.
- Baker CS (2008) A truer measure of the market: the molecular ecology of fisheries and wildlife trade. *Molecular Ecology*, **17**, 3985–3998.
- Baker CS, Steel D, Calambokidis J *et al.* (2013) Strong maternal fidelity and natal philopatry shape genetic structure in North Pacific humpback whales. *Marine Ecology Progress Series*, **494**, 291–306.
- Bamy IL, Van Waerebeek K, Bah SS *et al.* (2010) Species occurrence of cetaceans in Guinea, including humpback whales with southern hemisphere seasonality. *Marine Biodiversity Records*, **3**, 1–11.
- Barendse J, Best PB, Carvalho I, Pomilla C (2013) Mother knows best: occurrence and associations of resighted humpback whales suggest maternally derived fidelity to a southern hemisphere coastal feeding ground. *PLoS ONE*, **8**, e81238–15.
- Barlow J, gisiner R (2006) Mitigating, monitoring and assessing the effects of anthropogenic sound on beaked whales. *Journal of Cetacean Research and Management (Special Issue)*, **7**, 239–249.
- Barlow J, Calambokidis JH, Falcone EA *et al.* (2011) Humpback whale abundance in the North Pacific estimated by photographic capture-recapture with bias correction from simulation studies. *Marine Mammal Science*, **27**, 793–818.
- Bearzi G (2000) First report of a common dolphin (*Delphinus delphis*) death following penetration of a biopsy dart. *Journal of Cetacean Research and Management (Special Issue)*, **2**, 217–221.
- Bérubé M, Jorgensen H, McEwing R, Palsbøll PJ (2000) Polymorphic di-nucleotide microsatellite loci isolated from the humpback whale, *Megaptera novaeangliae*. *Molecular Ecology*, **9**, 2155–2234.
- Best PB, Findlay KP, sekiguchi K *et al.* (1998) Winter distribution and possible migration routes of humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the southwest Indian Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, **162**, 287–299.
- Bettridge S, Baker CS, Barlow J *et al.* (2015) Status review of the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) under the endangered species act. NOAA Technical Memorandum NMFS, 1–263.
- Boehme L, Thompson D, Fedak M *et al.* (2012) How many seals were there? The global shelf loss during the last glacial maximum and its effect on the size and distribution of grey seal populations. *PLoS ONE*, **7**, e53000–10.
- Borowski GH (1781) *Gemeinnützige Naturgeschichte des Thierreichs*. **1**, 1–21.
- Bouveroux T, Kiszka JJ, Heithaus MR, Jauniaux T, Pezeril S (2014) Direct evidence for gray seal (*Halichoerus grypus*) predation and scavenging on harbor porpoises (*Phocoena phocoena*). *Marine Mammal Science*, **30**, 1542–1548.
- Bowen BW, Karl SA (2007) Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molecular Ecology*, **16**, 4886–4907.
- Brown MW, Kraus SD, Gaskin DE, Gaskin (1991) Reaction of north Atlantic right whales (*Eubalaena glacialis*) to skin biopsy sampling for genetic and pollutant analysis. *Reports of the International Whaling Commission, Special Issue*, 81–90.
- Burg TM, Trites AW, J SM (1999) Mitochondrial and microsatellite DNA analyses of harbour seal population structure in the northeast Pacific Ocean. *Canadian Journal of Zoology*, **77**, 930–943.
- Burns D, Brooks L, Harrison P *et al.* (2013) Migratory movements of individual humpback whales photographed off the eastern coast of Australia. *Marine Mammal Science*, **30**, 562–578.
- Calambokidis J, Falcone EA, Quinn TJ, Burdin AM *et al.* (2008) SPLASH: Structure of populations, levels of abundance and status of humpback whales in the North Pacific. US Department of Commerce, Western Administrative Center, Seattle, WA

- Camphuysen K (2004) The return of the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in Dutch coastal waters. *Lutra*, **47**, 113–122.
- Cantor M, Cachuba T, Fernandes L, Engel MH (2010) Behavioural reactions of wintering humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) to biopsy sampling in the western South Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **90**, 1701–1711.
- Carroll EL, Baker CS, Watson M *et al.* (2015) Cultural traditions across a migratory network shape the genetic structure of southern right whales around Australia and New Zealand. *Scientific Reports*, **5**, doi:10.1038/srep16182, 1–13.
- Cato DH, J NM, Dunlop RA *et al.* (2013) A study of the behavioural response of whales to the noise of seismic air guns: design, methods and progress. **41**, 88–97.
- Caudal P, Hacala A (2017) *Rapport sur les base de données de Mammifères Marins*, FNE Saint-Pierre-et-Miquelon. FNE SPM - BioGeMME
- Cazau D, Adam O, Aubin T, Laitman JT, Reidenberg JS (2016) A study of vocal nonlinearities in humpback whale songs: from production mechanisms to acoustic analysis. *Scientific Reports*, 1–12.
- Cerchio S, Ersts PJ, Pomilla C (2009) *Updated estimates of abundance for humpback whale breeding stock C3 off Madagascar, 2000-2006. Paper SCSH presented to the IWC Scientific Committee*
- Cerchio S, Strindberg S, Collins T, Bennett C, Rosenbaum H (2014) Seismic surveys negatively affect humpback whale singing activity off northern Angola. *PLoS ONE*, **9**, e86464–11.
- Cerchio S, Trudelle L, Zerbini AN *et al.* (2016) Satellite telemetry of humpback whales off Madagascar reveals insights on breeding behavior and long-range movements within the southwest Indian Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, **562**, 193–209.
- Clapham PJ, Mead JG (1999) *Megaptera novaeangliae*. *Mammalian Species*, **604**, 1–9.
- Committee on Taxonomy (2016) *List of marine mammal species and subspecies*. Society for Marine Mammalogy, www.marinemammalscience.org. Consultée le 23 aout 2017.
- Cook CN, Sgrò CM (2017) Aligning science and policy to achieve evolutionarily enlightened conservation. *Conservation Biology*, **31**, 501–512.
- Cotter MP, Maldini D, Jefferson TA (2011) “Porpoicide” in California: Killing of harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) by coastal bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Marine Mammal Science*, **28**, E1–E15.
- Crain DD, Friedlaender AS, Johnston DW *et al.* (2013) A quantitative analysis of the response of short-finned pilot whales, *Globicephala macrorhynchus*, to biopsy sampling. *Marine Mammal Science*, **30**, 819–826.
- Creanza N, Kolodny O, Feldman MW (2017) Cultural evolutionary theory: How culture evolves and why it matters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**, 7782–7789.
- Cypriano-Souza AL, Fernandez GP, Lima-Rosa CAV, Engel MH, Bonatto SL (2010) Microsatellite genetic characterization of the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) breeding ground off Brazil (Breeding Stock A). *Journal of Heredity*, **101**, 189–200.
- Cypriano-Souza AL, Engel MH, Caballero S *et al.* (2017) Genetic differentiation between humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) from Atlantic and Pacific breeding grounds of South America. *Marine Mammal Science*, **33**, 457–479.
- Dalebout ML, Scott Baker C, Steel D *et al.* (2014) Resurrection of *Mesoplodon hotaula* Deraniyagala 1963: A new species of beaked whale in the tropical Indo-Pacific. *Marine Mammal Science*, **30**, 1081–1108.
- Dalton R (2010) Endangered-porpoise numbers fall to just 250. *Nature*, **465**, 674–675.
- Darling JD, Cerchio S (1993) Movement of a humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) between Japan and Hawaii. *Marine Mammal Science*, **9**, 84–89.
- Darling JD, Souza-Lima R (2005) Songs indicate interaction between humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) populations in the western and eastern south atlantic ocean. *Marine Mammal Science*, **21**, 557–566.
- Davidson AD, Boyer AG, Kim H *et al.* (2012) Drivers and hotspots of extinction risk in marine mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 3395–3400.
- Dawbin WH (1966) *The seasonal migratory cycle of humpback whales*. In Norris KS ed Whales, dolphins, and porpoises. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- de Bruyn PJN, Tosh CA, Terauds A (2013) Killer whale ecotypes: is there a global model? *Biological Reviews*, **88**, 62–80.

- Decker C, Hassani S, Jezequel M, Rault C, Dumas C, Meheust E, Alfonsi E, Jung J-L (2017) Mitochondrial DNA reveals historical maternal lineages and a postglacial expansion of the grey seal in European waters. *Marine Ecology Progress Series*, 566:217-227.
- Delfour F, Méheust E, Adam O, Mercera B, Jung J-L. 2014. Optimizing Non-Invasive sampling for genetic studies of marine mammals. 42nd Annual EAAM Symposium. Puerto de la Cruz, Tenerife, Espagne.
- Desmarts A (2002) Les immigrations basques aux Amériques. *Le Naturaliste Canadien*, **126**, 100–104.
- Dulau-Drouot V, Boucaud V, Rota B (2008) Cetacean diversity off La Réunion Island (France). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **88**, 312–10.
- Dulau V, Pinet P, Geyer Y *et al.* (2017) Continuous movement behavior of humpback whales during the breeding season in the southwest Indian Ocean: on the road again!, *Movement Ecology*, **5**, 1–18.
- El Moussaoui Z (2017) *Etude de la diversité génétique des baleines à bosse à Saint-Pierre-et-Miquelon*. Rapport de Master 2 GGB, Université de Brest.
- Engel MH, Fagundes NJR, Rosenbaum HC *et al.* (2008) Mitochondrial DNA diversity of the Southwestern Atlantic humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) breeding area off Brazil, and the potential connections to Antarctic feeding areas. *Conservation Genetics*, **9**, 1253–1262.
- Engel MH, Martin AR (2009) Feeding grounds of the western South Atlantic humpback whale population. *Marine Mammal Science*, **25**, 964–969.
- Engelhaupt D, Hoelzel RA, Nicholson C *et al.* (2009) Female philopatry in coastal basins and male dispersion across the North Atlantic in a highly mobile marine species, the sperm whale (*Physeter macrocephalus*). *Molecular Ecology*, **18**, 4193–4205.
- Ersts PJ, Rosenbaum HC (2003) Habitat preference reflects social organization of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on a wintering ground. *Journal of Zoology*, **260**, 337–345.
- Ersts PJ, Pomilla C, Kiszka J *et al.* (2011) Observations of individual humpback whales utilising multiple migratory destinations in the south-western Indian Ocean. *African Journal of Marine Science*, **33**, 333–338.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, **131**, 479–491.
- Fabiani A, Hoelzel AR, Galimberti F, Muelbert MMC (2003) Long-Range Paternal Gene Flow in the Southern Elephant Seal. *Science*, **299**, 676.
- Felix F, Caballero S, Olavarria C (2015) Genetic diversity and population structure of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) from Ecuador based on mitochondrial DNA analyses. *Journal of Cetacean Research and Management (Special Issue)*, **12**, 71–77.
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, **4**, 423–425.
- Filatova OA, Witteveen BH, Goncharov AA *et al.* (2013) The diets of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on the shelf and oceanic feeding grounds in the western North Pacific inferred from stable isotope analysis. *Marine Mammal Science*, **29**, E253–E265.
- Fleming A, Jackson J (2011) Global review of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *NOAA Technical Memorandum NMFS*, 1–209.
- Fontaine MC, Baird SJ, Piry S *et al.* (2007) Rise of oceanographic barriers in continuous populations of a cetacean: the genetic structure of harbour porpoises in Old World waters. *BMC Biology*, **5**, 30.
- Fontaine MC, Tolley KA, Michaux JR *et al.* (2010) Genetic and historic evidence for climate-driven population fragmentation in a top cetacean predator: the harbour porpoises in European water. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **277**, 2829–2837.
- Fontaine MC, Roland K, Calves I *et al.* (2014) Postglacial climate changes and rise of three ecotypes of harbour porpoises, *Phocoena phocoena*, in western Palearctic waters. *Molecular Ecology*, **23**, 3306–3321.
- Fontaine MC, Thatcher O, Ray N *et al.* (2017) Mixing of porpoise ecotypes in southwestern UK waters revealed by genetic profiling. *Royal Society Open Science*, **4**, 160992–14.
- Fontaine PH (2015) *Baleines et Phoques, Biologie et Ecologie*. Editions Multi Mondes, Sainte-Foy, Quebec, Canada.
- Foot AD, Thomsen PF, Sveegaard S *et al.* (2012) Investigating the potential use of Environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PLoS ONE*, **7**, e41781.
- Foot AD, Vijay N, Avila-Arcos M *et al.* (2016) Genome-culture coevolution promotes rapid divergence of killer whale ecotypes. *Nature Communications*, **7**, 1–12.

- Fossette S, Heide-Jørgensen MP, Jensen MV *et al.* (2014) Humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) post breeding dispersal and southward migration in the western Indian Ocean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **450**, 6–14.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2010) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge
- Frère CH, Krzyszczyk E, Patterson EM *et al.* (2010) Thar She Blows! A novel method for DNA collection from cetacean blow. *PLoS ONE*, **5**, e12299.
- Friedlaender AS, Halpin PN, Qian SS *et al.* (2006) Whale distribution in relation to prey abundance and oceanographic processes in shelf waters of the Western Antarctic Peninsula. *Marine Ecology Progress Series*, **317**, 297–310.
- Gambaiani DD, Mayol P, Isaac SJ, Simmonds MP (2008) Potential impacts of climate change and greenhouse gas emissions on Mediterranean marine ecosystems and cetaceans. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **89**, 179–201.
- Gandilhon N (2012) Contribution au recensement des cétacés dans l’archipel de Guadeloupe. *Thèse de l'Université des Antilles et de la Guyane*, 1–366.
- Garland EC, Rendell L, Lamoni L, Poole MM, Noad MJ (2017) Song hybridization events during revolutionary song change provide insights into cultural transmission in humpback whales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**, 7822–7829.
- Garrigue C, Forestell P, Greaves J *et al.* (2000) Migratory movement of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) between New Caledonia, East Australia and New Zealand. *Journal of Cetacean Research and Management*, **2**, 1–5.
- Garrigue C, Dodemont R, Steel D, Baker SC (2004) Organismal and “gametic” capture-recapture using microsatellite genotyping confirm low abundance and reproductive autonomy of humpback whales on the wintering grounds of New Caledonia. *Marine Ecology Progress Series*, **274**, 251–262.
- GIEC (2013) Résumé à l’intention des décideurs, Changements climatiques 2013: Les éléments scientifiques. Contribution du Groupe de travail au cinquième Rapport d’évaluation du Groupe d’experts intergouvernemental sur l’évolution du climat [sous la direction de Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex et P.M. Midgley]. Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni et New York (État de New York), États-Unis d’Amérique. 1–34.
- Gray JE (1846) On the British Cetacea. *Annals and Magazine of Natural History*, **Serie 1, 17**, 82–85.
- Green MI, Herzog DI, Baldwin JD (2007) Noninvasive methodology for the sampling and extraction of DNA from free-ranging Atlantic spotted dolphins (*Stenella frontalis*). *Molecular Ecology Notes*, **7**, 1287–1292.
- Green MI, Herzog DI, Baldwin JD (2011) Reproductive success of male Atlantic spotted dolphins (*Stenella frontalis*) revealed by noninvasive genetic analysis of paternity. *Canadian Journal of Zoology*, **89**, 239–253.
- Hammond PS, Macleod K, Berggren P *et al.* (2013) Cetacean abundance and distribution in European Atlantic shelf waters to inform conservation and management. *Biological Conservation*, **164**, 107–122.
- Härkönen TJ, Brasseur S, Teilmann J *et al.* (2007) Status of grey seals along mainland Europe from the Southwestern Baltic to France. *NAMMCO Scientific Publications*, **6**, 57–68.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, 313–321.
- Hebert PDN, Hollingsworth PM, Hajibabaei M (2016) From writing to reading the encyclopedia of life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **371**, 20150321–9.
- Heide-Jørgensen MP, Iversen M, Nielsen NH *et al.* (2011) Harbour porpoises respond to climate change. *Ecology and Evolution*, **1**, 579–585.
- Heide-Jørgensen MP, Laidre KL, Quakenbush LT, Citta JJ (2012) The Northwest Passage opens for bowhead whales. *Biology Letters*, **8**, 270–273.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 907–913.
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **359**, 183–195.
- Hoban SM, Hauffe HC, Pérez-Espona S *et al.* (2013) Bringing genetic diversity to the forefront of conservation policy and management. *Conservation Genetics Resources*, **5**, 593–598.
- Hoelzel AR, Dover GA (1989) Molecular techniques for examining genetic variation and stock identity in cetacean species. Reports of the International Whaling Commission, Special Issue. **13**, 81–120.

- Hoelzel AR, Dover GA (1991) Genetic differentiation between sympatric Killer whale populations. *Heredity*, **66**, 191–195.
- Hoelzel AR (1992) Conservation genetics of whales and dolphins. *Molecular Ecology*, **1**, 119–125.
- Hoelzel AR, Potter CW, Best PB (1998) Genetic differentiation between parapatric 'nearshore' and "offshore" populations of the bottlenose dolphin. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **265**, 1177–1183.
- Hoelzel AR (1998) Genetic Structure of Cetacean Populations in Sympatry, Parapatry, and Mixed Assemblages: Implications for Conservation Policy. *The Journal of heredity*, **89**, 451–457.
- Hoffman Ji, Matson Cw, Amos W, Loughlin Tr, Bickham Jw (2006) Deep genetic subdivision within a continuously distributed and highly vagile marine mammal, the Steller's sea lion (*Eumetopias jubatus*). *Molecular Ecology*, **15**, 2821–2832.
- Hoffman JI, Forcada J (2012) Extreme natal philopatry in female Antarctic fur seals (*Arctocephalus gazella*). *Mammalian Biology*, **77**, 71–73.
- Hoyt E (2005) Marine protected areas for whales, dolphins, and porpoises: a world handbook for cetacean habitat conservation. Second edition. *Earthscan editions, New York, USA*, 1–521.
- 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.
- Hudson RD (2000) A New Statistic for Detecting Genetic Differentiation. *Genetics*, **155**, 2011–2014.
- Hymery N, Alfonsi E, Jamin C, Dumas C, Chambon T, Hassani S, Jung J-L (2013) Isolation of CD34 +cells from peripheral blood and bone marrow of *Tursiops truncatus*. *Marine Mammal Science*, **29**, 195–203.
- IWC (2011) Report of the Workshop on the Comprehensive Assessment of Southern Hemisphere humpback whales. *Journal of Cetacean Research and Management (Special Issue)*, **3 (Special Issue)**, 1–50.
- Jackson JA, Steel DJ, Beerli P *et al.* (2014) Global diversity and oceanic divergence of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **281**, 20133222–20133222.
- Jackson JA, Ross-Gillepsie A, Butterworth DS *et al.* (2015) Southern Hemisphere Humpback Whale Comprehensive Assessment – A synthesis and summary: 2005-2015. *Report SC-a-SH presented to the IWC Scientific Committee*, 1–38.
- Jauniaux T, Charlier G, Desmecht M *et al.* (2000) Pathological findings in two fin whales (*Balaenoptera physalus*) with evidence of morbillivirus infection. *Journal of Comparative Pathology*, **123**, 198–201.
- Jauniaux TP, Brenez C, Fretin D *et al.* (2010) *Brucella ceti* infection in Harbor Porpoise (*Phocoena phocoena*). *Emerging Infectious Diseases*, **16**, 1966–1968.
- Jepson PD, Deaville R, Barber JL *et al.* (2016) PCB pollution continues to impact populations of orcas and other dolphins in European waters. *Scientific Reports*, **6**:18573.
- Johnson JH, Wolman AA (1984) The Humpback Whale, *Megaptera novaeangliae*. *Marine Fisheries Review*. **46**, 30–37.
- Jorgensen SJ, Reeb CA, Chapple TK *et al.* (2010) Philopatry and migration of Pacific white sharks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **277**, 679–688.
- Jost L (2008) G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, **17**, 4015–4026.
- Jung J-L, Fritig B, Hahne G (1993) Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Pathogenesis-Related proteins: Induction by aspirin (Acetylsalicylic Acid) and characterization. *Plant physiology*, **101**, 873–880.
- Jung J-L, Maurel S, Fritig B, Hahne G (1995a) Different Pathogenesis-Related-proteins are expressed in sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to physical, chemical and stress factors. *Journal of Plant physiology*, **145**, 153–160.
- Jung J-L, Charriere F, Laparra H, Hahne G (1995b) Genetic fingerprints in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using microsatellite sequences. *COLLOQUES-INRA*, 127–127.
- Jung J-L (1998) Amplification de séquences inter-microsatellites et empreintes génétiques chez les végétaux. *Regard sur la biochimie*, 13–19.
- Jung J-L, Stephan E, Louis M *et al.* (2009) Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in north-western France: aerial survey, opportunistic sightings and strandings monitoring. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **89**, 1045–1050.
- Jung J-L, Mullié WC, Van Waerebeek K *et al.* (2016) Omura's whale off West Africa: autochthonous population or inter-oceanic vagrant in the Atlantic Ocean? *Marine Biology Research*, **12**, 66–75.

- Jung J-L (2016) *Balaenoptera omurai*. In Savoure-Soubelet A., Aulagnier S., Haffner P., Moutou F., Van Canneyt O., Charrassin J.-B. Ridoux V. coord. Atlas des Mammifères Sauvages de France volume 1 Mammifères marins. Museum National d'Histoire Naturelle, Paris ; IRD, Marseille, 158-161.
- Jung J-L (2017) L'ADN pour observer les mammifères marins, sentinelles d'un milieu qui change. In *Cétacés, Nouvelles connaissances issues de la recherche française*. O. Adam & D Cazau editeurs. Editeur Association Dirac. ISBN-13: 979-1095209027
- Katona S, Baxter B, Brazier O *et al.* (1979) *Identification of humpback whales by fluke photographs*. In H.E. Winn and B.L. Olla eds. Behavior of Marine Animals. Vol. Cetaceans. Plenum Press, New York and London.
- Katona SK, Whitehead HP (1981) Identifying Humpback Whales using their natural markings. *Polar Record*, **20**, 439–6.
- Kawaguchi S, Kurihara H, King R *et al.* (2011) Will krill fare well under Southern Ocean acidification? *Biology Letters*, **7**, 288–291.
- Kawamura A. (1994) A review of baleen whale feeding in the Southern Ocean. *Report of the International Whaling Commission*, **44**, 261–271.
- Kennedy (2013) Satellite telemetry and humpback whales: a tool for determining the habitat use, distribution and behavior of an endangered large whale species. Dissertation, Doctor of Philosophy, Université Paris-Sud Centre de Neurosciences November, 2013. 1–162.
- Kennedy AS, Zerbini AN, Vásquez OV *et al.* (2014) Local and migratory movements of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) satellite-tracked in the North Atlantic Ocean. *Canadian Journal of Zoology*, **92**, 9–18.
- Kershaw F, Rosenbaum HC (2016) Developing a Geospatial Genetics Toolkit to Inform Marine Protection and Spatial Planning. *IMCC Conference Effective Marine Conservation Planning*, Saint John's, Newfoundland and the Labrador, Canada, 1–24.
- Kershaw F, Carvalho I, Loo J *et al.* (2017) Multiple processes drive genetic structure of humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) populations across spatial scales. *Molecular Ecology*, 1–18. doi: 10.1111/mec.13943
- Kiszka J, Vely M, Breyse O (2010) Preliminary account of cetacean diversity and humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) group characteristics around the Union of the Comoros (Mozambique Channel). *Mammalia*, **74**, 155–7.
- Klimova A, Phillips CD, Fietz K *et al.* (2014) Global population structure and demographic history of the grey seal. *Molecular Ecology*, **23**, 3999–4017.
- Kopps AM, Ackermann CY, Sherwin WB *et al.* (2014) Cultural transmission of tool use combined with habitat specializations leads to fine-scale genetic structure in bottlenose dolphins. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **281**, 20133245.
- Lambersten RH (1987) A biopsy system for large whales and its use for cytogenetics. *Journal of Mammalogy*, **68**, 443–445.
- Lambert A, Saloma A, Trudelle L, Mendez L, Vasquez O, Charrassin J-B, Mayer F-X, Adam O, Jung J-L (2017) Genetic characterization of humpback whales in the Ile Sainte-Marie Waters (Madagascar). Présentation Orale, Second Humpback Whale World Condress, La Réunion, France.
- Lambert E, MacLeod C, Hall K *et al.* (2011) Quantifying likely cetacean range shifts in response to global climatic change: implications for conservation strategies in a changing world. *Endangered Species Research*, **15**, 205–222.
- Larsen AH, Sigurjonsson J, Oien N, Vikingsson G, Palsboll P (1996) Populations Genetic Analysis of Nuclear and Mitochondrial Loci in Skin Biopsies Collected from Central and Northeastern North Atlantic Humpback Whales (*Megaptera novaeangliae*): Population Identity and Migratory Destinations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **263**, 1611–1618.
- Lawson GL, Wiebe PH, Ashjian CJ, Stanton TK (2008) Euphausiid distribution along the Western Antarctic Peninsula—Part B: Distribution of euphausiid aggregations and biomass, and associations with environmental features. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, **55**, 432–454.
- Lawson JW, Gosselin J-F (2009) Distribution and preliminary abundance estimates for cetaceans seen during Canada's marine megafauna survey - a component of the 2007 TNASS. *Canadian Science Advisory Secretariat*, 1–34.
- Lohmann KJ, Putman NF, Lohmann CMF (2008) Geomagnetic imprinting: A unifying hypothesis of long-distance natal homing in salmon and sea turtles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 19096–19101.

- Louis M, Viricel A, Lucas T *et al.* (2014a) Habitat-driven population structure of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the North-East Atlantic. *Molecular Ecology*, **23**, 857–874.
- Louis M, Fontaine MC, Spitz J *et al.* (2014b) Ecological opportunities and specializations shaped genetic divergence in a highly mobile marine top predator. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **281**, 20141558–20141558.
- Lowry DB (2012) Ecotypes and the controversy over stages in the formation of new species. *Biological Journal of the Linnean Society*, **106**, 241–257.
- Lyengar A (2014) Forensic DNA analysis for animal protection and biodiversity conservation: A review. *Journal for Nature Conservation*, **22**, 195–205.
- Mackintosh NA (1942) The southern stocks of whalebone whales. *Discovery Reports*, **22**, 197–300.
- Mann J, Sargeant BL, Watson-Capps JJ *et al.* (2008) Why do dolphins carry sponges? *PLoS ONE*, **3**, e3868.
- MacLeod CD, Santos MB, Reid RJ, Scott BE, Pierce GJ (2007) Linking sandeel consumption and the likelihood of starvation in harbour porpoises in the Scottish North Sea: could climate change mean more starving porpoises? *Biology Letters*, **3**, 185–188.
- Mannocci L, Dabin W, Augeraud-Véron E *et al.* (2012) Assessing the impact of bycatch on dolphin populations: the case of the common dolphin in the eastern north Atlantic. *PLoS ONE*, **7**, e32615.
- Martin M (2017) Exploration des limites d'espèces de poissons coralliens amphiatlantiques par des données moléculaires : l'exemple des sergents majors (*Abudefduf*), et des murènes (*Gymnothorax*). *Rapport de Stage de Master 1, Mention Sciences de l'Univers, Environnement, Ecologie Spécialité Oceanographie et Environnements Marins*. Université Pierre et Marie Curie
- Méheust E, Alfonsi E, Le Méné P, Hassani S, Jung J-L (2015) DNA barcoding for the identification of soft remains of prey in the stomach contents of grey seals (*Halichoerus grypus*) and harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *Marine Biology Research*, **11**, 385–395.
- Mendez L (2013) Analyse génétique des baleines à bosse (*Megaptera novaeangliae*) de Madagascar. *Rapport de stage de Master 2 d'Océanographie, spécialité Biologie Ecologie Marine*, Aix Marseille Université, 1–38.
- Mendez M, Rosenbaum HC, Wells RS, Stamper A, Bordino P (2010) Genetic evidence highlights potential impacts of by-catch to cetaceans. *PLoS ONE*, **5**, e15550.
- Minton G, Collins T, Findlay KP *et al.* (2012) Seasonal distribution, abundance, habitat use and population identity of humpback whales in Oman. *Journal of Cetacean Research and Management (Special Issue)*, **3**, 185–198.
- Mirimin L, Andrew W, Rogan E *et al.* (2009) Population structure of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) in the North Atlantic Ocean as revealed by mitochondrial and nuclear genetic markers. *Marine Biology*, **156**, 821–834.
- Miya M, Sato Y, Fukunaga T *et al.* (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, **2**, 150088–33.
- Morin PA, Archer FI, Foote AD *et al.* (2010) Complete mitochondrial genome phylogeographic analysis of killer whales (*Orcinus orca*) indicates multiple species. *Genome Research*, **20**, 908–916.
- Morin Pa, Parsons Km, Archer Fi *et al.* (2015) Geographic and temporal dynamics of a global radiation and diversification in the killer whale. *Molecular Ecology*, **24**, 3964–3979.
- Morin PA, Scott Baker C, Brewer RS, Burdin AM, Dalebout ML, Dines JD, Fedutin I, Filatova O, Hoyt E, Jung J-L, Lauf M, Potter CW, Richard G, Ridgway M, Robertson KM, Wade PM (2017) Genetic structure of the beaked whale genus *Berardius* in the North Pacific, with genetic evidence for a new species. *Marine Mammal Science*, **33**, 96–111.
- Mullié WC, Wagné MM, Elmamy CAA *et al.* (2013) Large number of stranded harbour porpoises *Phocoena phocoena* as by-catch victims in Mauritania. *Reports of the International Whaling Commission SC/65a/HIM03*, 1–5.
- Noad MJ, Cato DH, Bryden MM, Jenner MN, Jenner KCS (2000) Cultural revolution in whale songs. *Nature*, **408**, 537.
- Noren DP, Mocklin JA (2012) Review of cetacean biopsy techniques: Factors contributing to successful sample collection and physiological and behavioral impacts. *Marine Mammal Science*, **28**, 154–199.
- Nowacek DP, Friedlaender AS, Halpin PN *et al.* (2011) Super-aggregations of krill and humpback whales in Wilhelmina Bay, Antarctic Peninsula. *PLoS ONE*, **6**, e19173–5.

- O'Connor S, Campbell R, Cortez H, Knowles T (2009) Whale Watching Worldwide. Tourism numbers, expenditures and expanding economic benefits. *A special report from the International Fund for Animal Welfare, Yarmouth MA, USA, prepared by Economists at Large.*, 1–295.
- O'Shea TJ, Tanabe S (2003) *Persistent ocean contaminants and marine mammals: A retrospective overview.* in J. G. Vos, G. D. Bossart, M. Fournier and T. J. O'Shea, eds. *Toxicology of marine mammals.* Taylor Francis Publishers, New York, NY.
- Olavarria C, Baker CS, Garrigue C *et al.* (2007) Population structure of South Pacific humpback whales and the origin of the eastern Polynesian breeding grounds. *Marine Ecology Progress Series*, **330**, 257–268.
- Palumbi SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **25**, 547–572.
- Palsbøll PJ, Clapham PJ, Mattila DK *et al.* (1995) Distribution of mtDNA haplotypes in North Atlantic humpback whales: the influence of behaviour on population structure. *Marine Ecology Progress Series*, **116**, 1–10.
- Palsbøll PJ, Allen J, Bérubé M *et al.* (1997a) Genetic tagging of humpback whales. *Nature*, **388**, 767–769.
- Palsbøll PJ, Bérubé M, Larsen AH, Jorgensen H (1997b) Primers for the amplification of tri- and tetraner microsatellite loci in baleen whales. *Molecular Ecology*, **6**, 893–895.
- Palsbøll P, Bérubé M, Allendorf F (2007) Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology & Evolution*, **22**, 11–16.
- Paniz-Mondolfi A, Talhari C, Sander Hoffmann L *et al.* (2012) Lobomycosis: an emerging disease in humans and delphinidae. *Mycoses*, **55**, 298–309.
- Pardini AT, Jones CS, Noble LR *et al.* (2001) Sex-biased dispersal of great white sharks. *Nature*, **412**, 139–140.
- Pauls SU, Nowak C, Bálint M, Pfenninger M (2012) The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Molecular Ecology*, **22**, 925–946.
- Payne RS, McVay S (1971) Songs of humpback whales. *Science* **173**:585–597.
- Peltier H, Baagøe HJ, Camphuysen KCJ *et al.* (2013) The Stranding Anomaly as Population Indicator: The Case of Harbour Porpoise *Phocoena phocoena* in North-Western Europe. *PLoS ONE*, **8**, e62180.
- Perry AL (2005) Climate Change and Distribution Shifts in Marine Fishes. *Science*, **308**, 1912–1915.
- Pierson JC, Coates DJ, Oostermeijer JGB *et al.* (2016) Genetic factors in threatened species recovery plans on three continents. *Frontiers in Ecology and the Environment*, **14**, 433–440.
- Pierszalowski SP, Ferrari M, Glockner-Ferrari D *et al.* (2012) Investigating the feasibility of using DNA from sloughed skin for individual identification and kinship analysis in humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *Marine Mammal Science*, **29**, 533–541.
- Poloczanska ES, Brown CJ, Sydeman WJ *et al.* (2013) Global imprint of climate change on marine life. *Nature Climate Change*, **3**, 1–7.
- Pompanon F, Coissac E, Taberlet P (2011) Metabarcoding, une nouvelle façon d'analyser la biodiversité. *Biofutur*, **319**, 30–32.
- Pomeroy PP, Twiss SD, Redman P (2000) Philopatry, Site Fidelity and Local Kin Associations within Grey Seal Breeding Colonies. *Ethology*, **106**, 899–919.
- Pomilla C, Rosenbaum HC (2005) Against the current: an inter-oceanic whale migration event. *Biology Letters*, **1**, 476–479.
- Pomilla C, Rosenbaum HC (2006) Estimates of relatedness in groups of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on two wintering grounds of the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, **15**, 2541–2555.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, **155**, 945–959.
- Punt AE, Friday NA, Smith TD (2007) Reconciling data on the trends and abundance of North Atlantic humpback whales within a population modelling framework. *Journal of Cetacean Research and Management (Special Issue)*, **8**, 145–159.
- Purvis A, Hector A (2000) Getting the measure of biodiversity. *Nature*, **405**, 212–219.
- Putman NF, Verley P, Endres CS, Lohmann KJ (2015) Magnetic navigation behavior and the oceanic ecology of young loggerhead sea turtles. *Journal of Experimental Biology*, **218**, 1044–1050.
- Quintela M, Skaug HJ, Øien N *et al.* (2014) Investigating population genetic structure in a highly mobile marine organism: the minke whale *Balaenoptera acutorostrata* acutorostrata in the North East Atlantic. *PLoS ONE*, **9**, e108640.

- Razafindrakoto Y, Rosenbaum HC, Helweg D (2001) First description of humpback whale song from antongil bay, madagascar. *Marine Mammal Science*, **17**, 181–186.
- Read AJ, Drinker P, Northridge S (2006) Bycatch of Marine Mammals in U.S. and Global Fisheries. *Conservation Biology*, **20**, 163–169.
- Reilly SB, Bannister JL, Best PB *et al.* (2008) *Megaptera novaeangliae*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2008: e.T13006A3405371. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T13006A3405371.en>. Downloaded on 21 September 2017.
- Reeves RR, Swartz SL, Wetmore SE, Clapham PJ (2001) Historical occurrence and distribution of humpback whales in the eastern and southern Caribbean Sea, based on data from American whaling logbooks. *Journal of Cetacean Research and Management (Special Issue)*, **3**, 117–129.
- Richard KR, Dillon MC, Whitehead H, Wright JM (1996) Patterns of kinship in groups of free-living sperm whales (*Physeter macrocephalus*) revealed by multiple molecular genetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 8792–8795.
- Ridoux V (2016) Introduction. In Savouire-Soubelet A., Aulagnier S., Haffner P., Moutou F., Van Canneyt O., Charrassin J.-B. Ridoux V. coord. Atlas des Mammifères Sauvages de France volume 1 Mammifères marins. Museum National d'Histoire Naturelle, Paris ; IRD, Marseille, 11–40.
- Robbins J, Dalla Rosa L, Allen JM *et al.* (2011) Return movement of a humpback whale between the Antarctic Peninsula and American Samoa: a seasonal migration record. *Endangered Species Research*, **13**, 117–121.
- Rodríguez-Clark KM, Oliveira-Miranda MA, Aguilera Meneses M *et al.* (2015) Finding the “Conservation” in Conservation Genetics—Progress in Latin America. *Journal of Heredity*, **106**, 423–427.
- Rosel PE, Wilcox LA (2014) Genetic evidence reveals a unique lineage of Bryde’s whales in the northern Gulf of Mexico. *Endangered Species Research*, **25**, 19–34.
- Rosenbaum HC, Walsh PD, Razafindrakoto Y, Vely M, DeSalle R (1997) First description of a humpback whale wintering ground in baie d’antongil, Madagascar. *Conservation Biology*, **11**, 312–314.
- Rosenbaum HC, Pomilla C, Mendez M *et al.* (2009) Population structure of humpback whales from their breeding grounds in the south atlantic and indian oceans. *PLoS ONE*, **4**, e7318.
- Rosenbaum HC, Kershaw F, Mendez M *et al.* (2017) First circumglobal assessment of Southern Hemisphere humpback whale mitochondrial genetic variation and implications for management. *Endangered Species Research*, **32**, 551–567.
- Ruegg K, Rosenbaum HC, Anderson EC *et al.* (2013) Long-term population size of the North Atlantic humpback whale within the context of worldwide population structure. *Conservation Genetics*, **14**, 103–114.
- Ryan C, Wenzel F, Lopez Suarez P, Berrow SD (2014) An abundance estimate for humpback whales *Megaptera novaeangliae* breeding around Boa Vista, Cape Verde Islands. *Zoologica Caboverdiana*, **5**, 20–28.
- Samaran F, Stafford KM, Branch TA *et al.* (2013) Seasonal and geographic variation of southern blue whale subspecies in the Indian Ocean. *PLoS ONE*, **8**, e71561–10.
- Santora JA, Reiss CS, Loeb VJ, Veit RR (2010) Spatial association between hotspots of baleen whales and demographic patterns of Antarctic krill *Euphausia superba* suggests size-dependent predation. *Marine Ecology Progress Series*, **405**, 255–269.
- Sanvito S, Dueñas Meza A, Schramm Y *et al.* (2012) Isolation and cross-species amplification of novel microsatellite loci in a charismatic marine mammal species, the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). *Conservation Genetics Resources*, **5**, 93–96.
- Schlötterer C, Amos B, Tautz D (1991) Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, **354**, 63–65.
- Schmitt N, Double MC, Jarman SN *et al.* (2014a) Low levels of genetic differentiation characterize Australian humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) populations. *Marine Mammal Science*, **30**, 221–241.
- Schmitt NT, Double MC, Baker SC *et al.* (2014b) Mixed-stock analysis of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on Antarctic feeding grounds. *Journal of Cetacean Research and Management*, **14**, 141–157.
- Scholin CA, Gulland F, Doucette GJ *et al.* (2000) Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*, **403**, 80–84.
- Schorr GS, Falcone EA, Moretti DJ, Andrews RD (2014) First long-term behavioral records from cuvier’s beaked whales (*Ziphius cavirostris*) reveal record-breaking dives. *PLoS ONE*, **9**, e92633–10.
- Siebert U, Gilles A, Lucke K *et al.* (2006) A decade of harbour porpoise occurrence in German waters - Analyses of aerial surveys, incidental sightings and strandings. *Journal of Sea Research*, **56**, 65–80.

- Simmonds MP, Elliott WJ (2009) Climate change and cetaceans: concerns and recent developments. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **89**, 203–210.
- Smith TD, Allen J, Clapham PJ *et al.* (1999) An ocean-basin-wide mark-recapture study of the north atlantic humpback whale (*Megaptera novaeangliae*). *Marine Mammal Science*, **15**, 1–32.
- Southall BL, Bowles AE, Ellison WT *et al.* (2007) Marine mammal noise exposure criteria: initial scientific recommendations. *Aquatic Mammals*, **33**, 441–509.
- Steiger GH, Calambokidis J, Sears R, Balcomb KC, Cubbage JC (1991) Movement of humpback whales between California and Costa Rica. *Marine Mammal Science*, **7**, 306–310.
- Stevick PT, Allen J, Clapham PJ *et al.* (2003) North Atlantic humpback whale abundance and rate of increase four decades after protection from whaling. *Marine Ecology Progress Series*, **258**, 263–273.
- Stevick PT, Neves MC, Johansen F *et al.* (2011) A quarter of a world away: female humpback whale moves 10 000 km between breeding areas. *Biology Letters*, **7**, 299–302.
- Stevick PT, Allen JM, Engel MH *et al.* (2014) Inter-oceanic movement of an adult female humpback whale between Pacific and Atlantic breeding grounds off South America. *Journal of Cetacean Research and Management (Special Issue)*, **13**, 159–162.
- Stevick PT, Bouveret L, Gandilhon N *et al.* (2015) Humpback whales in the southeast Caribbean are behaviourally distinct from those off the Dominican Republic. *SC/66a/AWMP/2*, 1–8.
- Stevick PT, Berrow SD, Bérubé M *et al.* (2016) There and back again: multiple and return exchange of humpback whales between breeding habitats separated by an ocean basin. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **96**, 885–890.
- Stone GS, Florez-Gonzalez L, Katona S (1990) Whale migration record. *Nature*, **346**, 705.
- Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, Rieseberg LH (2012) Environmental DNA. *Molecular Ecology*, **21**, 1789–1793.
- Tarling GA, Klevjer T, Fielding S *et al.* (2009) Variability and predictability of Antarctic krill swarm structure. *Deep-Sea Research Part I*, **56**, 1994–2012.
- Taylor BL, Rojas-Bracho L, Moore J *et al.* (2016) Extinction is imminent for Mexico's endemic porpoise unless fishery bycatch is eliminated. *Conservation Letters*, **31**, 209–8.
- Taylor HR, Dussex N, van Heezik Y (2017) Bridging the conservation genetics gap by identifying barriers to implementation for conservation practitioners. *Global Ecology and Conservation*, **10**, 231–242.
- Thompson K, Baker CS, van Helden A *et al.* (2012) The world's rarest whale. *Current Biology*, **22**, R905–R906.
- Thomsen F, Laczny M, Piper W (2006) A recovery of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in the southern North Sea? A case study off Eastern Frisia, Germany. *Helgoland Marine Research*, **60**, 189–195.
- Tolley KA, Vikingsson GA, Rosel PE (2001) Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeographic patterns in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the North Atlantic. *Conservation Genetics*, **2**, 349–361.
- Tolley KA, Rosel PE (2006) Population structure and historical demography of eastern North Atlantic harbour porpoises inferred through mtDNA sequences. *Marine Ecology Progress Series*, **327**, 297–308.
- Tregenza N, Berrow SD, Hammond P, Leaper R (1997) Harbour porpoise (*Phocoena phocoena* L.) by-catch in set gillnets in the Celtic Sea. *ICES Journal of Marine Science*, **54**, 896–904.
- Trudelle L, Cerchio S, Zerbini AN *et al.* (2016) Influence of environmental parameters on movements and habitat utilization of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the Madagascar breeding ground. *Royal Society Open Science*, **3**, 160616–22.
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, **24**, 110–117.
- Valentini A, Taberlet P, Miaud C *et al.* (2016) Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, **25**, 929–942.
- Valsecchi E, Palsboll PJ, Hale P *et al.* (1997) Microsatellite Genetic Distances Between Oceanic Populations of the Humpback Whale (*Megaptera novaeangliae*). *Molecular Biology and Evolution*, **14**, 355–362.
- Van Bresse M-F, Raga AJ, Di Guardo G *et al.* (2009) Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Diseases of Aquatic Organisms*, **86**, 143–157.
- Van Bresse M-F, Duignan P, Banyard A *et al.* (2014) Cetacean Morbillivirus: Current Knowledge and Future Directions. *Viruses*, **6**, 5145–5181.
- Van Canneyt O, Van Ca, Dars C *et al.* (2015) Les échouages de mammifères marins sur le littoral français en 2015. *Rapport annuel du Réseau National Echouage*, accessible à <http://crrmm.univ-lr.fr/images/pdf/Rapport2015.pdf>, 1–49.

- Van Waerebeek K, Baker AN, Felix F, Gedamke J, Iniguez M (2008) Vessel collisions with small cetaceans worldwide and with large whales in the Southern Hemisphere, an initial assessmentV. *Lat. Am. J. Aquat. Mamm.*, **6**, 43–69.
- Van Waerebeek K, Ofori-Danson PK, Debrah J (2009) The Cetaceans of Ghana, a Validated Faunal Checklist. **15**, 1–20.
- Van Waerebeek K, Uwagbae M, Segniagbeto GH, Bamy IL, Ayissi I (2017) New Records of Atlantic humpback dolphin (*Sousa teuszii*) in Guinea, Nigeria, Cameroon and Togo underscore pressure from fisheries and marine bushmeat demand. *Revue d'Ecologie*, **72**, 192–205.
- Vincent C, Fedak M, McConnell B *et al.* (2005) Status and conservation of the grey seal, *Halichoerus grypus*, in France. *Biological Conservation*, **126**, 62–73.
- Viricel A, Rosel PE (2012) Evaluating the utility of *cox1* for cetacean species identification. *Marine Mammal Science*, **28**, 37–62.
- Wada S, Oishi M, Yamada TK (2003) A newly discovered species of living baleen whale. *Nature*, **426**, 278–281.
- 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.
- Weinrich MT, Lambersten RH, Baker CS, Schilling MR, Belt CR (1991) Behavioural responses of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the southern gulf of Maine to biopsy sampling. *Reports of the International Whaling Commission, Special Issue*, **13**, 92–97.
- Wenzel FW, Allen J, Berrow S *et al.* (2009) Current Knowledge on the Distribution and Relative Abundance of Humpback Whales (*Megaptera novaeangliae*) off the Cape Verde Islands, Eastern North Atlantic. *Aquatic Mammals*, **35**, 502–510.
- Whitehead H (2017) Gene–culture coevolution in whales and dolphins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**, 7814–7821.
- Whiten A, Ayala FJ, Feldman MW, Laland KN (2017) The extension of biology through culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**, 7775–7781.
- Wiemann A, Andersen LW, Berggren P *et al.* (2010) Mitochondrial Control Region and microsatellite analyses on harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) unravel population differentiation in the Baltic Sea and adjacent waters. *Conservation Genetics*, **11**, 195–211.
- Wiemers M, Fiedler K (2007) Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology*, **4**, 8.
- Wright DL, Witteveen B, Wynne K, Horstmann-Dehn L (2015) Evidence of two subaggregations of humpback whales on the Kodiak, Alaska, feeding ground revealed from stable isotope analysis. *Marine Mammal Science*, **31**, 1378–1400.
- Zanutti C (2016) Evaluation de la contamination chimique chez les grands dauphins (*Tursiops truncatus*) du golfe normand-breton. Analyses et résultats obtenus à partir d'individus échoués entre 1999 et 2015. *Rapport d'étude final Groupe d'Etude des Cétacés du Cotentin*, 1–125.