



HAL
open science

Le marsouin commun et le phoque gris en mer d'Iroise et le long de la façade Atlantique française : génétique des populations et modifications de l'écosystème

Eric Alfonsi

► **To cite this version:**

Eric Alfonsi. Le marsouin commun et le phoque gris en mer d'Iroise et le long de la façade Atlantique française : génétique des populations et modifications de l'écosystème. Sciences de la Terre. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2013. Français. NNT : 2013BRES0073 . tel-01643966

HAL Id: tel-01643966

<https://theses.hal.science/tel-01643966>

Submitted on 21 Nov 2017

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.



université de bretagne
occidentale



Le marsouin commun et le phoque gris en Mer d'Iroise et le long de la façade atlantique française : génétique des populations et modifications de l'écosystème

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Océanologie Biologique

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Eric ALFONSI

Préparée au sein des laboratoires :
BioGeMME (UBO) ; LEMM
(Océanopolis) ; LEMAR (UMR
CNRS/UBO/IRD/ IFREMER),

Soutenue le 26 septembre 2013 devant le jury composé de :

Olivier ADAM

Professeur, Orsay

Président du jury

Frédérique VIARD

Directeur de recherche, Roscoff

Rapporteuse

Vincent RIDOUX

Professeur, la Rochelle

Rapporteur

Valérie STIGER

Maître de conférences, Brest

Examinatrice

Sami HASSANI

Chef de service, Brest

Encadrant

Jean-Luc JUNG

Maître de conférences, Brest

Directeur de thèse

Encadrant ne faisant pas partie du jury :

Yves-Marie PAULET

Professeur, Brest

Directeur de thèse

Je dédie ma thèse au projet BioGeMME et à l'ensemble de ses membres et collaborateurs. Projet et thèse sont intimement liés sur le plan scientifique et humain. Tandis que l'une se finit, j'espère que nous poursuivrons le deuxième longtemps

Remerciements

Je tiens à remercier Vincent Ridoux d'avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse. Depuis que j'ai commencé à travailler sur les mammifères marins, vous êtes pour moi le Monsieur "Mammifères Marins" en France et je suis très impressionné par vos travaux, l'énergie que vous investissez dans la recherche au niveau national et international et votre capacité à rester simple et accessible malgré ces lourdes responsabilités.

Je tiens à remercier Frédérique Viard d'avoir accepté d'être le deuxième rapporteur de cette thèse. Les modèles sont très éloignés de ceux dont vous avez l'habitude mais vos compétences en génétique des populations seront une forte plus value dans la correction de ces travaux. J'ai travaillé sur une de vos publications sur le wakame en master 1 qui fut ma première prise de contact avec un réseau haplotypique. Au nombre de réseaux présents dans cette thèse, vous pourrez voir quelle influence cela a eu sur moi.

Merci à Valérie Stiger d'avoir accepté d'être examinatrice de cette thèse. En plus de l'intérêt scientifique de ta présence, je suis personnellement ravi que tu fasses partie de mon jury. Tu nous, moi et l'ensemble du projet BioGeMME, as soutenu depuis le début, le tout dans une bonne humeur communicative.

Merci à Olivier Adam d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse, je suis sûr que ton nombre farouche d'idées nouvelles et ton dynamisme seront un atout pour ce jury. Nous n'avons réussi à faire chanter la corde vocale qu'à moitié mais nous y arriverons totalement plus tard.

La thèse est une aventure soi disant personnelle. La vérité est que je ne me suis jamais senti seul au cours de ces années, au contraire beaucoup de personnes ont contribué à ces travaux et m'ont accompagné. Après la partie scientifique pure, le nombre important de rencontres et de collaborations au cours de cette thèse a été le côté le plus passionnant de cette thèse et a apporté beaucoup à ce projet. Cela m'a permis d'apprendre énormément et de faire progresser ces travaux. Merci à tous ceux qui ont contribué à l'avancée de cette thèse.

En premier, merci à Jean-Luc. Vous êtes le premier contributeur de cette thèse et vous avez été là tout au long. Tout a commencé fin 2007 avec un entretien pour un stage de master 1. Depuis, nous avons travaillé près de 6 ans ensemble et toujours dans un excellent état d'esprit. Vous m'avez énormément appris, tant sur un plan professionnel que personnel. En plus des compétences intellectuelles et techniques, très nombreuses, mais qui peuvent se retrouver dans le reste du manuscrit, vous m'avez enseigné la réflexion, l'intégrité et l'honnêteté scientifique, la remise en question et à avoir confiance en moi et en mes conclusions. Vous m'avez même appris (j'ai mis du temps pour cela) à ne pas être d'accord avec vous et l'argumenter, preuve de votre humilité. J'ai commencé comme un étudiant et vous m'avez appris à devenir chercheur. En plus de tout cela, je tiens à vous remercier pour vos qualités humaines. J'ai passé 6 belles années dans une ambiance détendue et stimulante intellectuellement et c'est grâce à vous. Vous n'avez pas arrêté de travailler au cours de ces 6 ans pour la mise en place et le développement du labo et, même dans les moments difficiles, vous avez continué à y croire et à avancer. Ce qui est construit actuellement, et dont j'ai largement profité, est le résultat de vos efforts. J'en suis très admiratif. Je ne pense pas que ce paragraphe soit à la hauteur de mon estime pour vous mais j'espère que cette thèse et le travail réalisé ensemble en seront des symboles plus forts. Merci pour tout et à bientôt pour la suite j'espère.

Merci à Sami. Vous êtes aussi là depuis le début et ce fut un plaisir. Vous m'avez appris une grande partie de ce que je sais sur les mammifères marins et toujours de manière pédagogique. Par votre travail, votre investissement, votre réseau et votre soutien, vous avez beaucoup fait pour que cette thèse se déroule dans les meilleures conditions, et ce fut le cas. Vous avez été le deuxième "pied" de ma thèse qui m'a permis de rester équilibré. Vous avez su aussi poser les bonnes questions qui ont lancé ces travaux, j'espère que les réponses sont à la hauteur de vos attentes. Votre côté hyper social, capable de mettre tout le monde à l'aise, m'impressionne beaucoup. Je retiendrai aussi toutes vos histoires qu'elles parlent de mammifères marins, de nourriture ou de voyages. J'espère aussi que nous continuerons à travailler ensemble.

Merci à Yves-Marie Paulet d'avoir accepté d'être co-directeur de cette thèse. Merci aussi pour vos précieux conseils et le fort soutien au cours de la thèse. Vous avez toujours été disponible quand j'en avais besoin, malgré vos nombreuses responsabilités. Merci aux directeurs successifs du LEMAR, Laurent Memery et Olivier Raguénau, pour m'avoir accepté au sein du LEMAR et à l'ensemble des membres de ce laboratoire.

Merci à Eric Hussenot, Jean-Paul Alayse, Céline Liret et l'ensemble de Brest'Aim pour avoir permis mon embauche en contrat Cifre et pour vos conseils et soutiens au long de cette thèse.

Merci à l'Etat français, au ministère de la Recherche et l'ARNT pour la bourse Cifre qui a permis de financer cette thèse.

Merci à François Gilles Carpentier, le deuxième enseignant chercheur de BioGeMME. Tu es là depuis mon master 1 et la réalisation d'un arbre phylogénétique. Ta présence a beaucoup apporté aux travaux sur les mammifères marins. D'abord en apportant une puissance statistique permettant de renforcer les résultats mais aussi par ta réflexion et ton point de vue toujours plein de recul et pertinent. Tu m'as beaucoup appris. Merci aussi pour ta bonne humeur

Merci à Eléonore. Tu as travaillé avec nous depuis plus de deux ans et participé à une grande partie des travaux exposés dans cette thèse. Notamment nous avons réalisé ensemble l'étude des phoques gris de Bretagne depuis les premières extractions en janvier 2012 et l'ensemble des manipulations et analyses qui en ont découlé. L'ajout de tes idées, de ton énergie et de ta bonne humeur ont rendu cette étude plus intéressante, plus pertinente et plus agréable à réaliser. Tu t'es aussi occupée de beaucoup d'autres choses au labo et à Océanopolis. Nous avons partagé tellement de moments, je ne m'en serais pas sorti sans toi. Merci beaucoup.

Merci à l'ensemble des personnes de passage au labo, qu'elles soient restées longtemps ou pas, vous m'avez tous appris des choses, apporté des résultats intéressants et ensoleillé mes journées. J'ai aussi beaucoup aimé transmettre ce que je savais à certains d'entre vous. Merci à Aurore, tu as commencé au début de ma thèse et ce fut un véritable plaisir de passer cette année avec toi. Merci aussi pour l'amitié qui s'est développée entre nous et bon vent pour tes projets. Merci à Mattias qui fut mon premier collègue de bureau et qui m'a appris à manipuler lorsque je n'osais pas embêter Jean-Luc, à Anne, c'est toi qui a travaillé en premier sur le Barcode, à Sandrine, Chrystelle et Sabrina que j'ai eu beaucoup de plaisir à encadrer pour leurs stages de master 1, à Jean-Baptiste, Cindy, Gwendoline, Amélie, Loriane, Charlène, Maëva et Matthieu.

Merci à Cédric le Maréchal, Joëlle Creff et Claude Ferec pour le génotypage des microsatellites et les précieux conseils sur ces marqueurs. Merci à Michaël Fontaine pour tout ce que tu m'as appris sur l'analyse des microsatellites, les marsouins communs et sur la génétique des populations en général. Cette rencontre au mont Saint-Michel a été déterminante pour la suite de ma thèse.

Merci à Nelly, Gaëlle et Stéphane du service RMN, à Elisabeth, Sébastien, Douraïed Ben Salem, Michel Nonent du service radiologie-IRM, Luc Bresollette, Philippe Quéhé du service Echographie pour les travaux réalisés dans la bonne humeur sur les lipides et les melons de cétacés. Merci à Philippe Sebert pour ses idées, ses conseils et la mise en relation. Cette étude me passionne et j'espère bien pouvoir la continuer.

Merci aux membres de l'équipe MMO. J'ai passé beaucoup de temps avec vous et cela restera un très bon souvenir de ma thèse, que ce soit les week-end, les échouages, les dissections, les repas de midi plus qu'animés ou les soirées en dehors d'Océano. Vous m'avez beaucoup appris sur les mammifères marins, leur étude et leur biologie mais je retiendrai encore plus votre sympathie, votre humour et le soutien total que vous m'avez offert. J'en ai été gêné souvent car je n'ai pas eu l'impression de vous rendre ce que vous m'avez apporté au cours de cette thèse. L'ensemble du travail de collecte et de stockage des échantillons sur des animaux échoués vivants ou morts que vous avez réalisé, a été primordial pour la réalisation de ces études. Merci à Jean-Marc, l'ancien qui est parti un bureau plus loin mais qui sera toujours un Mameux pour moi. Merci à Jean-Yves, j'apprécie beaucoup ta pédagogie et toute l'expérience que tu m'as transmise. Merci à Patrick, "ton côté ours" m'amuse beaucoup, surtout que je me suis senti très vite accepté. Merci à Christine pour ta gentillesse et la formidable énergie que tu dégages. Merci à Yann, pour ta bonne humeur quasi permanente et ton rire communicatif. Merci à Cécile, qui a apporté un vent de nouveauté à l'équipe par son sourire et son expérience. Merci à Sandra, que j'ai régulièrement côtoyé, tes connaissances et tes qualités humaines m'ont beaucoup apporté. Merci aussi à toutes les personnes de passage avec qui j'ai partagé une année, Faustine, Harmony, Chloé, Emilie, Mélanie, Gwendal, Audrey, Anne ou moins qu'une année Charlotte, Tess, Delphine et tous les autres.

Merci aussi à l'ensemble du personnel d'Océanopolis. Vous m'avez tous donné un coup de main à chaque fois que j'en ai eu besoin et toujours avec le sourire. Les moments passés à Océano auront été très agréables et notamment grâce à l'ambiance de l'endroit et la bonne humeur des personnes.

Merci au Parc Naturel Marin d'Iroise pour le soutien financier, logistique et moral de ma thèse. Merci à Cécile, Philippe et Patrick pour les discussions fortes intéressantes sur la Mer d'Iroise, la conservation et les mammifères marins, les conseils et le soutien. Merci aux agents de terrain pour la collecte d'échantillons et les sorties sur le terrain.

Merci à l'ensemble des membres du Réseau National Echouage pour la collecte des échantillons et des informations sur les mammifères marins. Sans vous ce travail n'aurait pas été possible. Merci à l'UMS Pélagis, anciennement CRMM, pour nous avoir fourni des échantillons de marsouins communs et pour les riches échanges scientifiques. Merci à Cécile Vincent pour sa collaboration et le partage de son savoir sur les phoques gris.

Merci aux ex et actuelles doctorantes que j'ai croisées et qui ont partagé leurs expériences et connaissances. Merci à Marie, Flore et Laurène.

Merci à l'EDSM pour toute la partie administrative et les formations au cours du doctorat. Un merci spécial à Elisabeth qui a su gérer mon dossier malgré mes retards et mes nombreuses demandes différentes. Merci aussi pour ton soutien.

Ces années de thèse, en dehors du travail je ne les ai pas vécus seul. Au contraire, de nombreuses personnes ont été à mes côtés. Certains le sont depuis bien plus longtemps, d'autres je les ai rencontrés en cours de route, tous m'ont beaucoup apporté. J'aurai énormément de choses à vous dire, de remerciement à exprimer et d'amour à partager mais je vous le dirai directement plus tard.

Alors ce sera un simple, mais sincère, merci! A tous, ma famille, mes amis, de Brest, de Besançon ou d'ailleurs. Votre soutien, votre bonheur, vos rires et votre présence, tout au long de cette aventure ont été une force fantastique pour moi. Je vous aime.

Sommaire

Table des matières

Introduction	6
Les mammifères marins, des espèces clés des écosystèmes marins.....	6
Le milieu marin subit des changements rapides, notamment dus aux actions anthropiques, qui impactent fortement les espèces et les populations	7
Les variations du milieu requièrent de comprendre et de conserver les écosystèmes pour limiter les impacts	8
La mer d'Iroise et ses alentours, un laboratoire d'étude des liens entre mammifères marins et pressions anthropiques	10
Suivi de la variabilité génétique et de la structure des populations et communautés de petits mammifères marins le long des côtes de Bretagne, et liens avec les modifications du milieu marin induites par les activités anthropiques et la conservation des écosystèmes	11
 Revue Bibliographique	 12
 Le changement climatique et ses impacts sur les écosystèmes	 12
Origine et réalité du changement climatique	12
Quels effets a le changement climatique sur les écosystèmes ?	13
Les activités anthropiques ont d'autres impacts perturbants pour le milieu marin.....	16
L'acidification des océans	16
Perturbations écotoxicologiques du milieu.....	17
Pêche, surpêche et impacts sur les stocks d'espèces cibles et les écosystèmes	18
Utilisations anthropiques et aménagements du littoral mènent aussi à des modifications physiques des habitats marins	19
Les effets de ces menaces sont synergiques	20
 Les mammifères marins	 22
Qu'est ce qu'un mammifère marin ?	22

Les mammifères marins, un groupe paraphylétique aux multiples points communs .	23
Les impacts du changement global sur les mammifères marins	24
Les impacts du changement climatique.....	24
Les autres menaces d'origine anthropique	28
Conservation des mammifères marins : nécessités et moyens	36
La réduction passée de l'abondance des mammifères marins et les impacts anthropiques actuels nécessitent la mise en place d'une stratégie globale de conservation des mammifères marins	36
Les mammifères marins occupent une place importante au sein des écosystèmes et leur disparition aurait d'importantes conséquences	36
La conservation des mammifères marins peut se faire par une protection directe, du milieu ou des espèces liées	37
Besoin de compréhension et de suivi	39
De nombreuses connaissances sont pré requises pour la conservation	39
De nombreux types de suivis des mammifères marins sont possibles	41
L'analyse du polymorphisme de l'ADN pour étudier les populations.....	43
Les différents marqueurs génétiques et leurs caractéristiques.....	43
L'étude des polymorphismes de l'ADN est un outil pour connaître et conserver les populations et les espèces	48
La mer d'Iroise et ses particularités.....	54
Chapitre 1 : Le suivi de la biodiversité génétique des mammifères marins des côtes atlantiques françaises	56
Introduction	57
L'importance du suivi de la biodiversité.....	57
Biodiversité et phylogénie des mammifères marins.....	58
Le suivi des échouages : un observatoire représentatif de la biodiversité des mammifères marins ?	62

L'outil génétique pour le suivi de la biodiversité.....	65
Le barcode ADN et le projet BOLD.....	67
Suivi moléculaire de la biodiversité génétique des mammifères marins échoués le long des côtes bretonnes	70
Publication : The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast.....	71
Chapitre 2 : Le marsouin commun.....	95
Introduction	96
Biologie de l'espèce.....	96
Répartition	98
Publication : Harbour porpoises (<i>Phocoena phocoena</i>) in north-western France: aerial survey, opportunistic sightings and strandings monitoring.....	101
Travaux de génétique des populations.....	107
Publication : A European Melting Pot of Harbour Porpoise in the French Atlantic Coasts Inferred from Mitochondrial and Nuclear Data.....	112
Chapitre 3 : Le phoque gris	133
Introduction	134
Biologie du phoque gris et menaces affectant l'espèce.....	134
Répartition du phoque gris	135
Suivi du déplacement et du comportement des phoques gris en Bretagne.....	137
Génétique des populations.....	139
Les particularités des phoques gris en Bretagne rendent intéressante une étude de génétique des populations	140
Résultats	142
Echantillonnage, extraction et amplification	142
Analyse des polymorphismes de l'ADN mitochondrial	150
Analyse des polymorphismes de microsatellites	161
Recherche de paramètres explicatifs des haplogroupes mitochondriaux et de différenciation génétique.....	163

Ajout de séquences de MCR issu de fèces de phoques gris	179
Ajout des séquences de phoques gris de la mer Baltique	181
Discussion	183
L'échantillonnage conséquent a permis une étude génétique portant sur les 10 dernières années	183
Une grande diversité génétique pour la région de contrôle mitochondriale.....	184
Une absence de structure génétique détectée par les marqueurs nucléaires.....	189
Les paramètres géographiques, biologiques ou les types d'échantillonnages n'amènent pas de différenciation génétique marquée	191
Conclusions biologiques de l'analyse de génétique des populations des phoques gris échoués vivants et morts en Bretagne.	195
L'utilisation de fèces pourrait indiquer une spécificité des individus présents sur les reposoirs	196
Structure génétique du phoque gris à l'échelle européenne	197
Discussion générale.....	199
Les modifications de l'abondance du phoque gris et d'aire de répartition du marsouin commun sont liés à des modifications des écosystèmes	199
Apports de notre étude à la conservation.....	201
Perspectives	203
Conclusions	204
Bibliographie.....	205
Liste des figures	237
Liste des tableaux.....	239
Annexes	240
Matériel et méthodes	241
Tableaux des amorces utilisées.....	249
Publication : code barre de l'ADN, Arvicola.....	251
Publication : culture de cellules de Grand Dauphin, Marine Mammal Sciences	254

Introduction

Les mammifères marins, des espèces clés des écosystèmes marins

Les mammifères marins forment un groupe paraphylétique présent dans toutes les mers

Les mammifères marins sont des mammifères dépendants, partiellement ou totalement, du milieu marin pour se nourrir, se reproduire ou se déplacer (Berta & Sumich 1999). Il s'agit d'un groupe paraphylétique composé de plus de 120 espèces réparties en trois ordres, les cétacés, les siréniens et les carnivores (Committee on Taxonomy. 2011). On peut en trouver dans toutes les mers et océans du monde et dans la grande majorité des écosystèmes marins (Jefferson *et al.* 1993).

Des espèces « clé de voûte » pour les écosystèmes

Les mammifères marins peuvent occuper différents niveaux dans les réseaux trophiques : des siréniens, consommateurs primaires, à l'orque, exemple de super prédateur par excellence ; mais la majorité des espèces sont des prédateurs supérieurs (Pauly *et al.* 1998). Au cours de leur évolution, les mammifères marins se sont diversifiés afin d'exploiter le maximum de la production primaire des écosystèmes. De par leur taille et leur nombre, la quantité de biomasse qu'ils consomment est très importante (Trites *et al.* 1997). La diversité des niches écologiques occupées et la biomasse consommée par les mammifères marins font qu'ils effectuent un important contrôle top-down sur le fonctionnement et la structure des écosystèmes (Bowen 1997).

Des espèces informatives sur l'état de l'écosystème

Parce que les mammifères marins intègrent et reflètent les variations écologiques du milieu sur une large échelle spatiale et temporelle, ils sont les premières sentinelles des changements des écosystèmes marins (Moore 2008). En tant qu'espèces à longue durée de vie, situées pour la plupart au sommet de la chaîne alimentaire, ils vont accumuler les polluants par des phénomènes de *biomagnification* (accumulation le long de la chaîne trophique) et de *bioaccumulation* (accumulation au cours de la vie de l'individu (Pierce *et al.* 2008). Ils seront donc le reflet des pollutions marines (Mössner & Ballschmiter 1997 ; Zhou *et al.* 2008). Les mammifères marins seront aussi très dépendants de la disponibilité de leurs proies (Learmonth *et al.* 2006 ; Sveegaard, Andreasen, *et al.* 2012a) et leurs variations d'abondance et d'aire de répartition peuvent être révélatrices des variations de disponibilité de ces proies (Bearzi *et al.* 2006) ou de modifications de la température (MacLeod *et al.* 2005)

Le milieu marin subit des changements rapides, notamment dus aux actions anthropiques, qui impactent fortement les espèces et les populations

Le changement climatique, principale menace

Depuis 100 ans, la température moyenne de la Terre a augmenté de 0,74°C (GIEC, 2007). Cette augmentation de température est due aux activités anthropiques, notamment l'émission massive de gaz à effet de serre (Levitus *et al.* 2001 ; Reichert 2002 ; GIEC, 2007). Cette augmentation de température est aussi présente dans les milieux marins dont la température moyenne a augmenté de 0,6°C en 100 ans (Hoegh-Guldberg & Bruno 2010) et l'ensemble des mers et océans sont touchés (GIEC, 2007). L'augmentation de température du milieu marin a de nombreux effets secondaires comme des changements du climat, les fontes des glaciers, la modification des courants marins, l'augmentation de la stratification verticale des couches d'eaux ou l'élévation du niveau de la mer (Learmonth *et al.* 2006).

D'autres actions anthropiques ont un fort impact sur les écosystèmes

D'autres actions d'origine anthropique ont des effets sur les conditions physico-chimiques des milieux marins. L'augmentation de la teneur en CO₂ de l'atmosphère va entraîner, par des réactions chimiques en chaîne, une augmentation de l'acidité des océans (Doney *et al.* 2009). Les activités humaines émettent de grandes quantités de contaminants dans le milieu qui vont se retrouver en partie dans le milieu marin (Ducrottoy *et al.* 2000). L'utilisation humaine des milieux côtiers et maritimes entraîne aussi une destruction (Airoldi & Beck 2007), une homogénéisation (Thrush *et al.* 2006) et une fragmentation (Montefalcone *et al.* 2010) des habitats marins.

L'exploitation des ressources biologiques marines a aussi eu un fort impact sur les écosystèmes marins. Depuis 20 ans, 80 millions de tonnes de biomasse sont prélevées annuellement par la pêche et 87% des stocks sont pleinement ou sur-exploités (FAO, 2012), ce qui déséquilibre les réseaux trophiques (Scheffer *et al.* 2005). Les mammifères marins ont aussi été exploités et le sont encore pour certains avec, par exemple, deux millions de grands cétacés chassés dans l'hémisphère Sud au 20^{ème} siècle (Baker & Clapham 2004). Une autre conséquence de l'exploitation des ressources marines sont les captures accidentelles. Par exemple, plus de 1000 dauphins communs sont capturés accidentellement le long des côtes atlantiques françaises (Mannocci *et al.* 2012). Ces captures accidentelles sont loin d'être négligeables pour les écosystèmes. Read *et al.* (2005) estiment que plus de 500 000 mammifères marins pourraient être capturés accidentellement tous les ans dans le monde (Read *et al.* 2006).

Quels impacts ont ces changements sur les écosystèmes et sur les espèces dont les mammifères marins.

Face à ces modifications du milieu qui causent des stress pour les êtres vivants le peuplant, il peut y avoir trois types de réponses différentes : soit ils s'y accommodent par leur plasticité phénotypique, soit ils se déplacent, soit ils meurent (Learmonth *et al.* 2006). Au niveau des espèces, cela peut entraîner des modifications d'aires de répartitions qui vont dépendre de l'habitat préférentiel (MacLeod 2009) et des déplacements des proies (Simmonds & Isaac 2007), des diminutions d'abondance et des extinctions locales ou globales (Pounds *et al.* 1999). Quatre espèces de mammifères marins, la rhytine de Steller, le phoque moine des caraïbes, l'otarie du Japon et le dauphin de Chine, ont déjà disparu à cause des actions anthropiques (Jackson *et al.* 2001 ; Sakahira & Niimi 2007 ; Turvey *et al.* 2007; McClenachan & Cooper 2008)).

Les effets sur les écosystèmes sont très importants : les habitats sont modifiés (Hoegh-Guldberg & Bruno 2010) et les réseaux trophiques, basés sur le développement du plancton très sensible aux variations des conditions physico-chimiques du milieu (Winder & Schindler 2004), vont voir leur productivité changer (Gregg *et al.* 2003) et leur structure se modifier (Beaugrand *et al.* 2002 ; Richardson & Schoeman 2004). Ces impacts sont si importants que certains écosystèmes, comme les récifs coralliens ou les forêts de laminaires, vont être complètement bouleversés (Jackson *et al.* 2001).

Les variations du milieu requièrent de comprendre et de conserver les écosystèmes pour limiter les impacts.

Des actions de conservation sont nécessaires pour limiter les impacts

Les impacts d'origines anthropiques agissent simultanément sur les écosystèmes et souvent de manière synergique (Letcher *et al.* 2010). Cette synergie des stress est une des principales causes d'extinction d'espèces (Brook *et al.* 2008). De plus, les changements sont trop rapides pour que les mécanismes naturels d'adaptation et de spéciation soient suffisants pour éviter les effondrements d'abondance et les extinctions d'espèces (Parmesan 2006). Pour les mammifères marins, DeMaster *et al.* (2001) estiment que le nombre de populations et d'espèces aura fortement diminué dans 100 ans, à cause de l'intensification des menaces d'origine anthropique (DeMaster *et al.* 2001). Il est donc primordial de mettre en place des mesures de conservation des espèces, des milieux et des écosystèmes dans leur ensemble, afin d'éviter, ou au moins de limiter, des catastrophes écologiques (Learmonth *et al.* 2006 ; Gambaiani *et al.* 2009 ; Simmonds & Elliott 2009).

Des suivis des espèces et des populations pertinents sont requis pour mieux connaître et comprendre

Pour mettre en place des projets et des actions de conservation efficaces, il est nécessaire de comprendre au mieux les espèces et les écosystèmes, les modifications du milieu qu'ils subissent et les impacts potentiels et effectifs de ces modifications (DeMaster *et al.* 2001 ; Jackson *et al.* 2001 ; Heller & Zavaleta 2009). Il faut pouvoir détecter et préciser les changements qui ont lieu ainsi que les organismes et les populations les plus en danger (Simmonds & Elliott 2009). Lorsque des mesures de conservation du milieu sont prises, il est de première importance de pouvoir détecter les effets de ces mesures (Gormley *et al.* 2012). Pour tout cela, les suivis temporels des populations et des espèces et l'étude des réactions des espèces aux changements sont de bons moyens de compréhension (Learmonth *et al.* 2006). Ces suivis peuvent être réalisés par différents types d'études de terrain et de laboratoire.

Parmi ceux ci, la génétique est un des moyens les plus efficaces pour obtenir des informations à l'échelle micro-évolutive ou écologique et pour suivre les impacts du changement global (Schwartz *et al.* 2007 ; Frankham 2010). Elle contribue à l'étude et à la conservation des trois types de biodiversité : écosystémique, spécifique et génétique (Frankham 2010). L'analyse de la diversité intraspécifique permet de définir des populations au sein d'une espèce (Moritz 1994 ; Palsbøll *et al.* 2007) et de suivre l'évolution de leur structure dans le temps (Pauls *et al.* 2013). La diversité intraspécifique est aussi une caractéristique essentielle à la résistance aux stress environnementaux et il est primordial de l'étudier pour comprendre les conséquences des changements globaux (Pauls *et al.* 2013). Enfin les outils génétiques sont très utiles pour les études écologiques en permettant d'aider à l'identification d'espèce, à l'étude du régime alimentaire et à la détermination de la richesse spécifique (Valentini *et al.* 2009)

Chez les mammifères marins, la génétique a déjà été souvent utilisée pour caractériser les populations et définir des unités de gestion (par exemple : (Rosenbaum *et al.* 2009 ; Caballero *et al.* 2012). Le suivi de la diversité intraspécifique a permis de détecter de fortes diminutions d'abondance (Hoelzel *et al.* 2002), des taux de captures accidentelles trop importants pour la viabilité à long terme de la population (Pichler & Baker 2012), de déterminer des tailles efficaces de populations ancestrales et des taux de migrations (Fontaine *et al.* 2010) ou encore d'identifier des variabilités génétiques très faibles et menaçant la survie de l'espèce (Schultz *et al.* 2008). Le suivi de l'identification d'espèce par génétique a permis d'identifier l'espèce de mammifères marins (Jayasankar *et al.* 2008), de détecter la présence d'espèce dans des échantillons d'eaux de mer (Foote *et al.* 2012) ou de compléter l'étude du régime alimentaire (Deagle *et al.* 2009).

La mer d'Iroise et ses alentours, un laboratoire d'étude des liens entre mammifères marins et pressions anthropiques

La mer d'Iroise forme une zone géographique particulière. D'abord parce que, grâce à une grande diversité de conditions chimiques, géologiques, bathymétriques et hydrodynamiques, elle présente une très grande diversité d'habitats (Raffin 2003). Ensuite parce qu'au niveau biologique c'est une zone de forte productivité et de grande diversité (Raffin 2003). Une grande partie de la biodiversité des côtes françaises de l'Atlantique et la Manche y est représentée, et c'est une zone frontière entre les peuplements d'habitats chauds du golfe de Gascogne, ceux d'habitats froids des eaux du nord de l'Europe et ceux du domaine océanique atlantique. Enfin elle est fortement impactée par les pressions d'origine anthropiques : la température en mer celtique a augmenté de 0,72°C entre 1982 et 2006 (Belkin 2009) et il est prévu qu'elle augmente encore de 1,5 à 5°C au cours des 100 prochaines années (Philippart *et al.* 2011). C'est aussi une zone de forte exploitation halieutique industrielle, et ce depuis plus d'un siècle, qui montre les signes d'une surexploitation depuis 30 ans (Guénette & Gascuel 2012). Cette zone est aussi très concernée par d'autres usages du milieu marin, tels que le tourisme, les loisirs, les rejets issus de l'industrie et de l'agriculture, le transport maritime et l'aquaculture (Raffin 2003). Ces multi usages et leurs impacts ont amené à la mise en place d'une structure de gestion de la mer d'Iroise et de ses ressources : le Parc naturel Marin d'Iroise.

Au niveau des mammifères marins, c'est une zone extrêmement riche en termes d'abondance et de diversité spécifique. Plus de 25 espèces différentes de mammifères marins ont déjà été observées en mer d'Iroise dont 9 sont courantes (Ridoux *et al.* 2000). Parmi les espèces courantes, on retrouve des écologies, des utilisations de l'habitat et des populations très différentes. Le dauphin commun, l'espèce la plus fréquente, présente des individus du plateau continental et d'autres pélagiques, sans que la structure et la différenciation entre ces populations soient encore bien définies (Pusineri *et al.* 2007). Le grand dauphin possède un écotype côtier sédentaire avec deux colonies résidentes, autour de l'île de Sein et dans l'archipel de Molène, et un écotype pélagique avec des individus semblant être de passage en mer d'Iroise (Liret 2001). Le marsouin commun est une espèce de plateau continental qui semble se déplacer au cours de sa vie (Camphuysen 2004). Le phoque gris est un pinnipède qui forme des colonies, dont une est présente dans l'archipel de Molène, mais avec des comportements individuels très variés (Vincent *et al.* 2005). Les abondances de ces espèces ont varié de manière marquée au cours des 50 dernières années. Le nombre de phoques gris et de grands dauphins résidents augmente depuis les années 60, alors que pour les marsouins communs, on assiste à un retour en mer d'Iroise depuis les années 90.

L'ensemble de ces caractéristiques fait de la mer d'Iroise et des mers alentours, une zone extrêmement pertinente pour le suivi des mammifères marins et des impacts des pressions anthropiques.

Suivi de la variabilité génétique et de la structure des populations et communautés de petits mammifères marins le long des côtes de Bretagne, et liens avec les modifications du milieu marin induites par les activités anthropiques et la conservation des écosystèmes

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes concentrés sur deux espèces de mammifères marins : le marsouin commun et le phoque gris.

Le marsouin commun est le cétacé le plus abondant de l'Atlantique Nord Est (Hammond *et al.* 2002). Il a connu des modifications majeures, de son aire de répartition, au cours des 60 dernières années avec une raréfaction, dans les années 50, puis un retour, dans les années 90, le long des côtes atlantiques françaises et des côtes belges, néerlandaises et allemandes (Reijnders 1992 ; Hammond *et al.* 2013 ; Peltier *et al.* 2013). Les campagnes de mesure d'abondance des petits cétacés SCANS 1 et 2 montrent clairement un déplacement global de l'espèce en Atlantique Nord Est avec une forte abondance au niveau du plateau celtique (Hammond *et al.* 2013) . Au niveau génétique, une séparation a été détectée entre les marsouins communs peuplant la péninsule ibérique et ceux du reste de l'Europe (Fontaine, Baird, *et al.* 2007a) mais la question de l'origine du retour du marsouin commun le long des côtes atlantiques françaises n'est pas encore résolue. Dans le cadre de ma thèse, je me suis penché sur l'étude de la structure génétique des marsouins communs des côtes de Bretagne, et plus largement de France, pour mieux comprendre le retour de cette espèce et déterminer les apports issus des deux populations de la façade atlantique européenne.

Le phoque gris lui est présent, en nombre d'individus réduit, en Bretagne avec environ 50 animaux pour la colonie des sept îles et 150 pour celle de l'archipel de Molène. Cependant son abondance est en constante augmentation depuis les années 60, ce qui est le signe d'une évolution de l'écosystème. Ensuite le nombre de naissances en mer d'Iroise ne suffit pas à assurer cette augmentation, il y a donc des apports extérieurs importants. Des échanges avec les îles britanniques ont déjà été prouvés (Vincent *et al.* 2005) mais la structure génétique européenne n'a pas encore été définie. Enfin, la mer d'Iroise correspond à la limite sud de répartition de l'espèce pour la façade atlantique est et il est intéressant d'y étudier la tendance, car les individus sont plus sensibles aux variations de l'environnement (Gambaiani *et al.* 2009). Dans le cadre de cette thèse nous avons analysé la structure génétique, la variabilité intraspécifique et leurs évolutions sur 11 ans afin d'étudier l'évolution génétique des phoques gris en Bretagne en parallèle de l'augmentation de l'abondance.

Revue bibliographique

L'environnement naturel est en évolution permanente. Tous les écosystèmes, de la forêt tropicale aux fonds abyssaux, subissent constamment des modifications, que ce soient des variations physico-chimiques ou biologiques, des changements aigus ou chroniques, locaux ou globaux. Cette évolution continue existe depuis l'apparition de la vie sur Terre et a entraîné plusieurs crises biologiques majeures, qui ont modifié radicalement la biosphère, en impliquant notamment des disparitions massives d'espèces mais aussi des apparitions de nouvelles. Un exemple particulier est la crise d'extinction du Permien-Trias, qui a conduit à la disparition de 95% des espèces (Benton & Twitchett 2003). Un nouveau facteur à prendre en compte actuellement est l'impact anthropique. Les changements se sont multipliés et amplifiés sous l'action de l'homme. Les impacts sur les écosystèmes sont nombreux, directs ou indirects, globaux ou locaux, et les actions augmentent avec la croissance de la population (Vitousek 1994). Ce changement global entraîne un nombre d'extinctions d'espèces si important et si rapide que certains auteurs parlent d'une crise de la biodiversité (Singh 2002). Le changement global d'origine anthropique se manifeste, pour une part importante, par un changement climatique global, qui a des effets nombreux, directs et indirects (Vitousek 1994 ; Parmesan 2006; GIEC, 2007), mais ce n'est pas le seul : la fragmentation et la dégradation de l'habitat (Travis 2003), la surexploitation des ressources biologiques (Jackson *et al.* 2001), la pollution des milieux (Ducrotoy *et al.* 2000) ou les espèces invasives (Molnar *et al.* 2008), sont, pour chacun, une part du changement global.

Le changement climatique et ses impacts sur les écosystèmes

Origine et réalité du changement climatique

La terre se réchauffe actuellement de manière importante. L'élévation moyenne de température entre 1906 et 2005 atteint 0,74° C selon les estimations du GIEC (2007). Il s'agit d'une vitesse sans précédent au cours des temps géologiques (Evans *et al.* 2010). Jusqu'à récemment, les scientifiques hésitaient à lier ce réchauffement aux émissions de gaz à effet de serre d'origine anthropique (Gambaiani *et al.* 2009). Le Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC) a été mis en place en novembre 1988 par deux organismes de l'ONU. Il s'agit d'un organisme intergouvernemental qui a pour objectifs de mieux comprendre et d'évaluer les risques du changement climatique global. Les travaux du GIEC

ont permis de démontrer la forte corrélation entre augmentation de la température moyenne à l'échelle de la planète et l'activité humaine (GIEC, 2007). Il est établi maintenant que c'est bien cette activité humaine qui est principalement responsable de l'augmentation globale de la température (Levitus *et al.* 2001 ; Reichert 2002 ; GIEC, bilan 2007) même si certains, qualifiés de *climatoseptiques*, semblent encore à convaincre (par exemple Courtillot *et al.* 2007).

L'augmentation de la température n'est pas identique partout : les milieux polaires sont ceux qui connaissent les variations les plus importantes (Parmesan 2006). Certaines zones polaires ont connu une augmentation de température supérieure à 2°C depuis 1970 (GIEC, 2007). Le milieu marin absorbe, quant à lui, une quantité importante de l'énergie supplémentaire et sa température moyenne a augmenté de 0,6°C en 100 ans (Hoegh-Guldberg & Bruno 2010). Là aussi, ces spécificités existent : les différentes mers européennes n'ont pas toutes connu les mêmes variations de température. Les mers fermées, comme la mer Baltique ou la mer du Nord sont plus impactées et les prédictions d'augmentations futures, qui les concernent, sont aussi plus marquées (Philippart *et al.* 2011). La température de la mer Celtique, par exemple, a augmenté de 0,72°C entre 1982 et 2006 (Belkin 2009) et il est prévu qu'elle augmente de 1,5 à 5°C au cours des 100 prochaines années (Philippart *et al.* 2011).

L'influence des variations de température est globale et aucun milieu, marin ou terrestre, n'est épargné. Les augmentations de température ont, de plus, des effets physico-chimiques indirects ; elles provoquent des modifications des précipitations, de la salinité de l'eau, des courants marins et aériens, la fonte des glaciers, le renforcement des événements météorologiques exceptionnels comme les tempêtes et une augmentation du niveau de la mer (cité par exemple par Learmonth *et al.* 2006).

Quels effets a le changement climatique sur les écosystèmes ?

Les effets, directs et indirects, du changement climatique sur les êtres vivants sont déjà bien visibles (Walther *et al.* 2002 ; Parmesan 2006) et ce, du niveau moléculaire à la biosphère (Peñuelas *et al.* 2013). Dans le milieu marin, les principaux effets vont porter sur les réseaux trophiques et l'habitat (Hoegh-Guldberg & Bruno 2010)

Impacts sur les écosystèmes et réactions, de l'être vivant aux communautés

Au niveau individuel, le changement climatique, et notamment les variations de la température, ont des effets physiologiques importants (Peñuelas *et al.* 2013). Ces changements vont modifier la croissance (Dekker & Beukema 1999), la reproduction (Halsband-Lenk *et al.* 2002), l'efficacité du système immunitaire et les besoins énergétiques (Catalán *et al.* 2012). Cela va aussi perturber la phénologie, c'est à dire la temporalité des événements périodiques, des individus, largement dépendante du climat (Walther *et al.* 2002 ;

Parmesan 2006), avec des décalages temporels de migrations annuelles (Huppopp & ppop 2003), des cycles de reproduction (Crick *et al.* 1997) ou des pics de croissance (Winder & Schindler 2004). Le changement climatique entraînera donc des modifications de la fitness (Galloy & Denoël 2010), de la plasticité phénotypique et, dans certains cas, si les effets sont trop importants, la mort, (Halsband-Lenk *et al.* 2002). Pour réagir, les individus peuvent modifier des expressions de gènes amenant des tolérances aux variations de température, en produisant par exemple des protéines de résistance thermique (Feder *et al.* 1997). Des individus mobiles peuvent se déplacer vers des régions correspondant mieux à leur optimum de température (Ma & Ma 2012).

Sur les espèces, le changement climatique exercera des pressions de sélection liées aux variations de température (Pauls *et al.* 2013). Ces pressions de sélection pourront entraîner des phénomènes de microévolution spécifique (Hoffmann & Sgrò 2011) menant à des diminutions de la diversité génétique naturelle (Pauls *et al.* 2013), allant jusqu'à des extinctions locales ou globales (Pounds *et al.* 1999) lorsque ces pressions sont trop fortes. Pour une majorité d'espèces, la réaction pourra consister en une modification des aires de répartition (Perry *et al.* 2005), souvent liée à un déplacement vers des régions plus froides ou des altitudes plus élevées (Parmesan 2006).

Au niveau des communautés, les effets découlent des effets individuels ou spécifiques et des perturbations induites dans les interactions entre espèces (Klanderud & Totland 2007 ; Peñuelas *et al.* 2013). On assiste à des déplacements de prédateurs pour suivre leurs proies, à des augmentations de la sensibilité à des pathogènes (Harvell *et al.* 2009) ou des parasites (Ford 1996), à un changement de la productivité du milieu (Gregg *et al.* 2003) ou à des espèces invasives (Nehring 1998).

Les changements de température et les perturbations des habitats marins

Le changement climatique entraîne des bouleversements des conditions physico-chimiques des habitats marins, qui ne se limitent pas au changement de température (Bindoff *et al.* 2007). Le réchauffement plus important en surface accroît la stratification verticale de la colonne d'eau (Hoegh-Guldberg & Bruno 2010) ce qui, en limitant les apports d'eaux profondes riches, augmente la taille des zones pauvres en nutriments (Bindoff *et al.* 2007) et diminue l'oxygénation de l'eau (Matear *et al.* 2000). Le changement climatique, en modifiant températures et précipitations, va modifier aussi la salinité de l'eau de mer en l'augmentant dans certaines zones, notamment près des tropiques, et en la diminuant dans d'autres : dans les régions polaires (Bindoff *et al.* 2007). Ces modifications hétérogènes de températures et de salinité, à leur tour, entraînent des modifications des courants marins (Bindoff *et al.* 2007). Par exemple, Bryden *et al.*, (2005) estiment que l'intensité du courant nord atlantique (MOC) a diminué de 30% en 50 ans (Bryden *et al.* 2005).

Des habitats marins particuliers tels que les coraux ou les banquises sont très impactés (Hoegh-Guldberg & Bruno 2010). Les récifs coralliens sont très sensibles à l'augmentation de la température et à l'acidification des océans, qui entraînent le blanchissement des coraux puis leur mort (Hoegh-Guldberg *et al.* 2007). Cet effet touche beaucoup de récifs coralliens et s'accroît avec le temps. Ainsi, sur la grande barrière de corail australienne, le nombre de récifs concernés a augmenté de 20% en 5 ans (Berkelmans *et al.* 2004). Des formations végétales marines sont aussi marquées par ces changements comme les forêts de kelp (Steneck *et al.* 2002) ou les herbiers marins (Mayot *et al.* 2005). L'élévation du niveau de la mer pourrait aussi entraîner la disparition de 20% des mangroves de la planète (Alongi 2008). Mais les effets les plus marqués se constatent au niveau de la banquise. En Arctique, la surface de banquise a diminué de 15% en 30 ans (Johannessen *et al.* 2004). Or cet habitat est essentiel aux espèces qui y vivent, que ce soit à l'air libre ou à proximité comme le phytoplancton (Gradinger 2009).

L'ensemble de ces habitats spécifiques, clairement impactés par le réchauffement climatique, joue un rôle critique dans la structuration de la biodiversité marine (Hoegh-Guldberg *et al.* 2007).

La base de la chaîne trophique du milieu marin est fortement impactée par le changement de température

Le réseau trophique du milieu marin repose essentiellement sur les microorganismes du phytoplancton, qui utilisent l'énergie solaire pour produire des biomolécules par la photosynthèse (Pomeroy 1974). Cette photosynthèse permet de produire 45 milliards de tonnes de matière organique par an (Falkowski *et al.* 1998). Cette production est ensuite consommée par le zooplancton ou recyclée dans la boucle microbienne (Pomeroy 1974). Le zooplancton occupe un rôle fondamental dans le cycle de la matière organique, comme consommateur primaire et première proie des prédateurs (Roemmich & McGowan 1995). Plus haut dans la chaîne trophique, il existe une série, plus ou moins longue en fonction des cas, menant des consommateurs secondaires jusqu'aux prédateurs supérieurs (Pomeroy 1974). Les réseaux trophiques marins sont souvent complexes, présentant beaucoup de liens et de connectivité ainsi qu'un fort taux d'espèces cannibales et de prédateurs mutuelles (Link 2002). Cependant, toute cette complexité repose principalement sur une même base : le plancton (Link 2002).

La croissance du phytoplancton est fortement dépendante de la température et de l'apport en nutriment du milieu. Les variations de température et la stratification de la colonne d'eau limitent l'apport en nutriment et donc la croissance du phytoplancton (Winder & Schindler 2004), mais aussi celle du zooplancton (Roemmich & McGowan 1995). Les variations de températures peuvent aussi entraîner des décalages temporels des blooms planctoniques (Winder & Schindler 2004). Enfin, l'acidification des océans induit des diminutions importantes de la croissance, de la calcification et de la fixation du carbone de certaines espèces de plancton (Doney *et al.* 2009).

Ces réactions physiologiques du plancton au changement climatique ont des répercussions sur l'écosystème dans son ensemble. La production primaire de la chaîne trophique du milieu marin est modifiée. La production primaire sur l'ensemble des océans a diminué de 6% en 20 ans (Gregg *et al.* 2003). La surface de zone de faible production a augmenté de 15% en 10 ans (Polovina *et al.* 2008). La biomasse du zooplancton a aussi diminué dans certaines zones, comme dans le sud de la Californie avec une diminution de 80% (Roemmich & McGowan 1995).

Des modifications d'aires de répartitions du plancton sont la conséquence du changement climatique. Par exemple 16 espèces de phytoplancton thermophiles ont colonisé la mer du Nord au cours du 20^{ème} siècle, dont 10 depuis 1990 (Nehring 1998). Les communautés évoluent avec des déplacements d'espèces vers des zones plus froides. Ainsi les espèces de copépodes se sont réorganisées en Atlantique Nord en fonction des modifications de température (Beaugrand *et al.* 2002). Cela a, bien sûr, des conséquences pour l'ensemble des consommateurs du réseau trophique qui doivent s'adapter à la diminution ou aux changements de la production primaire, ainsi qu'aux déplacements de leurs proies (Richardson & Schoeman 2004).

Les activités anthropiques ont d'autres impacts perturbants pour le milieu marin

L'acidification des océans

L'augmentation du CO₂ dans l'atmosphère, provoquée par les activités anthropiques, a aussi pour conséquence l'augmentation de la concentration de CO₂ dissous dans l'océan. Celui-ci va réagir avec l'eau pour former de l'acide carbonique qui va ensuite produire des ions H⁺ et bicarbonates, et contribuer ainsi à augmenter l'acidité des océans (Doney *et al.* 2009). Au cours des 250 dernières années, le pH global des océans a diminué de 0,1 unité, pour atteindre 8,1 qui correspond à un taux de changement probablement jamais atteint au cours des 20 millions d'années précédentes (Guinotte & Fabry 2008). Si les émissions de CO₂ se poursuivent, le pH pourrait diminuer de 0,7 unité au cours des 300 prochaines années (Caldeira & Wickett 2003). En plus de modifier l'acidité, la baisse du pH influe le cycle des carbonates, en diminuant la concentration du carbonate de calcium (CaCO₃) (Doney *et al.* 2009).

Ce phénomène, ainsi que l'acidification, ont des impacts importants sur les espèces marines, notamment celles qui possèdent un squelette calcaire tels que les coraux, les mollusques, les échinodermes ou les crustacés (Fabry *et al.* 2008). L'acidification va influencer sur la calcification mais aussi la croissance, la photosynthèse, la fixation de l'azote et la reproduction. Les réponses physiologiques ne sont pas identiques en fonction des espèces, mais dans la plupart des cas, l'acidification entraîne une diminution de la fonction physiologique. La photosynthèse est la seule exception, puisqu'elle est favorisée, non pas par l'acidification mais par l'augmentation de la concentration de CO₂ qui en est la cause (Doney *et al.* 2009). L'augmentation de l'acidité, ainsi que celle de la concentration en CO₂ et en bicarbonate, vont aussi entraîner un stress chimique pour les animaux et végétaux marins. Par exemple, la croissance, la reproduction et le métabolisme des poissons sur l'ensemble des stades du cycle de vie sont affectés (Guinotte & Fabry 2008).

Perturbations écotoxicologiques du milieu

Les activités humaines produisent une forte quantité de déchets, qui se retrouvent, pour une partie d'entre eux, dans l'environnement terrestre ou marin. Dans l'environnement marin, les pollutions peuvent, soit être d'origine terrestre et transportées jusqu'à la mer par le cycle de l'eau ou par l'action de l'homme, soit directement d'origine maritime (Matthiessen & Law 2002). Ces pollutions peuvent prendre la forme de macro déchets, comme les morceaux de plastiques (Eriksen *et al.* 2013) ou alors de composés dissous comme par exemple, l'azote (Ducrotoy *et al.* 2000), les métaux ou le Tributylétain (Turner 2010). L'augmentation de la pollution du milieu est une conséquence négative du développement rapide de l'industrialisation (Yasuhara & Yamazaki 2005). Le nombre de type de pollution est grand, par exemple en mer du Nord, il y a des pollutions azotées issues des fertilisants, des pollutions métalliques, organiques, nucléaires, des résidus issus de décharges et de stations d'épuration, des hydrocarbures (Ducrotoy *et al.* 2000). Ces émissions de polluants varient dans le temps en fonction des activités anthropiques (Matthiessen & Law 2002) et des législations. Certains composés, démontrés comme étant très toxiques, ont ainsi été interdits par certains pays, par exemple les polychlorobiphényles (PCB), qui sont des composés liposolubles, qui se retrouvent dans tous les compartiments des écosystèmes marins en quantité importante (Delbeke & Joiris 1988).

Ces composés ont de nombreux impacts sur les espèces et les écosystèmes. Leurs effets sont très variés, mais la plupart du temps, négatifs, et portent sur l'ensemble des fonctions physiologiques. Chez les animaux, cela peut toucher le système endocrinien, le système hormonal, le système immunitaire, le système reproducteur, le système nerveux, le système digestif, les autres organes internes (Letcher *et al.* 2010). Lorsque ces effets sont trop

importants, cela entraîne la mort de l'individu. Cette mortalité peut se retrouver à tous les stades de la vie, mais c'est au stade précoce qu'elle est la plus forte (Lau *et al.* 2007).

Au niveau des populations, les contaminants entraînent des effets sur l'abondance, le recrutement et la structure. Cela est dû à la toxicité qui impacte les individus mais aussi à l'adaptation des populations survivantes à l'environnement contaminé (Liu & Morton 1998). Les contaminants peuvent s'accumuler au sein des organismes lorsque l'absorption est supérieure à l'élimination, il s'agit de bioconcentration. Puis ils peuvent se propager et se concentrer le long de la chaîne alimentaire, on parle de biomagnification, et les prédateurs supérieurs sont alors les espèces les plus affectées (Bacelar *et al.* 2009). Les impacts sur les écosystèmes sont importants et le rétablissement est lent, même lorsque la cause de la pollution a diminué (Yasuhara & Yamazaki 2005).

Pêche, surpêche et impacts sur les stocks d'espèces cibles et les écosystèmes

Déjà, à la préhistoire, l'Homme exploitait les ressources marines, et ce faisant, modifiait les écosystèmes (Wing & Wing 2001). En 2011, 78,9 millions de tonnes de biomasse (poissons, mollusques, crustacés...) ont été extraites du milieu marin par l'homme. Cette quantité est stable depuis 1990 mais est trois fois plus grande que celle prélevée en 1960 (FAO, 2012). Les notions de surpêche et de surexploitation sont liées à une diminution de la taille des stocks induites quand les pêcheries capturent plus d'individus que le surplus de production des populations concernées (Beamish *et al.* 2006). Depuis 1950, le nombre de zones présentant un taux de captures non soutenable a augmenté sans interruption, et ce, dans toutes les zones du globe (Coll *et al.* 2008). En 2010, 30% des stocks mondiaux étaient estimés surexploités et 57% pleinement exploités (FAO, 2012).

Ces prélèvements conséquents effectués sur la biomasse des milieux marins a évidemment des effets très négatifs sur les espèces exploitées ainsi que sur les écosystèmes. Le premier impact est la diminution de l'abondance des espèces cibles, qui peut être très forte comme, par exemple, le cas de la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*) dont l'abondance a drastiquement chuté dans l'Atlantique Nord à cause de la pêche (Cardinale & Svedäng 2004). La pêche, en capturant principalement les individus âgés et de grande taille, modifie la structure des populations en entraînant la quasi disparition des individus les plus âgés. Ceci fragilise les populations, car les individus jeunes sont plus sensibles aux variations de l'environnement et la disparition des individus âgés diminue la capacité de résilience, c'est à dire de retour à l'état initial, après une perturbation, de la population (Beamish *et al.* 2006). De manière plus surprenante, la pêche entraîne aussi une évolution des espèces cibles, qui

peuvent montrer une reproduction plus précoce et une taille à maturité plus faible (Palkovacs 2011).

Au niveau des communautés, la pêche d'une espèce cible a des répercussions sur toutes les espèces liées, notamment ses proies. Par un effet *top-down*, c'est à dire un effet des prédateurs sur les proies, celles-ci vont voir leur abondance augmenter puisque celle de leur prédateurs aura diminué, puis leurs propres proies vont, elles, diminuer et ainsi de suite en descendant tout le réseau trophique (Scheffer *et al.* 2005). Certains auteurs suggèrent que la pêche entraîne une coévolution des proies des espèces cibles, qui connaissent un virage évolutionnaire d'un phénotype anti-prédateur à un phénotype d'exploitation du milieu, cette coévolution pouvant redescendre aussi le long du réseau trophique (Palkovacs 2011). A l'état stable, les écosystèmes sont en situation d'équilibre complexe. La surexploitation de certaines espèces peut entraîner des modifications brutales des écosystèmes. Par exemple la surpêche de poissons herbivores dans les systèmes coralliens a permis le développement des macro algues, qui ont alors recouverts les coraux, provoquant de fortes mortalités (Jackson *et al.* 2001). Enfin certaines espèces comme les coraux, les végétaux ou les mollusques formant des colonies, appelées espèces *ingénieuses*, ont un rôle important dans la mise en place ou la structuration de l'habitat (Coleman & Williams 2002). L'exploitation de ces espèces a un impact potentiel très fort sur les autres espèces et l'écosystème.

Utilisations anthropiques et aménagements du littoral mènent aussi à des modifications physiques des habitats marins

Par ses activités maritimes et côtières, l'homme modifie les habitats marins. L'urbanisation importante du littoral détruit des habitats naturels et les remplace par des habitats artificiels telles que les digues (Toft *et al.* 2007). Les chalûtages de fonds et les dragages détériorent fortement les habitats benthiques (Thrush *et al.* 1998 ; Thrush *et al.* 2001). La mise en place de structure offshore, comme les éoliennes, modifie les habitats marins, à cause de la mise en place de fondations importantes, mais aussi par un déplacement des sédiments (Gill 2005). La création de fermes aquacoles est aussi une cause importante de destruction d'habitat côtier, par exemple, en Thaïlande où un quart de la surface totale de mangrove a été transformé pour l'aquaculture de la crevette en 32 ans (Cheevaporn & Menasveta 2003). Les modifications du littoral, en plus d'une destruction, entraînent aussi une homogénéisation (Thrush *et al.* 2006) et une fragmentation (Montefalcone *et al.* 2010) des habitats marins.

Ces modifications de l'habitat ne sont pas récentes, et les effets cumulés sont importants. Ainsi en Europe, cela fait 2500 ans qu'il existe des destructions d'habitats marins liés à des aménagements du littoral, et aujourd'hui 85% des habitats côtiers sont impactés. La

disparition des récifs d'huîtres indigènes est estimée à plus de 90% par rapport à l'habitat initial (Airoidi & Beck 2007).

La modification, la fragmentation et la perte d'habitat sont considérés comme faisant partie des menaces les plus importantes pour la biodiversité (Sih *et al.* 2000; Airoidi & Beck 2007). Elles peuvent entraîner des extinctions d'espèces marines (Robert et Hawkins, 1999). La fragmentation de l'habitat limite les possibilités de migration et augmente le risque d'extinction locale (Walther *et al.* 2002). Les modifications d'habitats en mer Méditerranée entraînent des modifications de la densité, de la production et de la biomasse des espèces liées à ces habitats (Claudet & Fraschetti 2010). Au niveau des écosystèmes, les perturbations de l'habitat vont fragiliser les équilibres entre espèces en favorisant certaines et en défavorisant d'autres. Il y a un lien entre l'intensité des perturbations de l'habitat et les changements de la structure de la communauté utilisant celui ci. Ainsi, les pêcheries de fond vont entraîner une perte importante de l'épifaune benthique et augmenter la présence de charognards (Thrush *et al.* 1998). Il y aussi un lien entre l'intensité des perturbations de l'habitat, la perte de diversité spécifique au sein de cet habitat et le bon fonctionnement des écosystèmes (Thrush *et al.* 2001).

Les effets de ces menaces sont synergiques

Le changement climatique est global, et malgré des variations d'intensité locales, il impacte, tout comme l'acidification des océans, l'ensemble des écosystèmes marins (GIEC, 2007). L'exploitation des ressources halieutiques a lieu dans toutes les mers et océans (FAO, 2012). Les contaminants présents dans les mers ne sont pas partout les mêmes, mais la plupart des écosystèmes marins sont touchés. La majorité des écosystèmes marins est donc soumise simultanément à plusieurs stress d'origine anthropique. En Arctique par exemple, la liste des stress que subit l'écosystème marin est impressionnante : surpêche, chasse, destruction de l'habitat, augmentation du trafic maritime et du tourisme, arrivée de nouvelles espèces et de pathogènes, de contaminants, changement climatique et fonte des glaces sont tous présents ensemble (Letcher *et al.* 2010). Les effets simultanés de ces pressions peuvent être additifs, partiellement ou complètement, ou synergiques, c'est-à-dire que les effets simultanés seront plus forts que la somme des effets isolés (Brook *et al.* 2008). Par exemple, l'augmentation de la température et de la salinité dues au changement climatique amplifie la toxicité de certains polluants par un mécanisme physico-chimique (Noyes *et al.* 2009). La présence de stress multiples diminue aussi les capacités de résistance des individus et des espèces. Ainsi, l'application simultanée d'un stress salin et d'un stress thermique empêche complètement le développement de colonies de diatomées, alors que l'application d'un seul des deux facteurs ne fait que de le limiter (Roger *et al.* 2012). L'apparition temporelle successive de stress différents peut aussi avoir un fort impact, car le premier stress aura entraîné une sélection des

individus tolérants, qui va diminuer la diversité au sein de l'espèce et donc la capacité à résister au stress suivant (Provan 2013).

Par modélisation, il a été montré que la perte et la fragmentation d'habitats pouvait entraîner des extinctions locales plus rapides face à un stress climatique et que l'importance de cet effet synergique dépendait de la spécialisation de l'espèce (Travis 2003). Des expériences portant sur la résistance d'une espèce de zooplancton à 3 stress différents (l'augmentation de la température, la fragmentation de l'habitat et l'exploitation), ont montré que les trois stress cumulés entraînaient une diminution de la population de 70% par génération, soit 50 fois plus vite que la population contrôle, sans aucun stress (Mora *et al.* 2007). L'effondrement brutal des stocks de morue en Atlantique Nord, pourrait venir d'une modification de l'écosystème due au changement climatique, avec notamment des modifications de la composition planctonique causé par des modifications de la température, impactant une espèce déjà fortement touchée par la surexploitation (Beaugrand *et al.* 2008). Des effets en cascade sont aussi possibles, par exemple : la surexploitation des espèces de haut niveau trophique entraîne un affaiblissement de l'écosystème et augmente sa vulnérabilité à d'autres stress (Jackson *et al.* 2001).

La synergie de stress multiples est une des principales causes d'extinction d'espèces. Il est donc primordial de tenir compte de ces synergies pour la compréhension et la conservation des écosystèmes (Brook *et al.* 2008).

Les mammifères marins

Qu'est ce qu'un mammifère marin ?

Les mammifères marins sont définis comme étant des mammifères dépendant du milieu marin pour leur survie ou leur cycle de développement. Ils ne correspondent pas à un groupe taxonomique unique. Il existe 125 espèces de mammifères marins vivant actuellement (Committee on taxonomy, 2011). Ils appartiennent à 3 ordres : les cétacés, les siréniens et les carnivores. Le terme de mammifères marins regroupe aussi quelques espèces d'eau douce comme le dauphin rose de l'Amazone (*Inia geoffrensis*) qui appartiennent à l'ordre des cétacés. il y a actuellement 125 espèces de mammifères marins dans le monde, dont 33 espèces de pinnipèdes, 86 de cétacés, 4 de siréniens, 2 de loutres marines et l'ours blanc (Committee on taxonomy, 2011). Le nombre global d'espèces de mammifères marins change régulièrement, à cause de modifications de la taxonomie, de découvertes de nouvelles espèces (Möller *et al.* 2008) et d'extinctions (Turvey *et al.* 2007).

L'ordre le plus connu des mammifères marins est celui des cétacés. Il regroupe 86 espèces, dont les dauphins, les baleines, les marsouins, les baleines à bec et les dauphins de rivières (Committee on taxonomy, 2011). Les cétacés, qui sont retrouvés dans l'ensemble des mers et océans du globe, sont complètement inféodés au milieu aquatique (Shirihai & Jarrett 2007). Les siréniens, eux aussi complètement adaptés au milieu aquatique, regroupent 4 espèces actuelles, le dugong (*Dugong dugon*) et 3 espèces de lamantins. Ils vivent dans la zone tropicale des océans Indien, Pacifique et Atlantique (Vianna *et al.* 2006). Les pinnipèdes appartiennent, quant à eux, au groupe des carnivores. Il existe 33 espèces de pinnipèdes, répartis en trois grands groupes (Berta & Churchill 2012) : les *Otariidae* comprennent 15 espèces, les *Phocidae*, 18 et les *Odobenidae* une seule : le morse (*Odobenus rosmarus*) Les pinnipèdes occupent principalement les milieux tempérés et polaires (Kovacs *et al.* 2012). Ils passent une partie de leur cycle de vie sur la terre, notamment pendant leur période de mue et de reproduction, mais ils se nourrissent et se déplacent dans l'eau (Shirihai & Jarrett 2007).

Les mammifères marins, un groupe paraphylétique aux multiples points communs

Malgré le fait qu'ils appartiennent à différents groupes taxonomiques, les mammifères marins partagent des caractéristiques communes qui en font un groupe paraphylétique cohérent.

Plusieurs caractéristiques des mammifères sont assez spécifiques dans le milieu marin. Les mammifères sont des animaux homéothermes, mettant en œuvre des mécanismes de thermorégulation qui leur permettent de maintenir un métabolisme stable et plus intense que les poïkilothermes (Ivanov 2006). Les mammifères sont vivipares et la naissance est suivie d'une phase de soins parentaux et d'allaitement, qui augmente les chances de survie des petits (par exemple : Waerebeek & Read 1994 ; Georges & Guinet 2000; Hill *et al.* 2007). Ils présentent des comportements sociaux complexes tels que des échanges sonores, des jeux, des techniques de chasses en groupe (Simmonds 2006 ; Tripovich *et al.* 2008). Ils sont mobiles et beaucoup d'espèces de mammifères marins peuvent parcourir de grandes distances au cours de leur vie lors de migrations annuelles ou non (par exemple Read & Westgate 1997 ; Vincent *et al.* 2005 ; Mizroch *et al.* 2009). Ils possèdent aussi une longévité assez importante de 15 ans pour les petits cétacés et pinnipèdes, à plus de 100 ans pour la baleine du Groenland (*Balaena mysticetus*) (Shirihai et Jarret, 2007).

Parce que le milieu marin est très différent du milieu terrestre dont sont issus les mammifères marins, ils possèdent plusieurs adaptations convergentes à ce milieu (Reidenberg 2007) :

Les adaptations au déplacement dans l'eau se retrouvent dans la transformation des membres en nageoires, la disparition des membres postérieurs et l'apparition de la nageoire caudale pour les cétacés, l'adaptation des téguments à l'eau, soit par spécialisation de la fourrure devenue étanche à l'eau, soit disparaissant pour favoriser l'isolation et l'hydrodynamisme, et enfin par la présence d'une couche de graisse sous-cutanée entourant l'animal pour limiter les pertes de chaleur et permettant l'adaptation de la forme du corps qui devient plus hydrodynamique (Reidenberg 2007).

Des capacités de stockage important d'oxygène, d'adaptation du rythme cardiaque, du métabolisme et du catabolisme de l'acide lactique représentent d'autres adaptations des mammifères marins, leur octroyant des capacités uniques de plongée et d'apnée (Kooyman *et al.* 1981). Les mammifères marins présentent aussi des adaptations à l'alimentation en milieu marin avec des modifications de la dentition et du crâne, comme le développement du rostre des cétacés ou des mâchoires des pinnipèdes, pour optimiser la capture de proies (Uhen 2007). Enfin le milieu marin étant un milieu où la lumière est limitée, surtout en profondeur, les mammifères marins ont développé d'autres sens afin de se repérer et de chasser. Les

pinnipèdes ont développé la sensibilité de leurs vibrisses aux vibrations (Dehnhardt *et al.* 2001) et les odontocètes ont développé un système d'écholocation (McKenna *et al.* 2012).

Enfin c'est surtout leur rôle écologique qui rapproche le plus les mammifères marins. Un grand nombre de niveaux trophiques sont occupés par les mammifères marins, des herbivores avec les siréniens jusqu'au sommet de la chaîne alimentaire avec les orques. La majorité des mammifères marins sont des prédateurs supérieurs (Pauly *et al.* 1998) considérés quasiment tous comme des super prédateurs, car dépourvus de prédateurs naturels, en dehors d'autres mammifères marins (Bowen 1997 ; Trites *et al.* 1997 ; Pauly *et al.* 1998 ; Link 2002). Parce que ce sont des animaux de grande taille, possédant un fort métabolisme, les mammifères marins prélèvent une quantité importante de biomasse (Trites *et al.* 1997). Leur place dans les réseaux trophiques et la biomasse consommée font que les mammifères marins agissent sur le fonctionnement et la structure des écosystèmes par un fort contrôle *top-down* (Bowen 1997).

Les impacts du changement global sur les mammifères marins

Les impacts du changement climatique

Peu d'effets directs de l'augmentation de la température sur les mammifères marins sont observés

Les mammifères marins sont des homéothermes. Chaque variation de température du milieu extérieur entraînera donc une réaction physiologique de thermorégulation dont le but sera de maintenir la température interne de l'organisme à son idéal. Ceci fait que les homéothermes sont moins sensibles aux variations de la température du milieu (Ivanov 2006). Les effets directs du réchauffement climatique sont donc, à priori, relativement faibles (Learmonth *et al.* 2006 ; Gambaiani *et al.* 2009 ; Simmonds & Elliott 2009). Seuls quelques espèces, limitées dans leurs déplacements et vivant dans des eaux chaudes, comme le vaquita (*Phocoena sinus*) dans le Golfe de Californie, seraient directement menacés par l'élévation de la température (Learmonth *et al.* 2006 ; Simmonds & Isaac 2007).

Les exemples d'effets directs de variations de températures sur la physiologie des mammifères marins sont très rares.

Des effets liés aux impacts de l'augmentation de la température sur les habitats sont par contre clairement démontrés

Quelques effets clairs mais indirects de l'augmentation de la température ont des impacts sur les mammifères marins. La fonte des glaces, induite par l'augmentation de la température, a, par exemple, un effet sur les mammifères marins qui en dépendent

(Learmonth *et al.* 2006 ; Kovacs & Lydersen 2008). La diminution de la couverture neigeuse a entraîné un recrutement plus faible des phoques annelés (*Phoca hispida*) dans la baie d'Hudson entre 1962 et 2002. Ici le recrutement est pris comme nombre de jeunes survivants à leur première année. Les phoques annelés utilisent, en effet, la couverture neigeuse pour se construire une tanière pendant la période d'allaitement qui dure 6 semaines entre mars et juin. La diminution de l'épaisseur de neige entraîne donc une diminution de la protection de la tanière contre les prédateurs (Ferguson *et al.* 2005). Un autre exemple des effets indirects des hausses de température vient de la diminution de la banquise en Arctique et de l'augmentation de sa fragmentation. L'habitat de l'ours polaire (*Ursus maritimus*) a été réduit, ce qui l'a obligé à effectuer de plus longs déplacements (Derocher *et al.* 2004). L'élévation de la mer et l'augmentation du nombre et de la puissance des tempêtes affectera clairement les reposoirs des pinnipèdes ainsi que les zones de faibles profondeurs qu'ils utilisent comme zones de mise-bas et de nurserie (Learmonth *et al.* 2006). Certains auteurs supposent que cela pourrait provoquer la disparition du phoque moine de Méditerranée par l'inondation des grottes qui sont son dernier refuge (Harwood 2001 ; Learmonth *et al.* 2006).

L'effet le plus drastique du changement climatique sur les mammifères marins se réalise à travers la disponibilité de leurs proies

La majorité des impacts du changement climatique sur les mammifères marins sont attendus par le biais du réseau trophique (Simmonds & Isaac 2007). La plupart des mammifères marins appartiennent aux hauts niveaux trophiques (Pauly *et al.* 1998), leur distribution et leur abondance sont fortement influencées par la disponibilité des proies (Kenney *et al.* 1996 ; Gambaiani *et al.* 2009). Or le réseau trophique dans sa globalité est très fortement impacté par le changement climatique (voir partie Le changement climatique et ses impacts sur les écosystèmes). Notamment l'impact sur le plancton (Roemmich & McGowan 1995 ; Beaugrand *et al.* 2002 ; Winder & Schindler 2004) remonte ensuite tout au long de la chaîne trophique (Richardson & Schoeman 2004). Les proies des mammifères marins voient leurs aires de répartition modifiées avec les variations de température. Il a, par exemple, été montré que deux tiers des poissons de la mer du Nord, dont des espèces proies de mammifères marins comme le tacaud commun ou le merlan, avaient connu une modification de leur latitude ou de leur profondeur moyenne en 25 ans, en lien avec le réchauffement climatique (Perry *et al.* 2005). Il est prévu que cet effet se renforce avec le temps. Au vu des modifications des conditions environnementales prédites par la modélisation du changement climatique, Stenevik et Sundby (2007), prévoient en effet des modifications importantes touchant les espèces commerciales de poissons dans les eaux norvégiennes. Par exemple, ils prédisent que la mer du Nord sera occupée principalement par les maquereaux et harengs au nord et par les sardines et les anchois au Sud (Stenevik & Sundby 2007). Rodhouse (2012), prévoit quant à lui, que le changement climatique aura aussi des conséquences sur l'abondance et la distribution des céphalopodes qui sont des proies d'importance pour certaines espèces de mammifères marins, comme le cachalot ou l'éléphant de mer (Rodhouse 2012). La principale menace, conséquence de l'augmentation de température pour les mammifères marins, viendra

donc probablement des modifications des ressources alimentaires résultant du changement climatique (Learmonth *et al.* 2006).

Effet du changement climatique, à travers le réseau trophique, sur les individus

Plusieurs conséquences peuvent être attendues des baisses de la disponibilité des proies, liées au changement climatique. Une diminution de l'alimentation peut conduire à un affaiblissement et une famine allant potentiellement jusqu'à la mort de l'individu. Par exemple, l'hypothèse d'un lien entre changement climatique, abondance de proies et condition physiologique du prédateur a été émise pour le marsouin commun et sa proie, le lançon, en Ecosse (MacLeod *et al.* 2007). Les auteurs expliquent que l'augmentation de la famine des marsouins communs pourrait être liée à une diminution de l'abondance du lançon, elle-même conséquence du changement climatique. Il faut noter cependant que ces résultats sont contestés par d'autres auteurs, notamment au vu du nombre d'échantillons jugé insuffisant en regard des conclusions (Thompson *et al.* 2007). La mortalité importante de baleines grises (*Eschrichtius robustus*) qui a eu lieu en 1999/2000 sur la côte nord est du Pacifique est, elle aussi, attribuée à un manque de disponibilité des proies, qui aurait pu entraîner une famine et la mort. Ces variations d'abondance des amphipodes, proies des baleines grises, seraient dues à des modifications des conditions océanographiques et au réchauffement de l'eau (Moore *et al.* 2003 ; Simmonds & Isaac 2007).

Mais le manque de disponibilité des proies peut aussi se traduire, de manière à priori moins drastique, par une modification de l'alimentation (Simmonds & Elliott 2009). Au Groenland, Heide-Jorgensen *et al.* (2011) ont montré que la réserve énergétique des marsouins communs s'était améliorée entre 1995 et 2009, en comparant régime alimentaire et quantité de réserves lipidiques, ce changement s'expliquant par une modification du régime alimentaire. Les auteurs expliquent que la diminution de la couverture de glace et le déplacement d'espèces de poissons, comme la morue, de l'Atlantique du sud vers le nord, à cause du réchauffement climatique, ont permis au marsouin commun de chasser plus et de capturer des proies plus nutritives (Heide-Jørgensen *et al.* 2011). Amstrup *et al.*, eux décrivent des cas de cannibalisme chez l'ours polaire dans le Nord du Canada en 2004. C'est la première fois que ce type d'interaction intra spécifique est observée chez cette espèce et les auteurs émettent l'hypothèse qu'elle pourrait être liée au stress nutritionnel résultant de la diminution de la couverture de glace (Amstrup *et al.* 2006).

Le temps consacré à l'alimentation et les stratégies mises en place pour chasser peuvent aussi dépendre des types de proies disponibles. Lusseau *et al.*, ont étudié, en parallèle, les liens entre l'abondance des saumons et la composition des groupes sociaux chez l'orque au Canada et le grand dauphin en Ecosse. Ils ont montré qu'il existait une corrélation statistique entre la taille des groupes, l'abondance des proies et les variations climatiques. Lorsque les températures élevées entraînent des recrutements trop faibles des jeunes saumons, l'abondance des proies des orques et des grands dauphins sera diminuée les années suivantes et les groupes de prédateurs qui se formeront seront plus petits, ceci se retrouvant pour les

deux espèces (Lusseau *et al.* 2004). Il y a donc une adaptation du comportement des mammifères marins à la disponibilité des proies.

La disponibilité des proies est un facteur important pour une reproduction efficace et un taux de recrutement élevé des mammifères marins. La diminution de l'abondance des proies due aux modifications climatiques peut entraîner une diminution du taux de natalité et donc du recrutement. C'est le cas pour la baleine franche de l'Atlantique Nord (*Eubalaena glacialis*) dont le taux de natalité dépend de l'abondance d'une espèce proie de zooplancton, *Calanus finmarchicus*, elle même liée aux variations de température (Greene & Pershing 2004). C'est aussi le cas pour l'otarie de Kerguelen (*Arctocephalus gazella*) des îles Sandwich du sud, qui présente une forte diminution de la natalité les années de fortes températures (Forcada *et al.* 2005). Les auteurs estiment qu'il est très probable que le lien entre température et natalité se fasse par l'intermédiaire du krill, proie principale de l'otarie de Kerguelen, qui est fortement impacté par les fortes températures.

Enfin, plusieurs modèles montrent que ces impacts vont perdurer et même s'intensifier au cours du temps avec la poursuite de l'élévation de la température, et ainsi menacer de nouvelles espèces et populations (Learmonth *et al.* 2006 ; Simmonds & Elliott 2009). Ainsi, Gambaiani *et al.*, ont montré que l'élévation de la température en Méditerranée allait entraîner une diminution de l'abondance de *Meganyctiphanes norvegica*, qui est déjà situé en limite de sa tolérance thermique et qui ne pourra plus se déplacer vers le nord. Cette espèce d'euphausiacés étant la principale nourriture des rorquals communs, la population de Méditerranée semble donc très menacée dans un futur proche (Gambaiani *et al.* 2009).

Déplacement et modifications d'aire de répartition et d'abondance dus aux changements climatiques

Les mammifères marins sont des animaux capables de mouvements individuels, ils peuvent donc se déplacer pour fuir les conditions défavorables du milieu. Une des conséquences de l'élévation de la température, directe ou à travers les modifications du réseau trophique, voire de l'habitat, est de provoquer le déplacement de mammifères marins et donc des modifications d'aires de répartition au niveau des populations et des espèces (MacLeod 2009). Par exemple, il a été montré, en Nouvelle Zélande dans les années 90, que les observations de dauphins communs se faisaient à proximité de la côte lors de phases de températures élevées, et de manière plus éloignée lorsque les températures étaient plus basses. Les variations de température dépendaient de la saison et de l'influence du phénomène El Niño. La température de surface de l'eau a donc un impact sur les mouvements et la distribution du dauphin commun (Neumann 2001).

En Ecosse, le suivi des échouages de cétacés a montré un changement de la structure de la communauté entre 1948 et 2003. Quatre nouvelles espèces de cétacés ont été observées depuis 1985 alors qu'il n'y avait pas de nouvelles espèces observées entre 1965 et 1985. Sur ces 4 espèces, 3 sont des espèces de milieu tempéré chaud à tropical (dauphin bleu et blanc,

dauphin de Fraser et cachalot pygmée). Les auteurs estiment que l'augmentation de la température est la cause de l'arrivée de ces individus en Ecosse (MacLeod *et al.* 2005). La même étude, basée sur le suivi des échouages, mais aussi sur des survols aériens, montre une diminution des observations du lagénorhynque à bec blanc, une espèce d'eau froide, et une augmentation des observations du dauphin commun, une espèce d'eau tempérée à chaude. Là encore, les auteurs estiment que c'est l'augmentation de la température qui entraîne ces modifications d'abondances (MacLeod *et al.* 2005).

Certains auteurs estiment que les modifications d'aires de répartitions liées au changement du climat, pourraient représenter un cas général et impacter un grand nombre d'espèces de mammifères marins. Ainsi, en comparant les habitats préférentiels, les prédictions d'élévation de la température et les possibilités géographiques de déplacement de 78 espèces de cétacés, MacLeod estime que 88% de ces espèces vont voir leurs aires de répartition modifiées par l'élévation de la température (MacLeod 2009). Dans certains cas, il semble que ces modifications puissent être favorables à l'espèce, en entraînant une augmentation de l'aire de répartition. Cela concernerait 38% des espèces étudiées, principalement des espèces d'eaux chaudes. Pour la moitié des espèces étudiées, MacLeod (2009) prévoit des modifications défavorables, qui entraîneraient des diminutions d'aires de répartition. Cela concerne principalement les espèces qui vivent dans les hautes latitudes et qui ne pourront donc pas se déplacer vers des latitudes encore supérieures (MacLeod 2009). Ces espèces font donc partie de celles qui sont les plus menacées par le changement climatique (Learmonth *et al.* 2006 ; Inter-Research & MacLeod 2009).

De manière plus globale, des modélisations de biodiversité spécifique en eaux profondes sur les 100 prochaines années ont été réalisées en utilisant les optima de température de plusieurs genres de cétacés et les scénarii d'élévation de la température du GIEC ans (Whitehead *et al.* 2008). Les résultats prévoient que les zones polaires pourraient connaître une augmentation de la diversité des cétacés de plus en plus importante alors que les zones tropicales pourraient voir leur diversité spécifique diminuée.

Les autres menaces d'origine anthropique

La surexploitation directe des mammifères marins entraîne des réductions drastiques de l'abondance

Historiquement, les premières perturbations importantes causées par l'homme en milieu marin ont été dues à la surexploitation (Jackson *et al.* 2001). Cela a entraîné l'extinction d'espèces dans les écosystèmes, notamment côtiers. Ce fut, par exemple, le cas de la Rhytine de Steller (*Hydrodamalis gigas*) : cette espèce de sirénien a été chassée par l'homme au cours des 27 ans qui ont suivi sa découverte jusqu'à son extinction en 1768 (Jackson *et al.* 2001). Un autre cas emblématique d'extinction de mammifères marins lié à

leur surexploitation est celui du phoque moine des Caraïbes (*Monachus tropicalis*) : alors que l'abondance originelle de l'espèce est estimée à 250 000 individus, la chasse intensive qui en a été pratiquée au 18^{ème} siècle, l'a entraîné au bord de l'extinction, qui a finalement eu lieu en 1952 (McClenachan & Cooper 2008).

Le cas de surexploitation des mammifères marins le plus connu est la chasse intensive à la baleine. Et même si cette chasse n'a pas entraîné d'extinction d'espèces et qu'un moratoire international a été mis en place en 1982, la diminution d'abondance des espèces concernées a été très importante au cours de plus de 100 ans de chasse industrielle intensive entre 1870 et 1982. Il est ainsi estimé que plus de deux millions de baleines ont été capturées dans l'hémisphère Sud au 20^{ème} siècle. La baleine franche australe (*Eubalaena australis*), par exemple, aurait vu son abondance divisée par 10, passant de 80 000 individus à 8 000, avec un minimum atteint en 1920 (Baker & Clapham 2004). Des études génétiques ont estimé que le rorqual commun (*Balaenoptera physalus*) était actuellement à 4% de son abondance initiale pour le stock d'Atlantique Nord (Roman & Palumbi 2003). Des populations de baleines sont encore actuellement au bord de la disparition, suite à la chasse, telle que la population du Pacifique Ouest de baleines grises (*Eschrichtius robustus*), qui est encore actuellement à un niveau très bas, moins de 50 individus matures, est très menacée par l'ensemble des autres pressions anthropiques (Weller *et al.* 2002).

Les petits mammifères marins ont aussi été surexploités dans certaines zones du monde. Par exemple, en Turquie, la chasse au dauphin commun et au marsouin commun s'est poursuivie jusqu'en 1983, notamment pour la production d'huile. Il est estimé que 4 à 5 millions de petits cétacés ont ainsi été chassés en mer Noire au 20^{ème} siècle (Tonay & Öztürk 2012). La chasse aux pinnipèdes a aussi été importante pour certaines espèces, par exemple pour l'éléphant de mer du Nord (*Mirounga angustirostris*) qui a été intensivement chassés pour sa graisse (Hoelzel 1999). Il existe encore actuellement trois types de chasse aux mammifères marins : les chasses aborigènes de subsistance telle que la chasse au petit rorqual au Groenland (Reeves 2002), les chasses commerciales telle que la chasse au phoque du Groenland (Johnston *et al.* 2000) ou la chasse à la baleine pratiquée par la Norvège et l'Islande et les chasses « scientifiques » japonaises (Clapham *et al.* 1999).

La surexploitation des ressources marines et les compétitions entre mammifères marins et pêcheries produisent des effets directs et indirects

Comme cela a été évoqué plus haut, les mammifères marins sont très tributaires de leurs proies. La surexploitation des ressources marines (poissons, crustacés, mollusques, céphalopodes..) a donc un impact important. La population humaine, en constante augmentation, tire de la mer une grande partie de sa nourriture. Actuellement, 80 millions de tonnes de biomasse sont extraites tous les ans et 84% des stocks sont pleinement exploités ou surexploités (FAO, 2012).

Les pêcheries et les mammifères marins sont en partie en compétition. Dans une étude portant sur l'océan Pacifique, Trites et al (1997) ont utilisé les estimations de taille de population, de biomasse, de régime alimentaire et de consommation journalière des mammifères marins du Pacifique, pour déterminer la consommation totale de biomasse et la comparer avec celle capturée par les pêcheries. Ils ont montré ainsi que seulement 35% des proies consommées par les mammifères marins étaient des proies d'intérêt commercial et que les 50 millions de tonnes prélevées chaque année dans le Pacifique correspondent à un tiers de la consommation annuelle des mammifères marins (150 millions de tonnes). Il existe donc une compétition directe mais partielle. Il existe aussi une compétition indirecte à travers le réseau trophique et la production primaire nécessaire à la production des proies et des espèces capturées (Trites *et al.* 1997).

Des effets concrets et ciblés de cette compétition ont pu être démontrés. Cela peut être des modifications du régime alimentaire. Par exemple, Gomez-Campos *et al.* (2011) ont comparé le régime alimentaire du dauphin bleu et blanc le long de la côte est de l'Espagne, entre 1987 et 2010. Ils ont démontré que les adultes, qui avaient un régime alimentaire centré sur le merlu et la sardine (90%) en 1990, avaient actuellement un régime alimentaire beaucoup plus varié, dans lequel ces deux espèces ne représentent plus que 40%. Les auteurs associent cette modification à l'exploitation commerciale des deux espèces de poisson qui ont entraîné une forte diminution d'abondance (Gómez-Campos *et al.* 2011). La surexploitation des ressources marines peut aussi entraîner des diminutions d'abondance des mammifères marins. Par exemple, Bearzi *et al.*, (2006) ont étudié l'abondance du dauphin commun par transects maritimes dans l'est de la mer Ionienne entre 1997 et 2004. Cette abondance est fortement décroissante et le taux de rencontre divisé par 12 en 8 ans. Les auteurs associent cette diminution d'abondance avec la surpêche qui a entraîné une diminution drastique des proies du dauphin commun comme la sardine ou l'anchois (Bearzi *et al.* 2006).

DeMaster *et al.* (2001) ont essayé d'estimer les impacts des pêcheries sur les populations de mammifères marins pour les 100 prochaines années. Les prévisions des auteurs sont plutôt alarmantes : un nombre important de populations et d'espèces devraient disparaître à cause de la compétition avec les pêcheries, notamment dans les milieux côtiers. Trois types d'interactions sont prédits : une compétition trop importante des pêcheries qui va entraîner une diminution de l'abondance des mammifères marins, une pression de prédation des mammifères marins qui va empêcher le rétablissement des proies et donc une diminution de la pêche ou une pression trop importante à la fois de la pêche et des prédateurs qui va entraîner un effondrement de la ressource et aura des conséquences sur les pêcheries et les prédateurs (DeMaster *et al.* 2001).

Les captures accidentelles, une menace pour la survie à long terme des populations

La troisième menace liée à la pêche est la capture accidentelle des mammifères marins. Il s'agit de la capture d'un individu d'une espèce par un engin de pêche destiné à capturer d'autres espèces (poissons, crustacés, céphalopodes...). Chez les mammifères

marins, le nombre d'individus tués peut être très important. Par exemple, en Atlantique Nord-Est, il a été estimé qu'environ 24 000 dauphins, communs et bleus et blancs principalement, avaient été tués lors des campagnes de pêche au thon. Ce qui implique des taux de mortalité annuel de 1% pour le dauphin commun et de 1,6% pour le dauphin bleu et blanc (Rogan & Mackey 2007). En France, la campagne Gerdeau a permis d'estimer à environ 1700 le nombre de cétacés capturés par les filets maillants dérivants des pêcheries françaises en Atlantique Nord (Antoine et Goujon 1993). Les pinnipèdes sont aussi concernés par les captures accidentelles. Aux Pays-Bas, 15% des phoques gris échoués et 19% des phoques veaux marins présentent des traces de capture accidentelle (Osinga, Ferdous, *et al.* 2012a). Le nombre total de captures accidentelles au niveau mondial est très important. Read *et al.*, 2006, ont estimé à 6215 le nombre moyen de captures accidentelles par an, pour les cétacés et les pinnipèdes, entre 1990 et 1999 par les pêcheries des Etats-Unis. En extrapolant ce nombre en fonction du nombre de bateaux de pêche présents dans le monde, ils arrivent à une estimation de 650 000 mammifères marins capturés accidentellement par an en moyenne (Read *et al.* 2006).

Les taux de mortalité par capture accidentelle sont variables en fonction des lieux. Ainsi en Belgique, la proportion de marsouins communs échoués présentant des traces de capture accidentelle (15%) (Jauniaux *et al.* 2002) est plus faible que dans d'autres zones européennes, par exemple 46% en Allemagne (Siebert *et al.* 2001). Ces différences peuvent s'expliquer par des pratiques de pêches différentes, notamment l'utilisation plus ou moins importante de filets maillants (Jauniaux *et al.* 2002). Des variations saisonnières existent aussi. En Irlande les captures accidentelles sont plus importantes en fin d'hiver-début de printemps. Ces variations pouvant s'expliquer par des variations saisonnières des pêcheries et des variations saisonnières de la distribution et du comportement des mammifères marins (Couperus 1997).

Parce que ce sont des espèces à longue durée de vie et qui se reproduisent lentement, les mammifères marins sont sensibles à la mortalité d'origine anthropique et ont une capacité de rétablissement de l'abondance limitée (Mannocci *et al.* 2012). La mortalité induite par les captures accidentelles peut être très importante et donc insoutenable à court ou long terme pour l'espèce, ou la population, de mammifère marin impactée. Par exemple, Dans la mer Baltique, où le marsouin commun est très menacé par ces captures, le nombre de captures annuelles minimum (151 individus pris dans les filets par an) est supérieur au seuil de mortalité soutenable (115) estimé par rapport à l'abondance. Le rétablissement est donc fortement compromis tant que ce taux de capture ne diminuera pas (Berggren *et al.* 2002). Les taux de capture accidentelle de 1% pour le dauphin commun et de 1,6% pour le dauphin bleu et blanc en Atlantique Nord Est sont estimés non soutenable sur le long terme pour ces populations et l'utilisation des filets dérivant a été interdite par l'Union Européenne (Rogan & Mackey 2007). Ces captures accidentelles peuvent même amener à la disparition d'une espèce. Par exemple, pour le dauphin de Chine (*Lipotes vexillifer*), qui a été reconnu éteint en

2007, la principale cause suspectée, en plus de la dégradation du milieu, était le taux insoutenable de captures accidentelles (Turvey *et al.* 2007).

Pour pouvoir estimer les impacts de cette mortalité, il est important de connaître précisément l'abondance des individus et le taux de capture accidentelle (Jefferson & Curry 1994). En plus, la connaissance de la structure de population est très importante car le taux de mortalité peut être différent en fonction des populations. Le long de la côte atlantique française, le nombre de captures accidentelles annuel moyen du dauphin commun est différent entre la zone néritique (820) et océanique (189). S'il n'y a qu'une seule population entre les deux zones alors le risque d'extinction est modéré. S'il existe deux populations démographiquement séparées alors celle de la zone néritique présente un risque très fort d'extinction alors que celle de la zone océanique présente un risque nul. Dans le cas de l'hypothèse de deux populations, il faudrait diviser le taux de capture accidentelle par deux pour que le risque d'extinction de la zone néritique soit limité (Mannocci *et al.* 2012).

La présence de contaminants dans le milieu marin, une menace principalement indirecte sur les mammifères marins

L'augmentation importante du nombre et de la concentration des contaminants dans le milieu marin est aussi une menace importante pour les mammifères marins. Les contaminants pour lesquels les effets ont été le plus étudiés sont les métaux traces, comme le zinc ou le mercure (Das *et al.* 2004), et les polluants organiques persistants (POP) comme les polychlorobiphényles(PCB) (Kleivane & Skaare 1998). Parce que ce sont des animaux à longue espérance de vie, ils vont bioaccumuler au cours du temps les contaminants dans leurs tissus, notamment dans les tissus de réserve comme le lard et de transformation et élimination tels que le foie ou les reins (Pierce *et al.* 2008). Les contaminants vont aussi s'accumuler le long de la chaîne alimentaire, on parle alors de biomagnification. En mesurant les contaminations en polluants chez le phoque veau marin et des maillons inférieurs de son réseau trophique, Cullon *et al.*, (2012) ont estimé à 13,4 le facteur moyen de biomagnification, en tenant compte du niveau trophique. Ce qui veut dire que, par rapport aux organismes situés un niveau trophique en dessous, le phoque veau marin accumulera 13.4 fois plus de PCB (Cullon *et al.* 2012). La concentration de ces contaminants, par bioaccumulation et biomagnification, chez les cétacés et les pinnipèdes, est proche de celle des oiseaux marins et bien supérieure à celle observée chez les poissons et les autres espèces. Par exemple, le globicéphale noir concentre 20 fois plus le mercure que la morue et 400 fois plus que le zooplancton selon une étude effectuée par modélisation (Booth & Zeller 2005). La concentration en polluants va connaître des variations spécifiques, géographiques et individuelles qui sont dues à des expositions et à des physiologies différentes (Aguilar *et al.* 2002). Au niveau individuel, l'âge, le sexe et l'état de santé de l'animal vont influencer la concentration en contaminant (Das *et al.* 2004).

Les impacts des contaminants sont multiples, et, s'ils n'entraînent, à priori, pas de mortalité directe, différents effets indirects aboutissant à une augmentation de la mortalité

sont très fortement suspectés (Pierce *et al.* 2008). Ils peuvent entraîner une dépression immunitaire (Ross 2000) et donc augmenter la sensibilité des individus aux maladies infectieuses et aux parasites. Une étude cas-témoins a montré que l'exposition aux PCB du marsouin commun augmentait les risques de mortalité par maladies infectieuses et que ce risque augmentait de 2% pour chaque milligramme de PCB par kilogrammes de lipides (Hall *et al.* 2006). Cela peut aussi augmenter la prévalence de cancer comme cela a été montré sur les bélougas (*Delphinapterus leucas*) du Saint-Laurent (Martineau *et al.* 2002) pour qui les cancers sont la première cause de mortalité. Enfin les contaminants peuvent entraîner des réponses physiologiques comme la diminution de la capacité reproductive. Reijnders fut le premier à montrer un tel effet sur des phoques veaux-marins. Les femelles consommant du poisson contenant des PCB ont eu un taux de reproduction 3 fois inférieur à celui des femelles témoins. Cet effet d'inhibition de la reproduction peut agir même pour de faible concentration journalière consommée (Reijnders 1986). Des perturbations hormonales et des inhibitions de l'ovulation ont aussi été liées à des contaminants, par exemple chez le dauphin commun (Murphy *et al.* 2010).

L'utilisation de l'espace maritime, une autre menace indirecte sur les mammifères marins

L'habitat est très important pour les mammifères marins. Chaque espèce possède un habitat critique qui est la zone minimum vitale pour l'ensemble du cycle de vie et ils sont sensibles à sa destruction et à sa fragmentation (Harwood 2001). Cependant la caractérisation de l'habitat est très différente en milieu marin par rapport au milieu terrestre, et l'étude de sa fragmentation et de sa destruction est beaucoup plus complexe. Pour les mammifères marins, la perte d'habitat peut avoir différentes origines : l'aménagement du littoral peut amener à la destruction de reposoirs ou de zones de nurserie, la mise en place de structures offshore comme les éoliennes ou les plateformes pétrolières ou la formation de zones d'exclusion causée par le dérangement ou le bruit (Harwood 2001). Par exemple, Baldwin *et al.*, (2004) estiment que une des menaces pesant sur le dauphin à bosse de l'Indo-Pacifique (*Sousa chinensis chinensis*) est la destruction de son habitat par les aménagements littoraux comme les zones portuaires, le dragage et l'exploitation des sous sols marins. (Baldwin *et al.* 2004).

L'utilisation de l'espace maritime et côtier entraîne aussi des dérangements des mammifères marins qui peut entraîner des réponses des individus telles que la fuite et/ou la mise à l'eau (pour les pinnipèdes). Ces dérangements peuvent provenir des bateaux. Ainsi, en Nouvelle-Zélande, une comparaison entre les observations de grand dauphin et le nombre de navires dans un fjord montre que les dauphins évitent de rentrer dans le fjord lorsque le nombre de navire y est trop important et qu'ils fréquentent préférentiellement les zones sans navires (Lusseau 2005). Le dérangement peut aussi avoir des effets sur les pinnipèdes et sur la fréquentation des reposoirs. Une étude, portant sur une colonie de phoques veau-marins de la mer de Weddell, montre que dans 7% des cas de dérangements anthropiques, les phoques partaient à l'eau. Ces dérangements pouvant être terrestres, maritimes ou aériens (Osinga, Nussbaum, *et al.* 2012b).

Les sons de surface et sous-marins ont aussi un impact important sur les mammifères marins. Les sons peuvent produire des dérangements et des zones d'exclusion. Cela peut avoir un effet direct, comme les échouages en masse de baleines à bec, causés très probablement par l'utilisation de sonars très puissants (Cox *et al.* 2006). Même sans aller jusqu'à provoquer des mortalités, les sons sous marins peuvent perturber les mammifères marins. Romano *et al.* (2004) ont fait des prises de sang sur un bélouga et un grand dauphin, avant et après l'émission de sons de plus ou moins haute densité. Ils détectent une variation significative de différents composés sanguins après l'émission de son à haute intensité, comme une augmentation de la dopamine ou l'épinéphrine et une diminution du nombre de leucocytes, ce qui prouve un impact neurologique et immunologique des sons de haute densité (Romano *et al.* 2004). Les sons entraînent aussi un dérangement et un déplacement des mammifères marins dans un but de fuite. Par exemple, une étude de recensement par survol aérien a montré que la construction d'une ferme éolienne proche d'une colonie de phoques veau marins avait entraîné une forte diminution d'abondance et qu'après la construction, la colonie n'avait pas retrouvé son abondance de base (Skeate *et al.* 2012). Les auteurs estiment que c'est le bruit qui fait fuir les animaux. Les zones de perturbation sonore peuvent être très importantes en terme de surface et impacter une grande partie de l'habitat. Par exemple en comparant la distribution du marsouin commun dans la partie allemande de la mer du Nord, les projets de construction d'éoliennes offshore et la zone d'impact sonore, Gilles *et al.* (2009) estiment que 39 % des marsouins communs de la zone pourraient être impactés (Gilles *et al.* 2009).

Enfin, les collisions avec les navires sont aussi une menace pour les mammifères marins, notamment pour les grands cétacés, et cela peut avoir un impact pour les populations de petite taille situées dans des zones de haut trafic maritime (Laist *et al.* 2001). Le taux de mortalité induit peut être conséquent, par exemple 30% des baleines à bosse échouées et étudiées sur la côte est des Etats-Unis seraient mortes suite à une collision (Wiley *et al.* 1995). La majorité des mortalités est causée par des bateaux de grande taille et se déplaçant à plus de 13 noeuds (Laist *et al.* 2001).

De nombreuses actions anthropiques ont des impacts sur les mammifères marins pouvant entraîner des déplacements ou des extinctions. Les plus grandes menaces étant le réchauffement climatique et les différentes interactions avec les pêcheries. L'ensemble de ces impacts est schématisé dans la Figure 1.

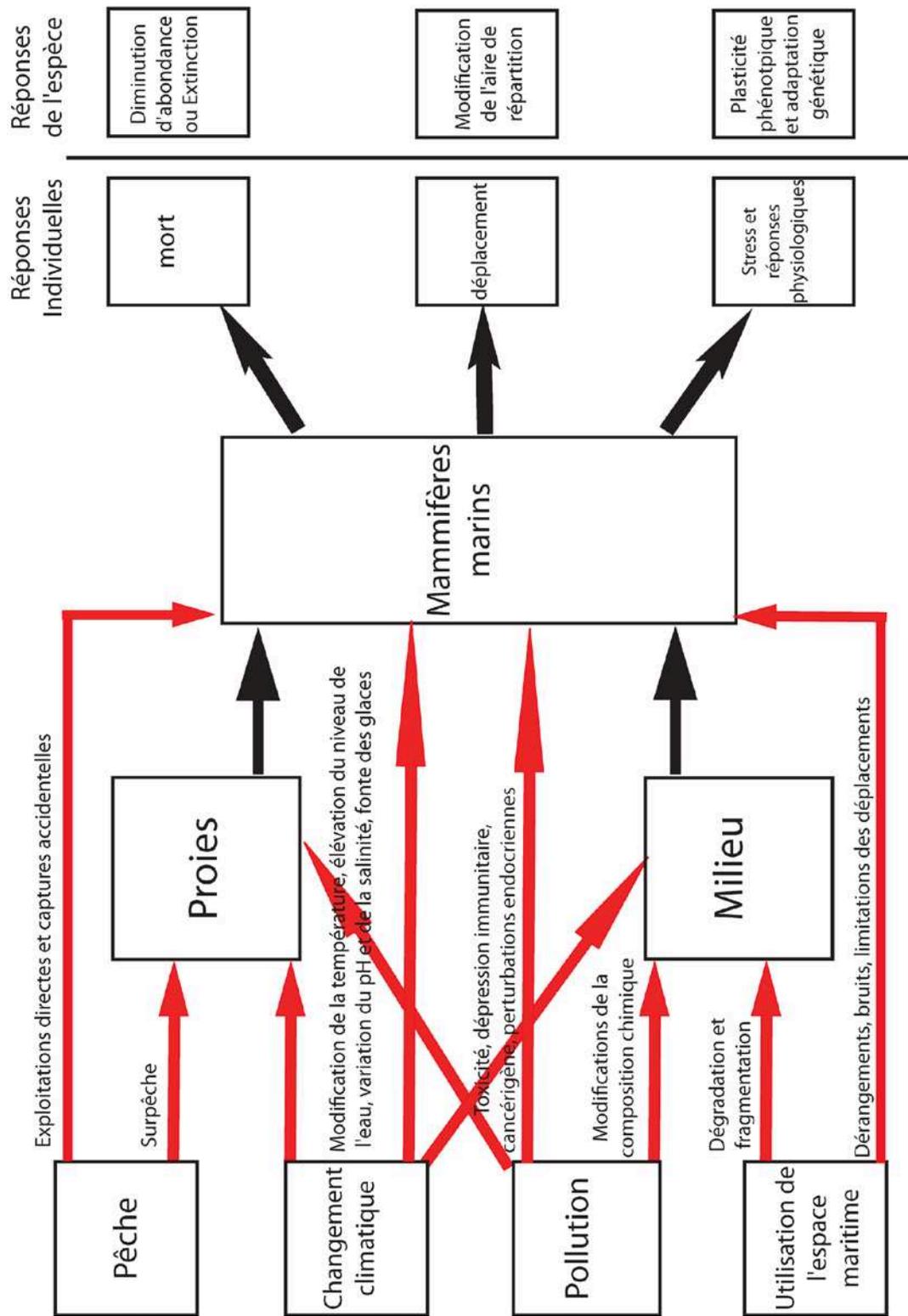


Figure 1 : Schéma des différents impacts du changement global sur les mammifères marins

Conservation des mammifères marins : nécessités et moyens

La réduction passée de l'abondance des mammifères marins et les impacts anthropiques actuels nécessitent la mise en place d'une stratégie globale de conservation des mammifères marins

Les actions anthropiques ont entraîné des diminutions d'abondance (Lotze *et al.* 2011) pouvant être drastiques (Hoelzel *et al.* 2002; Weller *et al.* 2002) et ayant mené à des extinctions de populations (Bearzi *et al.*, 2003) et d'espèces de mammifères marins ; comme la rhytine de Steller, le phoque moine des caraïbes et le dauphin de Chine qui ont disparu au cours des 250 dernières années à cause des actions anthropiques (Jackson *et al.* 2001 ; Turvey *et al.* 2007 ; McClenachan & Cooper 2008). La surexploitation directe passée des mammifères marins a notamment entraîné une diminution très importante de l'abondance de nombreuses espèces et populations (voir le paragraphe surexploitation des mammifères marins). Le nombre d'espèces menacées actuellement est important, et, par exemple, un quart des cétacés est classé par l'IUCN comme menacé (Simmonds & Elliott 2009).

Même si cette surexploitation est actuellement stoppée pour la majorité des espèces en grand danger, les mammifères marins sont soumis actuellement à d'autres menaces telles que les captures accidentelles, le changement climatique, l'augmentation des contaminants dans le milieu marin ou la fragmentation des habitats. Un faible niveau d'abondance augmente la sensibilité aux menaces actuelles (Brook *et al.* 2008). Par exemple la population de baleines grises de l'ouest du Pacifique est source d'inquiétudes : son abondance est très faible, et elle est fortement menacée par les captures accidentelles, les collisions avec les navires et les contaminants (Weller *et al.* 2002). Il y a donc fortement besoin de mettre en place des plans de gestion et de conservation des mammifères marins afin de limiter les extinctions locales et mondiales.

Les mammifères marins occupent une place importante au sein des écosystèmes et leur disparition auraient d'importantes conséquences

Comme cela a été dit plus haut (voir partie introduction), les mammifères marins ont un rôle important au sein des écosystèmes en occupant le sommet de la chaîne alimentaire et par un fort contrôle *top-down*. Au vu de la biomasse consommée, ils jouent aussi un rôle

important dans le recyclage des nutriments. Ils ont aussi un impact sur la structure de la communauté par la coévolution proie/prédateurs et en favorisant ou défavorisant certaines espèces, directement ou indirectement. Enfin, certaines espèces se nourrissant sur le fond ont un impact sur l'habitat benthique (Bowen 1997).

De par ce rôle écologique important, certains auteurs qualifient les mammifères marins de « pierre angulaire » des écosystèmes (« keystone species ») dont la diminution d'abondance entraîne des changements importants dans la communauté et des risques d'extinction en cascade (Harwood 2001). L'exemple des variations d'abondance de la loutre de mer et des impacts sur les oursins et les forêts de laminaires est souvent cité (Bowen 1997 ; Harwood 2001 ; Lotze *et al.* 2011). La présence de la loutre de mer empêche le développement des oursins ce qui permet de protéger les laminaires qui structurent l'écosystème. Lorsque les loutres disparaissent, les oursins prolifèrent, ce qui entraîne un broutage important et la quasi disparition des forêts de laminaires et des espèces liées. L'importance du rôle écologique des mammifères marins a aussi une forte influence sur les espèces d'intérêt commercial. Par exemple, par un modèle reposant sur 204 paramètres, Li *et al.* (2010) montre que la suppression des phoques veaux marins dans le détroit de Géorgie entraînerait une diminution de 33% de la biomasse des poissons d'intérêt commercial. Les auteurs estiment que c'est la suppression des effets de régulation, par la prédation des phoques sur les prédateurs du hareng, qui explique cette diminution de biomasse (Li *et al.* 2010).

Parce qu'ils occupent de nombreux rôles au sein des écosystèmes, les mammifères marins leur sont essentiels et leur disparition ou la diminution trop importante de leur abondance, a de fortes répercussions sur les autres espèces et les milieux. Il est donc nécessaire de limiter au maximum cette diminution d'abondance.

La conservation des mammifères marins peut se faire par une protection directe, du milieu ou des espèces liées

Une stratégie de conservation peut reposer sur des mesures centrées sur une ou plusieurs espèces ou sur la protection de l'habitat et donc, indirectement, des espèces qui l'utilisent (Zacharias & Roff 2001). Le plus efficace étant, bien sûr, de pouvoir considérer les deux aspects. L'une des menaces les plus importantes pour les mammifères marins concerne les changements de disponibilités des proies (Learmonth *et al.* 2006), il serait donc utile de les inclure dans les plans de conservation. Trois compartiments du milieu doivent donc être considérés pour mettre en place des stratégies de conservation des mammifères marins : eux-mêmes, leurs habitats et leurs proies.

La majorité des mesures de conservation des mammifères marins repose sur leur protection directe. Au niveau international, les espèces de mammifères marins ne sont pas toutes protégées de la même manière en fonction de l'estimation des risques pesant sur l'espèce et de l'intérêt scientifique et commercial qui lui est porté. Pour chaque espèce, une estimation du statut de conservation a été mise en place par l'IUCN (Union internationale pour la conservation de la nature) et le degré de protection est ensuite défini dans le cadre de conventions internationales ou d'organismes spécifiques. Par exemple, la commission baleinière internationale, qui a pour fonction de gérer les stocks de grands cétacés dans un souci d'exploitation, a décrété un moratoire sur la chasse à la baleine en 1982. En France, toutes les espèces de mammifères marins retrouvées dans les eaux territoriales sont protégées. Il est interdit de les tuer, capturer et harceler et de posséder, vendre ou acheter un individu ou un produit issu de mammifères marins (arrêté du 1^{er} juillet 2011). La protection directe des mammifères marins est une étape importante, dont l'efficacité est clairement prouvée. Le moratoire sur la chasse à la baleine a ainsi permis d'arrêter la diminution d'abondance des grands cétacés et à certaines espèces de se rétablir partiellement (Lotze *et al.* 2011). Le cachalot (Whitehead 2002) et la baleine bleue (Branch *et al.* 2004) ont montré un arrêt de la baisse de leur abondance suite à l'arrêt de la chasse. L'arrêt de son exploitation a aussi permis d'éviter la disparition de l'éléphant de mer du Nord et le rétablissement de son abondance 100 ans plus tard (Hoelzel *et al.* 2002). Des mesures de conservation centrées sur les mammifères marins peuvent aussi viser des nuisances particulières. Par exemple, les taux de captures accidentelles peuvent être réduits grâce à des améliorations techniques au niveau des pêcheries, comme des modifications des filets (Larsen *et al.* 2007) ou la mise en place de répulsifs acoustiques (Kastelein *et al.* 2008). Des régulations ponctuelles de la pêche peuvent aussi être mises en place afin d'éviter les zones et les périodes présentant des risques particuliers de captures accidentelles.

Des stratégies de conservation portant sur l'habitat peuvent aussi être entreprises. En France, l'arrêté du 1^{er} juillet 2011 interdit de "détruire ou d'altérer leurs zones de reproduction et de repos". La mise en place d'aires marines protégées ou de zones spéciales de conservation, par exemple dans le cadre du plan Natura 2000 en Europe, sont des outils efficaces (Learmonth *et al.* 2006). Ces zones permettent de protéger les mammifères marins par la protection de leur habitat (Jones 2001). En Nouvelle-Zélande par exemple, la mise en place d'une aire marine protégée, de 1170km² autour d'une péninsule, a permis d'améliorer les paramètres démographiques, notamment le taux de survie annuel du dauphin d'Hector dans la zone (Gormley *et al.* 2012). Cependant ce type de plan de conservation est certainement moins efficace dans le cas d'espèces mobiles (Grüss *et al.* 2011). Actuellement, la mise en réseaux d'aires marines protégées est considérée comme étant une solution à ce problème. D'autres mesures ciblées sur l'habitat, peuvent porter sur des réglementations concernant l'usage de contaminants, par exemple l'interdiction des PCB dans les années 80 à cause de leur grande toxicité pour les écosystèmes, la restauration d'habitat marin ou la sensibilisation du grand public (Lotze *et al.* 2011).

Les mesures de conservation des mammifères marins, portant sur la protection de leurs proies, sont rares. Toutefois, la mise en place d'aires marines protégées permet de prendre des mesures de conservation des proies (Jones 2001) notamment la mise en place de zone de non capture ("no-take") permettant de maintenir des stocks de proies suffisants pour les mammifères marins (Bearzi *et al.* 2006).

La mise en place de stratégies de conservation, pour être la plus efficace possible, doit respecter certaines conditions. Le changement climatique est un challenge important et il est nécessaire d'en tenir compte dans chaque scénario et plan de conservation (Heller & Zavaleta 2009). Mais bien qu'il puisse être considéré comme une priorité (Gambaiani *et al.* 2009), la résolution des problèmes qu'il soulève prendra beaucoup de temps et les impacts vont se faire sur le moyen et le long terme. Il est donc primordial d'agir sur les autres menaces anthropiques, plus facilement cernables, afin d'en diminuer les impacts sur les populations et les espèces et permettre ainsi à celles-ci de mieux résister aux changements climatiques dans le présent et le futur (Simmonds & Elliott 2009). Il est aussi nécessaire de faire travailler ensemble les scientifiques de tous les domaines, les gestionnaires et les usagers de la mer afin d'assurer une conservation efficace (Jefferson & Curry 1994) et en accord avec le développement humain. Des programmes de recherches et une coopération internationale sont aussi importants, les mammifères marins étant très rarement cantonnés à un seul pays (Simmonds & Elliott 2009). Enfin, les différents impacts anthropiques et les écosystèmes étant différents en fonction des régions, il est nécessaire d'adapter les plans de gestion localement (Learmonth *et al.* 2006).

Besoin de compréhension et de suivi

L'augmentation des connaissances sur les espèces et les milieux, ainsi que des suivis réguliers au cours du temps, sont des conditions *sine qua non* à la limitation des impacts des actions anthropiques et à une bonne gestion de la conservation du milieu (Jefferson & Curry 1994 ; Harwood 2001 ; DeMaster *et al.* 2001 ; Jackson *et al.* 2001 ; Learmonth *et al.* 2006 ; Heller & Zavaleta 2009).

De nombreuses connaissances sont pré requises pour la conservation

Pour la mise en place d'une stratégie de conservation efficace, il est nécessaire de comprendre les impacts subis par les mammifères marins. Des expérimentations ont ainsi déjà

été mises en place pour tester les effets des contaminants (Reijnders 1986) ou des sons sous-marins (Romano *et al.* 2004). Cependant il est difficile de mettre en place des expérimentations sur les mammifères marins pour des raisons éthiques et pratiques. Les suivis temporels sont une autre solution pour détecter les changements, identifier les nouvelles causes de mortalité, les comparer aux suivis des proies et des conditions du milieu et les lier aux perturbations (Learmonth *et al.* 2006). Ainsi, c'est le suivi de la composition spécifique des échouages et des observations en mer, qui a permis de montrer le déplacement du dauphin commun et du lagénorhynque à bec blanc, lié à l'augmentation de la température (MacLeod *et al.* 2005). Une connaissance de l'état initial des populations, avant les impacts des activités anthropiques, est un avantage pour clarifier les causes et l'importance des changements et pour donner des objectifs écologiquement viables de restauration (Jackson *et al.* 2001).

L'identification des unités de gestion, des populations démographiquement indépendantes dont le taux de croissance dépend principalement de ses taux de natalité et de mortalité, est essentielle dans la gestion et la conservation des populations naturelles (Palsbøll *et al.* 2007). Les unités de gestion étant considérées comme démographiquement indépendantes, les mesures de conservation doivent être spécifiques à chacune. Par exemple dans le cas de l'impact des captures accidentelles sur les dauphins communs le long des côtes atlantiques françaises, les risques d'extinction sont complètement différents, selon que l'on considère une ou deux unités de gestion. La population néritique, si elle est séparée de la population océanique, présente un risque très important d'extinction nécessitant des mesures de conservation immédiates (Mannocci *et al.* 2012). La définition de l'habitat critique, unité écologique requise pour l'alimentation et la reproduction tout au long du cycle de vie de l'espèce, est aussi importante pour savoir quelles zones géographiques protéger (Harwood 2001).

Enfin, parce qu'il n'est pas possible de protéger l'ensemble des espèces et des populations, il est important de déterminer lesquelles sont le plus en danger et pour lesquelles des mesures de conservation seraient le plus efficaces (Wilson *et al.* 2011). Cela nécessite des informations sur l'abondance, les capacités de résistance et de déplacement et sur les effets des perturbations (Heller & Zavaleta 2009). Par exemple chez les mammifères marins, les espèces polaires, qui sont particulièrement menacées par l'augmentation de la température et la fonte des glaces, nécessitent des mesures de protection urgentes car elles ne pourront pas se déplacer vers d'autres régions (Simmonds & Elliott 2009). Une modélisation des effets peut être effectuée et apporter des informations utiles aux gestionnaires, notamment pour estimer quelles mesures seraient les plus efficaces. Ainsi la modélisation des effets de 3 mesures différentes de protection montre que seule l'absence complète de capture accidentelle permet à la population de dauphin d'Hector de se rétablir (Slooten & Dawson 2010). Une fois que des mesures de conservation ont été prises, il est important de poursuivre le suivi des mammifères marins, afin de pouvoir estimer l'efficacité des mesures et de les adapter (Heller & Zavaleta 2009). Toujours dans le cas du dauphin d'Hector, les impacts de la mise en place d'une aire

marine protégée ont été étudiés et montrent qu'elle améliore grandement les paramètres démographiques dans la zone (Gormley *et al.* 2012).

De nombreux types de suivis des mammifères marins sont possibles

Pour aider à la conservation, différents types d'études ou de suivis peuvent être faits.

Une part importante de ces études sont des travaux de terrain, où l'animal est étudié dans son environnement naturel. Cela peut être des campagnes d'observations visuelles permettant de déterminer l'abondance absolue ou relative, ainsi que ses variations, si la campagne est répétée dans le temps (Hammond *et al.* 2002). L'utilisation de la photo-identification permet d'identifier les animaux et de les suivre individuellement (Vincent *et al.* 2005). Cela permet d'obtenir beaucoup plus d'informations sur le comportement et les déplacements des individus mais cela demande beaucoup plus d'efforts d'observation. Ces observations sur le terrain peuvent aussi se faire par l'acoustique (Samaran *et al.* 2010) et apporter des informations de présence et d'abondance. Il est plus difficile d'obtenir des valeurs absolues avec les méthodes acoustiques mais elles présentent l'avantage de ne pas être dépendantes des conditions de visibilité. Il est aussi possible de suivre les animaux par télémétrie et d'en apprendre plus sur leur déplacement et sur leur habitat critique (Vincent *et al.* 2005) mais la télémétrie ne peut s'effectuer que sur un nombre réduit d'individus.

Ensuite l'étude des mammifères marins morts est très informative. Il peut s'agir du suivi des captures accidentelles sur les bateaux de pêche (Berrow *et al.* 1998) qui apporte des informations sur le taux de mortalité induit. Il s'agit surtout du suivi des échouages qui est très riche en enseignement : il peut apporter de nombreuses informations sur les zones et les taux de mortalités, les densités relatives, la distribution, la richesse spécifique des mammifères marins (Peltier *et al.* 2013) mais en plus il apporte des informations sur les causes de mortalité (Jauniaux *et al.* 2002). Ces suivis nécessitent la mise en place de réseaux d'observateurs et doivent se faire à grande échelle géographique et temporelle pour être efficaces. Ils permettent aussi d'avoir accès à de nombreux prélèvements biologiques nécessaires aux travaux en laboratoire.

Enfin, en laboratoire, il est possible d'étudier le régime alimentaire, par l'étude des contenus stomacaux (Pusineri *et al.* 2007), des fèces (Deagle *et al.* 2009), des acides gras (Budge *et al.* 2006) ou des isotopes stables (Fontaine, Tolley, *et al.* 2007b). Les différentes méthodes fournissent des informations différentes mais toutes renseignent sur les proies consommées et sur les besoins trophiques de l'espèce. Il est aussi possible d'étudier les différentes fonctions physiologiques des individus et des espèces (par exemple McKenna *et al.* 2012) et d'obtenir des informations sur l'individu comme son âge ou son statut

reproducteur (Lockyer *et al.* 2001). Ces informations sont importantes pour mieux comprendre la biologie des espèces mais aussi les impacts des perturbations d'origines anthropiques. Pour l'étude des contaminants, il est possible de mesurer des contaminations directement (Aguilar *et al.* 2002) cependant cela ne renseigne pas sur les impacts de ces polluants. Il est aussi possible de mettre au point des modèles cellulaires pour déterminer les impacts (Hymery *et al.* 2013) mais cela n'informe pas sur le degré de contamination. Les prélèvements permettent aussi de réaliser des études de génétique (voir partie suivante). L'ensemble des données, obtenues sur le terrain, par le suivi des échouages et des captures accidentelles et en laboratoire, permet de mettre en place des modélisations (Mannocci *et al.* 2012) qui permettent de faire des prévisions et ainsi d'aider à la conservation.

Les différents travaux apportent tous des informations différentes et possèdent des avantages et des inconvénients. Il est donc important de pouvoir effectuer des études multidisciplinaires pour assurer la mise en place de mesures de conservation efficaces.

L'analyse du polymorphisme de l'ADN pour étudier les populations

Les différents marqueurs génétiques et leur caractéristiques

La génétique : l'étude du polymorphisme de l'ADN

L'ADN, acide désoxyribonucléique, est une biomolécule présente, chez les eucaryotes, dans le noyau de la cellule et dans les mitochondries, sous la forme de chromosomes. Elle porte les informations nécessaires au fonctionnement des cellules et des organismes, sous la forme de séquences de nucléotides. Elle est le support de l'hérédité puisque ces informations sont transmises lors de la reproduction.

La réplication de l'ADN ne produit pas toujours une copie identique, des événements de mutations peuvent se produire et amener l'apparition d'un polymorphisme, c'est à dire la présence de molécules d'ADN non identiques, entre les cellules. Plusieurs types de mutations peuvent se produire : des substitutions, c'est à dire le changement d'un nucléotide en un autre, des insertions d'un ou plusieurs nucléotides, des délétions d'un ou plusieurs nucléotides, ou encore des déplacements de fragments d'ADN de grande taille, lors de crossing-over asymétriques ou de transferts de gène. Si ces mutations se produisent sur des cellules germinales, elles pourront être transmises à la descendance et ce polymorphisme sera alors retrouvé entre les individus. Les mutations produisent donc une variabilité génétique entre les individus, les populations et les espèces.

La génétique étudie ce polymorphisme pour en tirer des informations à l'aide de marqueurs génétiques. Un marqueur génétique peut être défini comme une portion de l'ADN, de petite taille, facilement identifiable et analysable et présentant un polymorphisme. Il existe plusieurs types de marqueurs génétiques.

Les marqueurs nucléaires

Les marqueurs nucléaires sont, par définition, situés sur l'ADN chromosomique localisé dans le noyau des cellules eucaryotes. Une des particularités de l'ADN nucléaire des eucaryotes est que les chromosomes sont organisés par paires homologues sauf pour les chromosomes sexuels qui peuvent être différents. Chaque portion de l'ADN, codant ou non codant, est présente sur deux chromosomes. Pour un locus donné, chaque individu pourra donc présenter soit deux copies identiques (on parle alors d'individu homozygote pour le locus considéré), soit deux copies différentes (individu hétérozygote).

Le polymorphisme génétique peut être étudié de différentes façons. D'abord par empreintes génétiques ("DNA fingerprint") soit à l'aide de sondes radioactives (technique du Southern blot par exemple) soit suite à une amplification par PCR : amplification aléatoire d'ADN polymorphes ou RAPD ("Random Amplified Polymorphism DNA"), polymorphisme de longueur de fragment amplifié ou AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism") (Féral 2002 ; Arif *et al.* 2011) ou amplification de séquences inter-microsatellites, appelé aussi ISSR (Jung 1998). Ces trois marqueurs sont des marqueurs dominants et anonymes car basés sur un système de présence/absence de fragments sans (ou avec très peu de) connaissance nécessaire sur la nature de ces fragments. Ils permettent d'estimer des génotypes mais pas de calculer des fréquences alléliques et ils sont suffisamment variables pour pouvoir travailler à l'échelle de l'individu (Féral 2002). Chez les mammifères marins ils ont été utilisés, par exemple, pour déterminer des individus hybrides entre marsouins communs et marsouins de Dall (Willis *et al.* 2004) ou comparer des polymorphismes entre dauphins communs et marsouins communs (Hassani *et al.* 2008). Ces marqueurs permettent aussi l'analyse de plusieurs loci à la fois.

D'autres marqueurs ciblent une seule région de l'ADN à la fois. Ce sont souvent des marqueurs codominants et ciblés. Un de ces marqueurs les plus utilisés est le marqueur microsatellite ou SSR (Simple Sequence Repeat). Les microsatellites sont des portions d'ADN, présentes chez tous les eucaryotes (Tautz & Renz 1984), et ils sont formés par la répétition d'un motif simple, composé généralement de 1 à 5 nucléotides (GATA est un motif tetranucléotidique par exemple). Ce motif peut être répété jusqu'à 100 fois en un même locus (Arif *et al.* 2011). Litt et Luty ont constaté pour la première fois que les microsatellites présentaient une forte variabilité (Litt & Luty 1989). Cette variabilité provient d'un taux relativement haut de mutation pouvant provenir d'erreurs de réplifications ou de crossing-over non symétriques. Les mutations qui se produisent alors sont des ajouts ou des suppressions d'un ou plusieurs motifs. Les microsatellites sont des hot-spot de mutation, c'est à dire des zones de l'ADN hyper variables et donc très polymorphes (Féral 2002).

Pour étudier un site contenant un microsatellite précis, on détermine le nombre de répétitions du motif en amplifiant un fragment d'ADN contenant le microsatellite. La taille du fragment amplifié permettra de déterminer le nombre de répétitions du motif. Ce marqueur présente de nombreux avantages (Bourret *et al.* 2008) :

- il est un des plus variables disponible actuellement et permet de détecter des structures génétiques même très faibles au sein de populations
- il est codominant, ce qui permet de calculer des fréquences alléliques
- il est techniquement relativement facile à utiliser
- grâce à la PCR, il peut être analysé même à partir d'ADN dégradé et/ou en faible quantité (par exemple sur de l'ADN extrait de fèces de dauphin (Parsons 2001))

Le principal défaut des marqueurs microsatellites est la nécessité de connaître ses séquences flanquantes afin de pouvoir définir les amorces de PCR (Bourret *et al.* 2008).

Les marqueurs mitochondriaux

La mitochondrie est un organite cellulaire essentiel à la vie car elle participe à la transformation de l'énergie contenue dans les sucres et les graisses en ATP (Adénosine TriPhosphate) qui sera la source d'énergie chimique principale de la cellule (Ballard & Whitlock 2004). Chaque cellule eucaryote peut contenir de nombreuses mitochondries qui contiennent plusieurs copies de leur chromosome. Le chromosome mitochondrial chez les mammifères est un ADN double brin circulaire de taille comprise entre 15 000 et 17 000 paires de bases. Trente-sept gènes codant pour des molécules spécifiques de la mitochondrie sont présents : 2 gènes sont transcrits sous forme d'ARN ribosomique, 22 sous forme d'ARN de transfert et 13 gènes codent pour des sous-unités de protéines de la chaîne respiratoire. Il existe une partie non codante de grande taille, la région de contrôle mitochondriale, ayant un rôle dans la réplication. Sauf exception il n'existe pas de recombinaison de l'ADN mitochondrial chez les animaux. L'ADN mitochondrial est haploïde et sa transmission est uniquement maternelle, ce qui diminue la taille efficace de l'ADN mitochondrial (Ballard & Whitlock 2004). Le taux de mutation de l'ADNmt est généralement fort, Brown *et al.* (1979) ont, par exemple, estimé à 2% tous les millions d'années le taux de mutations chez les primates supérieurs (Brown *et al.* 1979). Cependant ce taux diffère entre les différentes parties de l'ADN mitochondrial. Il a été montré que chez les mammifères, la région de contrôle était la plus divergente, notamment sa partie 5', et que la partie codant pour l'ARN ribosomale était la plus conservée (Lopez *et al.* 1997).

Bien que l'ADN mitochondrial soit haploïde, la présence de chromosomes différents au sein d'une même cellule est possible, on parle alors d'hétéroplasmie (Vollmer *et al.* 2011). L'hétéroplasmie peut provenir de mutations ayant eu lieu sur une partie seulement des chromosomes mitochondriaux présents, de recombinaison ou de provenance multiples des mitochondries (apport paternel ou double apport maternel). Il existe des hétéroplasmies de sites, avec une substitution, ou de taille, avec la présence d'une insertion ou d'une délétion. Bien que les cas d'hétéroplasmies soient peu fréquents dans le règne animal, il en existe chez les mammifères marins et la proportion de leur présence varie en fonction de l'espèce. Chez les cétacés, la région de contrôle est plus sujette à l'hétéroplasmie que les parties codantes (Vollmer *et al.* 2011).

Les marqueurs mitochondriaux sont des séquences de l'ADN mitochondrial présentant un polymorphisme. Ils peuvent être issus de partie codante ou non codante. Ils ont été très utilisés, ces trente dernières années, comme outil, pour inférer les histoires évolutives et démographiques des espèces et des populations (Ballard & Whitlock 2004). Plusieurs des caractéristiques inhérentes à l'ADN mitochondrial sont à prendre en compte car elles peuvent entraîner des biais dans les analyses de génétique (Ballard & Whitlock 2004).

- L'absence de recombinaison implique que le chromosome mitochondrial doit être considéré comme une seule entité, et que, donc, ses différentes portions ne peuvent pas être considérées comme des marqueurs différents, mais simplement comme plusieurs parties du même marqueur.
- Une partie de l'ADN mitochondrial étant codant, l'ensemble du marqueur est soumis à la sélection. Cette sélection peut être forte car l'ADN mitochondrial code pour des protéines nécessaires à la chaîne respiratoire qui est essentielle à la cellule.
- Il existe des introgressions possibles au niveau de l'ADN mitochondrial qui peuvent perturber des analyses phylogénétiques comparant plusieurs marqueurs. L'introgression est un transfert d'une portion d'ADN entre deux organismes d'espèces différentes, suite à une hybridation ponctuelle.
- Enfin le mode de transmission uniquement maternel implique que les études portant sur l'ADN mitochondrial seul ne permettront pas une compréhension totale de l'histoire génétique.

Les marqueurs mitochondriaux peuvent être analysés de différentes façons. Historiquement, la première méthode d'analyse a fait appel à l'utilisation de polymorphisme de longueur de fragments de restriction ou RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"). Chez les mammifères marins, Wang *et al.* (1996), par exemple, ont utilisé cette approche pour étudier les marsouins communs en Amérique du Nord, et ils ont détecté ainsi des différenciations génétiques entre Atlantique et Pacifique (Wang *et al.* 1996). La deuxième méthode d'analyse, et la plus utilisée actuellement, consiste à comparer des séquences de portions d'ADN mitochondrial d'intérêt. Ces séquences peuvent correspondre à des parties codantes (cytochrome oxydase, cytochrome b...) ou non codante (région de contrôle mitochondriale) du génome mitochondrial, en fonction de l'échelle à laquelle se place l'étude, les parties non codantes étant beaucoup plus polymorphes (Arif *et al.* 2011). Les séquences de parties codantes peuvent typiquement être utilisées pour étudier la phylogénie (LeDuc *et al.* 1999), pour comparer des diversités génétiques intra et interspécifique (Viricel & Rosel 2012) ou pour identifier des espèces (voir chapitre 1). Les séquences de la région de contrôle mitochondriale sont principalement utilisées dans les études de génétique des populations (par exemple : Dalebout *et al.* 2005; Tolley & Rosel 2006) et peuvent servir à définir ou à confirmer des unités de gestions (Chivers *et al.* 2007).

Comparaison des marqueurs nucléaires et mitochondriaux

Il existe plusieurs différences entre les marqueurs nucléaires et mitochondriaux qui s'expliquent par les biologies différentes de ces deux génomes :

- La taille du génome est très différente, le génome mitochondrial étant 10 000 fois plus petit (Ballard & Whitlock 2004).
- Le nombre de copies présentes par cellule est très important pour l'ADN mitochondrial, plusieurs centaines de milliers alors que l'ADN nucléaire est présent lui une seule fois par cellule, au sein du noyau (Montier *et al.* 2009). Le nombre important de copies de l'ADN mitochondriale est un avantage lors de travaux menés sur de l'ADN en petite quantité, dégradé, fragmenté ou ancien.
- L'ADN mitochondrial est haploïde alors que l'ADN nucléaire est diploïde (sous la forme de paires de chromosomes homologues), ce qui fait que chaque loci sera présent deux fois et rend possible l'hétérozygotie (Ballard & Whitlock 2004).
- L'ADN mitochondrial est transmis uniquement par la mère ce qui empêche le mélange, contrairement à l'ADN nucléaire qui est brassé à chaque génération, et explique le fait que l'étude de l'ADN mitochondrial n'apporte des informations que sur la lignée maternelle de l'individu (Ballard & Whitlock 2004).
- La dérive génétique de l'ADN mitochondrial est 4 fois supérieure à celle de l'ADN nucléaire parce que l'ADN mitochondrial est haploïde et que la transmission est uniquement maternelle. Ceci entraîne une fixation des allèles plus rapide (Ballard & Whitlock 2004).
- Le taux de mutation est nettement supérieur pour l'ADNmt que pour l'ADN nucléaire, entre 5 à 10 fois chez les primates supérieurs (Brown *et al.* 1979).
- Le crossing over permet une recombinaison au sein d'un chromosome nucléaire et un brassage entre paires homologues, alors qu'il n'existe pas de recombinaison pour le chromosome mitochondrial. Les portions de l'ADN mitochondrial ne peuvent donc pas être considérées comme des marqueurs indépendants (Ballard & Whitlock 2004).

Les marqueurs mitochondriaux et nucléaires présentent beaucoup de qualités différentes qui se complètent. L'ADN mitochondrial, par sa taille efficace plus faible et son taux de mutation supérieur, est un marqueur puissant pour les études de biodiversité génétique. Cependant par son absence de recombinaison et sa transmission uniquement maternelle, il ne permet pas de diversifier les loci. L'ADN nucléaire, lui, permet d'étudier de nombreux loci facilement mais sa dérive génétique sera plus faible et la fixation des allèles moins rapide. C'est pour cela qu'il est conseillé de diversifier les marqueurs utilisés et de mélanger les loci mitochondriaux et nucléaires dans les études de biodiversité génétique (Ballard & Whitlock 2004 ; Arif *et al.* 2011).

Les études mélangeant les marqueurs peuvent obtenir des résultats différents voir contradictoires entre les marqueurs nucléaires et mitochondriaux. Cela peut venir d'une hybridation en cours, d'asymétries liées au sexe ou d'introgressions de l'ADN mitochondrial (Toews & Brelsford 2012). Certains marqueurs sont aussi choisis pour donner des informations différentes, ainsi l'ADN mitochondrial nous apporte des informations sur la lignée maternelle. Rosel *et al.*, ont par exemple utilisé cette caractéristique pour montrer une

phylogénie plus importante des femelles chez le marsouin commun (Rosel, France, *et al.* 1999a). Les marqueurs génétiques issus du chromosome Y apportent, eux, des informations spécifiquement sur la lignée paternelle. La combinaison des deux marqueurs est très utilisée pour identifier des hybrides et les espèces respectives des parents. Par exemple Vila *et al.*, ont pu identifier un hybride chien/loup et l'espèce de ses parents, grâce à la combinaison de ces marqueurs (Vilà *et al.* 2003).

L'étude des polymorphismes de l'ADN est un outil pour connaître et conserver les populations et les espèces

L'ADN une molécule informative sur l'individu

L'étude de l'ADN permet d'obtenir des informations sur des aspects très variés des individus et des espèces.

L'analyse du génome permet d'avoir des informations sur les gènes présents chez les individus et ainsi de détecter la présence de gène de résistance ou de maladie génétique (Frankham 2010). Par l'analyse du transcriptome, il est aussi possible d'étudier l'expression cellulaire et d'identifier des réponses aux stress (Frankham 2010). Par exemple Mollenhauer *et al.* (2009) ont comparé l'expression des gènes, par la technique d'hybridation suppressive soustractive (Ssh), dans des cellules de peau de grand dauphin, avant et après exposition à du méthylmercure et du sulfonate de perfluorooctane. Les auteurs observent des modifications d'expressions importantes notamment sur des gènes en lien avec la réponse aux stress, la peroxydation des lipides et l'apoptose (Mollenhauer *et al.* 2009).

Au niveau des informations biologiques sur les individus, il est possible, à partir de la molécule d'ADN, d'identifier l'espèce (Valentini *et al.* 2009), le sexe (Rosel 2003), les individus hybrides (Willis *et al.* 2004) ou des pathogènes (Jensen *et al.* 1999). L'identification d'espèces est particulièrement intéressante, principalement dans les cas où les caractères morphologiques ne sont pas disponibles ou suffisants. Un des exemples est, l'utilisation de ce type de démarches pour la conservation des espèces protégées et l'identification d'exploitations frauduleuses. C'est ce qui a été utilisé pour montrer que de la viande de baleine, mise en vente sur des marchés asiatiques, pouvait provenir d'espèces protégées (Palumbi & Cipriano 1998).

Enfin, il est aussi possible de caractériser de manière sûre un individu par marqueurs génétiques, on parle alors de ciblage moléculaire ("tag"), et ainsi de pouvoir le suivre dans le temps et l'espace, de mettre en place des méthodes de capture/recapture et de déterminer des abondances ou des taux de survies (Schwartz *et al.* 2007). Par exemple, le ciblage moléculaire effectué sur 3060 biopsies de baleines à bosse de l'Atlantique Nord, a permis de retrouver des individus présents sur des sites différents et, ainsi, de retracer des chemins de migration entre

zones d'alimentation et de reproduction, ainsi que de déterminer une abondance en Atlantique Nord de plus de 7500 individus par la méthode de capture recapture (Palsbøll *et al.* 1997). Ce ciblage moléculaire permet aussi d'identifier des liens familiaux et de discriminer avec précision les ascendants et les descendants. C'est ainsi que Twiss *et al.*, ont pu identifier les pères de chiots phoques gris (Twiss *et al.* 2006). Cela est aussi utilisé pour étudier les structures familiales au sein d'espèces qui vivent en groupes sociaux bien définis comme les grands dauphins (Krützen *et al.* 2004).

L'ADN apporte aussi des informations sur les populations

L'étude de l'ADN permet de déterminer de nombreux paramètres génétiques sur les individus, les populations et les espèces, comme les compositions et les fréquences alléliques ou les séquences nucléotidiques et la composition haplotypique. Ces paramètres permettent de calculer d'autres valeurs génétiques comme l'hétérozygotie, la taille efficace de la population, les flux de gènes, la diversité haplotypique ou des indicateurs de différenciation génétique tel que le *Fst*. Ces valeurs sont très utiles pour la conservation et la compréhension de la biologie des populations (Hartl & Clark 2007). Par exemple, la taille efficace est un indicateur important de la bonne santé de la population et de l'importance de la dérive génétique (Schwartz *et al.* 2007). Oliveira *et al.*, (2006) estiment la taille efficace de l'otarie à fourrure australe (*Arctocephalus australis*) au Pérou à 2153 individus. Ils estiment que cette valeur est faible et non suffisante pour résister aux variations importantes du milieu dues à El Nino (de Oliveira *et al.* 2006). La génétique peut aussi apporter des informations sur le passé en permettant d'estimer un temps de séparation, la taille de la population originale et le taux de migration entre deux groupes d'individus séparés actuellement. Par exemple Fontaine *et al.*, (2010), en comparant les fréquences alléliques de loci microsatellites de marsouins communs, ont estimé à 200 ans la séparation génétique entre la population de la péninsule Ibérique et celle de l'Atlantique Nord. Cela a aussi permis d'estimer la taille des stocks de grands cétacés avant la chasse intensive (Roman & Palumbi 2003). La diversité génétique, qui peut être exprimée par la richesse allélique ou la diversité haplotypique, est une donnée très importante pour la conservation et une diminution de celle ci est une indication de population impactée par une perturbation. Par exemple, il a été montré une diminution forte de la diversité haplotypique et nucléotidique du dauphin d'Hector en 100 ans, à cause d'un taux de captures accidentelles non soutenable (Pichler & Baker 2012).

Un "bottleneck", goulot d'étranglement, est une diminution de la diversité génétique due à une forte diminution de l'abondance en un temps relativement court. Si la démographie repart à la hausse, ce goulot d'étranglement ne sera plus détectable dans l'abondance mais le sera toujours génétiquement, car la diversité génétique se régénère beaucoup plus lentement que l'abondance. Un des cas les plus célèbres de goulot d'étranglement est celui de l'éléphant de mer (*Mirounga angustirostris*) qui a vu son abondance réduite à moins de 100 individus, il y a plus de 100 ans, abondance qui actuellement est remontée approximativement à 100 000 individus. Cette espèce présente donc une très faible diversité génétique qui pourrait être problématique dans l'avenir (Hoelzel *et al.* 2002). Un autre risque, important pour les

populations, est représenté par la consanguinité, c'est à dire une reproduction non aléatoire au sein d'une population, qui entraîne une augmentation de la dérive génétique et donc une diminution de la diversité. Il est nécessaire de la caractériser génétiquement et de la limiter au maximum pour assurer une meilleure survie des populations (Frankham 2010). De nombreuses informations génétiques peuvent donc être obtenues sur les populations, et le suivi de la diversité génétique est un moyen de déterminer lorsqu'elles sont en danger (Schwartz *et al.* 2007).

La diversité génétique est un paramètre essentiel pour résister face aux changements

La diversité génétique est un critère essentiel pour la survie des espèces et des populations, notamment parce qu'elle est nécessaire pour faire face aux changements (Pauls *et al.* 2013). Elle joue un rôle important dans la résistance aux stress, simples ou multiples, en augmentant la probabilité de présence de gènes de résistance (Roger *et al.* 2012). Il existe un lien entre diversité génétique et potentiel adaptatif, c'est donc un facteur primordial dans le cas du changement global et des multiples stress causés aux mammifères marins, et il est fondamental de tenir compte de cette diversité cryptique dans les stratégies de conservation (Pauls *et al.* 2013). Il a, aussi, été montré que le rétablissement des populations, après une perturbation, était plus efficace en cas de diversité génétique élevée (Lotze *et al.* 2011).

Pourtant, la diversité génétique n'est pas répartie de manière homogène au sein des espèces et il existe des zones géographiques pouvant présenter des richesses supérieures, par exemple les zones ayant servi de refuges durant les dernières glaciations, comme la péninsule Ibérique ou la Manche en Europe (Provan 2013). Il est donc important d'inclure cette hétérogénéité dans les modèles prédictifs et de protéger en priorité les zones les plus riches afin de préserver le potentiel adaptatif de l'espèce (Provan 2013). Par exemple, la diversité génétique de la région de contrôle mitochondriale du marsouin commun en Atlantique Nord est beaucoup plus importante à l'ouest qu'à l'est, avec une diversité nucléotidiques deux fois plus forte et un nombre d'haplotypes une fois et demie plus important. Cette diversité génétique plus importante est due à une colonisation de l'est de l'Atlantique plus tardive et à partir d'individus issus de l'ouest (Rosel, Tiedemann, *et al.* 1999b).

Les effets de fondation, les goulots d'étranglement, les changements d'aires de répartition, la micro évolution due aux modifications du milieu et la fragmentation de l'habitat, sont des causes de diminution de cette diversité génétique (Pauls *et al.* 2013). Par exemple, le phoque moine d'Hawaii (*Monachus schauinslandi*) montre une diversité génétique extrêmement basse avec seulement 8 loci microsatellites polymorphes sur 154 et un taux de diversité allélique moyenne de 1.1, ce qui veut dire que la grande majorité des loci ne présentait qu'un seul allèle au sein de l'espèce. Les auteurs estiment que c'est la réduction drastique de l'abondance, due à la surexploitation directe, qui est responsable de cette quasi absence de diversité génétique (Schultz *et al.* 2008). A l'échelle de la planète, la création de diversité génétique ne peut se faire que par mutation et c'est un processus qui prend beaucoup de temps, ce qui veut dire qu'à court et moyen terme, la perte de diversité génétique est

irréversible et diminue donc l'adaptabilité de l'espèce. L'adaptabilité passe par la diversité génétique de l'ensemble de l'ADN. Cependant, il a été montré que le suivi de la diversité génétique des marqueurs neutres pouvait être un bon proxy de cette adaptabilité, il est donc pertinent de les utiliser (Pauls *et al.* 2013).

La génétique est un outil de détermination des unités de gestion

Connaître la structure des populations au sein des espèces et définir des unités de gestion, est essentiel pour leurs conservations. Moritz (1995) a défini deux types d'unités : les ESU (Evolutionarily Significant Unit) et les MU (Management Unit). Les ESU présentent une séparation démographique totale entre les unités, c'est à dire qu'il n'y a aucun croisement entre ESU. Les MU, ou unités de gestion, sont des unités démographiques indépendantes mais pour lesquelles la séparation n'est pas totale et qui présentent des taux de migration entre elles. Les ESU peuvent contenir plusieurs MU. Cela peut varier en fonction des auteurs, mais les ESU se rapprochent du concept de sous-espèce alors que les MU se rapprochent du concept de population, au moins en biologie de la conservation. Au niveau de la caractérisation génétique, les ESU sont monophylétiques et définies par des allèles privés et les MU par des différences de fréquences alléliques (Moritz 1994).

Palsbøll, et ses collaborateurs, proposent de définir les MU, non pas par des différences de fréquences alléliques mais par une divergence génétique et donc un flux de gènes entre groupes. Ces MU sont centrales dans la gestion des populations naturelles face aux perturbations et il est nécessaire de bien définir le nombre d'unités de gestion, pour une conservation efficace. Si le nombre d'unités de gestion estimé est plus faible que le nombre réel, il y a des risques d'extinctions locales au sein des unités. Si le nombre d'unités de gestion estimé est plus fort que le nombre réel alors il y aura une augmentation superflue des mesures de conservation (Palsbøll *et al.* 2007). C'est pour cela que la structure des populations est une question centrale en conservation et que la majorité des études de génétique chez les mammifères marins concernent la structure des populations, la phylogéographie et le déplacement de gènes (de Oliveira *et al.* 2012). Par exemple, Wiemann *et al.* (2010), sur le marsouin commun en Baltique, ont identifié trois unités de gestion différentes et les auteurs conseillent de tenir compte de cette structure pour la mise en place des mesures de conservation (Wiemann *et al.* 2010). Une étude sur le ziphius (*Ziphius cavirostris*) utilisant la région de contrôle mitochondriale, montre que les animaux des différents bassins océaniques forment des populations différenciées et qu'il faut donc les considérer comme des unités de gestion différentes (Dalebout *et al.* 2005).

Les structures génétiques peuvent s'observer à différentes échelles

La détermination de structure génétique peut se faire à différentes échelles géographiques, de l'étude de la structure génétique mondiale à la structure génétique au sein d'un troupeau. Si l'on prend l'exemple du dauphin commun, une comparaison génétique de

marqueurs microsatellites, à l'échelle mondiale, montre qu'il existe une structure génétique entre les bassins océaniques (Amaral, Beheregaray, *et al.* 2012a). Une autre étude, réalisée à l'échelle de l'Atlantique, utilisant des marqueurs microsatellites et une portion de l'ADN mitochondrial, montre une séparation génétique entre l'ouest et l'est de l'Atlantique (Natoli *et al.* 2006). Ensuite, une étude utilisant des marqueurs microsatellites et une portion de l'ADN mitochondrial à l'échelle de l'Atlantique Nord a montré aussi une différence entre les deux côtés de l'Atlantique mais ne montre pas de différenciation au sein d'une façade (Mirimin *et al.* 2009). Les études de structure génétique peuvent aussi se faire à l'échelle d'une mer. Ainsi, une autre étude utilisant ces deux types de marqueurs a été menée au niveau de la mer Méditerranée et trouve une différenciation génétique entre les deux côtés du détroit de Gibraltar et une faible, mais significative, structure génétique au sein de la Méditerranée (Natoli *et al.* 2008). Enfin on peut chercher la présence de structures génétiques sur des échelles encore plus petites, comme un pays ou un groupe d'individus. Par exemple, Viricel *et al.* (2008), ont travaillé sur la détermination de la structure génétique au sein d'un groupe de dauphins communs échoués ensemble et en le comparant à des individus échoués le long des côtes françaises dans des échouages individuels. Les auteurs montrent une grande richesse génétique au sein des deux groupes et ne détectent pas de différence entre les deux (Viricel *et al.* 2008).

Les raisons expliquant la présence de structure génétique

S'il y a une présence de structure génétique c'est que le brassage génétique est insuffisant pour homogénéiser les gènes au sein de l'espèce. La première cause de limitation du flux de gène est l'isolement géographique. Cet isolement géographique peut être dû à des bassins océaniques différents (Rosel *et al.* 1995 ; Dalebout *et al.* 2005; Amaral, Beheregaray, *et al.* 2012a) ou alors à une distance au sein du même bassin océanique (Rosa *et al.* 2005 ; Natoli *et al.* 2008 ; Särnblad *et al.* 2011). Parfois des relations directes entre distances géographiques et distances génétiques peuvent être observées, on parle alors d'isolement par la distance (Westlake & Corry-Crowe 2002 ; Fontaine, Baird, *et al.* 2007a).

D'autres paramètres que la distance géographique peuvent expliquer les structures génétiques. Les écotypes sont des regroupements d'individus de la même espèce partageant des caractéristiques écologiques (régime alimentaire, habitat...). Ces écotypes, s'ils conduisent à une reproduction non homogène, induisent des séparations génétiques et peuvent expliquer une structure génétique d'un groupe d'individus partageant la même zone géographique. Par exemple, 3 écotypes d'orques d'Antarctique montrent une séparation génétique nette des séquences de la région de contrôle mitochondriale, ce sont donc des groupes génétiques différents (LeDuc *et al.* 2008). La structure sociale a aussi un rôle important sur la structure génétique. Oremus *et al.*, estiment que la différenciation génétique observée sur des Steno (*Steno bredanensis*) de Polynésie est due à la forte cohésion sociale qui maintient les individus proches. Cette structure sociale peut varier considérablement au sein d'une espèce (Oremus *et al.* 2012).

Malgré le fait que les mammifères marins soient capables de longs déplacements et que le milieu marin semble présenter des barrières physiques, aux flux de gènes, moindres que celles présentes en milieu terrestre, des variations des conditions physicochimiques peuvent limiter la connectivité et induire de la structure génétique (Amaral, Beheregaray, *et al.* 2012a). La présence d'une zone d'eau chaude et pauvre, au niveau du canyon de Capbreton, est supposée, par exemple, être une barrière suffisamment importante pour que les marsouins communs de la péninsule Ibérique forment une population séparée du reste de l'Europe (Fontaine, Baird, *et al.* 2007a). De plus, même sans représenter de véritables barrières, les conditions physicochimiques peuvent jouer un rôle sur la structure génétique. Par exemple, la séparation génétique entre les dauphins communs, au sein des bassins océaniques, peut être corrélée aux conditions physicochimiques de l'eau comme la concentration en chlorophylle, la température ou la turbidité. Une hypothèse serait que ce lien serait indirect, et que la corrélation se situerait plutôt au niveau de la répartition des proies, très dépendantes des conditions du milieu, qui va ensuite influencer sur les mammifères marins (Amaral, Beheregaray, *et al.* 2012a).

La mer d'Iroise et ses particularités

Une zone maritime présentant une très grande diversité d'habitats

La mer d'Iroise est une petite mer qui borde la pointe Finistère. Elle est délimitée par l'île d'Ouessant au nord ouest et l'île de Sein au sud et contient aussi l'Archipel de Molène. Cette mer se situe à la croisée de mers plus importantes avec la Manche au nord, la mer Celtique à l'ouest et le golfe de Gascogne au sud. Elle est aussi reliée à la rade de Brest et à la baie de Douarnenez. La profondeur maximum y est de 100 m, et elle comporte aussi un plateau dans l'archipel de Molène qui est une zone de grande taille et de faible profondeur (moins de 10 m) (Raffin 2003). Au niveau de l'hydrodynamisme, la mer d'Iroise est une zone présentant de forts courants, ce qui est notamment dû aux effets de la marée en Manche, entraînant des déplacements très importants de masses d'eaux. Ces forts courants vont amener l'apparition de fronts marins, c'est à dire des limites entre des zones aux caractéristiques (température, hydrodynamisme...) différentes. L'ensemble de ces conditions hydrodynamiques font que les eaux de la mer d'Iroise sont riches, avec une remontée de nutriments du fond vers la surface qui rend les eaux biologiquement productives (Le Duff 1999 ; Raffin 2003). Les températures en mer d'Iroise se situent entre 10 et 20 degrés. Les fonds marins sont très variés avec des fonds rocheux, des fonds de cailloutis et graviers, des fonds sableux plus ou moins fins et des fonds vaseux (Le Duff 1999). La diversité des conditions physico-chimiques explique la grande diversité des habitats présents dans la zone (Le Duff 1999). On trouve des champs de laminaires, des bancs de maërl, des herbiers de zostères, des sédiments envasés, des champs de blocs, des habitats pélagiques, des sédiments subtidiaux... (Raffin 2003 ; PNMI 2008). L'éventail des habitats de l'Iroise recouvre la plus grande partie des habitats théoriquement possibles sur les côtes Manche-Atlantique françaises (Le Duff 1999).

Une zone de grande richesse faunistique, notamment en mammifères marins

Grâce à son hydrodynamisme particulier, les apports nutritifs en mer d'Iroise sont importants, variés et de bonne qualité permettant la présence de fortes biomasses et d'une production primaire élevée, au niveau des macro algues et du phytoplancton. De plus, la grande diversité d'habitats offre une zone d'accueil pour de très nombreuses espèces. Ces deux raisons expliquent la présence d'une forte biodiversité et de réseaux d'interactions complexes (Le Duff 1999). On retrouve une grande richesse faunistique avec de nombreuses espèces de poissons, mollusques, crustacés, oiseaux, requins et mammifères marins (Raffin 2003) dont beaucoup sont considérés comme d'intérêts patrimoniaux (PNMI 2008). Certains sont présents tout au long de leur cycle biologique, alors que d'autres n'y passent qu'une partie de leur cycle de vie. La mer d'Iroise est aussi fréquentée par plusieurs espèces migratrices comme la sardine ou le requin pèlerin (Le Duff 1999). La mer d'Iroise se situe à la croisée de trois mers et héberge des espèces provenant de ces trois zones, Manche, golfe de Gascogne et Mer Celtique (Le Duff 1999). Au niveau des mammifères marins, la zone présente une grande

richesse en abondance et en diversité, avec plus de 25 espèces différentes, dont les principales sont le marsouin commun, le dauphin commun, le grand dauphin et le phoque gris.

Une zone impactée les multiples activités humaines

La mer d'Iroise est une zone aux multiples usages anthropiques (Raffin 2003). La pêche professionnelle est une activité importante. Les pêches se font au chalut, au casier, au filet ou à la drague et les espèces animales les plus pêchées sont la sardine, l'amande de mer et les gros crustacés. La pêche à pied est aussi très pratiquée, que ce soit par des professionnels ou des particuliers, ainsi que la collecte de végétaux marins, surtout des laminaires (Raffin 2003). La mer d'Iroise fait partie de la zone Atlantique Nord Est de la FAO où 93% des stocks sont considérés comme pleinement exploités ou surexploités, la mer Celtique et le golfe de Gascogne sont aussi considérés comme surexploités au vue de l'évolution des captures depuis 60 ans (Guénette & Gascuel 2012). D'autres usages du milieu marin sont présents comme une activité aquacole, notamment avec l'ostréiculture, l'extraction de sédiments, le tourisme, les nombreuses activités marines de loisirs comme le nautisme, la plongée sous marine ou les pêches de loisir (Raffin 2003).

Ces activités peuvent menacer les équilibres des écosystèmes, surtout si elles sont pratiquées sans régulation, mais ce ne sont pas les seules menaces pesant sur la mer d'Iroise. La zone est impactée par le réchauffement climatique avec une augmentation moyenne de la température du plateau celtique de 0.71°C (Belkin 2009) et une augmentation prédite sur 100 ans de 1.5 à 5°C (Philippart *et al.* 2011). Des modifications des écosystèmes marins des côtes anglaises et de la Manche, entre 1920 et 1995, ont déjà été observés avec des changements dans les communautés planctoniques et des animaux intertidaux (Southward *et al.* 1995). Les auteurs lient ces modifications aux variations de température qui ont eu lieu dans le même temps. Ils montrent que des espèces du golfe de Gascogne se sont déplacées vers le nord et estiment que ces changements vont s'amplifier avec le réchauffement climatique. Les modifications de la composition chimique de l'eau par des activités anthropiques constituent aussi une menace pour les écosystèmes de la mer d'Iroise. Les apports en matière organique et en nitrates, issus principalement des activités agricoles et d'un transfert par les fleuves jusqu'à la mer, entraîne une eutrophisation de la zone côtière et des proliférations d'algues toxiques ou non. Des contaminants comme le TBT sont aussi présents et ont des impacts sur les écosystèmes (Raffin 2003). La mer d'Iroise présente des zones d'eutrophisation et de présence de contaminants (PNMI 2008). Les modifications physiques de l'habitat, qu'elles soient causées par l'exploitation de ressources, les chaluts de fond, l'aménagement du littoral ou les activités de loisirs sont aussi des pressions sur les écosystèmes de la mer d'Iroise (Raffin 2003). Le Parc Naturel Marin d'Iroise a été créé pour permettre une gestion durable et efficace de l'ensemble des ressources de la mer d'Iroise tout en limitant les impacts sur les écosystèmes.

Chapitre 1 : Le suivi de la biodiversité génétique des mammifères marins des côtes atlantiques françaises

Introduction

L'importance du suivi de la biodiversité

La biodiversité est un terme désignant la diversité du vivant et qui correspond à l'ensemble des formes que peut prendre la vie. Parce que la biodiversité joue un rôle important pour la productivité et la stabilité des écosystèmes (Loreau *et al.* 2007) et qu'elle est nécessaire à l'ensemble des services écologiques rendus à l'homme (Chapin *et al.* 2000; Worm *et al.* 2006), il est primordial de l'inventorier et de la suivre à tous les niveaux et à toutes les échelles géographiques et temporelles (Singh 2002). Des programmes internationaux, comme la Convention sur la Diversité Biologique, signée par 168 pays en 1993, ont aussi des objectifs chiffrés de diminution de l'érosion de la biodiversité et doivent donc pouvoir estimer les variations temporelles de la biodiversité et les impacts des mesures de conservation (Pereira & Cooper 2006).

Le suivi de la biodiversité peut aussi amener à la compréhension des variations du milieu. Dans le cas, si complexe, du changement climatique, il est difficile de prédire les réponses biologiques, notamment en prenant en compte le délai pouvant exister entre effet et réponse des écosystèmes. Des suivis de la biodiversité sur le long terme sont requis (Lepetz *et al.* 2009). Par exemple, c'est grâce à un suivi de 40 ans de la biodiversité des copépodes en Atlantique Nord et la corrélation, qui a pu en être faite, avec la température de surface de l'eau sur la même période, qu'il a été montré que le changement climatique avait des effets sur les écosystèmes planctoniques (Beaugrand *et al.* 2002). C'est aussi en suivant la biodiversité des organismes intertidaux et du zooplancton sur 70 ans que Southward *et al.* (1995) ont montré que les changements globaux de température avaient un effet sur les écosystèmes du sud de l'Angleterre (Southward *et al.* 1995). Le suivi de la biodiversité comme indicateur des changements du milieu peut aussi être utilisé pour évaluer d'autres impacts des actions anthropiques. Par exemple, la comparaison de la biodiversité du benthos dans un estuaire australien montre une diminution du nombre d'espèces entre 1986 et 2003 et une détérioration de la qualité du milieu, notamment une eutrophisation du milieu causé par les rejets anthropiques (Wildsmith *et al.* 2011). Un autre exemple pertinent est donné par le suivi de la biodiversité de l'épifaune, et principalement la présence de certains groupes taxonomiques sensibles, qui est un bon indicateur des effets des chaluts de fond sur l'habitat benthique en Méditerranée (de Juan & Demestre 2012).

Pour observer et suivre la biodiversité, il y a plusieurs choix possibles, sur l'échelle géographique, sur l'échelle spatiale, sur la régularité, sur la résolution et sur les protocoles à définir. Ces choix doivent être faits principalement en fonction des questions biologiques,

mais aussi de l'effort qu'il est possible de mettre en place. Des suivis simples, à très large échelle et faisant participer le grand public, jusqu'à des suivis très ciblés, peuvent être utilisés (Couvét *et al.* 2011). Un autre type de réponse consiste aussi à mettre en place des observatoires de la biodiversité qui effectueront des suivis à long terme, et dont le but ne sera pas de répondre à une question précise mais de fournir des données standardisées, de manière continue et d'effort égal, sur toute la zone. Ces données permettront ensuite d'observer des changements lorsqu'il y en aura et d'aider à répondre à des problématiques qui sont indépendantes de la mise en place de l'observatoire. C'est le cas, par exemple, du "Continuous Plakton Recorder" (CPR) qui est un suivi du plancton de l'Atlantique Nord depuis les années 1920 et qui a permis la réalisation de nombreuses études scientifiques (Reid *et al.* 2003).

Biodiversité et phylogénie des mammifères marins

Les mammifères marins forment un groupe paraphylétique comprenant les cétacés, les siréniens et une partie des carnivores : les pinnipèdes, les loutres marines et l'ours blanc. Selon la Société de Mammalogie Marine (Society for Marine Mammalogy, SMM), il y a actuellement 125 espèces de mammifères marins dans le monde, dont 33 espèces de pinnipèdes, 86 de cétacés, 4 de siréniens, 2 de loutres marines et l'ours blanc (Committee on taxonomy, 2011). Ce nombre d'espèces peut varier pour plusieurs raisons. Tout d'abord par la découverte de nouvelles espèces de mammifères marins, ce qui est actuellement principalement le cas d'espèces cryptiques. Des exemples typiques sont le cas de la baleine franche du Pacifique Nord (*Eubalaena japonica*), qui jusqu'en 2000, était considérée comme une sous-population de Baleine franche de l'Atlantique Nord (*Eubalaena glacialis*) (Rosenbaum *et al.* 2000). C'est aussi le cas du dauphin Burrunan (*Tursiops australis*) qui était considéré comme un grand dauphin (*Tursiops truncatus*) auparavant et que des analyses génétiques et morphologiques ont identifié comme une nouvelle espèce (Charlton-Robb *et al.* 2011). Une autre cause, négative celle là, qui peut amener des variations dans le nombre d'espèces de mammifères marins, provient des extinctions d'espèces. Quatre espèces de mammifères marins, la rhytine de Steller, la phoque moine des Caraïbes, l'otarie du Japon (*Zalophus japonicus*) et le dauphin de Chine, ont disparu au cours des 250 dernières années à cause d'actions anthropiques (Jackson *et al.* 2001 ; Sakahira & Niimi 2007 ; Turvey *et al.* 2007 ; McClenachan & Cooper 2008). Un dernier cas enfin est celui d'espèces qui font débat et qui ne sont pas considérées de la même manière par les différents taxonomistes. Par l'exemple l'orque (*Orcinus orca*) est considéré comme une seule espèce présentant différents écotypes, mais certains auteurs estiment que plusieurs espèces d'orques devraient être reconnues (Morin *et al.* 2010).

Nous allons maintenant nous concentrer sur les cétacés et les pinnipèdes qui sont les principaux groupes de mammifères marins.

Phylogénie des cétacés

Le groupe vivant actuellement le plus proche des cétacés est celui des hippopotames avec une séparation datant de 53 millions d'années (Arnason *et al.* 2004 ; Uhen 2007). Le premier cétacé connu est le *Pakicetus*, qui était un mammifère semi aquatique vivant il y a 50 millions d'années. Ensuite arrivent plusieurs espèces de cétacés amphibies et c'est il y a 40 millions d'années qu'apparaissent les premiers cétacés complètement dépendants du milieu marin et 10 millions d'années plus tard les premiers mysticètes (de Muizon 2009). L'apparition des odontocètes, sous ordre différent des mysticètes, date aussi de 30 millions d'années selon les analyses de fossiles (de Muizon 2009).

Les mysticètes comprennent 14 espèces réparties en 4 familles, dont la plus importante est la famille des Balaenopteridae avec 8 espèces (Committe on taxonomy, 2011). La divergence entre les familles de mysticètes a commencé il y a 28 millions d'années avec la séparation entre les Balaenidae et les autres familles, puis il y a 22 millions d'années avec la divergence de la famille des Neobalaenidae. La principale difficulté dans la phylogénie des mysticètes est le placement de la baleine grise (*Eschrichtius robustus*) qui se situe au milieu des Balaenopteridae, alors que c'est le seul représentant de la famille des Eschrichtiidae, ce qui induit une paraphylie du groupe des Balaenopteridae (McGowen *et al.* 2009).

Les odontocètes forment un groupe beaucoup plus riche et diversifié que les mysticètes. Chez les odontocètes, il existe 86 espèces réparties en 9 familles dont les plus importantes sont les Delphinidae avec 36 espèces et les Ziphiidae avec 21 espèces (Committe on taxonomy, 2011). La première séparation s'est faite entre les cachalots, famille des Physeteridae et des Kogiidae, et le reste des odontocètes il y a 34.5 millions d'années. Ensuite il y a la séparation entre Ziphiidae et le reste, il y a 31 millions d'années. Les Platanistidae se différencient entre les Kogiidae et les Ziphiidae. Les autres familles de dauphins de rivière, Lipotidae, Pontoporiidae et Iniidae, se séparent il y a 22 millions d'années. Les trois groupes de Delphinoidea, que sont les Delphinidae, les Monodontidae et les Phocoenidae vont, eux, se séparer il y a moins de 15 millions d'années (McGowen *et al.* 2009).

La phylogénie des odontocètes présente plus de points de débat que celle des mysticètes. Par exemple, la situation des trois familles de Delphinoidea est restée longtemps indéterminée et des études morphologiques et génétiques ne réussirent pas à l'élucider. Une étude portant sur 3 gènes nucléaires a permis de montrer que le groupe des marsouins était plus proche du groupe narval-bélouga que du groupe des Delphinidae (Waddell *et al.* 2000). Mais le groupe, qui pose le plus de problème de phylogénie est la sous famille des Delphininae, qui a été très étudiée et dont la structure a été modifiée plusieurs fois (par exemple LeDuc *et al.* 1999 ; Kingston *et al.* 2009; McGowen 2011). C'est un groupe qui est très récent puisque sa radiation a débuté il y a 10 millions d'années (McGowen *et al.* 2009). Les différences génétiques entre espèces sont donc faibles ce qui explique les difficultés à établir une phylogénie robuste (Kingston *et al.* 2009). Et au sein de cette famille, le groupe des Delphininae est constitué d'espèces très proches pour lesquelles la différenciation

génétique est difficile (LeDuc *et al.* 1999 ; Amaral *et al.* 2007; McGowen 2011 ; Amaral, Jackson, *et al.* 2012b; Viricel & Rosel 2012).

Phylogénie des pinnipèdes

Les pinnipèdes sont une super-famille, de l'ordre des Carnivores, et proches de la famille des Ursidae (Uhen 2007). La monophylie de cette super famille a été longtemps discutée mais une étude, comparant les séquences de 6 gènes, nucléaires et mitochondriaux, de 76 espèces de Carnivores, a montré que les pinnipèdes étaient bien un groupe monophylétique (Flynn *et al.* 2005). L'espèce proche la plus ancienne connue est *Enaliarctos* vivant il y a 25 millions d'années. Cependant, elle n'est pas considérée comme l'ancêtre des pinnipèdes actuels mais comme une espèce sœur. L'apparition des pinnipèdes est estimée à 30 millions d'années (Uhen 2007). Il y a 23 millions d'années se sont séparées les différentes familles : Phocidae d'un côté, Otariidae et Odobenidae de l'autre. Il y a 18 millions d'années ces deux dernières familles se sont séparées (Higdon *et al.* 2007). Les Phocidae comptent actuellement 19 espèces, les Otariidae 14 et les Odobenidae 1 seule (Committee on taxonomy, 2011). Un problème de phylogénie existe chez les pinnipèdes avec le placement de l'espèce *Halichoerus grypus* qui diffère en fonction des auteurs. Certains le placent comme une espèce sœur du genre *Pusa* (Fulton & Strobeck 2010) alors que d'autres le placent à proximité de *Pusa Caspica* et au sein du genre *Pusa* qui devient donc paraphylétique (Arnason *et al.* 2006 ; Higdon *et al.* 2007). Les genres *Pusa*, *Phoca* et *Halichoerus* regroupent des espèces assez proches et dont les divergences remontent à moins de 2.5 millions d'années (Higdon *et al.* 2007).

La biodiversité des mammifères marins en Bretagne

Le long des côtes de la Bretagne, 25 espèces de mammifères marins avaient déjà été observées en 2000 (Ridoux *et al.* 2000), dont 6 espèces de pinnipèdes et 19 espèces de cétacés. Neuf espèces étaient couramment observées : le phoque gris et le phoque veau-marin pour les pinnipèdes, et pour les cétacés, le petit rorqual, le globicéphale noir, le dauphin de Risso, le dauphin commun, le dauphin bleu et blanc, le grand dauphin et le marsouin commun. D'autres espèces sont plus rarement observées, telles que le phoque à capuchon chez les pinnipèdes, le rorqual commun, le cachalot, le ziphius, l'orque et le lagénorhynque à flancs blancs pour les cétacés. Soit 6 espèces ayant été observées plusieurs fois et pour lesquelles, on peut considérer que les côtes bretonnes font partie de leur aire de répartition. Enfin il y a 10 espèces observées de manière isolée, pour lesquelles on peut considérer que les côtes bretonnes ne font pas partie de leur aire de répartition mais qu'il s'agit d'individus, souvent des jeunes qui s'en sont éloignés. Il s'agit du phoque annelé, du phoque barbu et du phoque du Groenland pour les pinnipèdes, de la baleine à bosse, du cachalot nain, du cachalot pygmée, de l'hyperoodon boréal, du mésoplodon de Blainville, du dauphin de Fraser et du lagénorhynque à bec blanc (Ridoux *et al.* 2000). Depuis cette date, il y a eu une seule nouvelle espèce observée en Bretagne (Hassani, communication personnelle), il s'agit d'un dauphin tacheté de l'Atlantique qui s'est échoué en 2005. C'est un dauphin tropical pour lequel la Bretagne ne fait pas partie de son aire de répartition. Il y a aussi des espèces qui n'avaient été

observées qu'une fois en 2000 qui ont été ré observées depuis sans que l'on puisse considérer que ce soient des espèces régulières en Bretagne. Par exemple des jeunes phoques polaires (barbu, annelé et du Groenland) ont été observés vivants et chez les cétacés des échouages d'hyperoodons boréals et d'orques morts (Données : Réseau National Echouages, disponible à <http://crmm.univ-lr.fr/index.php/fr/echouages/carte>)

L'analyse des données d'observations opportunistes de cétacés le long des côtes françaises de la Manche entre 1980 et 2000 montre que les espèces les plus observées et signalées le long des côtes bretonnes sont le marsouin commun, le dauphin commun, le grand dauphin, le dauphin de Risso et le globicéphale noir. Des orques, des dauphins bleus et blancs et des lagénorhynques à bec blanc ont aussi été signalés (Kiszka, Hassani, *et al.* 2004b). Cependant, l'étude ne prend pas en compte le sud de la Bretagne et les auteurs indiquent que les données d'observations opportunistes présentent des biais, car certaines espèces sont surreprésentées. Par exemple, le grand dauphin, qui présente des groupes résidents en mer d'Iroise et dans la baie du Mont Saint-Michel, est beaucoup observé sans que cela n'indique de fortes abondances. Les analyses des données obtenues par campagne d'observation dédiée sont plus fiables pour un calcul de l'abondance. La campagne SCANS 2 (Small Cetaceans in the European Atlantic and North Sea) en juillet 2005 a montré une forte présence de marsouins communs, de dauphins communs, de grands dauphins et de rorquals à museau pointu dans les eaux entourant la Bretagne. Des globicéphales noirs et des orques ont aussi été observés (Hammond *et al.* 2013). Enfin une campagne d'observation à bord de ferry en Manche et dans le golfe de Gascogne, a permis de signaler autour de la Bretagne la présence de marsouins communs et de dauphins communs en grande quantité, la présence régulière de globicéphales noirs, de grands dauphins et de dauphins bleus et blancs et la présence rare de dauphins de Risso, de ziphius, de cachalots et d'hyperoodons boréals (Kiszka *et al.* 2007). Les transects effectués dans cette étude ont principalement eu lieu en été et ne permettent donc pas d'avoir une image de la présence de cétacés sur toute l'année.

Pour les pinnipèdes, les phoques gris forment 2 colonies en Bretagne, la plus importante dans l'archipel de Molène et une aux Sept Iles. Des individus sont aussi couramment observés dans la baie du Mont Saint-Michel (Ridoux *et al.* 2000). Les colonies sont en constante augmentation comme le montrent les recensements (Vincent *et al.* 2005 ; Sami Hassani, communication personnelle). Les phoques veaux-marins forment une colonie dans la baie du Mont Saint-Michel dont l'abondance est en augmentation constante depuis 1986 (Hassani *et al.* 2008).

Il y a donc en Bretagne une forte biodiversité avec 26 espèces de mammifères marins observées, parmi lesquelles 15 sont des espèces régulières. Les 4 espèces les plus présentes sur les côtes sont le marsouin commun, le dauphin commun, le grand dauphin et le phoque gris.

Le suivi des échouages : un observatoire représentatif de la biodiversité des mammifères marins ?

Le suivi des échouages consiste à mettre en place un réseau d'observateurs, professionnels ou bénévoles avertis, qui vont inventorier les échouages, collecter des informations sur les individus et parfois des échantillons (par exemple : Jauniaux *et al.* 2002 ; Lopez *et al.* 2002 ; Osinga, Ferdous, *et al.* 2012a; Peltier *et al.* 2013). Le but est de suivre l'ensemble des échouages de mammifères marins, sans se focaliser sur une espèce en particulier, avec des moyens constants, autant que possible, au cours du temps et sur l'ensemble de la zone, et d'alimenter une base de données permettant les comparaisons géographiques et temporelles. Le suivi des échouages est donc bien un observatoire de la biodiversité des mammifères marins échoués.

Le suivi des échouages, avantages et inconvénients

Lorsque peu d'éléments sont connus sur les mammifères marins, le suivi des échouages permet d'obtenir les premières informations sur l'abondance et la diversité des espèces (Evans & Hammond 2004). Un autre avantage est son coût relativement faible (Evans & Hammond 2004 ; Peltier *et al.* 2013). Le suivi des échouages permet de collecter des informations sur l'histoire naturelle des animaux telles que l'espèce, l'âge, la taille, la maturité sexuelle, la longévité (Evans & Hammond 2004) mais aussi sur les causes de mortalités telles que les pathologies, les famines ou les morts traumatiques (Jauniaux *et al.* 2002). Enfin cela permet de collecter des échantillons nécessaires à des analyses telles que la génétique (Fontaine, Baird, *et al.* 2007a), la toxicologie (Law *et al.* 2012) ou le régime alimentaire (Méheust *et al.*, soumise). Enfin la large échelle géographique et temporelle des réseaux de suivi des échouages correspond aux échelles de vie et de déplacement des mammifères marins qui vivent longtemps et ont de grandes aires de répartition (Peltier *et al.* 2013).

Cependant, l'usage scientifique du suivi des échouages est limité par la difficulté de relier ce que l'on voit dans les échouages et ce qui arrive réellement aux populations. De plus la nature opportuniste de l'échantillonnage peut être limitante (Evans & Hammond 2004). Les animaux échoués sont très majoritairement des animaux morts, or ceux-ci sont dominés par quelques parties de la population comme les individus âgés, les individus malades et les très jeunes. Il ne sont donc pas toujours représentatifs de l'ensemble de la population (Bilgmann *et al.* 2011). De plus, seule une petite partie des animaux morts en mer se retrouvent inventoriés dans le cadre d'un suivi des échouages car la carcasse peut couler, être dévorée par des charognards, la dérive peut ne pas l'amener à s'échouer et enfin une fois échouée le taux de découverte n'est pas de 100%. Dans une étude, sur le nombre de dauphins communs retrouvés à la côte après avoir été marqués par un numéro d'identification, et dont la carcasse a été remise à l'eau suite à une capture accidentelle au large, seuls 8% des individus ont été retrouvés (Peltier *et al.* 2012). Les échouages ne sont donc pas représentatifs de la totalité de ce qui se passe en mer. Et plus les individus meurent loin de la côte moins il y a de probabilité

de retrouver leur carcasse à la côte (Peltier *et al.* 2012). Les distances parcourues par les carcasses entre la mort de l'animal et son échouage peuvent être importantes, ce qui peut induire un biais supplémentaire (Peltier *et al.* 2012) surtout que les événements d'échouages sont influencés par la topographie, l'hydrodynamisme et les conditions climatiques après la mort (Leeney *et al.* 2008). Toutefois, l'application de modélisation de la dérive des carcasses et l'utilisation de modèles hypothétiques d'échouages, permettent très nettement de renforcer les informations fournies par le suivi des échouages, d'en limiter les biais, et donc d'accroître la qualité et la pertinence globales des informations fournies par un réseau de suivi des échouages (Peltier *et al.* 2013).

La biodiversité des échouages renseigne sur les mammifères marins et le milieu

Plusieurs exemples confirment bien que le suivi des échouages permet d'obtenir des informations extrêmement pertinentes sur la diversité des mammifères marins (Evans & Hammond 2004). Le suivi des échouages de mammifères marins en Galice entre 1990 et 1999 a permis de détecter 15 espèces, principalement des cétacés, présentes le long des côtes (Lopez *et al.* 2002). Ces informations sont assez proches de la biodiversité réelle. Dans l'archipel d'Hawaii, un suivi des échouages, entre 1937 et 2002, a déterminé un nombre d'espèces présentes dans les eaux de l'archipel, équivalent à celui que trouvent les campagnes dédiées d'observations (Maldini *et al.* 2005). Des individus appartenant à des espèces inconnues dans les zones étudiées ont aussi été détectées, ce qui permet de compléter les connaissances sur les aires de répartition des mammifères marins. Par exemple, un phoque du Groenland a été identifié échoué le long des côtes méditerranéennes espagnoles en 2008, ce qui est l'observation la plus méridionale de l'espèce (Bellido *et al.* 2009). Un pseudorque a été observé échoué le long des côtes colombiennes en 2001 ce qui, selon les auteurs, permet de rajouter les eaux colombiennes à l'aire de répartition de cette espèce (Pardo *et al.* 2009). Des suivis d'échouages sur le long terme permettent d'observer de véritables changements dans la communauté de mammifères marins. En Ecosse, un suivi pendant une période de 55 ans entre 1948 et 2003, a permis d'observer l'arrivée de 4 nouvelles espèces dans les 20 dernières années, incluant notamment le dauphin bleu et blanc qui est devenu une espèce régulière en Ecosse (MacLeod *et al.* 2005). Les auteurs indiquent que ce changement a été d'abord observé dans les échouages avant de l'être en observation directe.

Le suivi des échouages peut, de même, refléter aussi les modifications d'abondance des espèces. Ainsi un suivi des échouages de cétacés, en Cornouailles Britannique entre 1911 et 2006, montre que les proportions de marsouins communs et de dauphins communs échoués ont considérablement augmenté depuis les années 80, et que cela correspond à une augmentation du nombre d'individus présents le long des côtes (Leeney *et al.* 2008). Les abondances relatives estimées par les échouages à Hawaii sont relativement proches de celles observées par campagnes dédiées d'observation (Maldini *et al.* 2005). De manière similaire, les abondances d'échouages et les taux de rencontres en mer ont été bien corrélés le long des côtes du sud ouest de la France (Castège *et al.* 2013). L'augmentation des échouages, morts ou vivants, des pinnipèdes entre 1979 et 2008 le long des côtes néerlandaises coïncide avec

l'augmentation des populations de phoques veau-marins et de phoques gris dans la zone (Osinga, Ferdous, *et al.* 2012a). Enfin, le suivi effectué en Ecosse a permis d'observer un shift dans les abondances de dauphins communs et de lagénorhynques à bec blanc, ces derniers ayant vu leur nombre d'échouages diminuer en même temps que ceux de dauphins communs augmentaient. Ce changement a ensuite été observé lors de campagnes d'observations (MacLeod *et al.* 2005).

Enfin, le suivi des échouages peuvent, dans certain cas, être liés aux effets des changements du milieu. Les modifications de diversité et d'abondance observées en Ecosse sont, selon les auteurs, le résultat de l'augmentation de la température du milieu marin car les espèces nouvelles ou plus abondantes sont des espèces de milieu chaud alors que les espèces en diminution d'abondance sont des espèces de milieu froid (MacLeod *et al.* 2005) La comparaison entre les observations, scientifiques, opportunistes ou reportées dans la presse ou dans les archives, d'échouages de cachalots en mer du Nord et les anomalies de température sur la zone entre 1563 et 2004 montrent une corrélation entre les deux. Les échouages de cachalots sont donc liés aux augmentations de température dans la mer du Nord (Pierce *et al.* 2007). Les échouages peuvent aussi informer sur la présence d'épizootie comme la maladie de Carré chez le phoque (Osinga, Ferdous, *et al.* 2012a) ou sur la proportion de captures accidentelles (Byrd *et al.* 2008) et ainsi servir de signal d'alarme en cas de trop forte mortalité de mammifères marins.

Le RNE, un observatoire de la biodiversité des mammifères marins le long des côtes de la France

Le Réseau National Echouage a été créé en 1972 par le docteur Raymond Duguay. Il s'agit d'un réseau de personnes capables de gérer les échouages de mammifères marins, morts ou vivants. Les principales missions sont la collecte d'informations et de prélèvements, le soutien aux personnes chargées de l'enlèvement des carcasses, l'information et la sécurisation des publics. Ce réseau s'étend à l'ensemble des façades maritimes françaises métropolitaines (Manche, Atlantique et Méditerranée) et d'outre mer. La coordination du RNE est assurée par l'unité mixte de service PELAGIS (UMS- 3462 CNRS/ Université de La Rochelle), anciennement CRMM. Plus de 300 correspondants, appartenant à l'un des 50 organismes participant au réseau, consacrent une partie de leur temps personnel ou professionnel, aux échouages de mammifères marins. Au niveau de la région Bretagne, le Laboratoire d'Etude des Mammifères Marins d'Océanopolis est le coordinateur régional.

De par son étendue géographique (plus de 6000 km de côtes) et temporelle (40 ans de suivi), de par ses protocoles standardisés et de par son suivi de toutes les espèces de mammifères marins, le RNE est un véritable observatoire de la biodiversité des mammifères marins (van Canneyt *et al.* 2012).

L'outil génétique pour le suivi de la biodiversité

L'identification d'espèces par l'ADN : un outil pertinent mais complexe à maîtriser

La taxonomie moléculaire est l'utilisation de marqueurs moléculaires, comme les séquences d'ADN ou les séquences protéiques par exemple, pour définir et classer les individus dans des taxons, notamment les espèces. Elle peut être utilisée pour définir ou confirmer de nouvelles taxonomies. Elle permet donc, par l'étude de la biodiversité génétique de suivre la biodiversité spécifique (Frankham 2010).

L'utilisation de barcode ADN et la comparaison avec des séquences provenant d'individus d'espèces connues permet l'identification de l'espèce de l'individu (Hebert, Cywinska, *et al.* 2003a). C'est un formidable outil pour le suivi de la biodiversité des mammifères marins. Cela peut permettre d'identifier ou de confirmer l'espèce d'individus échoués ou capturés accidentellement, notamment lorsqu'il s'agit d'espèces proches morphologiquement. Jayakansar *et al.* (2008) ont ainsi identifié 5 espèces de cétacés le long des côtes indiennes. Cette analyse génétique, basée sur des séquences du gène *cytb*, a permis d'identifier des dauphins communs à long bec (*Delphinus capensis*) qui, avant cela, étaient considérés comme des dauphins communs à bec court (*Delphinus delphis*) et de confirmer la présence de grands dauphins (*Tursiops truncatus*) de l'océan Indien (Jayasankar *et al.* 2008). Cette identification génétique d'espèces est aussi très intéressante lorsqu'il s'agit d'identifier l'espèce d'une carcasse dont l'état ne permet pas de le faire morphologiquement ou lorsqu'il n'y a qu'une partie de l'animal qui est retrouvée, comme un os ou un morceau de chair. Cela permet aussi l'analyse des espèces vendues sur les marchés et l'identification de chasses illégales ou de ventes mal référencées (Palumbi & Cipriano 1998). Une application sur le web, DNA surveillance, a été mise en place pour identifier les espèces à partir de séquences d'ADN mitochondrial (Ross *et al.* 2003). L'identification d'espèces par la génétique est aussi intéressante pour étudier le régime alimentaire en analysant l'ADN résiduel des proies du contenu stomacal (Méheust *et al.*, soumis) ou des fèces (Deagle *et al.* 2009).

Quand il s'agit d'individus d'espèces rares, peu étudiées, très peu présentes dans une région ou proches morphologiquement d'une autre espèce, l'identification de l'espèce est difficile. La famille des Ziiphidae (les baleines à becs), qui est constituée de 21 espèces en est un bon exemple. Ce sont des espèces qui vivent dans les eaux profondes et qui sont assez rarement observées. Par exemple, la baleine à bec de Longman (*Indopacetus pacificus*) est une des espèces les plus rares de cétacés, elle n'a jamais été observée vivante et jusqu'en 2003 seuls deux crânes avaient permis de la définir. L'identification génétique a permis de rajouter la description de 4 individus à l'espèce, dont 3 échoués et 2 qui avaient été mal identifiés sur la base des caractères morphologiques, et ainsi d'améliorer les connaissances générales sur cette espèce (Dalebout *et al.* 2003). Thomson *et al.* (2013) ont utilisé l'identification génétique sur une majorité des individus échoués et échantillonnés le long des côtes de Nouvelle-Zélande afin de d'identifier avec certitude les échouages. Les auteurs estiment cela encore

plus utile dans le cas des espèces rarement échouées comme certaines baleines à bec (Thompson *et al.* 2013). Cette identification quasi systématique a permis l'identification de deux baleines à bec échouées en 2010 comme des baleines à bec de Travers (*Mesoplodon traversii*), alors qu'elles avaient été mal identifiées à l'aide de la morphologie. Cette espèce n'était connue que par 3 fragments osseux découverts sur des plages (Thompson *et al.* 2012).

Enfin, le cas, sans doute, le plus complexe d'identification d'espèces de mammifères marins est celui des espèces cryptiques. Il s'agit d'espèces morphologiquement proches d'une autre espèce, bien connue celle-là, et qui sont de fait longtemps ignorées parce que confondues avec l'espèce connue. La majorité des nouvelles espèces de mammifères marins caractérisées récemment sont des espèces cryptiques, découvertes notamment par des différences génétiques. Par exemple, ce sont des analyses génétiques qui ont permis de soupçonner l'existence d'une nouvelle espèce de grands dauphins le long des côtes australiennes (Möller *et al.* 2008). Ensuite ce sont des analyses génétiques plus poussées et des observations de la morphologie qui ont permis de définir la nouvelle espèce, le dauphin Burrunan (*Tursiops australis*) endémique aux côtes australiennes (Charlton-Robb *et al.* 2011). C'est aussi une analyse génétique de nombreux Ziphiidae qui a permis de définir une nouvelle espèce, la baleine à bec de Perrin (*Mesoplodon perrini*) dont les individus étaient, avant, considérés comme appartenant à d'autres espèces de baleine à bec (Dalebout *et al.* 2002). Et il existe encore sûrement de nombreuses autres espèces cryptiques. Ainsi, récemment, la question de l'existence de plusieurs espèces d'orques a été posée (Morin *et al.* 2010).

Le suivi de la biodiversité génétique apporte de nombreuses informations

Plusieurs intérêts de l'utilisation de la génétique ont été décrits dans la partie revue bibliographique et certains sont en lien direct avec la biodiversité génétique. Quelques éléments clés concernant les principales informations fournies par un suivi de la biodiversité génétique sont :

- En dessous des espèces il existe des séparations en sous espèces qui peuvent être définies par l'étude de la diversité génétique (Rosel *et al.* 1995).
- Le suivi de la diversité génétique permet de définir la structure des populations et de suivre ces populations au cours du temps (Rosel, France, *et al.* 1999a).
- La diversité génétique permet de définir des unités de gestion essentielles à la conservation des espèces (Palsbøll *et al.* 2007).
- La diversité génétique est essentielle à la résistance et à la résilience des espèces face aux changements du milieu, il est donc primordial de la caractériser et de suivre son évolution (Pauls *et al.* 2013).
- Les variations de la diversité génétique sont des signaux de modifications de la santé de la population ou de l'espèce, et peuvent indiquer des goulots d'étranglement

(Hoelzel *et al.* 2002), des impacts anthropiques forts (Pichler & Baker 2012) ou un grand risque d'extinction (Schultz *et al.* 2008).

Le suivi de la biodiversité génétique permet donc d'apporter beaucoup d'informations sur les individus et les populations. C'est un paramètre essentiel à connaître pour leur conservation.

Le barcode ADN et le projet BOLD

Le suivi de la biodiversité génétique passe par l'étude de l'ADN. Cependant l'ADN est une molécule de grande taille et complexe, qu'il est difficile d'étudier entièrement sur chaque individu. Il est donc nécessaire de cibler des zones précises qui doivent être les plus informatives possibles. Pour pouvoir comparer les résultats, il est aussi important de travailler sur les mêmes marqueurs et de les mettre en commun dans une banque de données. Ce sont ces idées qui ont amené à la création du projet Barcoding of Life.

Historique du projet Barcoding of Life

Paul Hebert est celui qui a mis en place et développé le projet Barcoding of Life. Les séquences génétiques pouvant être considérées comme des « barcodes génétiques » apposés sur chaque cellule et portant l'information de l'espèce, il a développé l'idée du "DNA Barcoding", que nous traduirons par barcode de l'ADN, qui consiste à utiliser des régions précises de l'ADN pour déterminer l'espèce (Hebert, Cywinska, *et al.* 2003a).

En 2003 apparaît la première description du projet Barcoding of Life : il s'agit de développer une base de données de séquences contenant idéalement les séquences d'ADN de toutes les espèces animales pour une portion d'ADN ciblée et définie. Cette base de données permettrait alors d'identifier l'espèce d'un échantillon biologique en séquençant cette portion d'ADN et en la comparant avec la base de données, pour repérer la séquence d'espèce connue la plus proche (Hebert, Cywinska, *et al.* 2003a). Ils proposent dans le même article d'utiliser comme portion d'ADN un fragment de 650 paires de bases de la région 5' du gène mitochondrial codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase (*Cox1*) car elle présente une diversité importante au sein des animaux et une forte capacité de discrimination de l'espèce. Il a ensuite été montré que *Cox1*, sauf exception, présentait chez les animaux une forte variabilité inter spécifique mais une faible variabilité intra spécifique, ainsi que des régions très conservées au cours de l'évolution, permettant de définir des amorces d'amplification. Ce qui en fait un marqueur, à priori, idéal pour l'identification d'espèces (Hebert, Ratnasingham, *et al.* 2003b). En 2004, le premier travail d'identification d'espèces par barcode ADN concerne les oiseaux d'Amérique du Nord. Cette étude montre que le marqueur *Cox1* permet bien de discriminer les espèces d'oiseaux, ce qui permet de valider son utilisation pour ce taxon, et permet de suspecter la présence de 4 nouvelles espèces au sein de leur échantillonnage (Hebert *et al.* 2004). Depuis de nombreuses études ont utilisé le barcode

ADN et le marqueur *Cox1* pour différents taxons comme par exemple les chauves-souris (Clare *et al.* 2007) ou les poissons (Ward *et al.* 2005).

En mars 2005 a été mis en place un Consortium, le CBOL (Consortium for Barcoding Of Life), regroupant 120 organisations de 45 nations, dans le but de développer des collaborations internationales afin d'arriver à une librairie complète des eucaryotes. Ce Consortium a permis le développement massif de la base de données de séquence. Des outils informatiques ont donc été développés pour permettre de gérer, d'analyser et de stocker ces séquences (Ratnasingham & Hebert 2007). Cela a amené à la création de BOLD (the Barcode Of Life Data system) : une plateforme informatique (<http://www.boldsystems.org>) permettant de déposer des séquences, de gérer ses projets, d'analyser des séquences et d'identifier une espèce à partir d'une séquence inconnue. La différence entre BOLD et une base de données de séquences généraliste comme Genbank, c'est que seuls quelques marqueurs standardisés sont présents et qu'un nombre important d'informations portant sur l'échantillon, dont provient la séquence, est requis, ceci afin de pouvoir certifier la séquence en regard de la taxonomie, et ainsi l'utiliser comme référence pour l'outil d'identification d'espèce. D'autres outils de bioinformatique spécifiques ont aussi été mis au point par la suite. Par exemple, la plateforme iBarcode.org qui permet d'analyser ces séquences plus en détail (Singer & Hajibabaei 2009).

Cependant, le terme de barcode ADN peut aussi recouper d'autres notions, Valentini *et al.* (2008) ont défini deux barcodes ADN. Le premier, barcode ADN *sensu stricto*, correspond à l'identification de l'espèce avec un fragment standardisé, ce qui correspond à la démarche de Hebert. Le deuxième, barcode ADN *sensu lato* est moins restrictif, il correspond à l'identification d'un niveau taxonomique à l'aide d'un fragment d'ADN quel qu'il soit (Valentini *et al.* 2009).

Avantages et inconvénients du barcode ADN

Les avantages du barcode ADN *sensu stricto* et de la démarche du CBOL sont nombreux :

- Le marqueur *Cox1* se retrouve chez tous les animaux et présente, pour la plupart, une divergence intra spécifique nettement plus faible que la divergence inter spécifique, ce qui permet une bonne discrimination des espèces (Hebert, Cywinska, *et al.* 2003a; Hebert, Ratnasingham, *et al.* 2003b). Cette séparation entre les divergences intra et interspécifiques est appelée *barcoding gap*. C'est une caractéristique essentielle pour une utilisation efficace du barcode ADN (Viricel & Rosel 2012).
- La démarche est applicable aussi chez les champignons et les plantes, mais ce sont d'autres marqueurs de référence qui ont été définis.
- L'utilisation d'un seul marqueur au sein d'un règne permet une concentration importante des moyens et ainsi d'obtenir une base de données très étoffée. Il y a

actuellement (juillet 2013), pour les animaux, 1 367 662 séquences pour 127 679 espèces répertoriées soit près de 10 % des espèces connues.

- *Cox1* étant un gène mitochondrial, il bénéficie des avantages d'utilisations des marqueurs mitochondriaux tels que le nombre important de copies par cellule, l'haploïdie et le polymorphisme élevé (Ballard & Whitlock 2004).
- *Cox1* étant un gène, il possède des parties très conservées qui permettent de définir des amorces universelles, ou au moins utilisables pour l'ensemble d'un taxon (Ivanova *et al.* 2007).
- Une portion de seulement 100 paires de bases du marqueur *Cox1* suffit à identifier l'espèce dans 90% des cas. Il est donc possible de définir des amorces de mini-barcoding permettant d'identifier l'espèce d'individu à l'ADN très dégradé (Meusnier *et al.* 2008).

L'ensemble de ces avantages a convaincu une grande partie de la communauté scientifique et a fait du barcode ADN un outil très utilisé, ce qui est encore un avantage car plus le nombre de séquences dans la banque est important, plus la base de données est puissante et pertinente.

Cependant il existe aussi des inconvénients à cette démarche, principalement le choix du marqueur qui est très discuté. Pour certains chercheurs, le marqueur *Cox1* n'est pas celui qui présente le meilleur *barcoding gap*. Par exemple Santamaria *et al.* (2007) montrent que pour 4 espèces de mammifères, le gène *Cox1* n'est pas celui qui présente la plus faible variabilité intra spécifique ni le meilleur ratio variabilité inter/intra spécifique. Ils estiment même que pour la vache, c'est le moins bon des gènes mitochondriaux (Santamaria *et al.* 2007). Pour des espèces de corail, il a été montré que le barcode ADN *sensu stricto* était difficilement utilisable à cause d'une faible variabilité inter spécifique (Shearer & Coffroth 2008).

Ce choix du marqueur est un problème important chez les cétacés et surtout au niveau de la sous famille des *Delphininae* car le marqueur *Cox1* ne permet pas toujours une discrimination efficace des espèces à cause d'un manque de *barcoding gap*. Ce manque de *barcoding gap* est principalement dû à l'origine récente des cétacés. Une première étude a estimé que le marqueur *Cox1* ne permet pas une discrimination des espèces et préconise d'utiliser le marqueur *Cytb* pour travailler sur les delphinidés (Amaral *et al.* 2007). Une autre étude portant sur 61 espèces de cétacés montre que le marqueur *Cox1* est suffisamment discriminant pour la majorité des espèces de cétacés, qu'il existe effectivement un manque de *barcoding gap* pour les *Delphininae* mais que cela est dû à la trop récente séparation des espèces au sein du taxon et que le marqueur *Cytb* ne permet pas une meilleure discrimination (Viricel & Rosel 2012). Un résultat similaire a été obtenu pour les mammifères dans leur ensemble : le marqueur *Cox1* est représentatif du génome mitochondrial et, s'il existe des difficultés de discrimination, alors elles se retrouveront aussi sur d'autres marqueurs (Luo *et al.* 2011).

Malgré sa difficulté de mise en œuvre dont il faut tenir compte, l'identification d'espèce à l'aide d'une séquence d'ADN présente un grand intérêt pour l'ensemble des études de biologie et d'écologie et la démarche de barcode ADN, de par le nombre important de séquences et d'espèces présentes, est un formidable outil.

Suivi moléculaire de la biodiversité génétique des mammifères marins échoués le long des côtes bretonnes

Il y a, en moyenne, 150 mammifères marins, cétacés et pinnipèdes, échoués qui sont enregistrés par le RNE en Bretagne par an, et ce pour plus de 20 espèces différentes. Le suivi des échouages est un véritable observatoire de la biodiversité et apporte des informations sur l'évolution temporelle de la diversité et de l'abondance relative de mammifères marins dans la région. A cet observatoire de la biodiversité spécifique, il était pertinent, pour toutes les raisons évoquées précédemment, d'ajouter un observatoire de la biodiversité génétique. Une étude pilote a été conçue dans le cadre de ma thèse et présentée au RNE. Elle porte sur l'étude de 99 individus, de 15 espèces différentes, échoués le long des côtes françaises et pour lesquels une séquence de *Cox1*, et donc un barcode ADN *sensu stricto*, a été obtenue.

Les buts de ce suivi sont multiples : d'abord il s'agit de constituer une base de données de référence, à partir d'individus identifiés sur le terrain par morphologie, un catalogue de la biodiversité génétique des mammifères marins échoués en Bretagne, ce catalogue renforçant celui du projet international BOLD, qui est loin d'être complet pour les mammifères marins. Ensuite ce catalogue doit être considéré comme un état initial, un point zéro qui pourra être comparé par la suite avec la biodiversité génétique observée et ainsi faire un suivi temporel de celle-ci. Ce catalogue permet aussi l'identification par comparaison des individus échoués dont l'espèce ne peut être identifiée sur le terrain (pour cause de dégradation de la carcasse, d'espèce rarement observée, d'espèces proches morphologiquement...). Plus de 15% des échouages ne sont pas déterminés jusqu'à l'espèce et notamment avec une difficulté à discriminer les delphinés entre eux. Ce suivi de la biodiversité permettra d'identifier ces individus. Enfin, un effort important d'analyse génétique a porté sur le marsouin commun et le phoque gris pour lesquels une étude de génétique des populations est en cours dans le cadre de cette thèse. Ces résultats permettront de pousser les analyses de suivi de la biodiversité génétique intraspécifique. Ces résultats sont présentés dans la publication suivante : "The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast" ; Alfonsi, Méheust *et al.*, soumise. Cette publication a été soumise dans le cadre d'un numéro spécial de la revue *Zookeys*, suite à la conférence internationale ECBOL3 qui a eu lieu à Bruxelles en Septembre 2012 où j'ai présenté oralement ces résultats.

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. Bäckeljau | 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, Bäckeljau 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, LCOIea (5'-tcggccattttacatgttcata-3') and HBCUem (5'-ggggccgaagaatcagaata-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 \times 1 (Eurogentec) with a final concentration of MgCl_2 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).

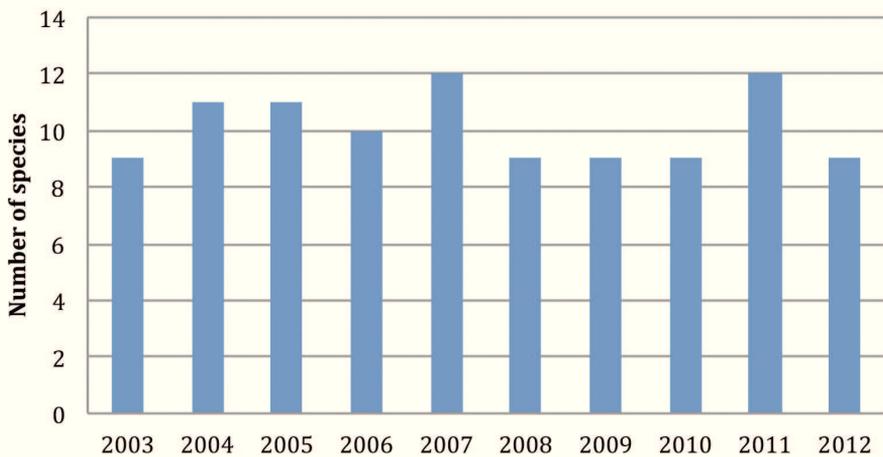
Members of the stranding network are trained to identify the stranded animals. Nevertheless, 258 animals (16.8% of the strandings) were not characterized to the species level, generally because of an advanced state of decomposition of the animal body, sometimes in conjunction with bad field-work conditions.

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.

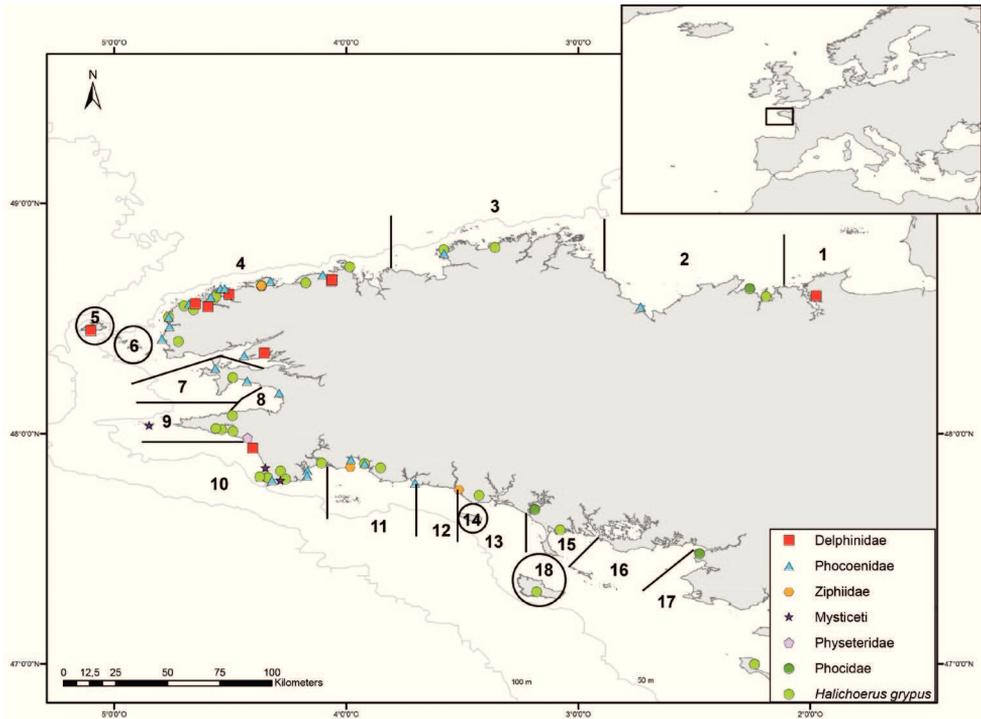


Figure 2. Organization of the stranding network in Brittany (North West of France) and localization of the stranded specimens used in this study. Numbers indicate the 18 geographic sections of the stranding network in this area. The map was drawn using ArcGIS Desktop: Release 9.3.1 (Environmental Systems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

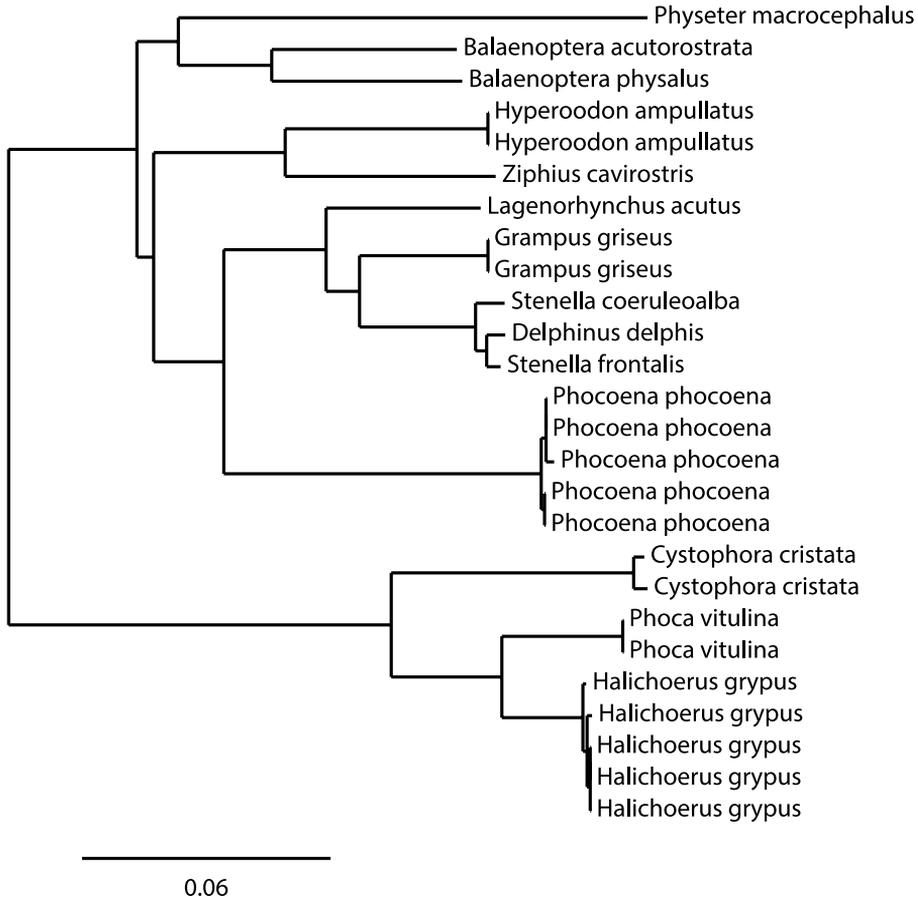


Figure 3. Neighbour-Joining tree of major species of marine mammals, based on K2P-distances calculated from 507 bp of COI. All sequences come from the IMMB project on BOLD, and only 5 harbour porpoise and 5 grey seal samples among those of the IMMB project have been included in the analysis.

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,

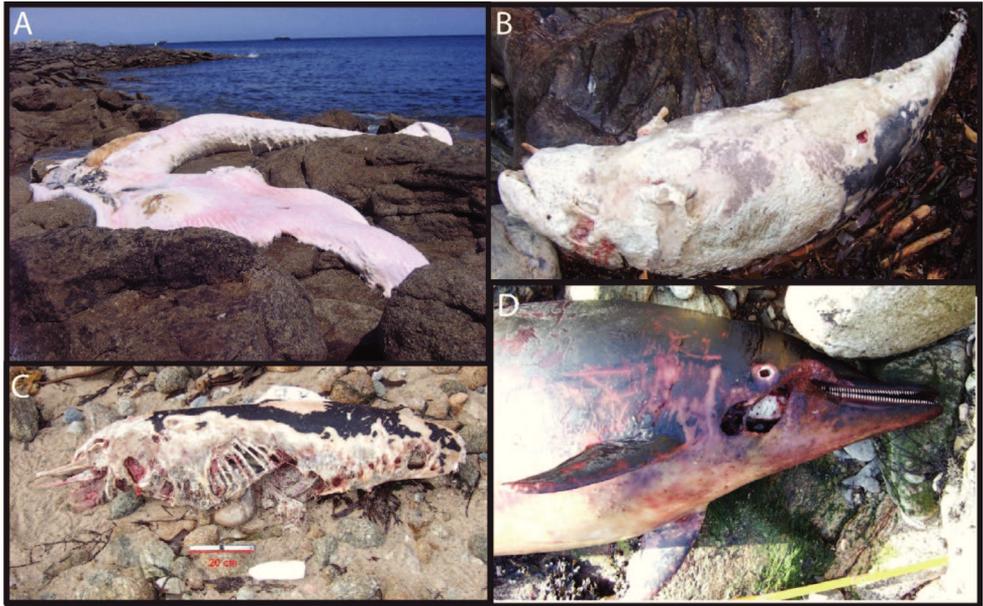


Figure 4. Examples of marine mammals stranded along the coasts of Brittany and the species-level identifications of which were determined or confirmed thanks to DNA barcoding. **A** Sample Ms250511, stranded on the “Île de Sein” during May 2011, and identified as a *Balaenoptera physalus* **B** Sample 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,

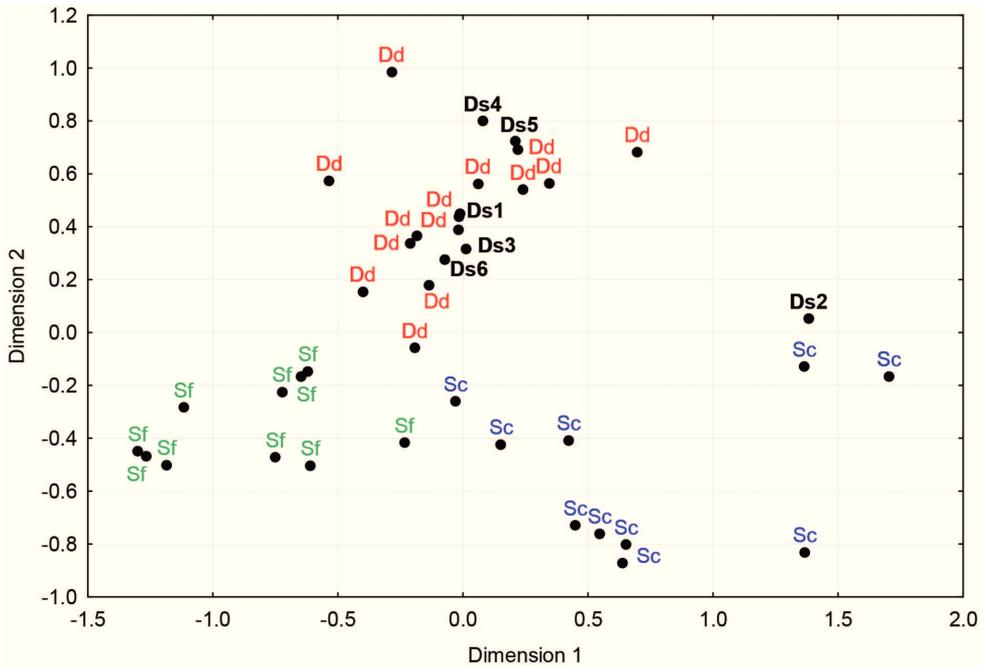


Figure 5. Non-metric Multidimensional Scaling plot of K2P-distance between MCR sequences of *S. coerulealba* (in blue), *D. delphis* (in red) and *S. frontalis* (in green). Individuals of each species are clearly clustered together, and unidentified samples (in black) stranded along the coasts of Brittany 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.

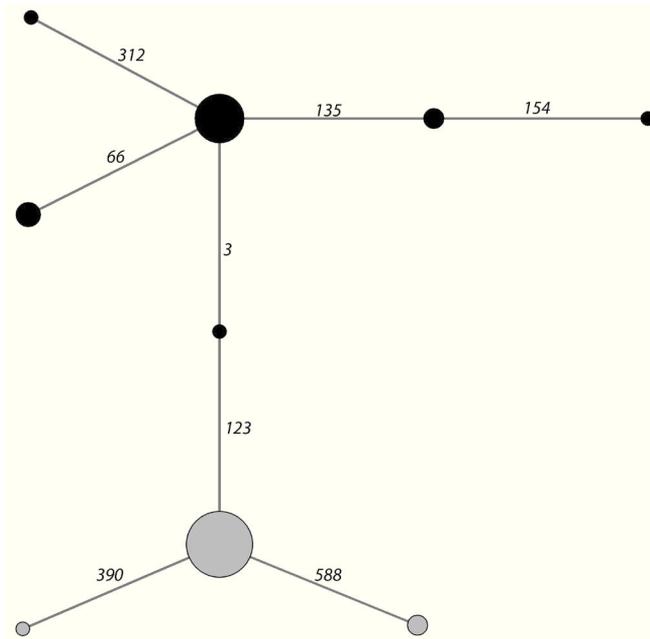


Figure 6. Haplotype network established from the COI sequences of 45 harbour porpoises stranded along the Atlantic coast of France (Appendix 1). Numbers on a line connecting two haplotypes correspond to the sequence position of the mutation differentiating these haplotypes. Two mitochondrial haplogroups 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, Bouquegneau 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, Woloszynska 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, Brelford 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

Appendix 1

List of the 46 *Phocoena phocoena* analyzed. (doi: 10.3897/zookeys.365.5873.app1) File format: Microsoft Word file (doc).

Copyright notice: This dataset is made available under the Open Database License (<http://opendatacommons.org/licenses/odbl/1.0/>). The Open Database License (ODbL) is a license agreement intended to allow users to freely share, modify, and use this Dataset while maintaining this same freedom for others, provided that the original source and author(s) are credited.

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 List of the 46 *Phocoena phocoena* analyzed. doi: 10.3897/zookeys.365.5873.app1

Appendix 2

Posterior probabilities for species identification determined by the nMDS analysis. (doi: 10.3897/zookeys.365.5873.app2) File format: Microsoft Word file (doc).

Copyright notice: This dataset is made available under the Open Database License (<http://opendatacommons.org/licenses/odbl/1.0/>). The Open Database License (ODbL) is a license agreement intended to allow users to freely share, modify, and use this Dataset while maintaining this same freedom for others, provided that the original source and author(s) are credited.

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 Posterior probabilities for species identification determined by the nMDS analysis. doi: 10.3897/zookeys.365.5873.app2

	Reference on BOLD	Reference in Alfonsi et al. (2012)	Place of stranding	Departments (Territorial and Administrative Division in France)
1	pp240100	ppbec1	Brittany	29
2	pp140904	ppbec2	Brittany	29
3	pp111204	ppbec3	Brittany	29
4	pp011005	ppbec7	Brittany	29
5	pp210306	ppbec8	Brittany	22
6	pp090506	ppbec9	Brittany	29
7	pp051006	ppbec10	Brittany	29
8	pp111006	ppbec11	Brittany	29
9	pp190107	ppbec12	Brittany	56
10	pp260207	ppbec13	Brittany	29
11	pp240907	ppbec14	Brittany	29
12	pp270907	ppbec15	Brittany	29
13	pp071207	ppbec17	Brittany	29
14	pp070208	ppbec18	Brittany	56
15	pp120908	ppbec23	Brittany	29
16	pp150908	ppbec24	Brittany	29
17	pp061008	ppbec25	Brittany	29
18	pp160808	ppbec21	Brittany	29
19	pp010508	ppbec19	Brittany	29
20	pp031107	ppbec16	Brittany	29
21	pp261208	ppbec26	Brittany	29
22	pp070908	ppbec22	Brittany	29
23	pp240708	ppbec20	Brittany	22
24	pp150909	ppbec29	Brittany	29
25	pp100909	ppbec28	Brittany	29
26	pp040609	ppbec27	Brittany	29
27	pp080410	ppbec31	Brittany	29

28	pp190310	ppbec30	Britanny	29
29	pp190111	-*	Britanny	29
30	-	ppbob1	Bay of Biscay	33
31	-	ppbob2	Bay of Biscay	85
32	-	ppbob4	Bay of Biscay	33
33	-	ppbob5	Bay of Biscay	33
34	-	ppbob6	Bay of Biscay	33
35	-	ppbob8	Bay of Biscay	33
36	-	ppbob11	Bay of Biscay	33
37	-	ppbec4	Brittany	56
38	-	ppbec5	English Channel	76
39	-	ppbec6	English Channel	62
40	-	ppbob12	Bay of Biscay	33
41	-	ppbob13	Bay of Biscay	33
42	-	ppbob14	Bay of Biscay	33
43	-	ppbob15	Bay of Biscay	33
44	-	ppbob19	Bay of Biscay	40
45	-	ppbob16	Bay of Biscay	33
46	-	ppbob18	Bay of Biscay	33

Table S1: List of the 46 *Phocoena phocoena* analyzed. References of each sample on the BOLD project IMMB are given for the 29 first samples (the other ones do not belong to the BOLD project). Correspondence with the references used in Alfonsi et al. 2012 for the same individuals are specified.

(*): pp190111 was not included in Alfonsi et al. (2012).

Territorial and Administrative Division in France ("départements"): 29 (Finistère), 33 (Gironde), 40 (Landes), 56 (Morbihan) 62 (Pas de calais), 76 (Seine-Maritime)

Species-Genbank Reference	Posterior probability of belonging to			Determined species
	Sc	Dd	Sf	
Sc-AM498725.1	1.000000	0.000000	0.000000	<i>Stenella coeruleoalba</i>
Sc-AM498723.1	0.999954	0.000000	0.000046	<i>Stenella coeruleoalba</i>
Sc-AM498721.1	0.999994	0.000005	0.000001	<i>Stenella coeruleoalba</i>
Sc-AM498719.1	0.989320	0.000349	0.010330	<i>Stenella coeruleoalba</i>
Sc-AM498717.1	0.999940	0.000000	0.000060	<i>Stenella coeruleoalba</i>
Sc-AM498715.1	0.999974	0.000000	0.000026	<i>Stenella coeruleoalba</i>
Sc-AM498713.1	0.900884	0.001148	0.097968	<i>Stenella coeruleoalba</i>
Sc-AM498711.1	0.999698	0.000000	0.000302	<i>Stenella coeruleoalba</i>
Sc-AM498709.1	0.999996	0.000004	0.000000	<i>Stenella coeruleoalba</i>
Sc-AM498707.1	0.254159	0.043760	0.702081	<i>Stenella frontalis</i>
Dd-FM211560.1	0.000522	0.904135	0.095342	<i>Delphinus delphis</i>
Dd-FM211553.1	0.000002	0.999990	0.000008	<i>Delphinus delphis</i>
Dd-FM211545.1	0.000002	0.998616	0.001383	<i>Delphinus delphis</i>
Dd-FM211535.1	0.000892	0.664208	0.334900	<i>Delphinus delphis</i>
Dd-FM211527.1	0.000000	0.999382	0.000618	<i>Delphinus delphis</i>
Dd-FM211519.1	0.000015	0.999776	0.000210	<i>Delphinus delphis</i>
Dd-FM211511.1	0.000000	0.999822	0.000178	<i>Delphinus delphis</i>
Dd-FM211503.1	0.000000	0.999999	0.000001	<i>Delphinus delphis</i>
Dd-FM211495.1	0.000003	0.947209	0.052788	<i>Delphinus delphis</i>
Dd-DQ520121.1	0.000000	0.999967	0.000032	<i>Delphinus delphis</i>
Dd-DQ520117.1	0.000001	0.995285	0.004713	<i>Delphinus delphis</i>
Dd-DQ520113.1	0.000010	0.996175	0.003815	<i>Delphinus delphis</i>
Dd-DQ520109.1	0.000002	0.991619	0.008378	<i>Delphinus delphis</i>
Dd-DQ520105.1	0.000003	0.999757	0.000240	<i>Delphinus delphis</i>
Sf-GQ504195.1	0.000141	0.074688	0.925171	<i>Stenella frontalis</i>

Sf-GQ504194.1	0.000006	0.000102	0.999893	<i>Stenella frontalis</i>
Sf-GQ504193.1	0.000082	0.067209	0.932709	<i>Stenella frontalis</i>
Sf-GQ504192.1	0.000008	0.000103	0.999889	<i>Stenella frontalis</i>
Sf-GQ504191.1	0.000184	0.001489	0.998327	<i>Stenella frontalis</i>
Sf-GQ504190.1	0.110536	0.004258	0.885205	<i>Stenella frontalis</i>
Sf-GQ504189.1	0.000049	0.028326	0.971625	<i>Stenella frontalis</i>
Sf-GQ504188.1	0.000009	0.001694	0.998298	<i>Stenella frontalis</i>
Sf-GQ504187.1	0.000039	0.000063	0.999899	<i>Stenella frontalis</i>
Sf-GQ504186.1	0.003433	0.000728	0.995839	<i>Stenella frontalis</i>
BOLD reference (our samples)				
Dd280211A	0.000002	0.998405	0.001593	<i>Delphinus delphis</i>
Ds080410	0.998108	0.001881	0.000011	<i>Stenella coeruleoalba</i>
Ds130210	0.000026	0.993354	0.006620	<i>Delphinus delphis</i>
Ds230409	0.000000	0.999993	0.000007	<i>Delphinus delphis</i>
Ds250412	0.000000	0.999982	0.000018	<i>Delphinus delphis</i>
Sc210910	0.000031	0.986569	0.013400	<i>Delphinus delphis</i>

Table S2: Posterior probabilities for species identification determined by the nMDS analysis. Only one sample (AM-498707.1), identified on genbank as a *Stenella coeruleoalba*, is putatively misidentified by our analysis as a *S. frontalis*

Chapitre 2 : Le marsouin commun

Introduction

Biologie de l'espèce

Le marsouin commun (*Phocoena phocoena* Linné, 1758) est un mammifère, de l'ordre des Cétacés et de la famille des *Phocoenidae*. C'est un des plus petits cétacés avec une taille maximale de 2 m et un poids compris entre 25 et 90 kg. La femelle est en moyenne plus grande que le mâle. Il a une tête ronde et sans rostre, contrairement aux dauphins communs par exemple ; le corps est trapu de couleur sombre sur le dessus et claire sur le dessous, les nageoires pectorales sont petites et ovales et la nageoire dorsale triangulaire. La longévité du marsouin commun peut atteindre 24 ans mais l'espérance de vie se situe autour de 12 ans (Lockyer *et al.* 2001). Le marsouin commun vit en solitaire ou en petit groupe. Les deux sexes atteignent la maturité sexuelle entre 3 et 4 ans, la gestation dure environ 11 mois et la période de naissance n'est pas très étendue (2 mois) mais elle varie en fonction du lieu concerné. Certaines femelles sont en gestation durant l'allaitement du petit précédent (Read, 1999).

Le marsouin commun est un prédateur supérieur qui se nourrit principalement de poissons et de céphalopodes. Son régime alimentaire est basé sur un nombre d'espèces limité mais celles-ci sont variables en fonction du lieu et/ou de la saison (Santos & Pierce 2003). Par exemple en Ecosse il est basé sur les lançons (*Ammodytidae*) et le merlan (*Merlangius merlangus*) (Santos *et al.* 2004) alors que en Bretagne on ne trouve aucune de ces deux espèces mais principalement du chinchard commun (*Trachurus trachurus*) (Méheust *et al.* soumise). Parce que c'est un endotherme marin, avec un rapport surface/volume élevé, vivant dans des eaux froides, le marsouin commun dépense beaucoup d'énergie pour maintenir sa température. De plus, il possède peu de réserves énergétiques, il ne peut donc survivre sans nourriture, que pendant de courtes périodes (Kastelein *et al.*). Une disponibilité constante de proies est donc primordiale et le moindre changement d'accessibilité des proies aura un impact sur les réserves d'énergies et la survie (MacLeod *et al.* 2007).

Les connaissances sur les déplacements journaliers et annuels du marsouin commun sont peu nombreuses, notamment en raison du caractère discret de l'animal qui limite les observations. Ce n'est pas une espèce sédentaire, ce sont des animaux très mobiles pouvant parcourir plus de 50 km par jour (Read & Westgate 1997), et l'abondance varie souvent au cours de l'année dans les zones de présence, mais aucun schéma de migration régulier n'est connu. C'est par exemple le cas le long des côtes néerlandaises où l'observation de marsouin commun est beaucoup plus importante entre Novembre et Mars (Camphuysen 2004) ou dans la partie centrale de la façade est de la mer du Nord où, entre 2002 et 2004, les observations sont très irrégulières au cours de l'année sans lien avec les saisons (Thomsen *et al.* 2007). Les travaux de poses de balises montrent des comportements individuels variés. C'est le cas, à l'échelle de la journée, de 3 marsouins équipés de balises dans les eaux danoises qui se comportent très différemment, que ce soit en terme de distance parcourue, de profondeur ou

de nombre de plongée (Linnenschmidt *et al.* 2013). C'est aussi le cas, à l'échelle de la saison, pour des individus équipés de balises dans la baie de Fundy, qui présentent des déplacements, des vitesses et des profondeurs très différentes (Read & Westgate 1997). Sveegaard *et al.*, trouvent des résultats similaires dans les eaux danoises : les individus équipés de balises présentent des déplacements variés au cours de l'année. Par contre, les auteurs montrent des comportements réguliers : une plus grande dispersion des immatures, des zones occupées préférentiellement malgré ces déplacements variés et bien que les individus du Skagerrak et ceux des eaux danoises intérieures se mélangent peu (Sveegaard, Nabe-Nielsen, *et al.* 2012b). De plus, il semblerait que certaines zones géographiques soit spécifiques. Par exemple une zone de la côte ouest du Danemark semble être une zone de nurserie avec un taux de présence de juvéniles très important (Sonntag *et al.* 1999).

Les causes de mortalité du marsouin commun sont nombreuses, qu'elles soient d'origine naturelle ou anthropique. Les principales causes naturelles observées sur les marsouins échoués sont la maigreur morbide, le parasitisme et les infections des voies respiratoires. Mais on trouve aussi des lésions hépatiques, gastro-intestinales cardiaques et des épizooties (Jauniaux *et al.* 2002 ; Siebert *et al.* 2006). Une autre cause de mortalité, qui peut être importante en fonction des zones géographiques, est l'agression par d'autres espèces telles que l'orque, le grand dauphin ou même le phoque gris. Cotter *et al.* (2012) indiquent que 35 % des marsouins communs échoués en Californie présentaient des traumatismes liés à des attaques par des grands dauphins (Cotter *et al.* 2012). Les causes de mortalité sont souvent multiples pour un même animal et il est difficile de savoir quelle en est la cause et quelle en est la conséquence. Par exemple un animal, souffrant d'une pneumonie, aura des difficultés à chasser ; ce qui va entraîner une maigreur importante mais un individu maigre sera aussi plus sensible à une infection. De plus, même si ces causes sont naturelles, elles peuvent être liées indirectement aux modifications, d'origine anthropique ou non, de l'environnement. Par exemple la maigreur peut être due à une diminution importante des proies (Jauniaux *et al.* 2002) causée par la surpêche ou un déplacement des proies. Il a été prouvé par une approche cas-témoin que les marsouins communs, présentant une forte contamination en PCB, étaient plus sensibles aux infections, les PCB provoquant une dépression immunitaire (Hall *et al.* 2006).

Les mortalités d'origine anthropiques impactent aussi beaucoup les populations de marsouin commun. Il s'agit de la chasse, par exemple en Turquie (Tonay & Öztürk 2012) mais surtout des captures accidentelles. Cette cause de mortalité est connue depuis longtemps et est beaucoup étudiée. Jefferson et Curry, en 1994, estimaient que les captures accidentelles pouvaient être une des causes du déclin de l'espèce et la principale menace (Jefferson & Curry 1994). Par exemple en Allemagne, 46 % des marsouins communs échoués présentent des traces de captures accidentelles (Siebert *et al.* 2001). En mer Baltique, il a été estimé que les captures accidentelles étaient supérieures à la limite de mortalité maximum permettant un maintien de l'espèce (Berggren *et al.* 2002). En plus de ces menaces directes, de nombreuses activités humaines ont des impacts indirects sur les marsouins communs, comme le trafic

maritime (Herr *et al.*, 2005), la mise en place de structures en mer comme les éoliennes off shore (Gilles *et al.* 2009) ou la pollution (Pierce *et al.* 2008). Ces menaces indirectes sont rarement des causes de mortalité mais par contre elles impactent souvent les populations en les fragilisant et/ou en les exposant à d'autres causes de mortalité.

Répartition

Le marsouin commun est présent dans les eaux froides et tempérées de l'hémisphère Nord. C'est une espèce de faible profondeur (maximum 200m), qui vit le long des côtes et au dessus du plateau continental. On le retrouve dans trois bassins différents : le Pacifique Nord, l'Atlantique Nord et la mer Noire (Gaskin 1984). Dans le Pacifique Nord, on retrouve des marsouins communs du Japon à la Californie (Taguchi *et al.* 2010), dans l'Atlantique, de la Caroline du Nord à la Mauritanie (Tolley & Rosel 2006) et en mer Noire dans l'ensemble du bassin et dans la mer Egée (Viaud-Martínez *et al.* 2007). La présence du marsouin commun le long des côtes africaines est la moins bien documentée, cependant il a été montré qu'ils étaient présents des côtes marocaines aux côtes sénégalaises et que leur présence était liée à un upwelling apportant des eaux fraîches et productives (Boisseau *et al.* 2007). Les trois bassins océaniques sont séparés géographiquement et il n'y actuellement aucune migration entre eux (Rosel *et al.* 1995).

Au niveau de la façade atlantique européenne, on le retrouve de l'Islande à Gibraltar, autour des Iles Britanniques ainsi que dans la mer Baltique (Gaskin 1984). Le marsouin commun est l'espèce la plus commune (Hammond *et al.* 2002) et la campagne SCANS 2 effectuée en juillet 2005 estime le nombre d'individus à 386 000 (Hammond *et al.* 2013). Cette campagne montre une présence importante autour des Iles britanniques et en mer du Nord avec des zones de fortes abondances bien ciblées au niveau de la mer Celtique, du nord ouest de l'Ecosse, de l'est de l'Angleterre et autour du Danemark. Cette campagne, qui apporte beaucoup d'informations, reste une vision ponctuelle (le mois de juillet 2005) qui a besoin d'être étayée par des suivis temporels. De nombreuses études locales ou européennes confirment la présence de marsouins communs en grand nombre, en mer du Nord et autour des îles Britanniques, par exemple : (Donovan & Bjorge 1995 ; Siebert *et al.* 2006 ; Thomsen *et al.* 2007). En péninsule Ibérique la campagne SCANS 2 ne détecte qu'une faible présence de marsouins communs mais des études locales nous apportent plus d'informations. C'est une espèce commune mais pas la plus importante. Ainsi, c'est la troisième espèce en nombre d'observations et d'échouages (7%) en Galice et cette proportion est stable au cours des années (Lopez *et al.* 2002 ; Pierce *et al.* 2010). Des marsouins communs sont aussi observés au Portugal (Wise *et al.* 2007).

Si cette aire de répartition recouvre toute la façade atlantique européenne, l'abondance du marsouin commun y est très variable, avec des zones de fortes abondances qui se déplacent

avec le temps, des régions qui connaissent une raréfaction et d'autres un retour important du marsouin commun. La campagne SCANS de 2005 (Hammond *et al.* 2013) était la 2eme campagne globale d'observation des cétacés dans la mer du Nord et les mers adjacentes. Une première campagne, SCANS 1, a eu lieu en juillet 1994 (Hammond *et al.* 2002). Cette première campagne couvrait une zone un peu plus réduite qui ne comprenait pas le golfe de Gascogne, la péninsule Ibérique et la partie nord ouest des Iles britanniques. Les deux campagnes estiment un nombre de marsouins communs dans la zone d'étude équivalent (autour de 340 000 en 1994 et autour de 385 000 en 2005), il n'y a donc pas eu de variation notable du nombre d'individus dans les eaux européennes en 11 ans. Cependant la comparaison des deux campagnes montre un déplacement global des zones d'abondance du marsouin commun. En 1994 les zones d'abondance se situaient autour du Danemark et à l'est de la Grande Bretagne. En 2005 on observe les zones d'abondance dans la baie sud de la mer du Nord, en mer Celtique, au nord de l'Ecosse et autour du Danemark. Il semble y avoir un déplacement de l'espèce vers le sud de la zone étudiée. La zone d'abondance de la mer Celtique comprend la pointe Finistère (Hammond *et al.* 2013).

Ces variations d'abondance ne sont pas récentes, il y a eu aussi des variations au milieu du 20^{ème} siècle avec notamment une diminution importante le long de certaines côtes européennes. Reijnders (1992) décrit la raréfaction du marsouin commun le long de la côte est de la mer du Nord, des côtes françaises et du Portugal. Cette raréfaction se fait dans les années 50 dans des régions où l'espèce était considérée comme commune avant. Cependant il y a assez peu d'informations disponibles sur ces périodes et il est difficile de savoir précisément quelle a été l'évolution de cette raréfaction. Les périodes plus récentes présentant le retour du marsouin commun dans certaines zones sont beaucoup mieux documentées surtout par des études locales :

- Le long des côtes allemandes et danoises, le retour date des années 80 (Reijnders 1992).
- Le long des côtes néerlandaises, le retour a été suivi grâce à de l'observation systématique sur plus de 30 ans entre 1972 et 2004 (Camphuysen 2004). Le déclin aurait commencé dans les années 40, ensuite le marsouin commun est complètement absent des côtes jusqu'à la fin des années 80. Enfin, le nombre d'individus observés augmente régulièrement jusqu'à 2004. Le taux moyen d'augmentation est de 40% par an ce qui est bien supérieur au taux maximum de recrutement de l'espèce (10%). La majorité des observations se fait en hiver dans cette zone (Camphuysen 2004).
- En Cornouailles britannique, le suivi des observations opportunistes montre une augmentation forte à partir de 1995 et celui des échouages montre une augmentation statistiquement significative et régulière de la proportion de marsouin commun entre 1991 et 2008 (Pikesley *et al.* 2011).
- En Belgique, le retour du marsouin commun a été prouvé par l'augmentation de la proportion d'échouage de l'espèce à partir de 1997 (Kiszka, Haelters, *et al.* 2004a).

- En France, la raréfaction avait déjà été supposée en 1977 (Duguy 1977). Le retour le long des côtes de la Manche est montré par des observations opportunistes (Kiszka, Hassani, *et al.* 2004b), suivi des échouages (Kiszka, Haelters, *et al.* 2004a) et transect maritime (Kiszka *et al.* 2007).
- Dans le sud de la France les données d'échouages montrent une augmentation importante du nombre de marsouins communs à partir de 1997 (données RNE, obtenues sur le site <http://crmm.univ-lr.fr>). Ces études locales confirment bien ce qui avait été supposé à partir de la comparaison des deux campagnes SCANS : le marsouin commun a connu un déplacement global en Europe au cours des 15 dernières années.

Plusieurs observations semblaient indiquer un retour du marsouin commun en Bretagne, c'est pour cela qu'un travail de compilation et d'analyse d'une campagne d'observation par survol aérien, des données d'échouages et d'observations opportunistes entre 1997 et 2007 a été effectué en 2008. Ce travail n'a pas été réalisé durant ma thèse mais par l'ensemble de l'équipe pendant mes stages de master 1 et 2. Il est placé ici car il est une pièce importante dans la compréhension des déplacements de marsouins communs en Bretagne et la base de nos travaux de génétique : Jung *et al.*, Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in north-western France: aeriels surveys, opportunistic sightings and strandings monitoring. 2009

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.

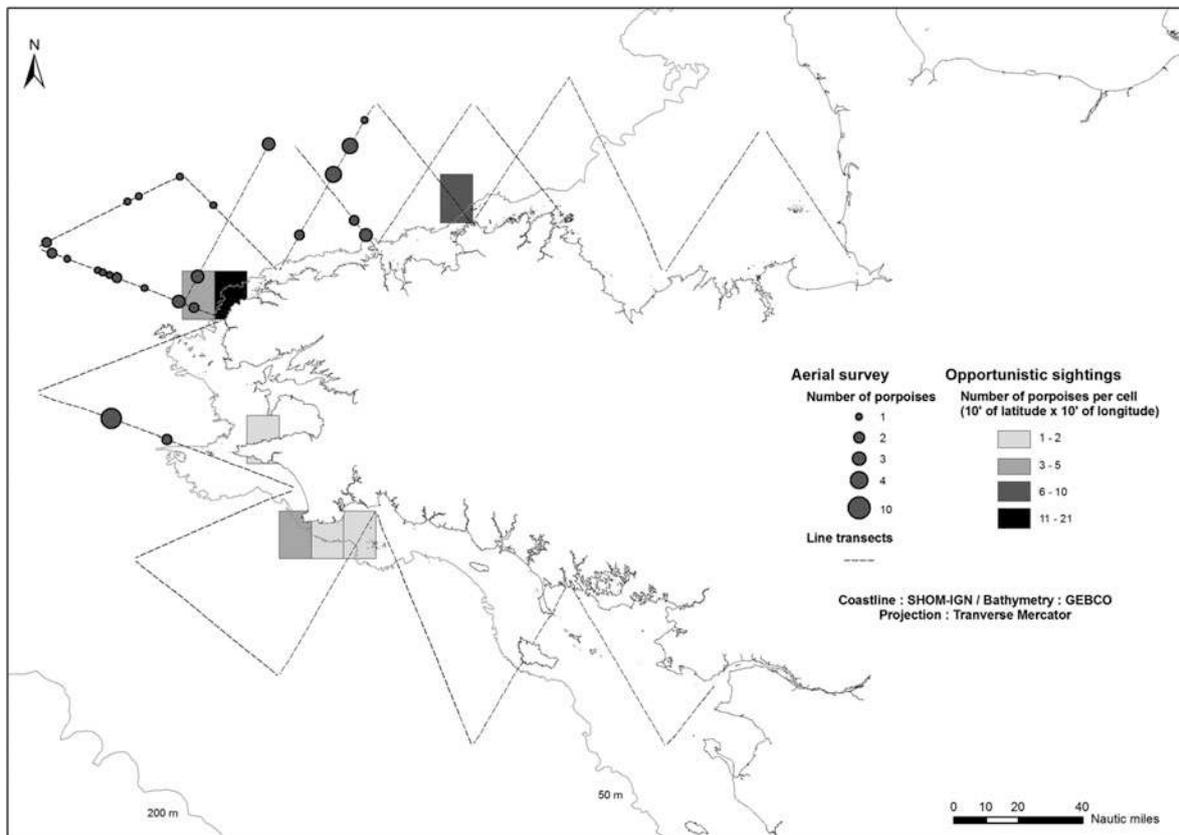


Fig. 1. Distribution of harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) sightings around the Brittany coastline (north-western France) from aerial survey (2005) and opportunistic sightings (2002–2007).

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.

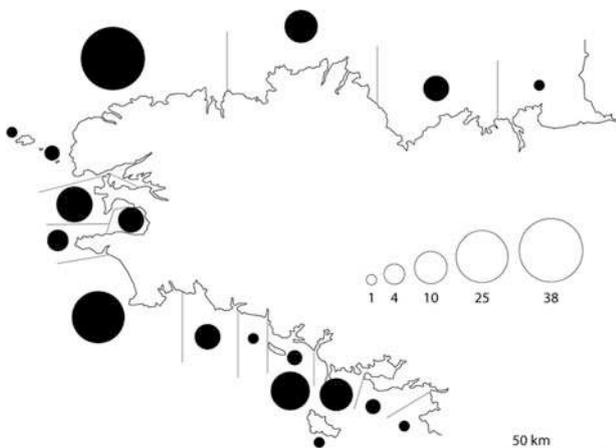


Fig. 2. Distribution of harbour porpoise stranding events along the Brittany coastline (north-western France) between 1997 and 2007. Numbers and surfaces of the circles represent the numbers of stranded porpoises.

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

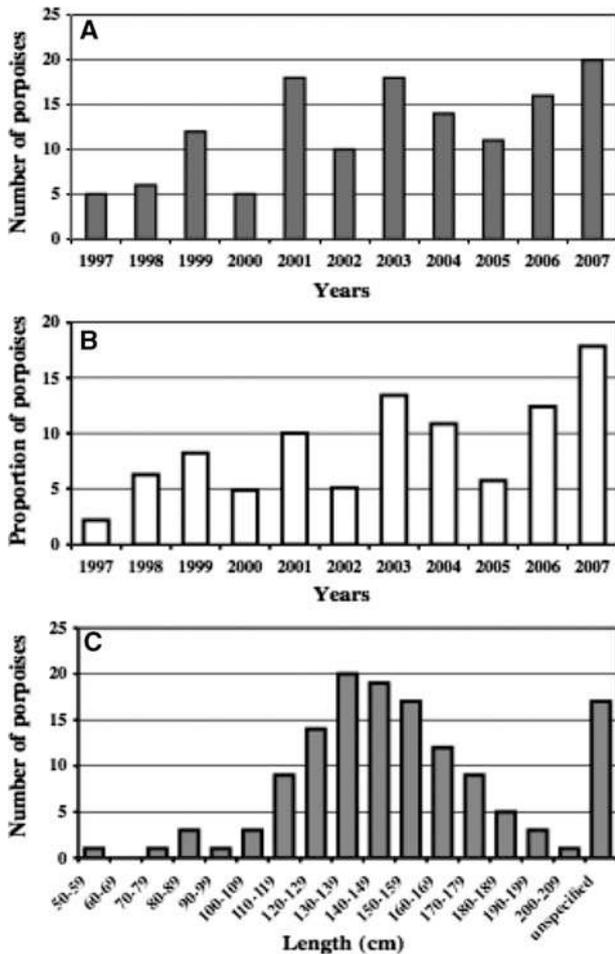


Fig. 3. Inter-annual distribution of harbour porpoise stranding events along the Brittany coastline (north-western France), and length distribution of stranded individuals. (A) Numbers of stranded porpoises from 1997 to 2007; (B) proportion of porpoises among all the stranded cetaceans, from 1997 to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

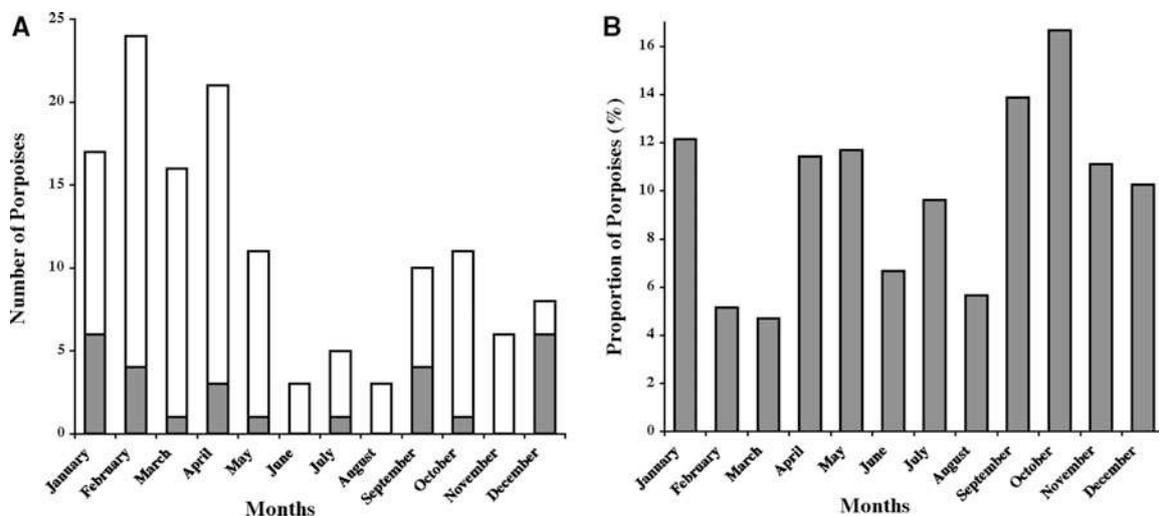


Fig. 4. Intra-annual distribution of porpoise stranding events along the Brittany coastline (north-west of France) between 1997 and 2007. (A) Cumulated numbers of stranded porpoises for each month of the year. Greyed parts represent those porpoises for which a prior by-catch has been proved; (B) monthly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

Ce retour du marsouin commun le long des côtes bretonnes pose de nombreuses questions qui s'inscrivent notamment dans un contexte de modifications du milieu et de conservation :

- Quelle est la biodiversité génétique de ces individus ? Est ce qu'une structure peut être observée ?

La biodiversité génétique est une donnée importante pour définir des unités de gestion des espèces et il est nécessaire de savoir si les marsouins communs des côtes françaises doivent être gérés et protégés différemment en France, s'il doit être mis en place une gestion à l'échelle européenne ou au contraire des gestions à petites échelles. De plus la diversité génétique est aussi un indicateur de la bonne santé de la population. Elle peut apporter des informations sur des diminutions brutales du nombre d'individus, des goulots d'étranglement génétiques ou des fragmentations de populations.

- Quelle est l'origine géographique et génétique des animaux revenus en Bretagne ?

La provenance des animaux apportera des informations sur les déplacements globaux des marsouins communs en Bretagne et sur la biologie fondamentale de l'espèce. Les caractéristiques de la, ou des, population(s) source(s) peuvent aussi influencer sur la présence durable de l'espèce.

- Quelles sont les causes de ce retour ? quelles étaient les causes de la raréfaction ?

Actuellement, le milieu marin connaît de grands changements d'origines anthropiques ou naturelles. Est-ce une conséquence de l'action humaine qui a entraîné cette raréfaction et/ou ce retour ? Cela pourrait être dû à un déplacement de proies, à une dégradation du milieu (pollution, dérangements, perturbations sonores...) qui aurait entraîné une raréfaction, à une résilience du milieu le long des côtes françaises qui permettrait au marsouin commun de revenir, à une dégradation du milieu d'origine qui pousserait les animaux à se déplacer vers les côtes françaises. Les informations acquises sur le retour du marsouin commun pourront apporter des nouvelles connaissances sur l'évolution du milieu marin occupé par cette espèce.

Cependant pour répondre à ces questions, en plus des études de distribution, d'abondance et de suivi des échouages, des études de génétique des populations sur le marsouin commun sont nécessaires pour apporter un éclairage complémentaire.

Travaux de génétique des populations

La génétique des populations est un outil très utilisé pour suivre et comprendre les modifications de répartition d'une espèce, définir des populations et pour aider à la gestion de

l'espèce. Plusieurs travaux de génétique des populations ont eu le marsouin commun pour sujet d'étude. Les marsouins étant répartis entre trois bassins océaniques, les premières études de génétique ont porté sur la caractérisation génétique de ces trois bassins. A partir d'une partie de la séquence de la région de contrôle mitochondriale et de l'absence d'haplotype en commun, Rosel *et al.*, montrent que les marsouins du Pacifique, de l'Atlantique et de la mer Noire sont nettement séparés et qu'il n'y a plus d'échanges entre eux (Rosel *et al.* 1995). Ils montrent aussi que les individus de l'océan Pacifique présentent une structure génétique en fonction des régions. Une autre étude (Wang *et al.* 1996) portant sur des sites de restrictions de l'ADN mitochondrial, confirme la séparation entre le Pacifique et l'Atlantique. De plus, elle indique l'existence d'une structure génétique dans l'Atlantique Nord Ouest. Ces deux études estiment la séparation des marsouins du Pacifique et de l'Atlantique à 5 millions d'années. La séparation des marsouins communs de la mer Noire et de l'Atlantique a été confirmée par l'analyse de la région de contrôle mitochondriale (Viaud-Martínez *et al.* 2007) et de loci microsatellites (Fontaine, Baird, *et al.* 2007a; Fontaine *et al.* 2010). Cependant les deux études ne donnent pas la même estimation du temps de séparation, 20 000 ans (Viaud-Martínez *et al.* 2007) et 5 000 ans (Fontaine *et al.* 2010). Les séparations entre les 3 bassins océaniques ont amené la définition de 3 sous espèces de marsouins communs : *P. phocoena vomerina* pour le Pacifique; *P. phocoena phocoena* pour l'Atlantique et *P. phocoena relicta* pour la mer Noire.

Plusieurs travaux ont été consacrés à la caractérisation génétique au sein de chaque bassin. Dans le Pacifique, l'étude de Chivers *et al.*, (2002) montre la présence d'une structure génétique le long de la côte ouest de l'Amérique du Nord (Chivers *et al.* 2002). L'étude de Taguchi *et al.*, (2010) la complète avec des échantillons du Japon et révèle une séparation génétique entre les individus du sud du Canada et des Etats Unis (hors Alaska) et ceux du Japon, de l'Alaska et du nord du Canada. Au niveau de la mer Noire, il a été montré que les marsouins communs de toute la mer Noire et de la mer d'Azov faisaient partie d'une seule population homogène (Fontaine *et al.* 2012).

En Atlantique Nord Ouest, des travaux basés sur une portion de la région de contrôle mitochondriale et sur 6 loci microsatellites ont été menés (Rosel, France, *et al.* 1999a). Une forte variabilité génétique est trouvée mais les résultats diffèrent en fonction du marqueur : l'analyse de l'ADN mitochondrial montre une structure génétique entre les zones d'échantillonnage alors que l'analyse des marqueurs nucléaires ne montre pas de structure génétique. Les auteurs en concluent que c'est la phylopatricie plus importante chez les femelles que chez les mâles qui explique ce résultat. Trois unités de gestion différentes sont définies par ces travaux.

Une comparaison a été faite entre les individus issus de cette étude et des individus de l'Atlantique Est pour observer les différences génétiques, à l'échelle de l'Atlantique (Rosel, Tiedemann, *et al.* 1999b), d'un marqueur mitochondrial. Une séparation importante, mais pas absolue, est détectée. La partie ouest présente une variabilité génétique bien plus forte, ce qui

indiquerait une colonisation de l'Atlantique Est par des individus issus de l'Ouest, avec une perte de diversité à l'issue de cette colonisation. Les échanges existent entre les deux parties mais sont limités (estimation de 2,7 femelles par génération). L'ajout d'individus d'Islande a permis de montrer que la limite de séparation entre l'est et l'ouest se situait entre l'Islande et la Norvège (Tolley *et al.* 2001).

En Europe, la génétique des populations du marsouin commun a été étudiée par des études locales, à plus ou moins grande échelle, mais surtout dans le Nord de l'Europe. Par exemple Tiedemann *et al.* (1996) ont comparé des marsouins de la mer Baltique et de la mer du Nord. Ils montrent que les marsouins de mer Baltique sont séparés génétiquement de ceux de mer du Nord, qu'ils présentent une diversité génétique inférieure et qu'ils sont issus d'une colonisation par des individus de la mer du Nord il y a plusieurs milliers d'années. Selon les auteurs, bien que le marsouin soit assez mobile et que des migrations hivernales hors de la Baltique soit connues, les échanges sont limités car la reproduction a lieu en été, lorsque les animaux sont revenus en mer Baltique (Tiedemann *et al.* 1996). Une autre étude (Wiemann *et al.* 2010) confirme ces résultats et ajoute une structure génétique à une échelle plus fine entre la mer du Nord et le fond de la mer Baltique par l'analyse de marqueurs nucléaires et mitochondriaux. Cette étude définit 3 unités de management différentes au sein de la mer Baltique. En 1997, une étude portant sur des marqueurs RFLP montrait aussi une séparation entre les marsouins de l'intérieur de la mer Baltique, ceux du Kattegat-Skagerrak et ceux de Norvège (Wang & Berggren 1997). Cependant cette différence ne repose que sur quelques haplotypes spécifiques, la majorité des individus de l'étude faisant partie du même haplotype.

Une autre étude comparant les marsouins de Norvège et de mer du Nord montre des différences génétiques entre eux (Tolley *et al.* 1999) et notamment entre les marsouins issus de la côte britannique de la mer du Nord et ceux issus de la côte norvégienne. Cette séparation entre côte est et ouest de la mer du Nord est confirmée par une étude utilisant des loci microsatellites et des comparaisons morphologiques (Luna *et al.* 2012). Les marqueurs microsatellites séparent nettement les individus en trois groupes : ceux des îles britanniques, ceux du Danemark et ceux de Norvège. Les comparaisons morphologiques permettent aussi de séparer les individus de Norvège, qui chassent des proies pélagiques en eaux plus profondes, des autres. Les auteurs en déduisent que la structure génétique est en partie due à une isolation physique des populations et une adaptation de chacune à leur milieu spécifique.

En Grande Bretagne, des travaux portant sur la région de contrôle mitochondriale ont montré des différences significatives entre le nord et le sud de la mer du Nord et entre la mer Celtique et le nord de la mer du Nord mais la structure génétique est assez faible, ce qui induit des flux de gènes importants (Walton 1997).

Une étude de marqueurs microsatellites à plus grande échelle dans le Nord de l'Europe a eu lieu (Andersen *et al.* 2001). Grâce à 12 loci, ils ont comparé les marsouins communs issus des zones définies par l'IWC comme étant des zones de populations différentes. Ils

rejetent l'hypothèse de la panmixie entre ces zones et trouvent bien une différenciation génétique entre ces 6 zones (Groenland, côtes norvégiennes, Irlande, côtes britanniques de la mer du Nord, côtes danoises de la mer du Nord et mers intérieures danoises). Cette différenciation est faible, ce qui suppose des flux de gènes. En conclusion, les marsouins communs du nord de l'Europe sont donc structurés génétiquement mais avec un flux de gène entre les différents groupes.

Sur le sud de l'Europe et en Afrique, il existe très peu d'informations génétiques. C'est pour cela que Tolley et Rosel (2006) ont travaillé sur des échantillons issus de France, du Portugal et d'Afrique, plus des échantillons de mer du Nord, de Norvège et de mer Noire pour comparaison. Les auteurs montrent que l'Afrique et la mer Noire présentent uniquement des allèles privés ce qui implique une séparation absolue entre Europe, Afrique et mer Noire. Cependant il faut prendre ce résultat avec précautions à cause du faible nombre d'individus d'Afrique échantillonnés (5). Une différence génétique importante est aussi observée entre mer du Nord, France et Portugal, avec notamment l'absence au Portugal de l'haplotype N1 qui est l'haplotype dominant dans le nord de l'Europe. Les auteurs montrent une isolation par la distance entre les zones étudiées (Tolley & Rosel 2006).

En France, il n'y a pas eu d'étude spécifique de génétique de populations du marsouin commun. Cependant plusieurs travaux ont utilisé des échantillons des côtes françaises dans le cadre d'une étude plus globale. Par exemple Viaud-Martinez *et al.*, (2007) comparent des individus de mer Noire à ceux de l'Atlantique (France et Gibraltar). En plus de la séparation forte entre Atlantique et mer Noire, ils montrent une diversité génétique plus importante dans l'Atlantique et notamment en France. La France partage des haplotypes avec la mer du Nord, la Norvège et le Portugal et présente la plus grande diversité haplotypique (0,834) au sein d'une structure d'isolation par la distance (Tolley & Rosel 2006). Selon les mêmes auteurs, les marsouins communs de France sont significativement différents de ceux du Portugal ($F_{st} = 0,076$), de la Norvège ($F_{st} = 0,081$) et de la mer du Nord ($F_{st} = 0,258$). Fontaine *et al.* (2007) ont aussi travaillé sur des échantillons français dans le cadre d'une étude à l'échelle de toute l'Europe à l'aide de 10 loci microsatellites. Leurs principaux résultats, en plus de la séparation mer Noire/Atlantique, sont la séparation nette des marsouins de péninsule Ibérique dans une population, l'appartenance des autres marsouins européens du golfe de Gascogne à l'Islande à une seule population continue et la présence d'une isolation par la distance au sein de cette population. La différenciation génétique est beaucoup plus importante entre la péninsule Ibérique et le reste de l'Atlantique Nord ($F_{st} = 0,090$) qu'au sein de cette dernière ($F_{st} < 0,001$). En 2010, Fontaine *et al.* estiment à 200 ans environ la séparation de la population de péninsule Ibérique de celle du reste de l'Atlantique. Ils estiment que les tailles efficaces de la population ibérique est de 79 individus et que celle de du reste de l'Atlantique de 350 individus. Ils estiment aussi qu'il n'y a quasiment pas de migration vers la péninsule Ibérique (0,34 migrants par génération) mais qu'il en existe une de la péninsule Ibérique vers la population du nord de l'Atlantique (4,65 migrants par génération).

Cependant ces résultats ne répondent pas précisément aux questions posées par le retour du marsouin commun le long des côtes bretonnes. Cette région n'ayant jamais fait l'objet de travaux de génétique des populations spécifiques, nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses à partir des études décrites précédemment :

- Les marsouins communs présents le long des côtes françaises sont issus de la population du nord de l'Europe puisqu'ils font partie de la même population selon l'étude de Fontaine *et al* (2007)
- Il existe une isolation par la distance entre la mer du Nord et le Portugal et la diversité génétique des marqueurs mitochondriaux des individus des côtes françaises est importante selon l'étude de Tolley et Rosel (2006)
- Le nombre de migrants estimé entre la péninsule Ibérique et la France serait trop faible (environ 5 migrants par génération soit environ 15 migrants depuis le retour du marsouin commun en France) pour expliquer l'augmentation aussi importante du nombre de marsouins communs en Bretagne (Fontaine *et al.* 2010)

Afin de répondre aux questions posées par le retour du marsouin commun en Bretagne et de confirmer ou d'infirmier ces hypothèses, une étude de génétique des populations du marsouin commun a été initiée en 2009 dont voici les principaux résultats : Alfonsi *et al.*, A european melting pot of harbour porpoise in the the french atlantic coasts inferred from mitochondrial and nuclear data. 2012

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*9}

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

9 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 nucleotidic 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:

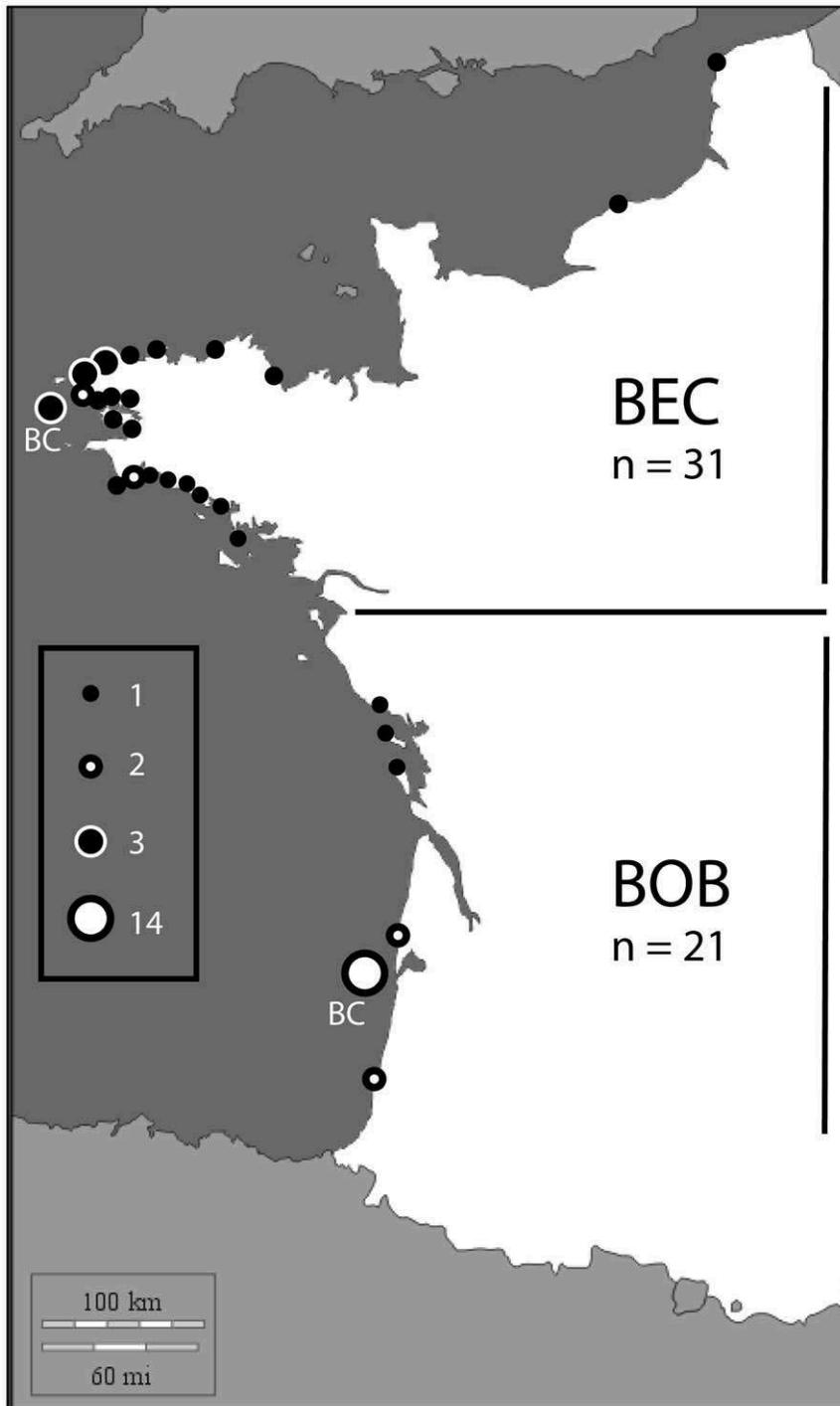


Figure 1. Geographic repartition of sampling sites of harbour porpoises. Samples were taken from 52 stranded or by-caught (BC) harbour porpoises. Dots indicate the places of sampling, and numbers of individuals for each site are indicated. Samples have been arbitrarily named following their place of 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

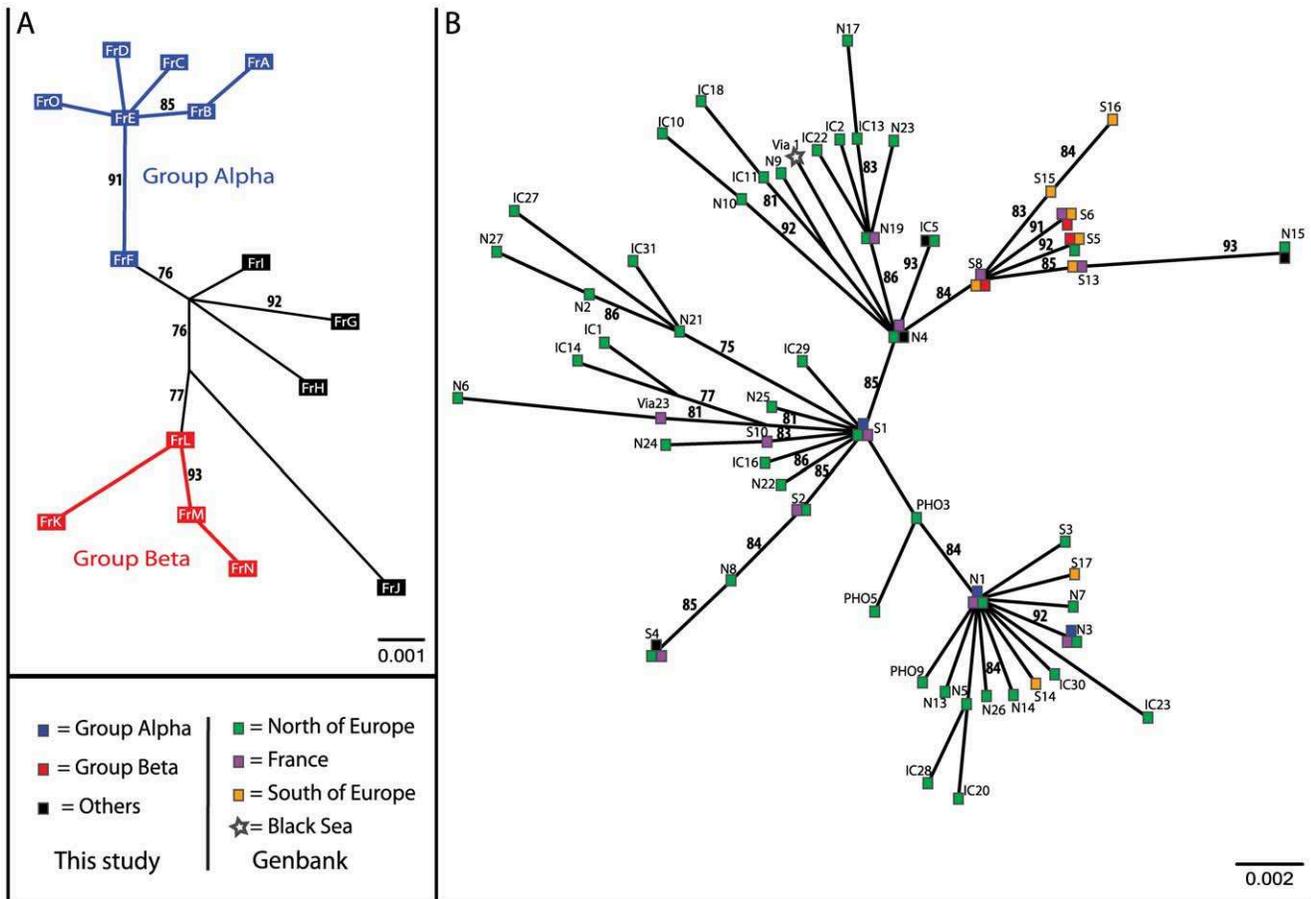


Figure 2. Maximum likelihood trees reconstructed using mtDNA control region haplotypes. A. Maximum likelihood tree obtained for the 581 bp mtDNA control region sequences determined in this study. Supports for the nodes were determined by an approximate likelihood-ratio test, and values are represented 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

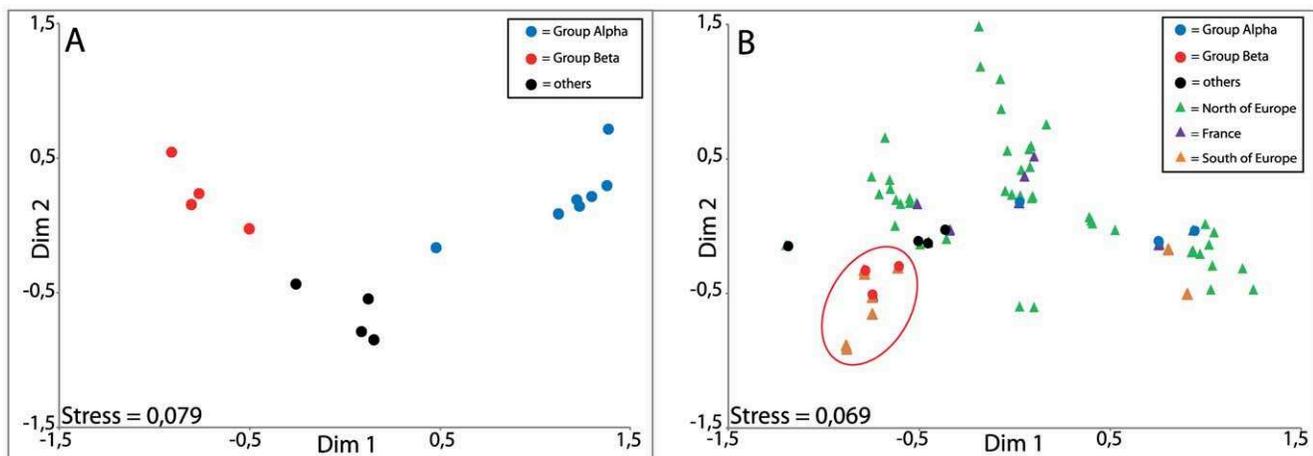


Figure 3. Multidimensional Scaling plots representative of distance between mtDNA control region sequences. **A.** Distances between the harbour porpoise samples analyzed in this study. Individuals attributed to group α by the maximum likelihood analysis are represented as blue dots, to group β as red 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), Fis = value Fis 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 ($n_{\alpha} = 14$ and $n_{\beta} = 21$), 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'-acctcggtctgtaaacc-3') and mcrr (5'-accaaatgaatgaaactcag-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 “Pingroise” 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 *PowSim* 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 porpoise 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.umil.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.

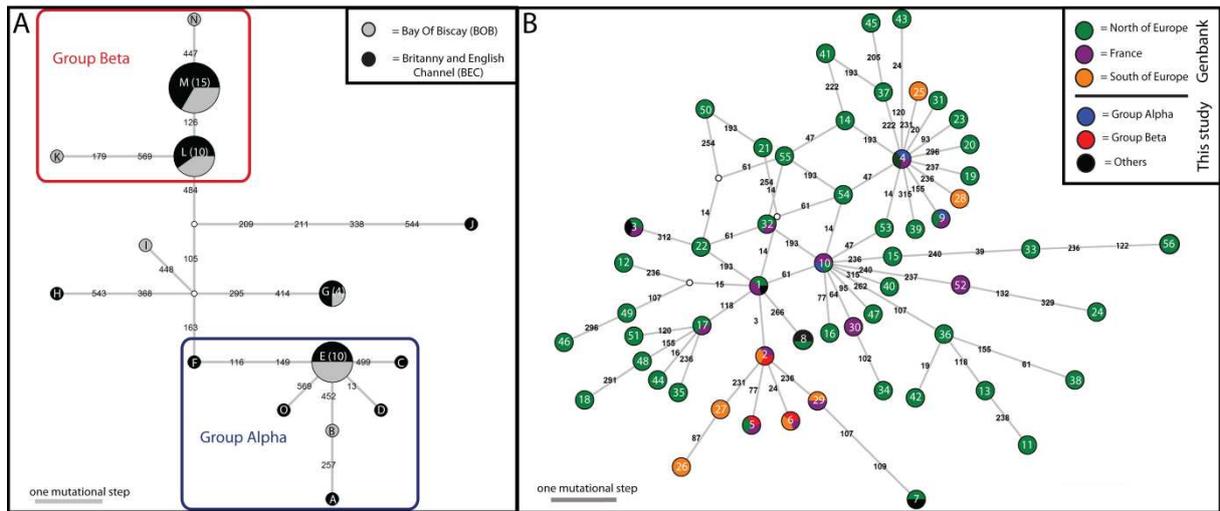


Figure S1 : Mitochondrial haplotype networks. **A.** Haplotype network depicting the relationships between the 15 harbour porpoises mtDNA control region haplotypes determined in this study. **B.** Haplotype network of the 56 truncated haplotypes of mtDNA control region of harbour porpoise determined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

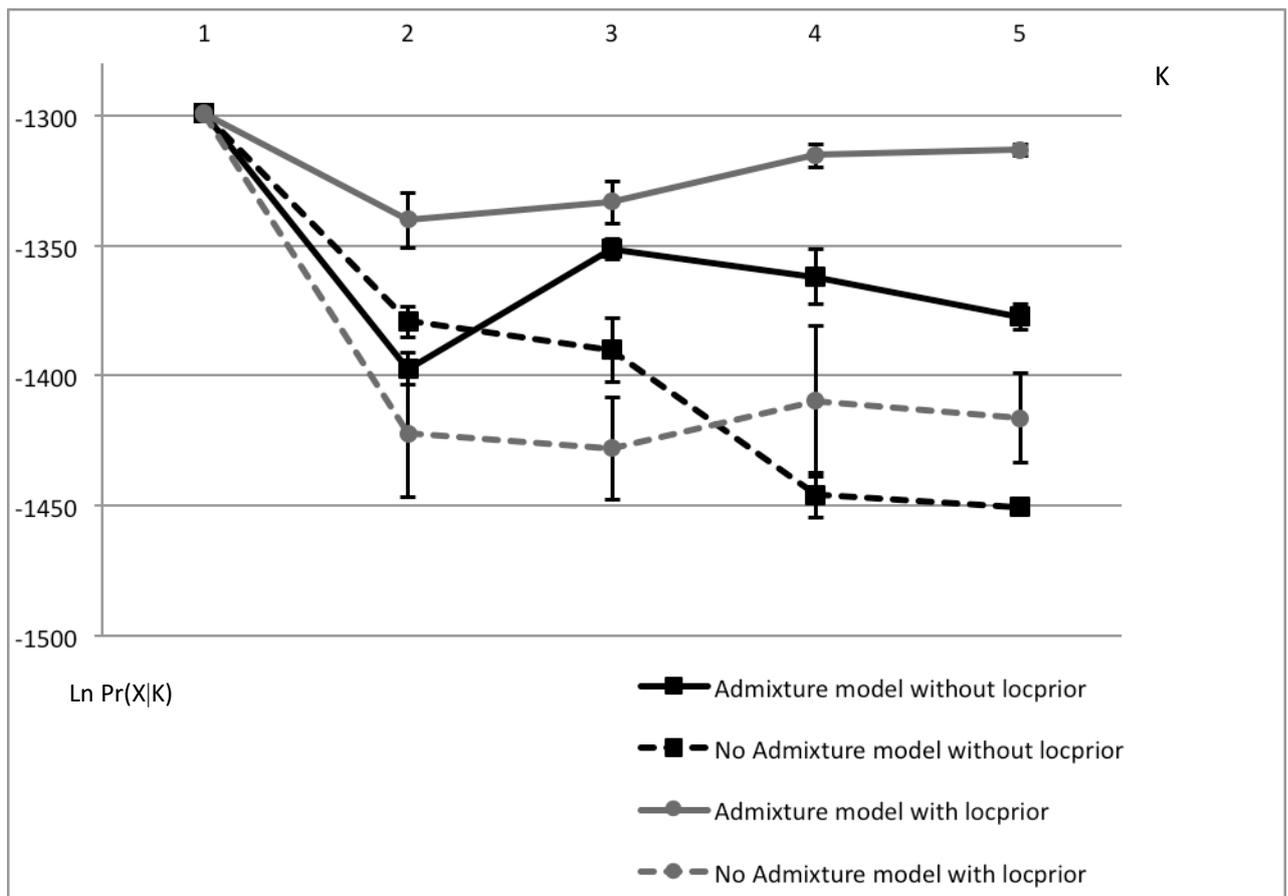


Figure S2 : Mean probabilities [$\text{LnPr}(X|K)$] of the data as a function of the fixed number of clusters (K).

Table S1: List of the 52 harbour porpoises sampled.

The geographic area, the days of sampling and the gender are given for each individual. The haplotypes are those determined in this study. Territorial and administrative division of France (from North to South): D62, “Pas de Calais”; D76, “Seine Maritime”; D22 “Côtes d’Armor”; D29, “Finistère”; D56, “Morbihan”; D85 “Vendée”; D17, “Charente-Maritime”; D33, “Gironde”; D40, “Landes”. ND: Non-determined.

Geographic area of sampling	Individual	Stranding Date	Gender	Territorial and administrative division of France	Haplotype
Brittany and English Channel	ppbec1	24/01/2000	male	D 29	FrG
	ppbec2	12/09/2004	female	D 29	FrM
	ppbec3	11/12/2004	female	D 29	FrG
	ppbec4	08/01/2005	female	D 56	FrO
	ppbec5	04/03/2005	female	D 76	FrE
	ppbec6	14/03/2005	female	D 62	FrD
	ppbec7	01/10/2005	male	D 29	FrM
	ppbec8	21/03/2006	male	D 22	FrJ
	ppbec9	08/05/2006	male	D 29	FrE
	ppbec10	05/10/2006	male	D 29	FrM
	ppbec11	11/10/2006	male	D 29	FrM
	ppbec12	19/01/2007	female	D 56	FrL
	ppbec13	25/02/2007	female	D 29	FrG
	ppbec14	22/09/2007	male	D 29	FrH
	ppbec15	26/09/2007	male	D 29	FrM
	ppbec16	03/11/2007	female	D 29	FrA
	ppbec17	07/12/2007	male	D 29	FrM
	ppbec18	07/02/2008	female	D 56	FrM
	ppbec19	30/04/2008	male	D 29	FrL
	ppbec20	24/07/2008	male	D 22	FrM
	ppbec21	16/08/2008	female	D 29	FrL
	ppbec22	07/09/2008	male	D 29	FrL
	ppbec23	12/09/2008	female	D 29	FrL
	ppbec24	15/09/2008	female	D 29	FrE
	ppbec25	06/10/2008	male	D 29	FrE
	ppbec26	25/12/2008	male	D 29	FrE
	ppbec27	04/06/2009	female	D 29	FrM
	ppbec28	10/09/2009	female	D 29	FrL
	ppbec29	15/09/2009	female	D 29	FrC
	ppbec30	19/03/2010	female	D 29	FrF
	ppbec31	08/04/2010	male	D 29	FrM
Bay of Biscay	ppbob1	16/01/2000	female	D 33	FrI
	ppbob2	01/03/2000	female	D 85	FrL
	ppbob3	01/03/2000	female	D 33	FrG
	ppbob4	13/03/2000	male	D 33	FrE
	ppbob5	13/03/2000	male	D 33	FrL
	ppbob6	25/02/2004	female	D 33	FrK
	ppbob7	03/03/2004	male	D 33	FrM
	ppbob8	05/03/2004	male	D 33	FrE
	ppbob9	21/04/2004	male	D 33	FrB
	ppbob10	06/05/2004	female	D 40	FrE
	ppbob11	29/11/2004	female	D 33	FrM
	ppbob12	08/01/2006	male	D 33	FrL
	ppbob13	10/01/2006	male	D 33	FrE
	ppbob14	13/01/2006	male	D 33	FrE
	ppbob15	14/01/2006	male	D 33	FrM
	ppbob16	18/01/2006	male	D 33	FrN
	ppbob17	19/01/2006	male	D 17	FrL
	ppbob18	02/02/2006	female	D 33	FrM
	ppbob19	22/02/2006	male	D 40	FrM
	ppbob20	09/01/2006	male	D 33	ND
	ppbob21	16/06/2006	male	D 17	ND

Table S2: Variable sites in the fifteen-mtDNA control region haplotypes defined in this study. Only the variable nucleotide positions are represented. Sequences of the haplotype FrA is on the top row, and for the other haplotypes, identities with FrA are indicated by a dot, gaps (only for nt 105 and 154) by a dash. **N**: number of individuals sharing the haplotype. The numbering was established in function of the sequence determined in this study; position 1 is equivalent to position 15375 of the complete harbour porpoise mitochondrial genome sequence (Genbank accession AJ554063.1). Group alpha and beta have been identified during this study.

Haplotype names	Position																N									
	13	104	105	116	126	149	154	163	179	209	211	257	295	338	368	414			447	448	452	484	499	543	544	569
FrA	C	A	G	A	G	C	A	C	G	G	T	C	C	C	C	A	T	A	A	C	A	C	T	C	1	Group alpha
FrB	T	1	
FrC	T	G	1	
FrD	T	T	G	.	T	.	.	.	1	
FrO	T	G	.	.	.	T	.	1	
FrE	T	G	10	
FrF	.	.	.	G	.	T	T	G	1	
FrG	.	.	.	G	.	T	.	T	.	.	.	T	T	.	.	G	.	.	G	4	
FrH	.	.	.	G	.	T	-	T	.	.	.	T	.	.	T	.	.	.	G	.	.	T	.	.	1	
FrI	.	-	.	G	.	T	.	T	.	.	.	T	G	G	1	
FrJ	.	.	A	G	.	T	.	T	.	A	C	T	.	T	G	.	.	.	C	.	1	
FrK	.	.	A	G	.	T	.	T	A	.	.	T	G	T	.	.	.	T	1	Group beta
FrL	.	.	A	G	.	T	.	T	.	.	.	T	G	T	10	
FrM	.	.	A	G	A	T	.	T	.	.	.	T	G	T	15	
FrN	.	.	A	G	A	T	.	T	.	.	.	T	C	.	G	T	1	

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

Sequences of the haplotypes were all published on Genbank, and authors mentioned the geographical origins of the animals.

Authors	Number of Haplotypes	Haplotype names	Genbank Accession (from -> to)	Geographical origin
Tolley & Rosel, 2006 [39]	18	N1, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17	AY262369.1-> AY262386.1	Norway, North Sea, France, Portugal, Africa
Tolley et al. 2001 [36]	10	N3, N4, N5, N20, N21, N23, N24, IC1, IC5, IC14	AF311924.1 -> AF311933.1	Norway, Iceland
Tolley et al. , 2001 [36]	14	IC2, IC10, IC11, IC13, IC16, IC18, IC20, IC22, IC23, IC27, IC28, IC29, IC30, IC31,	GQ338845.1 -> GQ338858.1	Iceland
Tolley & Rosel, 2006 [39]	17	N2, N6, N7, N8, N9, N10, N11, N13, N14, N15, N16, N17, N19, N22, N25, N26, N27	GQ338859.1 -> GQ338875.1	Norway
Viaud-Martinez et al., 2007 [40]	13	Via19, Via20, Via21, Via22, Via 23, Via24, Via 25, Via26, Via 27, Via 28, Via 29, Via 30, Via 31	EF063664.1 -> EF063676.1	France, Gibraltar
Tiedemann et al., 1996 [32]	9	Pho1, Pho2, Pho3, Pho4, Pho5, Pho6, Pho7, Pho8, Pho9	Y13872.1 -> Y13880.1	North sea, baltic Sea
Walton, 1997 [31]	1	UK1	X91613.1	United Kingdom

Table S4. Haplotype data sets analyzed

FrA to FrN are the 15 haplotypes of mtDNA Control Region determined in this study. They were truncated from 581 bp to a 334 bp fragment, common with the sequences determined previously by others and published in Genbank. Names of the corresponding haplotypes and references for the published sequences are given.

Haplotypes (this study)	Group	Corresponding truncated haplotype	Corresponding published sequences (geographical origin of the sample)	Authors
FrA		FrAt	N3 (Norway); VIA 19 (France)	(Tolley & P E Rosel, 2006) [39] (Viaud-Martinez et al., 2007) [40]
FrB, FrC, FrD, FrE, FrO	Group α	FrEt	PH07, PH01 (North Sea); S11 (France); N1 (North Sea, France, Norway) ; VIA 29 (France); UK1 (United Kingdom)	(Tiedemann et al., 1996) [32] (Tolley & P E Rosel, 2006) [39] (Viaud-Martinez et al., 2007) [40] (M. J. Walton, 1997) [31]
FrF		FrFt	S12 (France); VIA 20 (France); S1 (France, North Sea)	(Tolley & P E Rosel, 2006) [39] (Viaud-Martinez et al., 2007) [40]
FrG		FrGt	S4 (France, North Sea); VIA 22 (France)	(Tolley & P E Rosel, 2006) [39] (Viaud-Martinez et al., 2007) [40]
FrH		FrHt	IC5 (Iceland)	(Tolley et al. 2001) [36]
FrI	unassigned	FrIt	N16 (Norway); S7 (France); N4 (Norway); VIA 25 (France);	(Tolley & P E Rosel, 2006) [39] (Viaud-Martinez et al., 2007) [40]
FrJ		FrJt	N15 (Norway)	(Tolley & P E Rosel, 2006) [39]
FrK		FrKt	S5 (North Sea); VIA 26 (France)	(Tolley & P E Rosel, 2006) [39] (Viaud-Martinez et al., 2007) [40]
FrL	Group β	FrLt	S8 (Portugal, France); VIA 27 (France)	(Tolley & P E Rosel, 2006) [39] (Viaud-Martinez et al., 2007) [40]
FrM, FrN		FrMt	S9 (France) ; S6 (Portugal, France); VIA 28 (France)	(Tolley & P E Rosel, 2006) [39] (Viaud-Martinez et al., 2007) [40]

Table S5: Summary statistics for the 7 microsatellite loci analyzed and for each group of samples

Data are expressed for each locus and as the average of all loci for (a) all samples, (b) arbitrary geographic groups and (c) genetic groups and defined during mtDNA control region sequence analysis.

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), F_{is} = value F_{is} calculated after Weir and Cockerham. Asterisks mark significant departure from HWE after the Bonferroni correction (* : $p < 0.05$)

	N	nA	range	He	Ho	A	F_{is}
(a) all samples							
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 loci	46	12.0		0.806	0.797	8.48	0.011
(b) Geographic arbitrary groups							
Group BOB							
PPHO110	20	9	124 - 146	0.822	0.900	7.71	-0.098
PPHO130	19	12	115 - 143	0.859	0.842	10.53	0.020
PPHO137	19	13	159 - 189	0.892	0.895	11.55	-0.003
PPHO102	20	8	178 - 196	0.654	0.500	7.34	0.240
PPHO142	20	12	174 - 206	0.836	0.850	10.03	-0.017
PPHO104	20	11	201 - 233	0.895	0.950	9.91	-0.063
PPHO131	20	7	110 - 130	0.818	0.900	6.38	-0.103
all loci	20	10.3		0.825	0.834	9.06	-0.011
Group BEC							
PPHO110	26	6	132 - 144	0.783	0.885	5.52	-0.133
PPHO130	26	13	113 - 141	0.808	0.846	10.03	-0.049
PPHO137	26	10	159 - 183	0.825	0.654	8.39	0.211
PPHO102	26	9	176 - 198	0.686	0.423	7.59	0.388*
PPHO142	26	13	174 - 208	0.753	0.808	9.95	-0.074
PPHO104	26	11	193 - 231	0.826	0.846	8.97	-0.025
PPHO131	26	6	116 - 130	0.814	0.923	5.54	-0.137
all loci	26	9.7		0.785	0.769	8.00	0.020
(c) Genetic groups α and β defined with mtDNA control region sequence analysis							
Group α							
PPHO110	14	7	130 - 144	0.833	0.857	7.00	-0.030
PPHO130	14	11	113 - 141	0.862	0.929	11.00	-0.080
PPHO137	14	9	167 - 185	0.844	0.643	9.00	0.245
PPHO102	14	7	176 - 198	0.709	0.429	7.00	0.405
PPHO142	14	9	174 - 204	0.786	0.786	9.00	0.000
PPHO104	14	9	201 - 225	0.857	0.714	9.00	0.172
PPHO131	14	6	110 - 126	0.815	0.929	6.00	-0.146
all loci	14	8.3		0.815	0.755	8.29	0.076
Group β							
PPHO110	23	8	124 - 146	0.811	0.957	6.77	-0.185
PPHO130	22	12	115 - 141	0.851	0.818	10.37	0.039
PPHO137	23	15	159 - 189	0.899	0.870	11.65	0.033
PPHO102	23	9	176 - 196	0.703	0.522	7.59	0.263
PPHO142	23	13	174 - 206	0.821	0.870	10.52	-0.060
PPHO104	23	12	193 - 233	0.876	0.957	9.83	-0.094
PPHO131	23	6	116 - 130	0.814	0.913	5.60	-0.125
all loci	23	10.7		0.825	0.844	8.90	-0.023

Table S6 : Correspondances between truncated haplotypes and their coding on ML phylogenetic tree and on haplotype networks

All identical haplotypes after truncation are grouped on a same lane

Haplotype(s)	Number of haplotypes	Leaf name on the phylogenetic tree	Name of the haplotype network
FrIt N16 S7 N4 VIA25	5	N4	1
FrLt S8 VIA27	3	S8	2
FrGt S4 VIA22	3	S4	3
FrEt FrBt FrOt FrDt FrCt S11 N1 VIA29 UK1 PHO7 PHO1	11	N1	4
FrKt S5 VIA26	3	S5	5
FrNt FrMt S9 S6 VIA28	5	S6	6
FrJt N15	2	N15	7
FrHt IC5	2	IC5	8
FrAt N3 VIA19	3	N3	9
FrFt S12 S1 VIA20	4	S1	10
N27	1	N27	11
N9	1	N9	12
N2	1	N2	13
N26 PHO2	2	N26	14
N25	1	N25	15
N22 N11	2	N22	16
N19 N20 VIA24	3	N19	17
N17	1	N17	18
N14	1	N14	19
N13	1	N13	20
N10	1	N10	21
N8	1	N8	22
N7	1	N7	23
N6	1	N6	24
S17	1	S17	25
S16 VIA30	2	S16	26
S15	1	S15	27
S14	1	S14	28
S13 VIA31	2	S13	29
S10 VIA21	2	S10	30
S3	1	S3	31
S2 PHO6 PHO4	3	S2	32
IC14	1	IC14	33
N24	1	N24	34
N23	1	N23	35
N21	1	N21	36
N5	1	N5	37
IC31	1	IC31	38

IC30	1	IC30	39
IC29	1	IC29	40
IC28	1	IC28	41
IC27	1	IC27	42
IC23	1	IC23	43
IC22	1	IC22	44
IC20	1	IC20	45
IC18	1	IC18	46
IC16	1	IC16	47
IC13	1	IC13	48
IC11	1	IC11	49
IC10	1	IC10	50
IC2	1	IC2	51
VIA23	1	VIA23	52
PHO9	1	PHO9	53
PHO8 PHO3	2	PHO3	54
PHO5	1	PHO5	55
IC1	1	IC1	56
Via1	1	Via 1	absent of network

Table S7: Primer sequences for the seven microsatellites loci analyzed in this study.

Locus names are from (P. E. Rosel et al., 1999). Tails corresponding to universal primers are underlined. Universal primers sequences were GTCGTAGTCGACGACCGTTA (linked to FAM) and GACTTCGGATAGCTAGTCGT (linked to Hex). Forward (f) and reverse (r) are given by reference to the Genbank sequences.

Locus name/ Genbank Accession	Primer names	Primer sequences (5'-3')
PPHO110 /AF151785	Pp HO110Eaf Pp HO110EAR	CTACACAAACCTATAAATGAGATAAA <u>TAGTCGACGACCGTTA</u> GACCTTATTCCGTCTTCACC
PPHO130 /AF151786	Pp HO130Eaf Pp HO130EAR	CTACACACACCTCTATTCAAGCCC <u>TCGGATAGCTAGTCGT</u> AGAATGTCCAACACAGGAGCAG
PPHO137 /AF151787	PpHO137Eaf PpHO137EAR	AGTGTGCAGAGAAATGGCCTCA <u>TCGGATAGCTAGTCGT</u> AGCTTGGAGTTTGGCTCCCT
PPHO102/ AF151788	Pp HO102Eaf Pp HO102EAR	CCTATCAACACCCTGGAGTTATGC <u>TCGGATAGCTAGTCGT</u> AAAGGAGAACAGGAGGAGGAGG
PPHO142/ AF151789	Pp HO142Eaf Pp HO142EAR	AAATAACACACACGGCCGCA <u>TAGTCGACGACCGTTA</u> AACCGTTCCCAACTGGTTTGC
PPHO104/ AF151790	Pp HO104Eaf Pp HO104EAR	<u>TCGGATAGCTAGTCGT</u> TGTGTGGCTGAGAAAGCACTGA TTTATGGCCTGCTGGGTACAA
PPHO131/ AF151791	Pp HO131Eaf Pp HO131EAR	<u>TAGTCGACGACCGTTA</u> GCCATCAATCAGGACAGCACCTA GCGCTTGGAGAGATTTTCGACGTA

Chapitre 3 : Le phoque gris

Introduction

Biologie du phoque gris et menaces affectant l'espèce

Le phoque gris (*Halichoerus grypus*) est un animal de la famille des Phocidés et de l'ordre des carnivores (Berta & Churchill 2012). Il existe un important dimorphisme entre les mâles et les femelles, puisque les mâles peuvent mesurer jusqu'à 230 cm et peser plus de 300 kg alors que les femelles ne dépassent pas 195 cm et pèsent jusqu'à 186 kg. La couleur du pelage des mâles est plus foncée et leur museau est très prononcé. Les femelles présentent des pelages plus clairs. Ce dimorphisme est moins présent chez les juvéniles, pesant entre 10 et 20 kg à la naissance et dont les pelages vont évoluer jusqu'à l'âge adulte (Bonner 1981). Le phoque gris passe une partie de sa vie en mer pour se nourrir et se déplacer et une partie à terre pour la période de mue et la reproduction.

La période de reproduction comporte plusieurs phases. La saison des accouplements a lieu autour du mois de novembre, l'implantation de l'œuf se produit une centaine de jours plus tard en février, l'embryon se développe et la naissance a finalement lieu en octobre, un mois avant le début de la saison d'accouplement suivante (Bonner 1981). Cette chronologie a été décrite pour la colonie d'Orkney au Nord de l'Ecosse, mais des variations ont été mises en évidence pour d'autres colonies : une saison de mise bas/accouplement en février/mars en Baltique par exemple (Bonner 1981). Les mâles sont polygynes (Twiss *et al.* 2006) et il existe une phylopatrie importante qui se traduit par le fait qu'une grande partie des phoques gris se reproduit et met bas au sein des colonies de naissance (Pomeroy *et al.* 2000). Les soins maternels sont limités à deux ou trois semaines d'allaitement après la naissance, le juvénile devant ensuite se débrouiller seul pour se nourrir. Cependant, la courte période d'allaitement lui a permis de prendre jusqu'à 1,8 kg par jour et de peser entre 30 et 40 kg après l'allaitement. La femelle redevient féconde dès la fin de l'allaitement et repart à l'eau après la période de chaleur. Les adultes reviendront à terre, environ 3 mois après la période de reproduction, pour la mue qui dure environ un mois (Bonner 1981). Entre ces deux grandes périodes à terre, l'animal va chasser pour reformer ces réserves énergétiques et peut revenir à terre pour se reposer.

En mer, le phoque gris va présenter plusieurs types de comportements différents. Dans les grands déplacements, l'animal va être constamment en plongée mais passera peu de temps au fond, donnant à sa courbe de plongée une forme de V. Les trajets se font quasiment en ligne droite, à allure rapide et constante, et permettent à l'animal de parcourir autour de 87 km par jour (Vincent *et al.* 2005). Ces plongées pourraient éventuellement aussi lui permettre de chasser de manière opportuniste durant le peu de temps passé au fond. Durant les phases de nourrissage par contre, l'animal passera 60% de son temps de plongée au fond, donnant à sa courbe de plongée une forme de U. Les trajets se font à l'intérieur d'une zone et non pas en

ligne droite. Enfin, l'animal peut aussi se reposer en mer. Il ne se déplacera alors quasiment pas mais restera submergé 80% du temps (Thompson *et al.* 1991). Les phoques gris ne se nourrissent pas forcément dans leur zone utilisée pour la reproduction et certains individus peuvent même se déplacer sur de grandes distances entre les zones de nourrissage et de reproduction (Russell *et al.* 2013).

Le phoque gris est un prédateur qui se nourrit de proies vivants sur le fond, benthiques, ou proche du, fond, démersales. Il est aussi opportuniste, c'est à dire qu'il ne privilégie pas un seul type de proies (Méheust *et al.*, soumise). Son régime va être différent en fonction des zones. Par exemple, il va se nourrir principalement de saumon et de morue en Ecosse alors qu'il va se nourrir de hareng et de morue au Canada (Bonner 1981). Ridoux *et al.* (2007), en comparant les régimes alimentaires du phoque gris dans différentes zones géographiques, ont bien montré une hétérogénéité de régime alimentaire en fonction des localités. Tout spécialement, en Bretagne, les phoques gris ont un régime alimentaire spécifique duquel le lançon est quasi absent, alors que l'espèce est pourtant présente en Bretagne, et une dominance des labridés (Ridoux *et al.* 2007). Cette spécificité a été confirmée ensuite (Méheust *et al.*, soumise).

Le phoque gris est globalement en augmentation d'abondance au niveau mondial et son statut IUCN est considéré comme "préoccupation mineure" (Kovacs *et al.* 2012). Le phoque gris possède peu de prédateurs naturels. Quelques attaques de requins et d'orques peuvent arriver occasionnellement mais sans effet significatif sur les populations (Bonner 1981). Cependant, diverses menaces pèsent sur l'espèce : il a été très exploité dans le passé et une chasse excessive a entraîné la disparition de colonies entières, par exemple en mer de Wadden au 16ème siècle (Harkonen *et al.* 2007). La chasse est encore présente dans certaines zones comme en Islande ou, dans certains cas particuliers, au Royaume Uni où les pêcheurs ont une autorisation d'abattre les phoques gris en cas de trop grande proximité avec les filets de pêche (Vincent *et al.* 2005). Les interactions avec les pêcheries représentent d'ailleurs une menace importante pour l'espèce avec notamment des captures accidentelles et des abattages illégaux (Cronin 2011). Les phoques gris sont aussi soumis à d'autres perturbations du milieu d'origine anthropique : présence de polluants, des taux importants de dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et de (polychlorobiphényles) PCB ont été détectés dans le lard de phoques gris, notamment en mer Baltique, (Bonner 1981), mais aussi pollutions acoustiques produites par les activités anthropiques comme la prospection sismique ou l'installation d'éoliennes off shore (Cronin 2011). La fonte des glaces provoquée par le changement climatique peut aussi être une menace pour les phoques gris mettant bas sur la glace (Kovacs *et al.* 2012).

Répartition du phoque gris

Origine de l'espèce et répartition mondiale

Le phoque gris serait apparu il y a environ 1,5 millions d'années dans le Nord de l'Atlantique lors de la divergence des lignées du taxon *Phocina* (Fulton & Strobeck 2010). Depuis, cette espèce a colonisé une partie de l'Atlantique nord et trois stocks distincts sont identifiés : celui de l'Atlantique Nord Ouest, de Terre-Neuve à la Nouvelle Ecosse, celui de la Baltique et celui de l'Atlantique Nord Est, en Islande, Norvège et autour des Iles Britanniques jusqu'à la limite sud de répartition : la France (Bonner 1981). En France, des phoques gris sont présents en baie de Somme, dans la baie du Mont Saint-Michel, aux Sept Iles et, à l'extrême sud, dans l'archipel de Molène (Harkonen *et al.* 2007).

En Europe, les colonies Britanniques regroupent la majorité des phoques gris. En 2010, le nombre de phoques gris présents au Royaume-Uni est estimé à 111 000 individus, dont près de 90% présents dans les colonies écossaises. Le reste des colonies britanniques se situent principalement le long de la côte est de l'Angleterre. Enfin, 4% des phoques du Royaume-Uni, soit entre 4000 et 5000 individus, sont présents autour du plateau Celtique, au pays de Galles et en Cornouaille britannique. Les populations du Royaume-Uni sont en augmentation d'abondance de 1% par an en moyenne depuis 10 ans (SCOS 2012). En Irlande, le nombre de phoques gris est estimé entre 5500 et 7000 (Cronin 2011). En Mer Baltique, les effectifs sont aussi à la hausse avec une multiplication par 3 en 30 ans (Graves *et al.* 2009). De plus, l'entrée de la Baltique, où il n'y avait pas de phoque gris au début du 20ème siècle, a vu l'arrivée de l'espèce et la mise en place de petites colonies dont certaines voient leur abondance augmentée au cours du temps (Harkonen *et al.* 2007). De même, pour la côte est de la mer du Nord, où l'abondance, nulle au début des années 70, augmente régulièrement, notamment en mer de Wadden (Harkonen *et al.* 2007).

Le retour du phoque gris en Bretagne

La présence du phoque gris en Bretagne avant les années 50 est peu documentée mais il semblerait que quelques individus aient été observés. Des fossiles de phoques gris datant de 16 000 ans ont été retrouvés en France (Harkonen *et al.* 2007). Les récits anciens et l'utilisation du nom breton du phoque pour désigner des structures naturelles (rochers en mer par exemple) attestent très certainement de sa présence en Bretagne depuis le 18ème siècle (Prieur & Hussenot 1983). Roux (1957) rapporte des témoignages d'habitants d'Ouessant ayant vu des phoques gris et même, pour certains, expliquant que leur présence est habituelle. Brien et Prieur (1973) citent des articles de presse locale relatant la présence de phoques gris en Bretagne dès 1907. Mais il faut attendre 1957 pour avoir la première description scientifique établie du phoque gris en Bretagne (Roux 1957) qui concerne plusieurs individus à Ouessant en 1955. L'auteur estime que Ouessant pourrait abriter un "petit groupe isolé relique des colonies d'autrefois suite à l'extermination". Les phoques gris observés par la suite sur le littoral sont principalement des juvéniles nés en Angleterre et échoués sur les côtes bretonnes (Prieur & Hussenot 1983). Ensuite il faudra attendre le début des années 70 pour que des nouvelles constatations scientifiques soient réalisées. Le suivi des captures et des observations signalées entre 1900 et 1973 montre une augmentation dans les années 50 puis

dans les années 70 de la présence constatée du phoque gris en Bretagne. De nouvelles observations sont ensuite faites à Ouessant, ainsi que dans l'archipel de Molène, et la première naissance de phoque gris relatée a eu lieu en 1973 (Brien & Prieur 1973). En 1978, la présence d'une petite colonie aux Sept-Iles était soupçonnée pour la première fois (Prieur & Duguy 1978).

A partir du milieu des années 70, l'ensemble des observations va dans le sens d'une augmentation de l'abondance des phoques en mer d'Iroise. En 1975, jusqu'à 10 individus différents pouvaient être observés et l'abondance dans la mer d'Iroise était alors estimée à une vingtaine d'individus (Prieur & Duguy 1978). En 1990, 25 individus étaient observés au cours du même recensement (Duguy & Hussenot 1991). Cette abondance augmente jusqu'à 65 individus en 2000 avec un taux de croissance de 7% par an entre 1991 et 2000 (Vincent *et al.* 2005) et jusqu'à près de 100 individus en 2010 (Sami Hassani, communication personnelle). La colonie de phoques gris en mer d'Iroise est donc en constante augmentation d'abondance depuis 60 ans.

En parallèle de cette augmentation des individus de la colonie, le nombre de juvéniles échoués en difficulté augmente, certainement en provenance des colonies britanniques. Afin de conforter les effectifs locaux, il est décidé de soigner ces juvéniles et de les relâcher à proximité des colonies bretonnes. Un centre de soins sera ainsi créé par la Société pour l'étude et la protection de la nature en Bretagne (SEPNB) et l'Université de Bretagne Occidentale et il sera ensuite installé à Océanopolis en 1990 (Vincent 2001). Ce centre de soins a, depuis, recueilli et soigné plus de 450 phoques en plus de 20 ans (Hassani, communication personnelle).

Suivi du déplacement et du comportement des phoques gris en Bretagne

Le phoque gris a fait l'objet d'un suivi régulier par le LEMM depuis 1991 en partenariat avec la réserve Naturelle de l'Iroise et depuis 2007 avec le PNMI. Ce suivi comprend notamment les travaux réalisés dans le cadre de la thèse de Cécile Vincent. Des travaux de photo-identification, de recensements et de suivis télémétriques ont permis d'accumuler des informations sur les déplacements des phoques gris des colonies bretonnes et sur leur comportement.

Les recensements, en plus de détecter l'augmentation de l'abondance de la colonie de l'archipel de Molène, ont démontré que la présence des individus n'était pas régulière au cours de l'année et qu'il y avait des différences de comportement entre les mâles et les femelles. Les mâles sont plus présents durant l'hiver et la période de mue, alors que les femelles sont plus présentes en été (Vincent *et al.* 2005). Le nombre plus faible d'individus observés durant la

saison de reproduction indique que peu d'individus se reproduisent en Bretagne et que certains vivant le reste de l'année dans la colonie partent pour la saison de reproduction, certainement vers leur lieu de naissance (Vincent 2001 ; Gerondeau *et al.* 2007). Toutefois la présence de blanchons en Bretagne (Vincent 2001 ; Hassani, communication personnelle) indique qu'une faible partie, au moins, s'y reproduit.

La photo-identification a permis d'identifier 88 individus entre 1998 et 2000 dans l'archipel de Molène, et la méthode de capture recapture montre que le plateau d'identification est atteint. Le nombre de phoques gris présents dans l'archipel est donc limité (Vincent 2001). Une très grande fidélité aux sites entre les années est observée, près de 80 % des individus ont été retrouvés sur une période de 3 ans (Vincent *et al.* 2005). La photo-identification permet aussi de montrer que les phoques gris présents sur les roches de Portsall et dans l'archipel appartiennent à la même colonie, alors que ceux des archipels de Triagoz et des Sept-Iles appartiennent à une autre colonie. Aucun phoque identifié dans une des colonies n'a été observé dans l'autre (Vincent *et al.* 2005). La photo-identification se poursuit actuellement et montre que de nouveaux phoques arrivent régulièrement. Le nombre de phoques différents identifiés en 2009 est de 153 (Sami Hassani, communication personnelle).

Le suivi par télémétrie montre d'abord l'extrême variabilité individuelle. Des balises Argos ont été posées sur 16 phoques gris en Bretagne permettant de connaître leurs positions plusieurs fois par jour. Les poses de balises se sont faites entre 1999 et 2003. La moyenne du nombre de jours de suivi est de 104 avec un minimum de 13 jours et un maximum de 180. Sur 16 phoques suivis, aucun schéma général n'a pu être défini. Certains individus sont restés dans l'archipel de Molène pendant toute la durée du suivi alors que d'autres ont effectué de grands déplacements en direction des Iles britanniques, un individu remontant jusqu'au pays de Galles. Un seul phoque gris s'est déplacé jusqu'en mer du Nord. Il s'agissait d'un juvénile qui est ensuite revenu en Bretagne (Vincent *et al.* 2005). Ces résultats montrent que le phoque gris est capable de grands déplacements, avec des vitesses approchant les 90 km par jour, et qu'il pouvait donc facilement - en termes de distances - passer d'une colonie à l'autre. Ces résultats montrent aussi que les liens entre les colonies bretonnes et celles du Sud des îles britanniques sont forts. Toutefois, en moyenne les 16 phoques gris, portant une balise, ont passé 57% de leur temps proche des reposoirs de l'archipel de Molène, ce qui indique donc bien que, malgré de grandes capacités de déplacement, les animaux sont fortement associés à cette colonie (Vincent *et al.* 2005).

Les travaux de capture-recapture et de suivis télémétriques, menés spécifiquement sur les juvéniles réhabilités montrent aussi une grande diversité individuelle (Vincent *et al.* 2002). Certains individus vont rester proches des colonies bretonnes alors que d'autres vont beaucoup se déplacer, jusqu'aux colonies irlandaises par exemple. La majorité des recaptures se fait en Bretagne mais cela peut être partiellement dû à un biais d'échantillonnage, plus fort autour du lieu de lancement de l'étude (Vincent *et al.* 2002). Le taux de mortalité des phoques réhabilités est estimé à 20%. Les phoques gris réhabilités survivants semblent s'intégrer

rapidement aux colonies bretonnes et britanniques (Vincent *et al.* 2002). Par contre il est difficile d'estimer les impacts de la réhabilitation des phoques gris sur la conservation des colonies bretonnes (Vincent *et al.* 2002).

En conclusion, ces travaux montrent que les colonies bretonnes ne sont pas isolées mais qu'elles font partie d'un peuplement plus large comprenant, au moins, le sud des Iles Britanniques. Cependant la forte fidélité au site semble aussi indiquer que ce large peuplement comporte des spécificités locales, notamment en mer d'Iroise.

Génétique des populations

Comprendre la structure génétique du peuplement de phoques gris en mer d'Iroise, et plus largement celle des animaux fréquentant les côtes bretonnes, et pouvoir comparer ces données avec celles de colonies britanniques, puis des autres stocks de l'espèce, représente bien un questionnement actuel.

A ce jour, peu d'études de génétique des populations ont eu lieu sur le phoque gris. La plus ancienne est une étude de Boskovic *et al.* (1996). C'est aussi les seuls travaux de structure des populations menés à l'échelle de l'Atlantique. Les auteurs ont étudié les polymorphismes de la longueur des fragments de restrictions (RFLP) de l'ADN mitochondrial pour comparer des phoques gris de deux zones du Canada, de la Norvège et de la mer Baltique. Au Canada, les deux zones différentes présentent quatre haplotypes communs et trois privés, ce qui implique pour les auteurs la présence d'une structure génétique mais aussi d'échanges entre les deux. Aucun haplotype commun n'est retrouvé entre le Canada, la Norvège et la mer Baltique et chacune des trois zones géographiques ne montre que des haplotypes privés, ce qui semblerait impliquer une séparation stricte des trois zones géographiques. Les différenciations génétiques entre les zones permettent d'estimer des temps de divergence de 1 million d'années entre l'est et l'ouest de l'Atlantique et de 350 000 ans entre la mer Baltique et la Norvège. Cependant cette étude présente une faible résolution génétique avec peu d'individus pour une aussi large échelle géographique.

Une autre étude a été menée en 1995 (Allen *et al.* 1995). Elle consiste en une comparaison par analyse de polymorphismes de marqueurs microsatellites de deux colonies britanniques, l'île de North Rona et l'île de May. Cette étude porte sur un nombre conséquent d'individus (1134) et sur 8 loci microsatellites. Aucune différenciation n'est observée entre les juvéniles et les adultes sur les deux îles et aucune différenciation n'est observée entre les deux périodes d'échantillonnage (1986 et 1993 pour North Rona et 1991 et 1992 pour l'île de May). Par contre, une très forte différenciation génétique est observée entre les deux îles. Au vu des déplacements des adultes et de la forte dispersion des juvéniles, les auteurs attribuent cette différenciation à une forte phylopatricité et à la forte fidélité au site (Allen *et al.* 1995).

Une étude plus récente a porté sur la comparaison entre trois colonies de phoques gris de mer Baltique, ainsi que sur la différenciation génétique entre mer Baltique et nord de l'Ecosse (Graves *et al.* 2009). Cette étude utilise les polymorphismes de séquences de la région de contrôle mitochondriale et des polymorphismes de microsatellites. Entre les colonies de la Baltique, une différenciation génétique a été observée pour les marqueurs microsatellites avec des *Fst* significatifs, cependant aucune différenciation n'a été observée à partir des marqueurs mitochondriaux. Entre la mer Baltique et le nord de l'Ecosse, une forte différenciation génétique est observée à l'aide de marqueurs microsatellites (*Fst* = 0,094) au moins 6 fois plus importante qu'entre les colonies de la Mer Baltique. Les auteurs ont calculé un temps de divergence estimé à au moins 11 000 ans (Graves *et al.* 2009). Ces trois études montrent que les phoques gris peuvent présenter une structure génétique forte même entre deux zones géographiques assez proches (*i.e.* deux colonies), et qu'il semble exister une forte séparation entre l'est et l'ouest de l'Atlantique ainsi qu'entre la Mer Baltique et le reste de l'Europe.

A ma connaissance, seules deux études, très préliminaires, de génétique des populations ont porté sur des phoques gris échantillonnés en Bretagne. Une première étude a comparé 6 groupes de phoques gris, quatre groupes Bretagne, (phoques réhabilités, phoques capturés accidentellement, phoques capturés dans l'archipel de Molène, phoques nés dans l'archipel de Molène et aux Septs-Iles), et deux groupes Ecossais (North Rona et ile de May) à l'aide de 8 loci microsatellites (Becher *et al.* 2001). Les résultats semblent montrer une plus grande différence entre les phoques de Bretagne et d'Ecosse qu'au sein d'une zone géographique. Il semble que la séparation ne soit pas totale entre l'Ecosse et la Bretagne car certains individus des deux zones géographiques sont proches. Il semble aussi que les phoques réhabilités soient plus éloignés génétiquement des trois autres groupes bretons. Cependant certains groupes de cette étude préliminaires sont constitués d'un très faible nombre d'individus ($n = 7$ pour le groupe des phoques gris nés dans les colonies bretonnes par exemple) ce qui clairement limite la portée de l'étude (Becher *et al.* 2001). Une deuxième étude a été réalisée par Walton et Stanley (résultats non publiés, cités dans Ridoux *et al.* 2000) et elle comporte des échantillons de phoques gris bretons. Cette étude porte sur les séquences de la région de contrôle pour 246 animaux dont 15 bretons, et montrerait une séparation entre un groupe avec les individus d'Ecosse et de l'est de l'Angleterre et l'autre avec les individus du plateau celtique, dont la Bretagne.

Les particularités des phoques gris en Bretagne rendent intéressante une étude de génétique des populations

Les phoques gris en mer d'Iroise présentent plusieurs particularités. La mer d'Iroise constitue la limite géographique sud de la répartition de l'espèce. Elle accueille des colonies

en pleine croissance avec des individus capables de grands déplacements vers d'autres colonies mais aussi de fortes fidélités aux sites (Vincent *et al.* 2005). Il y a des naissances en mer d'Iroise mais en nombre bien insuffisant pour assurer la croissance de la colonie qui doit donc être provoquée par une émigration d'autres colonies (Prieur & Duguy 1978 ; Prieur 1984 ; Vincent 2001) comprenant par exemple des arrivées de juvéniles du pays de Galles (Prieur & Duguy 1978). Enfin, le régime alimentaire est très spécifique (Ridoux *et al.* 2007 ; Méheust *et al.*, soumis). Des travaux génétiques portant sur l'espèce ont montré qu'une structuration génétique pouvait être présente entre des colonies pourtant relativement proches.

Des raisons de compréhension fondamentale écologique aussi bien que des motivations de conservation de la biodiversité et du milieu amènent à étudier plus en avant les peuplements de phoques gris en mer d'Iroise. Plusieurs questions majeures se posent actuellement, portant principalement sur (i) la richesse génétique des phoques gris fréquentant les côtes bretonnes, et les informations que pourra nous apporter cette donnée sur le processus de colonisation de la mer d'Iroise et de l'archipel de Molène, (ii) sur la structure génétique et l'existence éventuelle de groupes génétiques ou populations de phoques gris en Bretagne, (iii) sur les variations chronologiques éventuelles dans les dernières années, aussi bien en terme de diversité (est-ce que l'augmentation d'abondance s'accompagne d'un enrichissement génétique au cours du temps ?) que de structuration génétique pouvant montrer des phénomènes de colonisations différents .

Pour répondre à ces questions, une étude de génétique des populations a été mise en place. Des marqueurs nucléaires et mitochondriaux ont été utilisés. Pour les marqueurs nucléaires, sept loci microsatellites disponibles dans la littérature (Allen *et al.* 1995) ont été choisis. Pour les marqueurs mitochondriaux, une étude pilote a d'abord été faite pour tester trois marqueurs différents et choisir le plus informatif pour le reste de l'étude.

L'échantillonnage est composé de phoques gris échoués vivants le long des côtes françaises, soignés à la clinique des phoques d'Océanopolis, et de phoque gris échoués morts en Bretagne et échantillonnés dans le cadre du Réseau National Echouages. Une comparaison avec des haplotypes de phoques gris de Baltique ainsi qu'avec des séquences issues de fèces collectés dans les colonies bretonnes a aussi été effectuée.

Résultats

Echantillonnage, extraction et amplification

Deux cent soixante neuf phoques gris ont été échantillonnés dans le cadre de cette étude. Deux cent trois sont des animaux échoués vivants qui ont été soignés à la clinique des phoques d'Océanopolis et pour lesquels l'ADN a été extrait à partir de prélèvements de sang. Ils seront appelés Hgc (pour "*H. grypus* care center") suivi d'un numéro d'ordre dans cette étude. Soixante six échantillons proviennent de phoques gris échoués morts échantillonnés dans le cadre du Réseau National Echouage, et pour lesquels l'ADN a été extrait de biopsies de tissus (lard ou muscle). Ces échantillons sont appelés Hgs (pour "*H. grypus* stranding network") suivi d'un numéro d'ordre. Les "Hgc" se sont échoués le long de la façade atlantique française, jusqu'en Espagne pour 3 individus, et sur 11 années successives avec 18 phoques par an en moyenne, un minimum de un seul phoque en 2002 et un maximum de 35 en 2007. Les "Hgs" ont tous été retrouvés le long de la façade atlantique bretonne (Figure 2). Les dates et lieux d'échouage, le sexe et les marqueurs génétiques analysés dans le cadre de cette thèse pour chacun des échantillons, sont recensés dans le Tableau 1.

Les extractions d'ADN ont pu être réalisées pour les 269 échantillons avec des concentrations d'ADN extrait variables. Pour les "Hgc", la moyenne est de 4,1 ng/μL, le minimum de 0,5 ng/μL et le maximum de 21,7 ng/μL. Pour les "Hgs", la moyenne est de 34,5 ng/μL, le minimum de 0,8 ng/μL et le maximum de 163 ng/μL.

La détermination de la séquence de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial ainsi que le génotypage des microsatellites ont été réalisés pour 230 extraits d'ADN, correspondant donc à 85,5% des échantillons biologiques disponibles (Tableau 2). La séquence de la région de contrôle mitochondriale (MCR) a été déterminée pour 240 individus (182 Hgc et 58 Hgs) soit pour 89,2% des échantillons. Le génotypage des marqueurs microsatellites a été réalisé chez 249 individus (196 Hgc et 53 Hgs) soit 92,6% du total. Au final, seuls les extraits obtenus à partir de 10 individus (3,7% du total) n'ont permis ni la détermination de la séquence de MCR ni le génotypage des marqueurs microsatellites. Les amplifications de MCR, qui n'ont pas fonctionné du premier coup ont été relancées au moins une fois et ajoutées aux autres en cas de réussite. Les amplifications de microsatellites non réussies n'ont pas été réessayées.

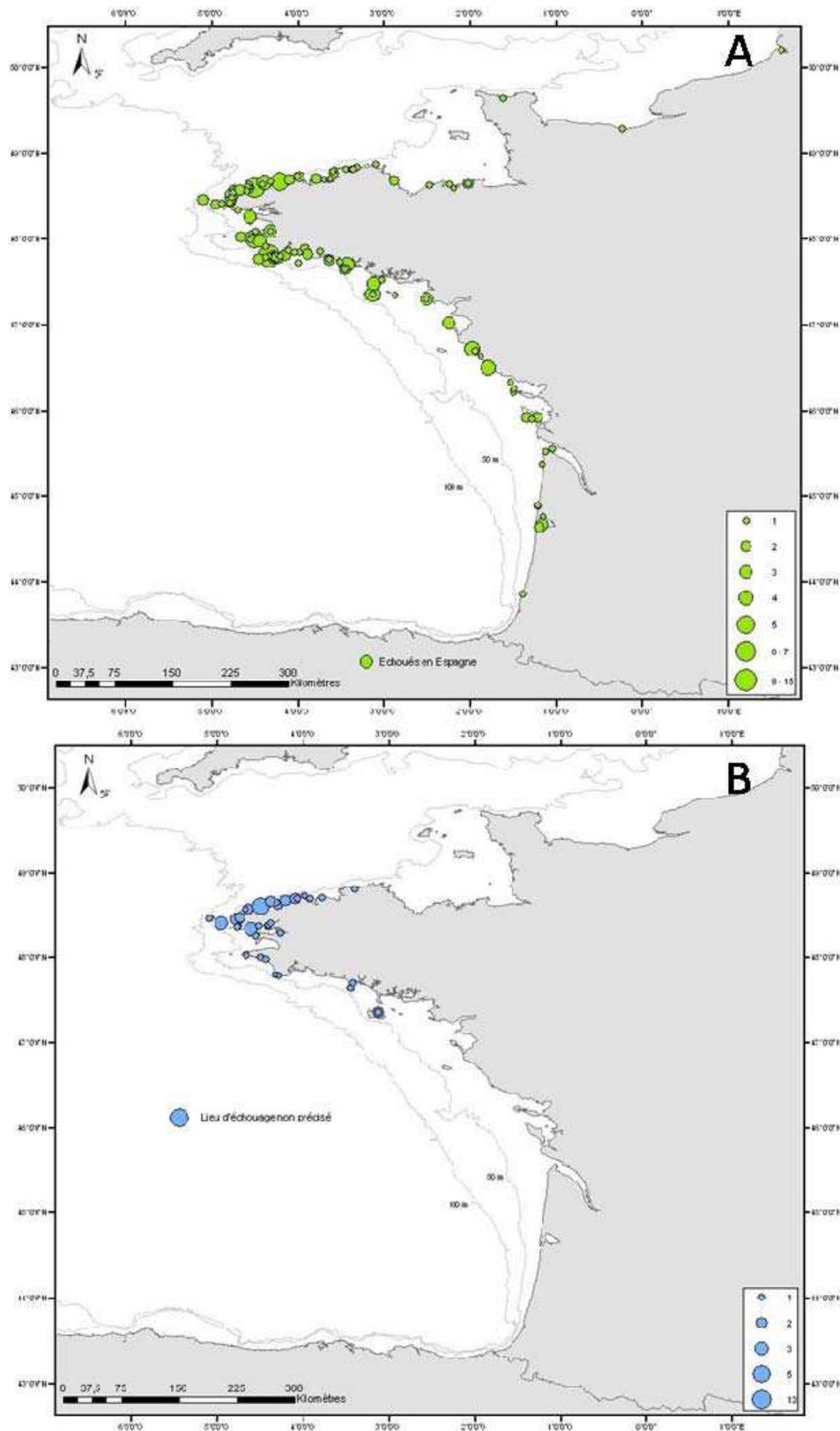


Figure 2: Lieux d'échouages des individus de cette étude

A = phoques échoués vivants. B = phoques échoués morts. Carte réalisée par Sandra Fuchs

Tableau 1 : Origine des échantillons utilisés

Individu	date échouage	lieu échouage	sexe	MCR	Micro satellites	Données manquantes
Phoque issus de la clinique						
Hgc227	13-nov-02	Saint Gilles Croix de Vie	M	oui	oui	
Hgc231	02-janv-03	Les Glénan - Saint Nicolas	M	oui	oui	
Hgc233	09-janv-03	Plouhinec	F	oui	oui	
Hgc234	22-janv-03	Penmarc'h	M	oui	oui	
Hgc236	13-nov-03	Tréboul	M	oui	oui	
Hgc237	25-nov-03	Aber Wrac'h	M	oui	oui	
Hgc239	06-déc-03	Ploudalmézeau	M	oui	oui	
Hgc240	11-déc-03	Belle Ile	M	non	oui	X
Hgc241	24-déc-03	Landeda	F	oui	oui	
Hgc243	29-déc-03	Plougasnou	F	oui	oui	
Hgc244	08-janv-04	Audierne	M	H	oui	
Hgc245	13-janv-04	Longeville sur mer	M	oui	oui	
Hgc247	24-janv-04	Loctudy	M	oui	oui	
Hgc248	22-janv-04	Noirmoutier	F	oui	oui	
Hgc250	14-févr-04	Ars en Ré	M	oui	oui	
Hgc254	12-nov-04	Ouessant	M	oui	oui	
Hgc255	14-nov-04	Belle-Ile	M	H	oui	
Hgc256	15-nov-04	Cherbourg	F	oui	oui	
Hgc257	15-déc-04	Ouistreham	M	oui	oui	
Hgc258	24-déc-04	Penmarc'h	M	H	oui	
Hgc259	24-déc-04	Douarnenez	M	oui	oui	
Hgc260	27-déc-04	Pont Aven	F	oui	oui	
Hgc261	29-déc-04	Le Porge	M	oui	oui	
Hgc262	31-déc-04	Penmarc'h	M	oui	oui	
Hgc263	03-janv-05	Ile d'Oléron	M	oui	oui	
Hgc265	09-janv-05	Brignogan	M	oui	oui	
Hgc266	10-janv-05	Kerlouan	M	oui	oui	
Hgc267	12-janv-05	Porspoder	M	oui	oui	
Hgc268	07-janv-05	Noirmoutier	F	oui	oui	
Hgc269	15-janv-05	Plouguerneau	F	oui	oui	
Hgc270	19-janv-05	Le Guilvinec	M	oui	oui	
Hgc271	23-janv-05	Penmarc'h	M	oui	oui	
Hgc272	29-janv-05	Plougouvelin	M	oui	oui	
Hgc273	31-janv-05	Mousterlin	M	oui	oui	
Hgc274	30-janv-05	Fouesnant	M	oui	oui	
Hgc275	24-janv-05	Arcachon	F	H	oui	
Hgc276	22-janv-05	Arcachon	M	oui	oui	
Hgc277	07-févr-05	Penmarc'h	M	oui	oui	
Hgc278	07-févr-05	Lesconil	M	oui	oui	
Hgc279	13-févr-05	Les sables d'Olonne	M	H	oui	

Hgc280	13-févr-05	Les sables d'Olonne	F	oui	oui	
Hgc281	02-mars-05	Le Guilvinec	F	oui	oui	
Hgc285	25-nov-05	Saint Hilaire de Riez	M	oui	oui	
Hgc286	27-nov-05	Baie de Douarnenez	F	oui	oui	
Hgc287	10-déc-05	Les sables d'Olonne	M	oui	oui	
Hgc288	16-déc-05	Penmarc'h	F	oui	oui	
Hgc290	19-déc-05	Concarneau	F	oui	oui	
Hgc291	30-déc-05	Lampaul Plouarzel	M	non	oui	X
Hgc292	31-déc-05	Penmarc'h	F	oui	oui	
Hgc293	05-janv-06	Vendays-Montolivet	M	H	oui	
Hgc294	08-janv-06	Groix	F	oui	oui	
Hgc295	09-janv-06	Plouguerneau	M	oui	oui	
Hgc296	10-janv-06	Plouescat	M	oui	oui	
Hgc297	13-janv-06	Molène	F	oui	oui	
Hgc298	14-janv-06	Audierne	F	oui	oui	
Hgc299	15-févr-06	Penmarc'h	M	oui	oui	
Hgc300	25-févr-06	Verdon	M	oui	oui	
Hgc301	05-mars-06	Esquibien	F	oui	oui	
Hgc302	28-mars-06	Ars en Ré	M	oui	oui	
Hgc305	18-nov-06	Guisseny	F	oui	oui	
Hgc306	22-nov-06	Plouescat	F	oui	oui	
Hgc307	28-nov-06	Penmarc'h	F	oui	oui	
Hgc308	05-déc-06	Concarneau	M	oui	oui	
Hgc309	07-déc-06	Porspoder	M	oui	oui	
Hgc310	07-déc-06	Fort bloqué	M	oui	oui	
Hgc311	08-déc-06	Plogoff	F	oui	oui	
Hgc312	08-déc-06	Erquy	F	oui	oui	
Hgc313	09-déc-06	Loctudy	F	non	oui	X
Hgc314	11-déc-06	Ploemeur	M	oui	oui	
Hgc315	16-déc-06	Melon	M	oui	oui	
Hgc316	16-déc-06	Le Guilvinec	M	oui	oui	
Hgc317	26-déc-06	Tréompan	F	H	oui	
Hgc318	27-déc-06	Lesconil	F	oui	oui	
Hgc319	31-déc-06	Quiberon	M	oui	oui	
Hgc321	03-janv-07	Portsall	M	oui	non	X
Hgc322	03-janv-07	Trévou Tréguignec	M	non	oui	
Hgc323	04-janv-07	Ploudalmézeau	M	oui	oui	
Hgc324	06-janv-07	Plomeur	M	oui	oui	
Hgc325	05-janv-07	Arcachon	F	oui	oui	
Hgc326	10-janv-07	Plovan	M	non	oui	X
Hgc327	16-janv-07	Quiberon	F	oui	oui	
Hgc328	15-janv-07	Moliets	F	non	oui	X

Hgc329	15-janv-07	Soulac	M	non	oui	X
Hgc330	21-janv-07	Penmarc'h	F	H	oui	
Hgc331	21-janv-07	Lampaul Plouarzel	F	oui	oui	
Hgc332	23-janv-07	St Guénolé	M	oui	oui	
Hgc333	20-janv-07	La Teste de Buch	M	oui	oui	
Hgc334	27-janv-07	Plougasnou	M	oui	oui	
Hgc335	07-févr-07	Le Croisic	M	oui	oui	
Hgc336	14-févr-07	Cléder	M	oui	oui	
Hgc337	16-févr-07	Belle-Ile-en-Mer	M	oui	oui	
Hgc338	26-févr-07	Moëlan sur mer	F	oui	oui	
Hgc339	02-mars-07	Le Verdon	M	oui	oui	
Hgc340	03-août-07	Landéda	M	oui	oui	
Hgc341	31-oct-07	St Coulomb	M	oui	oui	
Hgc343	10-déc-07	Penmarc'h	F	non	oui	X
Hgc344	11-déc-07	Pleumeur Bodou	M	oui	oui	
Hgc345	12-déc-07	Trébeurden	M	oui	oui	
Hgc346	13-déc-07	Le Croisic	F	oui	oui	
Hgc347	15-déc-07	Trebeurden	M	oui	oui	
Hgc348	24-déc-07	Plouha	M	oui	oui	
Hgc349	25-déc-07	Penmarc'h	M	oui	oui	
Hgc350	22-déc-07	La Teste	F	oui	oui	
Hgc351	23-déc-07	Cap Ferret	M	non	oui	X
Hgc352	27-déc-07	Ile de Batz	M	oui	oui	
Hgc353	28-déc-07	Ile vierge	M	oui	oui	
Hgc354	28-déc-07	Arcachon	M	non	oui	X
Hgc355	29-déc-07	Plouhinec	F	oui	oui	
Hgc356	29-déc-07	Plouescat	M	oui	oui	
Hgc358	04-janv-08	Carnac	M	oui	oui	
Hgc359	04-janv-08	Trégunc	F	oui	oui	
Hgc360	05-janv-08	Esquibien	M	oui	oui	
Hgc361	06-janv-08	Saint-Malo	M	oui	oui	
Hgc362	05-janv-08	Saint-Pierre d'Oléron	M	oui	oui	
Hgc363	10-janv-08	Belle-Ile	F	oui	oui	
Hgc364	14-janv-08	Moëlan sur mer	F	oui	oui	
Hgc365	15-janv-08	Lannion	F	oui	oui	
Hgc366	15-janv-08	Plozevet	M	H	oui	
Hgc367	09-janv-08	Saint hilaire de Riez	F	oui	oui	
Hgc368	06-janv-08	Saint Pierre d'Oléron	F	oui	oui	
Hgc369	30-déc-07	Espagne	F	oui	oui	
Hgc370	19-janv-08	Tréffiagat	F	oui	oui	
Hgc372	22-janv-08	Roscoff	M	H	oui	
Hgc373	24-janv-08	Plouha	F	oui	oui	
Hgc374	25-janv-08	Douarnenez	M	oui	oui	
Hgc375	30-janv-08	Espagne	F	oui	oui	

Hgc376	23-janv-08	Noirmoutier	F	oui	oui	
Hgc377	25-janv-08	St Hilaire de Riez	M	oui	oui	
Hgc378	09-févr-08	Penmarc'h	M	oui	oui	
Hgc379	14-févr-08	Le Croisic	M	oui	oui	
Hgc380	18-févr-08	St Hilaire de Riez	F	oui	oui	
Hgc381	26-févr-08	Bénodet	F	H	oui	
Hgc382	16-mars-08	Ile d'Hoëdic	M	oui	oui	
Hgc383	18-mars-08	Plounéour Lanvern	F	oui	oui	
Hgc384	26-mars-08	Plouhinec	F	oui	oui	
Hgc387	13-nov-08	Crozon	M	non	oui	X
Hgc388	14-déc-08	Sauzon - Belle Ile en mer	F	oui	oui	
Hgc389	25-déc-08	Cléder	F	oui	oui	
Hgc390	28-déc-08	Landunvez	M	oui	oui	
Hgc391	01-janv-09	Ruscumunoc	M	H	oui	
Hgc392	03-janv-09	Plogoff	F	oui	oui	
Hgc393	22-janv-09	Lechiagat	M	oui	oui	
Hgc394	25-janv-09	Audierne	F	oui	oui	
Hgc395	01-févr-09	Crozon	M	oui	oui	
Hgc396	22-févr-09	Plozevet	M	oui	oui	
Hgc397	09-nov-09	Crozon	M	oui	oui	
Hgc398	11-nov-09	Trégunc	F	oui	oui	
Hgc399	26-nov-09	Ile de Groix	M	oui	oui	
Hgc400	26-nov-09	Plouescat	M	oui	oui	
Hgc401	27-nov-09	Plouguerneau	F	non	non	X
Hgc402	27-nov-09	Croisic	M	non	non	X
Hgc403	I	I	I	non	non	X
Hgc404	29-nov-09	Plouguerneau	F	oui	oui	
Hgc405	01-déc-09	Ile grande	F	oui	oui	
Hgc406	26-nov-09	Espagne	M	oui	oui	
Hgc407	02-déc-09	Penmarc'h	F	oui	oui	
Hgc408	04-déc-09	Plobannalec	F	oui	oui	
Hgc409	05-déc-09	Moëlan	F	oui	oui	
Hgc410	07-déc-09	Guilvinec	M	oui	oui	
Hgc411	08-déc-09	Molène	F	oui	oui	
Hgc413	27-déc-09	Plomeur	M	oui	oui	
Hgc415	07-janv-10	Portsall	F	oui	oui	
Hgc416	08-janv-10	Plouguerneau	F	oui	oui	
Hgc417	08-févr-10	St Debis d'Oléron	F	oui	oui	
Hgc418	08-févr-10	Le Porge	M	oui	oui	
Hgc419	26-oct-10	St Malo	M	oui	oui	
Hgc420	27-oct-10	Plozevet	M	oui	oui	
Hgc421	27-oct-10	Plouarzel	F	non	non	X

Hgc422	13-nov-10	Kerlouan	M	oui	oui	
Hgc423	25-nov-10	Guimaëc	M	oui	oui	
Hgc424	23-dec-10	Les sables d'Olonne	M	oui	oui	
Hgc425	30-dec-10	Ploemeur	F	H	oui	
Hgc426	11-janv-11	St Pabu	F	oui	oui	
Hgc427	16-janv-11	Plouescat	M	oui	oui	
Hgc428	28-janv-11	Baie de Somme	F	oui	oui	
Hgc430	17-oct-11	St Jacut de la mer	F	oui	oui	
Hgc431	22-oct-11	Quiberon	M	non	non	X
Hgc432	05-nov-11	St Cast le Guildo	M	oui	oui	
Hgc433	02-dec-11	Penmarc'h	M	oui	oui	
Hgc434	04-dec-11	Ploemeur	M	oui	oui	
Hgc435	09-dec-11	Perros Guirrec	F	oui	oui	
Hgc436	15-dec-11	Roscoff	M	non	non	X
Hgc437	16-dec-11	Kerlouan	M	oui	oui	
Hgc438	18-dec-11	Lannilis	F	oui	oui	
Hgc439	18-dec-11	Douarnenez	M	oui	oui	
Hgc440	19-dec-11	Plouguerneau	F	oui	oui	
Hgc441	20-dec-11	Porspoder	M	oui	oui	
Hgc442	25-dec-11	Groix	F	oui	oui	
Hgc443	27-dec-11	Treffragat	M	oui	oui	
Hgc444	28-dec-11	Plouguerneau	M	non	oui	X
Hgc445	28-dec-11	Plouhinec	M	oui	oui	
Hgc447	29-dec-11	Sillon du Talbert	F	non	oui	X
Hgc448	01-janv-12	Ploemeur	M	non	oui	X
Hgc449	05-janv-12	Kerlouan	F	oui	oui	
Hgc450	06-janv-12	capturé dans un filet, mer d'Iroise	M	oui	oui	
Hgc451	09-janv-12	Les portes en Ré	F	non	oui	X
Hgc452	12-janv-12	Plouhinec	F	oui	oui	
Hgc453	11-janv-12	Plouarzel	M	oui	oui	
Hgc454	12-janv-12	Ouessant	F	oui	oui	
Hgc456	18-janv-12	Bretignolles/mer	F	oui	oui	
Hgc457	18-janv-12	Locquirec	F	oui	oui	
Hgc458	23-janv-12	Ile d'Oléron	M	oui	oui	
Hgc460	10-fev-12	Lechiagat	I	oui	oui	X
Phoques échoués morts						
Hgs 1	06-nov-91	I	I	oui	oui	X
Hgs 2	07-déc-00	Belle-Ile	M	oui	oui	
Hgs 3	05-janv-01	Ile de Groix	M	oui	oui	
Hgs 4	13-avr-01	Crozon	M	H	non	X
Hgs 5	12-juin-01	Cléder	M	oui	non	X
Hgs 6	11-janv-02	Béniguet	M	oui	oui	
Hgs 7	27-juil-02	Lampaul-Plouarzel	I	oui	oui	X
Hgs 8	28-juil-02	Plouzané	F	oui	non	X

Hgs 9	13-janv-03	Sibiril	F	oui	oui	
Hgs 10	07-févr-03	Plouguerneau	M	oui	oui	
Hgs 11	02-déc-03	Molène	F	oui	oui	
Hgs 12	07-mai-04	Cléder	M	oui	oui	
Hgs 13	27-mai-04	Béniguet	M	oui	oui	
Hgs 14	27-déc-04	Ouessant	M	oui	oui	
Hgs 15	23-janv-05	Plouhinec	F	oui	oui	
Hgs 16	15-févr-05	Lampaul-Ploudalmézeau	M	non	oui	X
Hgs 17	23-févr-05	Lampaul-Plouarzel	F	oui	non	
Hgs 18	12-déc-05	Molène	F	non	oui	
Hgs 19	30-déc-05	Plozévet	M	non	non	X
Hgs 20	10-janv-06	Kerlouan	M	oui	non	X
Hgs 21	31-mars-06	I	F	oui	oui	X
Hgs 22	19-mai-06	Le Conquet	M	H	oui	
Hgs 23	02-janv-07	Plouguerneau	M	oui	oui	
Hgs 24	29-janv-07	Tréompan	F	H	oui	
Hgs 25	30-janv-07	Plogoff	F	oui	oui	
Hgs 26	06-févr-07	Plouguerneau	I	oui	oui	
Hgs 27	07-févr-07	Plougasnou	M	oui	oui	
Hgs 28	24-août-07	Lanildut	M	oui	oui	
Hgs 29	07-sept-07	I	F	oui	non	X
Hgs 30	14-janv-08	Ploemeur	M	oui	oui	
Hgs 31	11-fevr-08	Lampaul-Plouarzel	M	non	oui	X
Hgs 32	26-févr-08	Le Guilvinec	M	oui	oui	
Hgs 33	19-avr-08	I	M	oui	oui	X
Hgs 34	13-aout-08	I	I	oui	oui	X
Hgs 35	23-janv-09	Penmarc'h	I	oui	oui	
Hgs 36	26-fev-09	I	I	oui	oui	X
Hgs 37	07-mai-09	Lanildut	I	non	non	X
Hgs 38	21-mai-09	Plougastel	F	oui	oui	
Hgs 39	20-juil-09	Landevennec	M	oui	non	X
Hgs 40	20-aout-09	Relecq Kerhuon	I	oui	oui	
Hgs 41	12-dec-09	I	I	oui	oui	X
Hgs 42	20-déc-09	Roscoff	F	non	oui	X
Hgs 43	31-déc-09	Plouzané	M	oui	oui	
Hgs 44	18-janv-10	Plouenour-Trez	I	oui	oui	
Hgs 45	16-juin-10	Treleven	M	oui	oui	
Hgs 46	19-nov-10	Molène	M	oui	oui	
Hgs 47	03-janv-11	Carantec	M	non	non	X
Hgs 48	11-fevr-11	Plouescat	M	oui	oui	
Hgs 49	11-févr-11	Plouzané	M	oui	oui	
Hgs 51	24-juil-11	Plouescat	F	non	non	X
Hgs 52	30-août-11	Brest, 4 pompes	M	oui	oui	
Hgs 53	25-nov-11	Lampaul-Ploudalmézeau	M	oui	non	X

Hgs 54	05-déc-11	Louannec	M	oui	oui	
Hgs 55	07-déc-11	Plouguerneau	F	oui	oui	
Hgs 56	15-déc-11	Plougastel Daoulas	F	oui	oui	
Hgs 57	19-déc-11	I	I	oui	oui	X
Hgs 58	22-déc-11	I	I	oui	oui	X
Hgs 59	29-déc-11	I	I	oui	oui	X
Hgs 60	04-janv-11	I	I	H	oui	X
Hgs 61	09-janv-12	Plouguerneau	I	oui	oui	
Hgs 62	09-janv-12	I	I	oui	oui	X
Hgs 63	09-janv-12	I	I	oui	oui	X
Hgs 64	28-janv-12	Goulven	I	oui	oui	X
Hgs 65	07-fevr-12	Goulven	I	oui	oui	X
Hgs 66	17-fevr-12	Kerlouan	F	oui	oui	
Hgs 67	14-avr-12	Conquet	F	oui	non	X

Hgc correspond à des échantillons collectés sur des individus vivants de la clinique des phoques d'Océanopolis. *Hgs* correspond à des échantillons collectés sur des individus morts dans le cadre du Réseau National Echouage. I = indéterminé. H = hétéroplasmie. MCR = région de contrôle mitochondriale. Données manquantes correspond à un individu pour lequel il manque le lieu ou la date d'échouage, pour lequel le sexe n'est pas connu ou l'amplification n'a pas fonctionné pour un type de marqueurs.

Tableau 2 : Récapitulatif du nombre d'extraits d'ADN obtenus et des taux de réussite des analyses de marqueurs moléculaires

	Nombre	séquences de MCR déterminées	microsatellites génotypés
échantillons Hgc	203	182 (89,6%)	196 (96,6%)
échantillons Hgs	66	58 (87,9%)	53 (80,3%)
Total	269	240	249

Hgc correspond à des échantillons collectés sur des individus vivants de la clinique des phoques d'Océanopolis. *Hgs* correspond à des échantillons collectés sur des individus morts dans le cadre du Réseau National Echouage.

Analyse des polymorphismes de l'ADN mitochondrial

Présence d'hétéroplasmie

Les séquences de MCR déterminées chez 17 individus, 13 "Hgc" (7,1%) et 4 "Hgs" (6,9%), présentent des hétéroplasmies de taille, qui correspondent à la présence d'au moins deux génomes mitochondriaux différents, dont l'un possède une insertion d'un nucléotide par rapport à l'autre. Cela provoque, à partir du nucléotide inséré, un décalage des deux séquences sur le chromatogramme qui rend l'analyse de la séquence impossible à partir d'un seul brin (Figure 3). Les séquences de ces 17 individus n'ont pas été considérées dans la suite de cette étude, qui porte donc sur 223 séquences de MCR déterminées à partir de 169 Hgc et 54 Hgs.

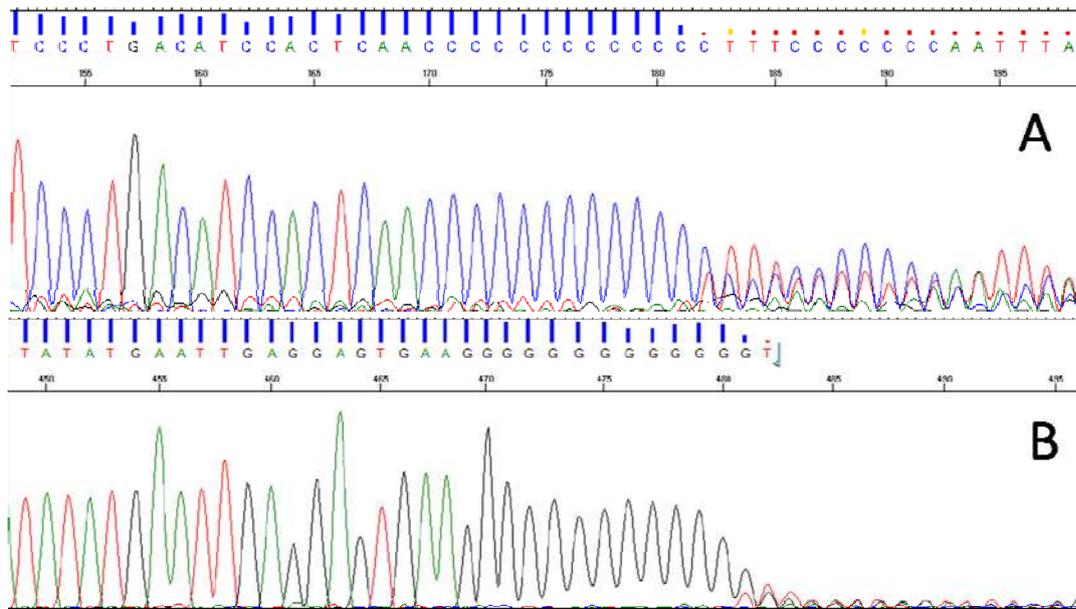


Figure 3 : A : chromatogramme présentant une hétéroplasmie de taille au nucléotide 177 de la séquence du brin sens de MCR de Hgc293. B : chromatogramme présentant une hétéroplasmie de taille au nucléotide 481 de la séquence du brin complémentaire de MCR de Hgc293. La suite de la séquence est difficilement analysable pour les deux brins.

Analyse pilote comparative des taux de polymorphismes de 3 marqueurs mitochondriaux

Une étude pilote a été mise en place au début de ces travaux afin de tester les polymorphismes et surtout la valeur des informations génétiques, apportées par trois marqueurs mitochondriaux différents : la région de contrôle mitochondriale (MCR), le gène codant pour la sous unité 1 de la cytochrome oxydase (*cox1*) et le gène codant pour le cytochrome b (*cytb*). Quarante individus, issus de la clinique, ont été sélectionnés, en tirant au hasard 3 individus par saison de clinique, soit 33 individus, et en ajoutant des individus, aussi tirés aléatoirement, pour les saisons présentant beaucoup de phoques (Tableau 3).

Tableau 3 : Individus sélectionnés pour l'étude pilote portant sur trois marqueurs mitochondriaux

Individu	date échouage	Cox1	Cytb	MCR
Hg080202	08-févr-02	1	1	0
Hgc227	13-nov-02	1	1	1
Hgc233	09-janv-03	1	1	1
Hgc237	25-nov-03	1	1	1
Hgc241	24-déc-03	1	1	1
Hgc248	22-janv-04	1	1	1
Hgc255	14-nov-04	1	1	0
Hgc257	15-déc-04	1	1	1
Hgc266	10-janv-05	1	0	1
Hgc269	15-janv-05	1	1	1
Hgc286	27-nov-05	1	1	1
Hgc290	19-déc-05	1	1	1
Hgc292	31-déc-05	1	1	1
Hgc309	07-déc-06	1	0	1
Hgc321	03-janv-07	1	0	1
Hgc322	03-janv-07	1	1	0
Hgc323	04-janv-07	1	1	1
Hgc325	05-janv-07	1	1	1
Hgc343	10-déc-07	1	0	0
Hgc358	04-janv-08	1	1	1
Hgc372	22-janv-08	1	1	0
Hgc378	09-févr-08	1	1	1
Hgc381	26-févr-08	1	1	0
Hgc387	13-nov-08	1	1	1
Hgc393	22-janv-09	1	1	1
Hgc394	25-janv-09	1	1	1
Hgc397	09-nov-09	1	1	1
Hgc398	11-nov-09	1	1	0
Hgc400	26-nov-09	1	1	0
Hgc404	29-nov-09	1	1	1
Hgc406	26-nov-09	1	1	1
Hgc407	02-déc-09	0	1	0
Hgc413	27-déc-09	1	1	1
Hgc422	13-nov-10	1	1	1
Hgc423	25-nov-10	1	0	1
Hgc427	16-janv-11	1	0	1
Hgc430	17-oct-11	1	1	1
Hgc434	04-dec-11	1	1	1
Hgc437	16-dec-11	1	1	1
Hgc443	27-dec-11	1	1	1
Total		39	34	31

Hg080202 est un individu de la clinique qui n'a pas été utilisé dans la suite de l'étude

Les séquences de ces trois marqueurs ont été déterminées pour 39 individus pour le marqueur *cox1*, pour 34 pour *cytb* et 31 pour MCR (**Erreur ! Référence non valide pour un signet.**), dont 26 individus en commun pour lesquels les 3 séquences ont été déterminées. Un quatrième marqueur a été créé pour ces 26 individus en concaténant les trois séquences obtenues.

Tableau 4 : Polymorphismes et indices de diversités pour différents marqueurs

Marqueur mitochondrial	Nb de séquences	Taille de la séquence	Nb Sites variables	P	Nb haplotypes	<i>H</i>	π
MCR	31	620	22	3,55	13	0,95	0,0077
<i>cox1</i>	39	658	7	1,06	7	0,66	0,0014
<i>cytb</i>	34	661	5	0,76	5	0,58	0,0017
Concaténation des 3	26	1945	32	1,65	16	0,96	0,0035

P = polymorphisme en %. *H* = diversité nucléotidique. π = diversité nucléotidique

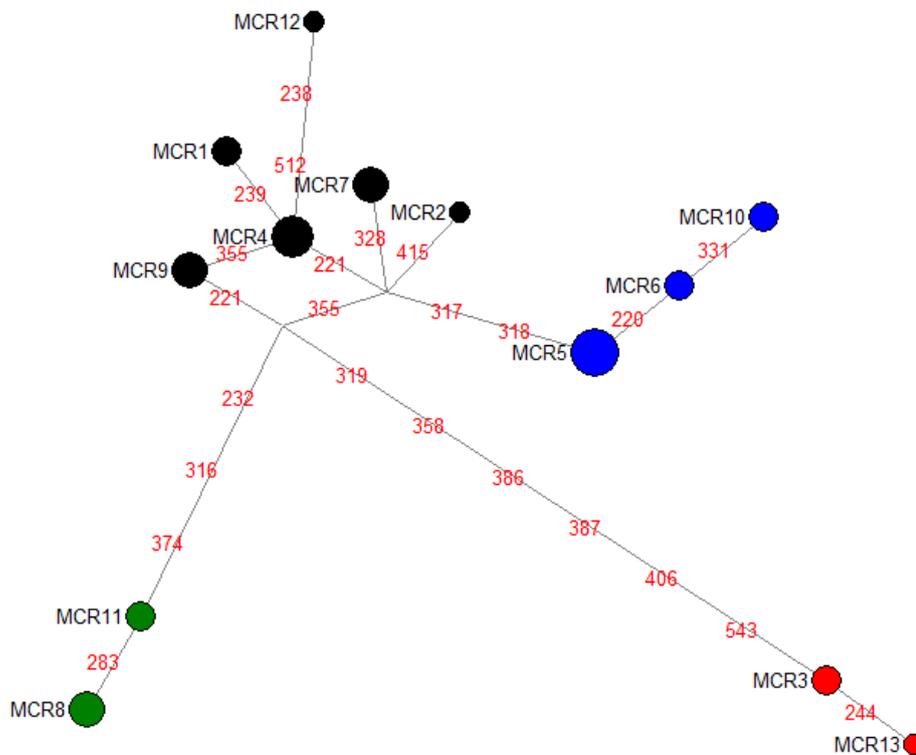


Figure 4 : Réseau haplotypique réalisé à partir des séquences de MCR de 31 phoques gris

Pour une description des réseaux haplotypique voir le matériel et méthode en annexe. Les couleurs correspondent aux haplogroupes. Noir : haplogroupe 1. Bleu haplogroupe 2. Vert : haplogroupe 3. Rouge : haplogroupe 4

MCR présente la plus forte diversité avec 22 sites variables pour 620 étudiés (3,55% de polymorphisme), 13 haplotypes déterminés pour 31 individus analysés, une diversité haplotypique de 0,95 et nucléotidique de 0,0077. Un réseau haplotypique, construit à partir des séquences de MCR déterminées, est présenté dans la Figure 4. Il est clairement très éclaté, ne possède pas d'haplotype dominant et 12 mutations séparent les haplotypes les plus éloignés (MCR13 et MCR10). Trois groupes d'haplotypes sont facilement observables et les individus restants forment aussi un groupe. Quatre haplogroupes, regroupant des haplotypes proches entre eux, peuvent donc être définis. L'haplogroupe 1 regroupe 14 individus (MCR1, MCR4, MCR9 et MCR12), l'haplogroupe 2 en regroupe 9 (MCR5, MCR6 et MCR10), l'haplogroupe 3 en regroupe 5 (MCR8 et MCR11) et l'haplogroupe 4 en regroupe 3 (MCR3 et MCR13). Ces haplogroupes regroupent des individus éloignés de deux mutations ou moins, et sont éloignés les uns des autres par au moins trois mutations. Ils seront confirmés ensuite par l'augmentation du nombre d'individus et une analyse par nMDS (voir suite des résultats)

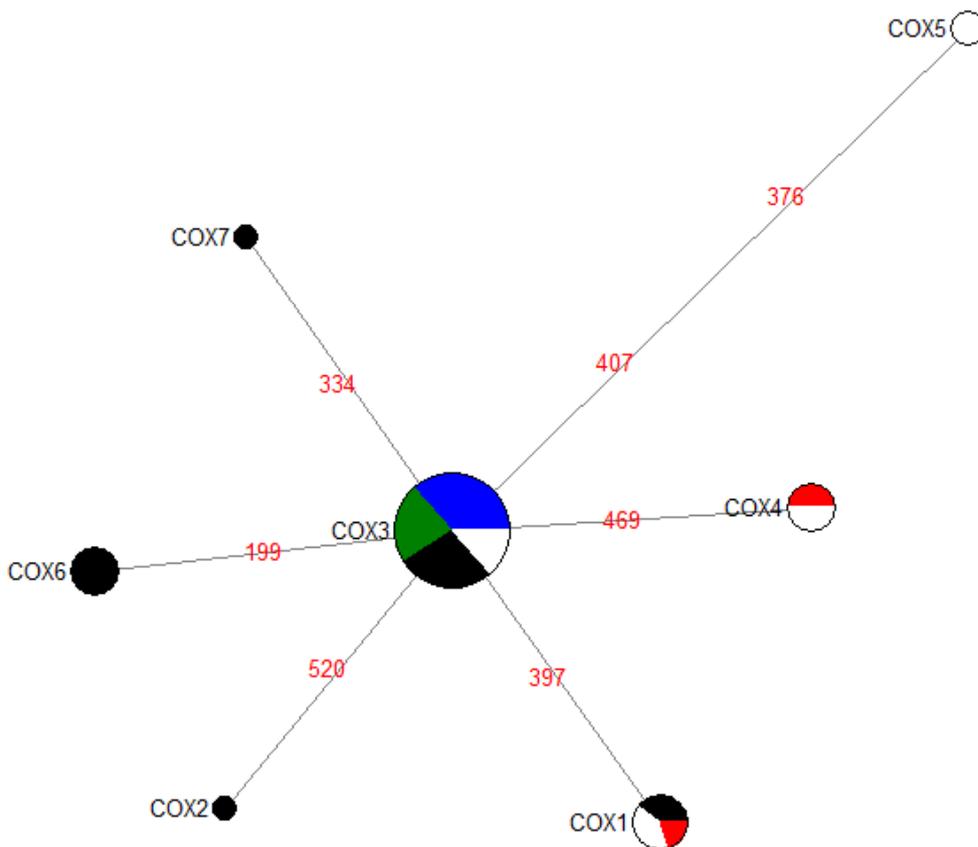


Figure 5 : Réseau haplotypique réalisé à partir des séquences de *cox1* de 39 phoques gris.

Les couleurs correspondent aux haplogroupes identifiés précédemment avec le marqueur MCR. Noir : haplogroupe 1. Bleu haplogroupe 2. Vert : haplogroupe . Rouge : haplogroupe 4. Blanc : individu non séquencé en MCR

L'analyse comparative des séquences de *cox1* montre que ce marqueur présente une diversité beaucoup plus faible : 7 sites variables pour 658 nucléotides déterminés (1,06% de polymorphisme), 7 haplotypes pour 39 individus analysés, une diversité haplotypique égale à 0,66 et une diversité nucléotidique de 0,0014. Le réseau haplotypique construit en analysant ces séquences de *cox1* est présenté dans la Figure 5. Il possède une forme d'étoile, avec un haplotype dominant retrouvé chez 22 individus et 6 haplotypes satellites, distants d'une ou deux mutations. Trois mutations séparent les haplotypes les plus éloignés (Cox5 et les autres sauf Cox3). On peut réaliser une première comparaison des résultats obtenus avec MCR en reportant sur le réseau haplotypique de *cox1* les couleurs des haplogroupes de MCR. L'haplogroupe (en noir) est présent dans 5 des 7 haplotypes *cox1*. L'haplogroupe 4 (en rouge) se retrouve dans deux haplotypes *cox1* différents, séparés par l'haplotype principal, ce qui peut indiquer que plusieurs événements de mutation se sont produits sur le même site nucléotidique à des moments différents.

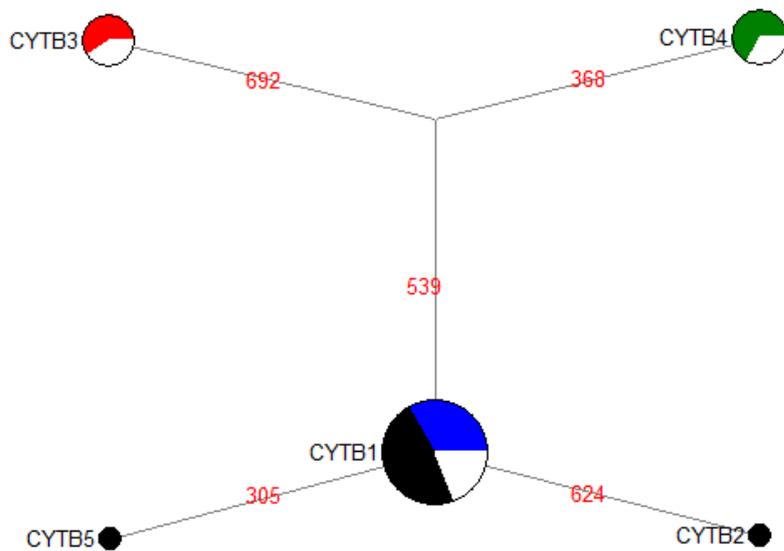


Figure 6 : réseau haplotypique réalisé à partir des séquences de *cytb* de 34 phoques gris

Les couleurs correspondent aux haplogroupes identifiés avec le marqueur MCR. Noir : haplogroupe 1. Bleu haplogroupe 2. Vert : haplogroupe 3. Rouge : haplogroupe 4. Blanc : individu non séquencé en MCR

Le gène *cytb* présente la diversité la plus faible parmi les trois marqueurs, avec cinq sites variables pour 634 nt analysés (0,76% de polymorphisme), cinq haplotypes retrouvés chez 34 animaux différents, une diversité haplotypique de 0,58 et nucléotidique de 0,0017. Le réseau haplotypique (Figure 6) montre un haplotype dominant regroupant 21 individus et 4 haplotypes voisins de moindre importance. Trois mutations séparent les haplotypes les plus éloignés (Cytb3 et Cytb4 par rapport à Cytb2 et Cytb5). La même analyse comparative que pour *cox1* avec les haplogroupes de MCR peut être réalisée. Pour *cytb*, les haplogroupes 3 et 4 sont chacun présents dans un haplotype de *cytb*, alors que les haplogroupes 1 et 2 se partagent l'haplotype *cytb* central, ainsi que les 2 haplotypes les plus proches.

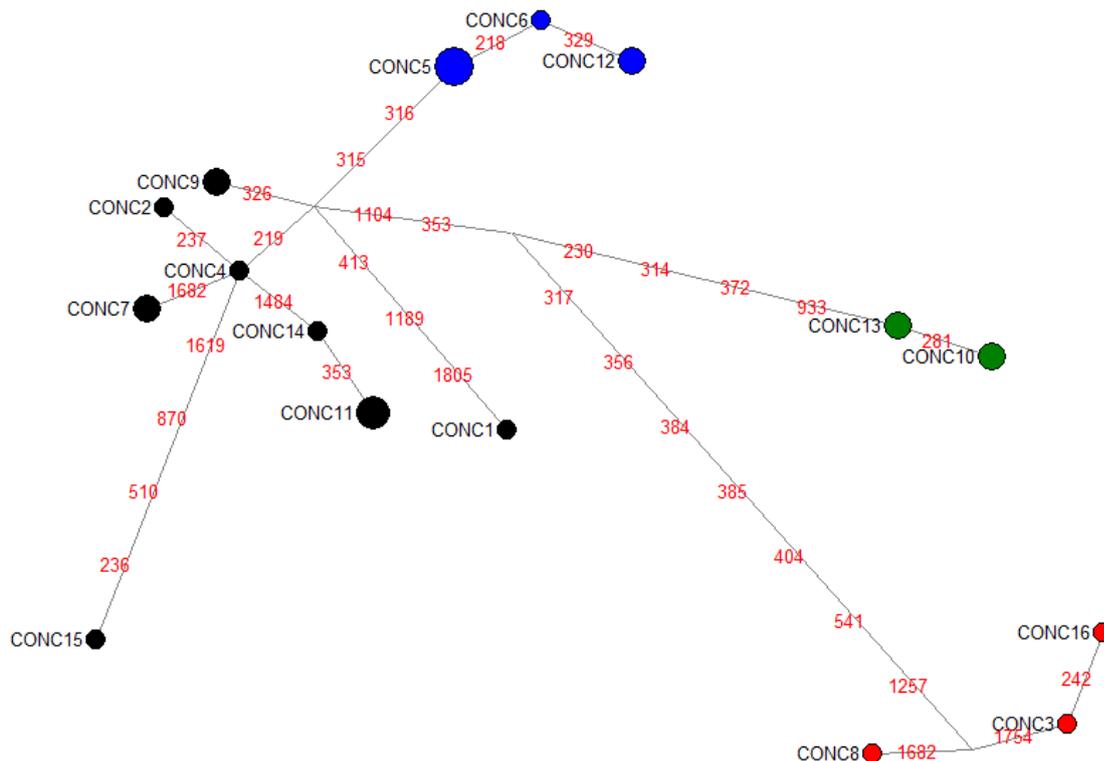


Figure 7 : réseau haplotypique réalisé à partir des séquences issues de la concaténation de *cox1/cytb/MCR* déterminées chez 26 phoques gris

Les couleurs correspondent aux haplogroupes identifiés avec le marqueur MCR. Noir : haplogroupe MCR1. Bleu haplogroupe 2. Vert : haplogroupe 3. Rouge : haplogroupe 4

La concaténation des trois marqueurs permet de produire une séquence de longueur totale de 1945 nucléotides qui présente 32 sites variables et 16 haplotypes déterminés chez 26 individus. La diversité haplotypique égale à 0,96 est la plus forte pour nos marqueurs. Les valeurs de pourcentage de polymorphisme (1,65%) et de diversité nucléotidique (0,0035) dépendent de la longueur de la séquence et sont donc intermédiaires entre MCR et les autres marqueurs. La Figure 7 montre le réseau haplotypique construit à l'aide de la séquence concaténée : il est encore plus éclaté que celui construit à l'aide de MCR, il ne présente pas d'haplotype dominant et montre une distance maximum entre haplotypes de 16 mutations entre Conc16 et Conc15. Les haplogroupes définis par l'analyse de MCR sont clairement retrouvés et sont encore plus éloignés les uns des autres. L'haplogroupe 4 défini par MCR3 et MCR 13 (en rouge) se retrouve séparé par deux mutations de plus. L'haplogroupe principal (en noir) se retrouve lui encore plus éclaté, avec Conc1 (MCR2) et Conc15 (MCR12) se retrouvant éloignés à 4 mutations de l'haplogroupe le plus proche.

Des trois marqueurs, c'est MCR qui présente la plus grande diversité génétique, et, si la concaténation des trois marqueurs renforce la sûreté de détection des haplogroupes de MCR, elle n'apporte pas, à priori, beaucoup d'informations nouvelles. Suite à cette étude

pilote, nous avons donc décidé d'analyser la séquence de MCR pour l'ensemble des individus de notre étude.

Analyse des polymorphismes de la région de contrôle mitochondrial pour l'ensemble des individus

Après avoir retiré les données concernant les 17 individus présentant de l'hétéroplasmie, 223 séquences de MCR exploitables correspondant à 223 individus différents, 169 "Hgc" et 54 "Hgs", ont été obtenues. La partie commune entre toutes ces séquences est de 482 nucléotides. Trente quatre sites variables (7.05% de polymorphisme) permettent de définir 33 haplotypes (Tableau 5). La diversité haplotypique est de 0,92 et nucléotidique de 0,0082.

Tableau 5 : Polymorphismes et indices de diversités de MCR chez 223 phoques gris

marqueurs	Nb de séquences	Taille de la séquence	Nb Sites variables	P	Nb haplotypes	H	π
MCR	223	482	34	7,05	33	0,919	0,00816

P = polymorphisme en %. H = diversité nucléotidique. π = diversité nucléotidique

Le réseau haplotypique (Figure 8) est très diversifié et complexe. Plusieurs chemins de mutations possibles sont présents à trois endroits du réseau. Aucun haplotype majoritaire ne peut être détecté, mais 7 haplotypes différents, répartis dans le réseau, regroupent les deux tiers des individus : 44 dans l'haplotype 4, 24 dans l'haplotype 2, 19 dans l'haplotype 19, 18 dans l'haplotype 1, 15 dans l'haplotype 16 et 14 dans les haplotypes 9 et 11. Onze haplotypes ne sont représentés que par un seul individu. Dix sept mutations séparent les haplotypes les plus éloignés (H20 et H28). Les 4 haplogroupes, définis lors de l'étude pilote par l'analyse de MCR se retrouvent avec l'haplogroupe 1 central et 145 individus (qui correspond à l'haplogroupe de MCR1, MCR2, MCR4, MCR7, MCR9 et MCR12 de l'étude pilote), l'haplogroupe 2 et 49 individus (qui correspond à l'haplogroupe de MCR5, MCR6 et MCR10), l'haplogroupe 3 et 15 individus qui correspond à l'haplogroupe de MCR11 et MCR8) et l'haplogroupe 4, le plus excentré, et 14 individus (qui correspond à l'haplogroupe de MCR3 et MCR13).

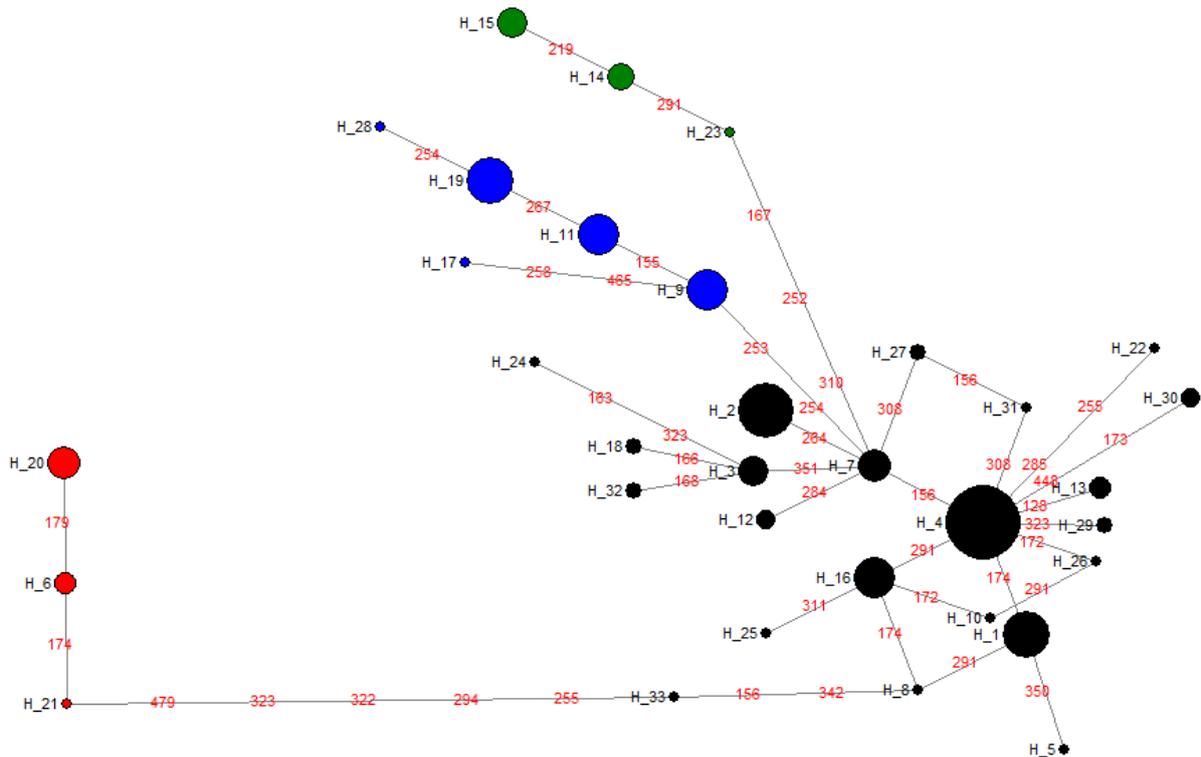


Figure 8 : Réseau haplotypique, construit à partir des séquences de MCR de 223 phoques gris, et présentant une grande diversité génétique et quatre haplogroupes bien séparés

Les couleurs correspondent aux haplogroupes définis dans l'étude pilote. Noir : haplogroupe 1. Bleu haplogroupe 2. Vert : haplogroupe 3. Rouge : haplogroupe 4

Les distances génétiques entre les 223 séquences ont aussi été analysées pour produire une analyse par Positionnement Multi dimensionnel non métrique (ou nMDS pour « non metric Multi Dimensional Scaling »). Cette analyse a pour but de représenter, au mieux, dans un plan à deux dimensions les distances entre chaque séquence prises deux à deux. Le diagramme obtenu (Figure 9) montre un groupe central, et 3 groupes isolés en haut à droite, en haut à gauche et en bas au centre. Les haplotypes formant ces différents groupes sont les mêmes que ceux formant les haplogroupes du réseau d'haplotypes présenté Figure 8. L'haplogroupe 1 (en noir, Figure 8) correspond au groupe central du nMDS, l'haplogroupe 2 (en bleu Figure 8) correspond au groupe situé en haut à gauche du nMDS, l'haplogroupe 3 (en vert Figure 8) correspond au groupe situé en bas du MDS et l'haplogroupe 2 (en rouge Figure 8) correspond au groupe situé en haut à droite du nMDS. Les 4 haplogroupes sont donc détectés par les deux méthodes d'analyse, ce qui confirme clairement leurs existences.

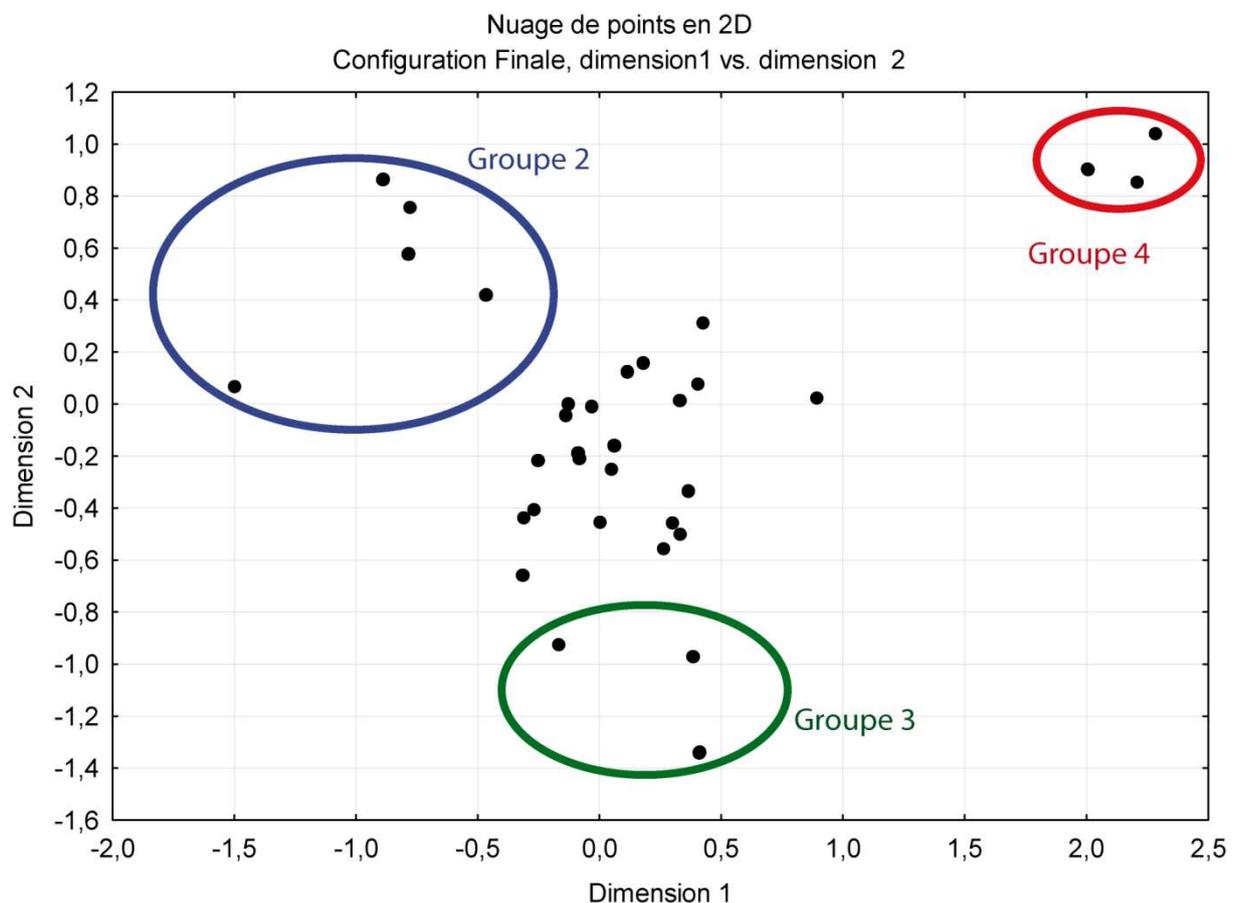


Figure 9 : Analyse par positionnement multidimensionnel (nMDS) des distances génétiques calculées entre les 223 séquences de MCR de phoques gris. Les haplogroupes sont bien séparés

Chaque point représente un haplotype. Les groupes correspondent aux haplogroupes définis à partir de MCR dans l'étude pilote. Stress = 0,108

Analyse des polymorphismes de microsatellites

Sept loci microsatellites, choisis parmi les données disponibles dans la littérature, ont été amplifiés et génotypés à partir des extraits d'ADN correspondants à 269 individus. Deux cent quarante neuf individus ont pu être génotypés pour au moins cinq loci sur sept (Tableau 6), les autres ont été retirés de l'étude. Sur les 7 loci, 3 sont génotypés complètement pour les 249 individus et, au minimum, 242 individus sont génotypés pour le loci Hgdii. Les 7 loci sont polymorphes au sein de l'échantillonnage et présentent de 7 (SGPv9 et Hg6.1) à 12 allèles (Hg8.9). L'hétérozygotie attendue varie de 0,628 à 0,806 pour une moyenne de 0,732. L'hétérozygotie observée varie de 0,61 à 0,79 avec une moyenne de 0,71. Le *Fis* par loci est positif pour tous les loci sauf Hg6.1 pour lequel il est fortement négatif ($Fis_{Hg6.1} = -0,067$). Il est très élevé ($Fis_{Hg3.6} = 0,121$) et statistiquement significatif pour le locus Hg3.6. Le *Fis* pour l'ensemble des 7 loci est égal à 0,032, et il est statistiquement significatif. Il a été décidé de conserver les 7 loci pour la suite de l'étude et de faire certaines analyses avec et sans le locus Hg3.6.

Tableau 6 : Statistiques descriptives pour les 7 loci microsatellites analysés chez 249 phoques gris

	Référence Genbank	Nb individu	nA	<i>Ra</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>Fis</i>	significativité <i>Fis</i>
Hg4.2	G02089	249	8	7,944	0,628	0,61	0,031	0,221
Hg3.6	G02090	249	8	7,999	0,761	0,671	0,121*	0,0071
Hgdii	G02093	242	9	9	0,713	0,674	0,058	0,1
SGPv9	G02091	245	7	7	0,805	0,792	0,018	0,329
Hg6.1	G02094	247	7	6,98	0,648	0,692	-0,067	0,95
Hg8.9	G02092	248	12	11,999	0,806	0,79	0,021	0,243
Hg8.10	G02096	249	10	9,972	0,761	0,739	0,031	0,186
total		249	61		0,732	0,71	0,032*	0,0214

nA = nombre d'allèles. *Ra* = richesse allélique pour 245 individus. *He* = Hétérozygotie attendue. *Ho* = Hétérozygotie observée. * = statistiquement significatif à 5%. Loci issus de Allen et al. 1995

Les déséquilibres de liaison ont été estimés. Sur 21 couples, seuls 3 présentent un déséquilibre significatif au seuil de 5%. Il s'agit de Hg3.6/Hg8.10, Hgdii/SGPv9 et Hg3.6/Hgdii. Ces déséquilibres ne sont plus significatifs après application de la correction de Bonferroni.

Une analyse bayésienne, par "clustering" de la structure génétique, au sein des 249 individus pour les 7 loci microsatellites a été réalisée à l'aide du logiciel Structure. Plusieurs paramètres ont été testés : modèles avec admixture ou sans admixture, fréquences d'allèle corrélées ou indépendantes. Tous les nombres de groupes prévisionnels (*K*) ont été testés entre *K* = 1 et *K* = 5, pour chaque couple de paramètres et en 5 itérations. Aucune structure

n'a pu être détectée et les probabilités d'appartenance à un groupe sont très proches pour chaque individu dans tous les cas de figures (Figure 10).

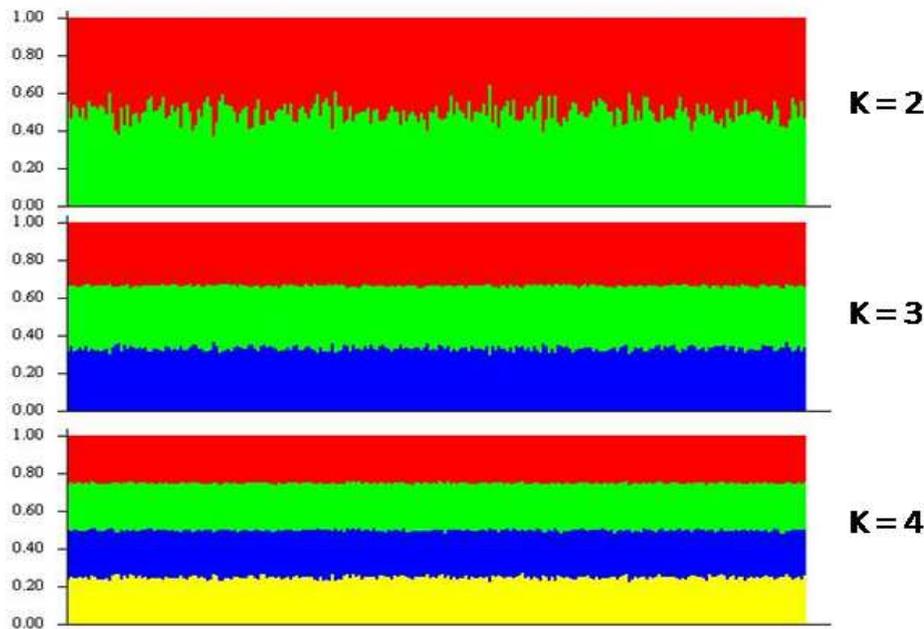


Figure 10: Représentation graphique d'un exemple de résultat d'analyse réalisée par le logiciel Structure

Les 249 individus sont représentés alignés les uns à côté des autres en abscisse, et pour chacun, les probabilités d'appartenance aux groupes théoriques pour $K = 2$ à $K = 4$ sont représentées par des codes couleurs. Les probabilités d'appartenance des différents individus aux différents groupes sont équivalentes, donc aucune structure génétique n'est détectée

Cette absence de structuration génétique au sein de notre échantillonnage est aussi confirmée par l'analyse des probabilités calculées par Structure : la probabilité $P(D)$ que la structure proposée par le logiciel soit juste, est calculée lors de chaque itération et la moyenne des itérations est déterminée pour chaque valeur de nombre de cluster (K) et paramètres testés (Figure 11). Pour 3 couples de paramètres, c'est le cas $K = 1$ qui présente la probabilité la plus forte, avec de fortes diminutions pour les valeurs de K supérieures à 1. Pour le couple de paramètres « modèle sans admixture » et « fréquences d'allèles indépendantes », il y a une légère augmentation non significative de $P(D)$ avec les valeurs de K , le maximum se situant à $K = 4$. Lorsque $K = 4$, chaque individu a près de 25% de probabilité d'appartenir à chacun des 4 groupes, ce qui démontre bien qu'aucune structure n'a été détectée.

L'analyse bayésienne par "clustering" a aussi été réalisée en retirant le locus Hg3.6. Les résultats sont identiques : aucune structure n'est détectée (résultats non présentés).

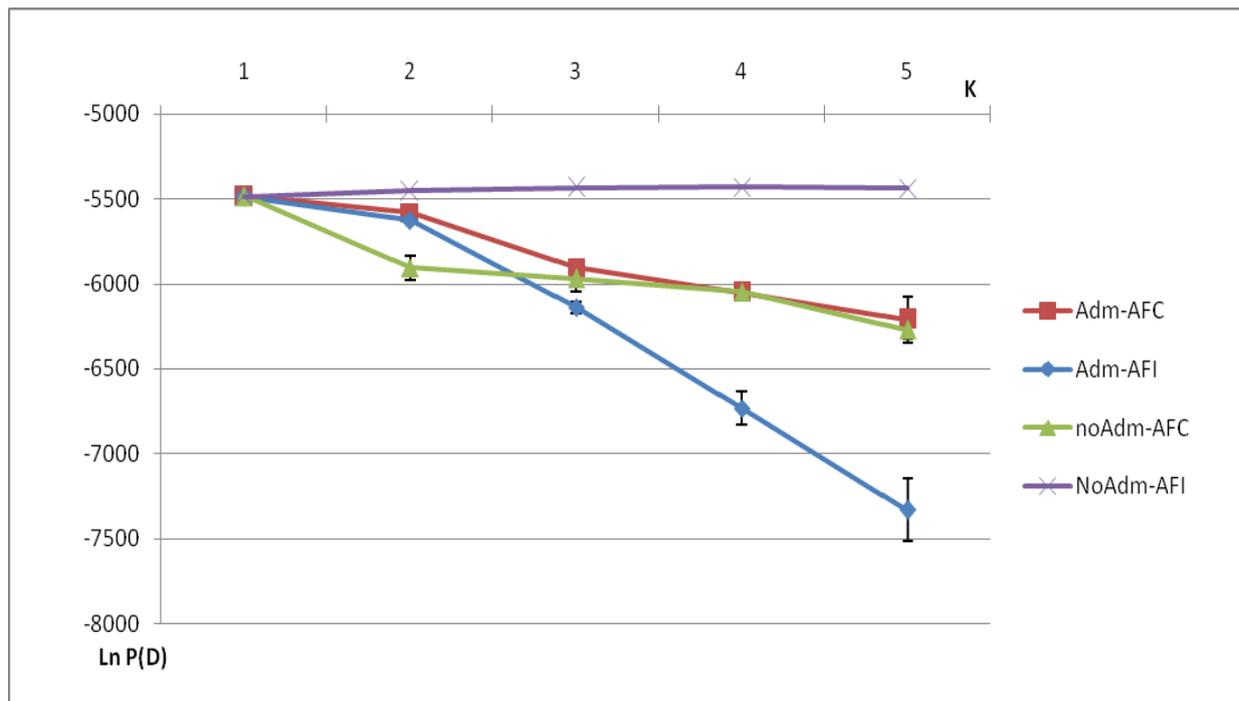


Figure 11 : Probabilités de justesse des groupes génétiques prédits par le logiciel Structure, en fonction de K pour l'analyse de 7 loci microsatellites pour 249 phoques gris

Les quatre courbes correspondent aux 4 couples de paramètres possibles. $\ln P(D)$ est le logarithme népérien de la probabilité que la structure proposée soit juste. K est le nombre de clusters fixé lors de l'analyse. L'écart type des 5 itérations par point est représenté par une barre. Adm = modèle avec admixture. noAdm = modèle sans admixture. AFC = fréquences d'allèles corrélés. AFI = fréquences d'allèles indépendantes.

Recherche de paramètres explicatifs des haplogroupes mitochondriaux et de différenciation génétique

Plusieurs groupes, définis *a priori*, ont été utilisés pour tester les différences génétiques entre plusieurs caractéristiques (échantillonnage, sexe, période temporelle, zone géographique) sur les marqueurs mitochondriaux et nucléaires.

Les paramètres descriptifs : la richesse allélique (Ra), le nombre moyen d'allèles privés (Ap) pour les marqueurs microsatellites, le nombre de sites variables, le polymorphisme (P), le nombre d'haplotype, la diversité haplotypique (H) et nucléotidique (π) pour les marqueurs mitochondriaux permettent de comparer la diversité et la richesse génétique entre les groupes. La richesse allélique et le nombre d'allèles privés correspondent à une moyenne pour les 7 loci. Des écarts de 0,15 indiquent qu'il y a un allèle d'écart entre les groupes, ce qui sur les 61 allèles totaux observés n'est pas très important. Le polymorphisme et le nombre d'haplotypes sont des mesures de richesse génétique brute, cependant elles ne sont pas relativisées par la taille du groupe et il faut donc faire attention dans la comparaison

de groupes de tailles différentes. La diversité haplotypique est une valeur entre 0 et 1, elle est indépendante de la taille du groupe et elle indique s'il y a une dominance d'un haplotype sur les autres (valeur faible) ou s'il y a une diversité importante (valeur proche de 1). La diversité nucléotidique est une valeur positive, indépendante de la taille du groupe et qui donne une indication de la distance génétique (nombre de mutations) moyenne entre les haplotypes. Plus elle est grande, plus les haplotypes sont séparés par un nombre important de mutations. Le *Fis* permet d'estimer s'il existe un écart à la loi de Hardy-Weinberg et donc un excès (valeur négative) ou un déficit (valeur positive) en hétérozygote. La significativité du *Fis* est mesurée à l'aide de test par permutation.

Les tests de différenciation génétique : le *Fst* pour les marqueurs microsatellites et le *Hst*, le *Snn* et le *Fst* pour les marqueurs mitochondriaux permettent d'estimer s'il existe une différenciation génétique entre les groupes. Les deux *Fst* et le *Hst* ont des valeurs supérieures à zéro en cas de différenciation, le *Snn* a, lui, des valeurs comprises entre 0 et 1 et plus elles sont proches de 0 ou de 1, plus la différenciation est forte. Ces tests sont tous couplés à des tests de significativité mesurée à l'aide de test par permutation.

Comparaison croisée des marqueurs : les haplogroupes mitochondriaux peuvent ils être retrouvés par l'analyse des polymorphismes du génome nucléaire ?

Deux cent quatorze individus ont, à la fois, une séquence de MCR ne présentant pas d'hétéroplasmie et un génotypage des loci microsatellites exploitables. Les quatre haplogroupes identifiés à partir des séquences de MCR (Figure 8) ont permis de créer 4 groupes parmi ces 214 individus, qui ont alors été comparés au niveau des marqueurs nucléaires (Tableau 7). Les richesses alléliques et le nombre moyen d'allèles privés sont peu différents d'un groupe à l'autre, de $R_{\text{haplogroupe1}} = 5,83$ à $R_{\text{haplogroupe3}} = 6,01$ et de $A_{\text{haplogroupe1}} = 0,25$ à $A_{\text{haplogroupe3}} = 0,41$. Les *Fis* sont, quant à eux, très différents, avec un maximum de 0,043 pour l'haplogroupe 1 (statistiquement significatif) et un minimum de -0,092 pour l'haplogroupe 4. Aucune différenciation génétique n'a par contre été détectée entre les groupes avec un *Fst* égal à 0.

Tableau 7 : Statistiques descriptives pour 7 loci microsatellites en fonction des haplogroupes mitochondriaux

		haplogroupe 1	haplogroupe 2	haplogroupe 3	haplogroupe 4
marqueurs microsatellites	nb d'individus	139	48	14	13
	<i>Ra</i>	5,83	5,86	6,01	5,86
	<i>Ap</i>	0,25	0,34	0,41	0,37
	<i>Fis</i>	0,043*	0,013	-0,003	-0,092
	<i>Fst</i>	0			

Ra = Richesse allélique moyenne pour 13 individus. *Ap* = nombre moyen d'allèles privés. * = statistiquement significatif à 5%

Le modèle Locprior (Hubisz *et al.*, 2009) permet de rajouter des *a priori*, aux analyses bayésiennes de recherche de cluster effectuées par le logiciel Structure. Les différents haplogroupes mitochondriaux ont été utilisés comme *a priori*, mais, à nouveau, aucune structure génétique n'a été détectée par l'analyse des polymorphismes de microsatellites (résultats non présentés).

Influence de l'origine des échantillons sur la diversité génétique (Clinique/Echoués)

Les polymorphismes de microsatellites ont été analysés pour 196 individus issus de la clinique et 53 échoués morts (Tableau 8). Avec un nombre moyen d'allèles privés de 0,72 et une richesse allélique de $Ra = 7,66$, Hgc présente une richesse génétique légèrement plus importante que Hgs ($Ra = 7,4$; $Ap = 0,4$). Les Fis sont positifs pour les deux groupes mais avec une valeur ($Fis = 0,037$) statistiquement significative pour les Hgc. Aucune différenciation génétique entre les deux groupes n'est détectée par le calcul du Fst .

Au niveau de la région de contrôle de leur ADN mitochondrial, les phoques gris issus de la clinique ($n=196$) présentent une plus forte variabilité génétique que ceux échoués morts ($n=53$), que ce soit pour le nombre de sites variables, le polymorphisme, le nombre d'haplotypes ou la diversité nucléotidique (Tableau 8). Cette variabilité supérieure provient en partie du plus grand nombre d'individus analysés. La diversité haplotypique est, quant à elle, proche entre les deux groupes ($H_{Hgc} = 0,92$ et $H_{Hgs} = 0,91$). Les trois tests de différenciation génétique mis en œuvre ne détectent aucune différence entre les 2 groupes. La représentation des groupes sur le réseau haplotypique (Figure 12) ne montre pas de différence notable dans la répartition des individus issus des deux sources d'échantillonnages.

		Hgc	Hgs
marqueurs microsatellites	nb d'individus analysés	196	53
	Ra	7,66	7,4
	Ap	0,72	0,40
	Fis	0,037*	0,018
	Fst	0	
marqueurs mitochondriaux	nb d'individus	169	54
	nb sites variables	33	22
	polymorphisme (%)	6,85	4,56
	nb d'haplotypes	31	15
	H	0,92	0,91
	π	0,0083	0,0077
	Fst	0	
	Snn	0,64	
	Hst	0,0046	

Tableau 8: statistiques descriptives et indicateurs de différenciation génétique. Comparaison des échantillons issus de la clinique des phoques (Hgc) et de ceux issus d'animaux échoués morts (Hgs)

Ra = Richesse allélique moyenne pour 53 individus. Ap = nombre moyen d'allèles privés. H = diversité haplotypique. π = diversité nucléotidique. * = statistiquement significatif à 5%.

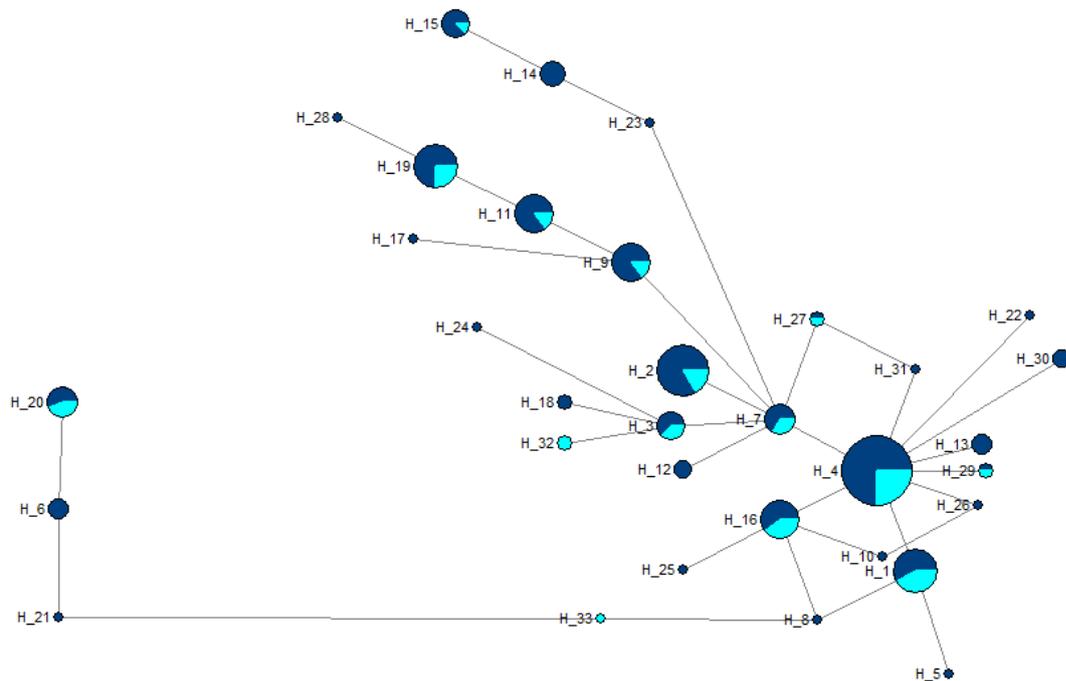


Figure 12 : Réseau haplotypique construit à partir de 223 séquences de MCR de phoques gris. Comparaison des échantillons issus de la clinique des phoques et de ceux issus d'animaux échoués morts

Bleu clair : animaux échoués mort issus du RNE (Hgs). Bleu foncé : animaux issus de la clinique des phoques d'Océanopolis (Hgc)

Influence du sexe des animaux sur la diversité génétique (Femelles/Mâles)

Les polymorphismes des marqueurs microsatellites ont été analysés chez 93 femelles et 137 mâles phoques gris (Tableau 9) Les richesses alléliques moyennes (Ra mâles = 8,35) et les nombres moyens d'allèles privés (Ap mâles = 0,64) sont plus élevés chez les mâles que chez les femelles (Ra femelles 7,85 et Ap femelles = 0,14). Le Fis est lui plus fort, et statistiquement significatif, pour les femelles (0,052) que pour les mâles (0,024). Aucune différenciation génétique entre les deux groupes n'est détectée par le Fst .

Tableau 9 : Statistiques descriptives et indicateurs de différenciation génétique. Comparaison des individus mâles et femelles

		Femelle	Mâles
marqueurs microsatellites	nb d'individus	93	137
	<i>Ra</i>	7,85	8,35
	<i>Ap</i>	0,14	0,64
	<i>Fis</i>	0,052*	0,024
	<i>Fst</i>	0	
marqueurs mitochondriaux	nb d'individu	84	121
	nb site variables	29	30
	polymorphisme	6,01	6,22
	nb d'haplotype	26	24
	H	0,94	0,91
	π	0,0085	0,0081
	<i>Fst</i>	0	
	<i>Snn</i>	0,48	
Hst	-0,0025		

Ra = Richesse allélique moyenne pour 93 individus. *Ap* = nombre moyen d'allèles privés. *H* = diversité haplotypique. π = diversité nucléotidique. * = statistiquement significatif à 5%.

Au niveau mitochondrial, 84 femelles et 121 mâles ont été analysés (Tableau 9). L'ensemble des résultats des statistiques descriptives sont proches pour les deux sexes. Les trois tests de différenciation génétique ne détectent aucune différence entre les 2 groupes. La représentation des groupes sur le réseau haplotypique (Figure 13) ne montre pas de différence notable dans la répartition des deux sexes.

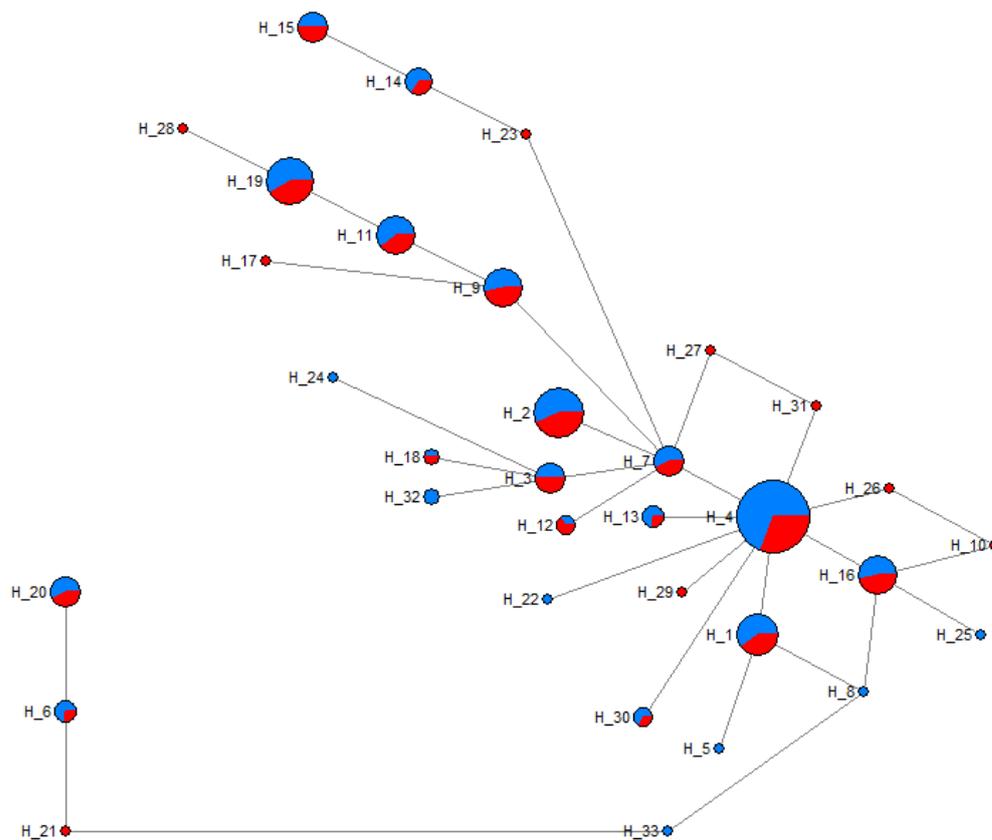


Figure 13 : Réseau haplotypique construit à partir de 205 séquences de MCR de phoques gris. Comparaison des individus mâles et femelles

Bleu : mâles. Rouge : femelles.

Comparaison des années

Afin de rechercher d'éventuelles variations chronologiques, 11 groupes d'animaux échantillonnés ont été définis (un groupe par année entre 2003 et 2012 et un groupe pour les 8 individus dont le prélèvement est antérieur à 2003). Le nombre moyen d'individus par groupe est de 22,8 avec un maximum de 41 pour l'année 2007. Certains groupes (antérieurs à 2003, 2003 et 2010) présentent un faible nombre d'individus avec un minimum de 8 individus pour le groupe des antérieurs à 2003. Le faible nombre d'individus de certains groupes peut avoir un effet important sur les résultats.

Au niveau des marqueurs microsatellites, le groupe le plus important est celui de l'année 2007 avec 41 individus analysés, et le moins nombreux celui qui regroupe les prélèvements antérieurs à 2003 avec 6 individus analysés (Tableau 10). Les richesses alléliques moyennes, entre $Ra_{\text{antérieur à 2003}} = 4,29$ et $Ra_{2012} = 4,79$, et les nombres moyens d'allèles privés, entre $Ap_{\text{antérieur à 2003}} = 0,012$ et $Ap_{2004} = 0,190$, sont assez proches entre les groupes, puisque l'écart entre les richesses alléliques représente moins de

trois allèles au total et celui entre le nombre moyen d'allèles privés, moins de deux allèles. Les *Fis* sont en général légèrement positifs, avec un maximum pour *Fis*₂₀₁₁ = 0,122. Trois années présentent des *Fis* négatifs (*Fis*_{antérieur à 2003} = -0,115 ; *Fis*₂₀₀₄ = -0,014 ; *Fis*₂₀₁₀ = -0,009) Le groupe 2011 est le seul qui présente une valeur de *Fis* qui est statistiquement significative. Le *Fst* est différent de 0 mais non significatif.

Tableau 10 : Statistiques descriptives et indicateurs de différenciation génétique. Comparaison des années d'échouages

		Antérieur à 2003	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
marqueurs microsatellites	nb d'individus	6	12	17	28	27	41	34	26	13	28	17
	<i>Ra</i>	4,29	4,57	4,62	4,69	4,34	4,68	4,38	4,62	4,64	4,51	4,79
	<i>Ap</i>	0,012	0,028	0,190	0,126	0,076	0,078	0,053	0,137	0,089	0,125	0,034
	<i>Fis</i>	-0,115	0,046	-0,014	0,038	0,033	0,023	0,02	0,04	-0,009	0,122*	0,014
	<i>Fst</i>	0,001										
marqueurs mitochondriaux	nb d'individus	8	11	14	24	24	34	29	25	12	26	16
	nb sites variables	4	15	19	20	23	21	23	12	20	23	17
	polymorphisme	0,83	3,11	3,94	4,15	4,77	4,36	4,77	2,49	4,15	4,77	3,53
	nb d'haplotypes	4	7	12	12	15	12	15	10	8	13	9
	<i>H</i>	0,75	0,91	0,98	0,93	0,95	0,83	0,93	0,87	0,92	0,94	0,93
	π	0,0028	0,0069	0,0079	0,0087	0,0095	0,0062	0,0085	0,0065	0,012	0,0099	0,0093
	<i>Fst</i>	0,09*										
	<i>Snn</i>	0,12*										
<i>Hst</i>	0,011*											

Ra = Richesse allélique moyenne pour 6 individus. *Ap* = nombre moyen d'allèles privés. *H* = diversité haplotypique. π = diversité nucléotidique. * = statistiquement significatif à 5%.

Au niveau mitochondrial, les groupes vont de 8 individus analysés pour le groupe des antérieurs à 2003 à 34 individus pour le groupe 2007 (Tableau 10). Le polymorphisme au sein des groupes varie de $P_{\text{antérieur à 2003}} = 0,83\%$ à $P_{2006} = 4,77\%$, les nombres d'haplotypes varient de 4 pour le groupe des antérieurs à 2003 à 15 pour 2006 et 2008. Ces valeurs sont très corrélées à la taille des groupes. Les diversités haplotypiques varient de $H_{\text{antérieur à 2003}} = 0,75$ à $H_{2004} = 0,98$ et les diversités nucléotidiques de $\pi_{\text{antérieur à 2003}} = 0,0028$ à $\pi_{2010} = 0,012$ ce qui sont des écarts assez importants. Cependant aucune tendance n'est détectée, mis à part la faible diversité du groupe antérieur à 2003 qui présente le plus faible nombre d'individus.

Les trois tests de différenciation génétique détectent une différence statistiquement significative entre les 11 groupes. L'AMOVA, analyse moléculaire de variance, permet

d'attribuer la part de la variation génétique lié au groupe défini *a priori*. Elle estime que 9% de la variation génétique peut être expliquée par la répartition en année. La représentation des groupes sur le réseau haplotypique (Figure 14) ne montre pas de différence notable dans la répartition des individus issus des deux sources d'échantillonnages, mais le nombre de catégories très important rend difficile la lecture.

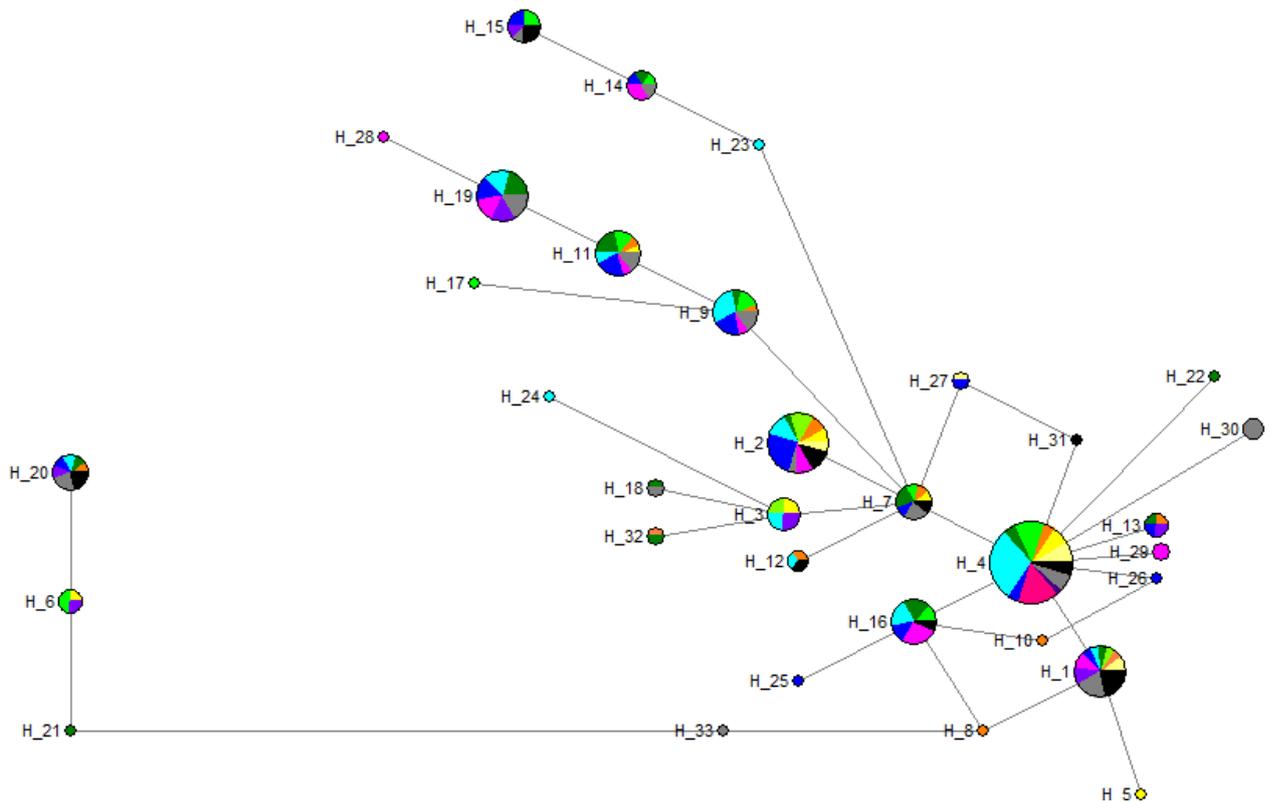


Figure 14 : Réseau haplotypique construit à partir de 223 séquences de MCR de phoques gris. Comparaison des années d'échantillonnage

Jaune clair : antérieur à 2003. Jaune : 2003. Orange : 2004. Vert clair : 2005. Vert foncé : 2006. Bleu turquoise : 2007. Bleu foncé : 2008. Rose : 2009. Violet : 2010. Gris : 2011. Noir : 2012.

Une différenciation génétique a donc été observée entre les années. Elle est importante et significative pour MCR mais pas pour les microsatellites. Afin de mieux cibler la structure génétique temporelle, différents groupes ont été définis et leur diversité et leur différenciation génétique ont été comparées.

Analyse comparative des variations génétiques par groupe chronologique

Pour tester la présence d'un enrichissement génétique au cours du temps, deux groupes ont été définis, un groupe avant 2008 comprenant 138 individus et un groupe de 2008 à 2012

comprenant 122 individus. La limite a été placée à 2008 pour avoir des groupes de tailles les plus proches possibles.

Aucune différence génétique n'est détectée entre ces deux groupes, que ce soit pour les marqueurs microsatellites ou mitochondriaux et aucun test de différenciation génétique n'est significatif (résultats non présentés).

Des tests de comparaison de la richesse allélique et du nombre d'allèles privés ont aussi été réalisés pour des groupes de 3 années et de deux années et aucune différence ne fut observée (résultats non présentés).

Recherche d'une périodicité années paires/années impaires dans l'échantillonnage

Comme la répartition des *Fis* en fonction des années (Figure 15) montre une différence entre les années paires (faible *Fis*) et impaires (fort *Fis*), des comparaisons entre années paires et impaires ont été faites.

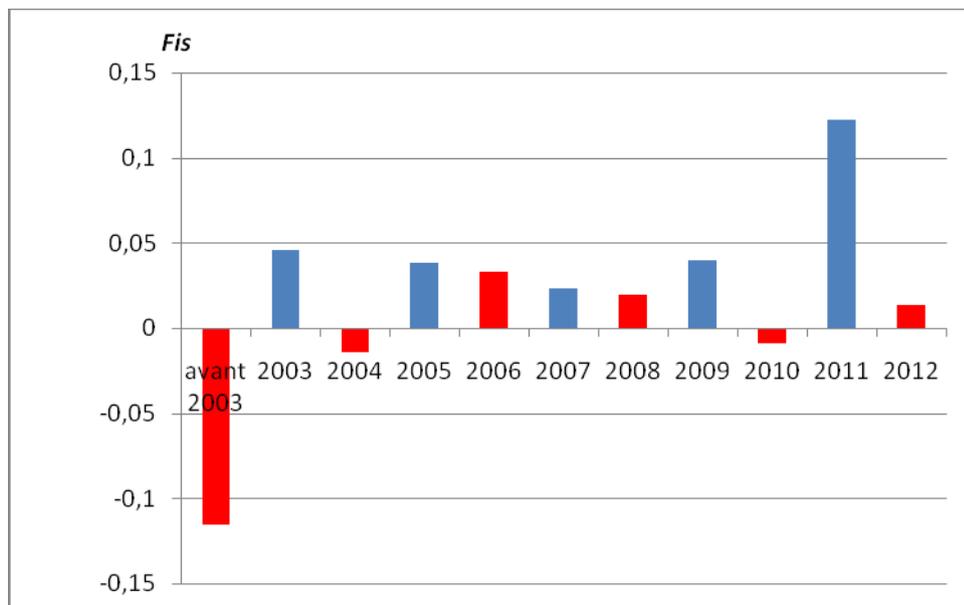


Figure 15 : *Fis* en fonction des années pour 249 phoques gris

En rouge le groupe des années paires. En bleu le groupe des années impaires

La comparaison des *Fis* par année a aussi été faite sans prendre en compte Hg3.6. Une différence entre les années paires et impaires est aussi observée avec notamment, quatre valeurs de *Fis* négatives pour le groupe des antérieurs à 2003, 2004, 2010 et 2012 (résultats non présentés).

Le génotypage des marqueurs microsatellites a été effectué pour 113 individus dont les prélèvements ont été effectués lors d'années paires et 136 lors d'années impaires (Tableau 11).

Les richesses alléliques moyennes et le nombre moyen d'allèle privés sont très proches. Par contre, le calcul des valeurs de *Fis*, positifs pour les deux groupes, montre une valeur beaucoup plus forte et statistiquement significative pour les années impaires ($F_{isimpaires} = 0,048$). Un *Fst*, statistiquement significatif et de valeur $F_{st Paires/impaires} = 0,002$, distingue les 2 groupes. Si on le calcule en ne tenant pas compte du locus Hg3.6, le *Fst* est de 0,001 et est non significatif ($p \text{ value} = 0,10$).

Tableau 11 : Statistiques descriptives et indicateurs de différenciation génétique. Comparaison des années d'échouages paires et impaires

		Années paires	Années impaires
marqueurs microsatellites	nb d'individus	113	136
	<i>Ra</i>	8,13	8,15
	<i>Ap</i>	0,48	0,5
	<i>Fis</i>	0,011	0,048*
	<i>Fst</i>	0,002*	
marqueurs mitochondriaux	nb d'individus	100	123
	nb sites variables	28	29
	polymorphisme	5,81	6,02
	nb d'haplotypes	25	24
	<i>H</i>	0,94	0,90
	π	0,009	0,0075
	<i>Fst</i>	0,082*	
	<i>Snn</i>	0,52	
	Hst	0,011*	

Ra = Richesse allélique moyenne pour 113 individus. *Ap* = nombre moyen d'allèles privés. *H* = diversité haplotypique. π = diversité nucléotidique. * = statistiquement significatif à 5%.

Au niveau mitochondrial, le groupe des années paires est constitué de 100 individus et celui des années impaires de 123 (Tableau 11). Les deux groupes présentent une diversité génétique proche avec un polymorphisme et un nombre d'haplotypes quasi identiques (Nb sites variables de 28 pour les années paires et de 29 pour les années impaires, polymorphisme de 5,81 pour les années paires et de 6,02 pour les années impaires). Les individus des années paires ont une diversité haplotypique et nucléotidique ($H_{paires} = 0,94$ et $\pi_{paires} = 0,009$), légèrement supérieure à ceux des années impaires, ($H_{impaires} = 0,9$ et $\pi_{impaires} = 0,0075$). Un test de différenciation, le *Snn*, ne détecte pas de différence significative entre les 2 groupes. Par contre les deux autres tests, *Fst* et Hst, montrent une différenciation significative entre les deux groupes. L'AMOVA indique que 8,2% de la variabilité peut être expliquée par la répartition en années paires et impaires. La représentation des groupes sur le réseau haplotypique (Figure 16) montre une légère différence dans la répartition des individus issus des années paires et impaires. Certains haplotypes comme le 4, le 3, le 9 ou 16 sont dominés par les années impaires alors que les haplotypes 1, 2, 7, 15 ou 20 sont dominés par les années paires bien que le nombre total d'individus soit plus faible pour les années paires.

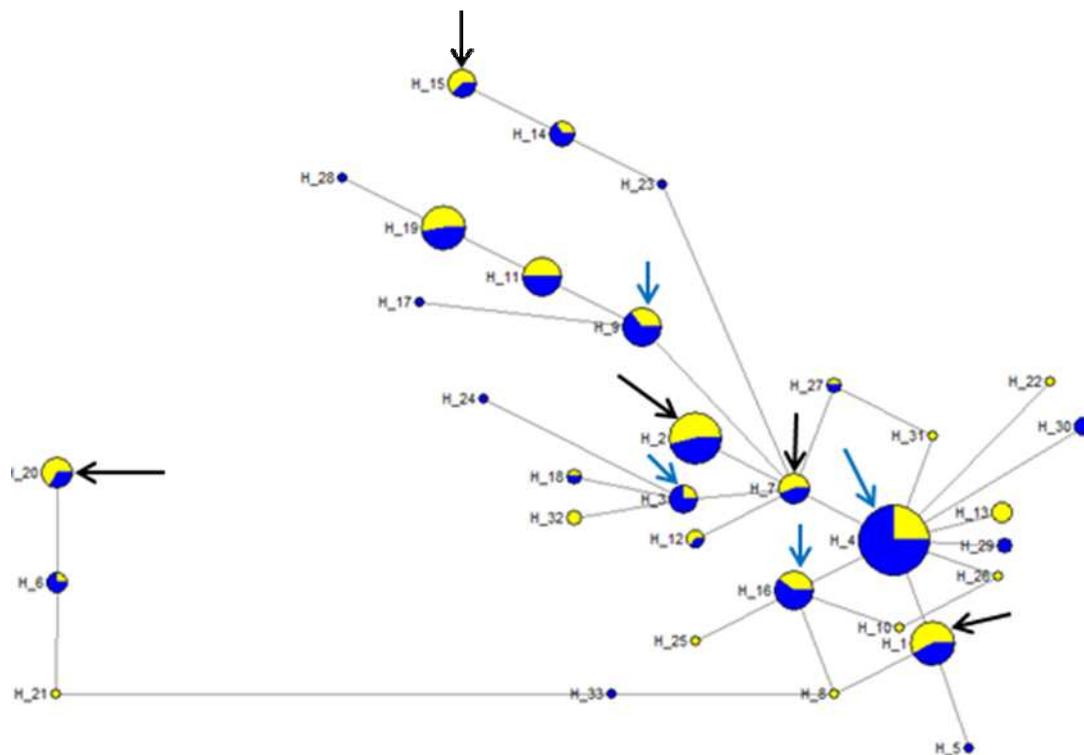


Figure 16 : Réseau haplotypique construit à partir de 223 séquences de MCR de phoques gris. Comparaison des années d'échouage paires et impaires

Bleu : années impaires. Jaune : années paires. Les flèches bleues correspondent aux haplotypes dominés par les années impaires. Les flèches noires correspondent aux haplotypes dominés par les années paires

Les tests de différenciation génétique ont aussi été réalisés pour les années paires et impaires en ne considérant soit que les phoques issus de la clinique "Hgc", soit que les phoque échoués morts "Hgs". Pour les "Hgc", le F_{st} calculé pour les microsatellites est statistiquement significatif ($F_{st\text{annéepaire/impaires}} = 0,003$) ainsi que le H_{st} , mitochondrial, ($H_{st\text{annéepaire/impaires}} = 0,005$). Pour les "Hgs", seul le S_{nn} , mitochondrial, est statistiquement significatif ($S_{nn\text{annéepaire/impaires}} = 0,588$).

Le caractère pair ou impair des années d'échouage a été utilisé pour définir deux groupes *a priori* pour le modèle Locprior du logiciel Structure. Avec les paramètres sans admixture et fréquences des allèles corrélées, une structure est observée (Figure 17). Cette structure est plus ou moins fortement détectée en fonction des itérations, mais elle montre bien que certains individus échoués les années paires sont génétiquement différents des autres mais que cette différence ne se retrouve quasiment pas les années impaires. Si l'on place une limite à 50% minimum de probabilité d'appartenance au cluster vert, on obtient 22 individus présentant une différence génétique avec les autres. Les 22 se sont échoués durant les années paires. L'ensemble des années paires, des sexes, des origines géographiques et des mois de l'année sont représentés dans ces 22 individus. Sur 22 individus, 12 haplotypes MCR

différents et les quatre haplogroupes sont représentés. Hormis le fait que seules les années paires soient présentes, il ne semble pas y avoir de tendance expliquant cette structure.

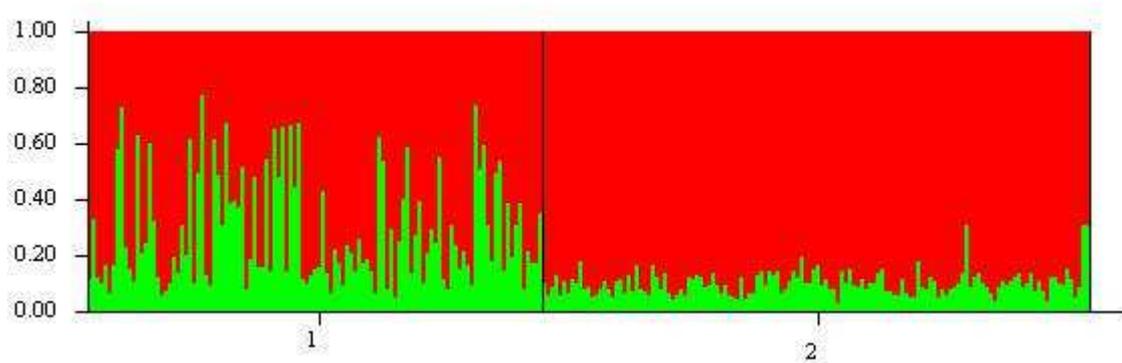


Figure 17 : Représentation graphique d'un exemple de résultat d'analyse réalisée par le logiciel Structure avec le modèle Locprior pour les années paires et impaires

Les 249 individus sont représentés alignés les uns à côté des autres en abscisse avec ceux échoués les années paires en 1 et ceux échoués les années impaires en 2. Pour chacun, les probabilités d'appartenance à l'un des deux groupes théoriques sont représentées par des codes couleur. La moitié des individus échoués les années paires ont des probabilités conséquentes d'appartenir au groupe théorique en vert alors que la quasi-totalité des individus échoués une année impaire ont de très faibles probabilités d'appartenir au groupe théorique vert. Une structure génétique est donc présente

L'analyse de structure utilisant le modèle Locprior pour les années paires et impaires a aussi été réalisée sans tenir compte de Hg3.6. Une structure, plus faible mais présente, est aussi détectée (résultats non présentés).

Une différence génétique est détectée pour les deux types de marqueurs entre les individus échoués les années paires et ceux échoués les années impaires. Elle se reflète par des valeurs *Fis* différentes, un *Fst* nucléaire, un *Fst* mitochondrial et un *Hst* significatif et enfin par une structure détectée à l'aide du modèle locprior.

Comparaison des cohortes

Les phoques de la clinique utilisés dans cette étude sont tous des individus juvéniles échoués et échantillonnés l'année de leur naissance. Une saison clinique se déroulant entre octobre et avril, elle se situe à cheval sur deux années civiles différentes, et il est apparu judicieux de comparer aussi les individus au sein d'une même cohorte, donc d'une même saison clinique. Dix groupes, 1 par saison clinique ont été définis. Tous les tests ont été effectués spécifiquement sur ces nouveaux groupes, mais aucune particularité génétique nouvelle n'a été déduite de ces résultats, qui sont globalement identiques à ceux obtenus en séparant les groupes par année civile, à part que les tests de différenciation génétique pour les

marqueurs mitochondriaux, significatifs pour les années civiles, ne le sont pas pour les cohortes.

Une éventuelle périodicité d'une année sur deux a aussi été recherchée. Mais, contrairement aux groupes réalisés sur la base des années civiles, pour lesquels une différence génétique significative a été constatée entre les années paires et impaires, une telle périodicité n'est pas retrouvée pour les groupes basées sur les saisons cliniques et donc les cohortes.

Comparaison des mois d'échouage (Novembre/Décembre/Janvier/Février/Autres)

Cinq groupes ont pu être définis sur la base du mois d'échouage des animaux : un groupe pour chacun des mois pour lesquels les échouages sont les plus importants en nombre (novembre, décembre, janvier et février) et un dernier groupe constitué des individus échoués entre mars et octobre.

Au niveau des marqueurs microsatellites, les groupes les plus petits (novembre et autres) sont constitués de 24 individus et le plus grand (janvier) de 91. (Tableau 12). Les richesses alléliques moyennes et les nombres moyens d'allèles privés sont relativement proches. Les *Fis* sont négatifs pour novembre et autres et positifs pour décembre, janvier et février. Deux groupes, décembre (*Fisdécembre* = 0,057) et février (*Fisfévrier* = 0,08), ont une valeur statistiquement significative. Aucune différenciation génétique entre les cinq groupes n'est détectée par le calcul des *Fst*.

Tableau 12 : Statistiques descriptives et indicateurs de différenciation génétique. Comparaison des mois d'échouages

		Novembre	Décembre	Janvier	Février	Autres
marqueurs microsatellites	nb d'individus	24	79	91	31	24
	<i>Ra</i>	6,57	6,43	6,58	6,92	6,51
	<i>Ap</i>	0,182	0,179	0,083	0,358	0,024
	<i>Fis</i>	-0,036	0,057*	0,024	0,08*	-0,019
	<i>Fst</i>			0		
marqueurs mitochondriaux	nb d'individus	23	66	78	28	28
	nb sites variables	24	27	26	16	23
	polymorphisme	4,98	5,6	5,39	3,32	4,77
	nb d'haplotypes	14	21	20	11	13
	<i>H</i>	0,94	0,89	0,92	0,9	0,92
	π	0,011	0,0077	0,0074	0,0065	0,0096
	<i>Fst</i>			0		
	<i>Snn</i>			0,27		
<i>Hst</i>			0,0078*			

Ra = Richesse allélique moyenne pour 24 individus. *Ap* = nombre moyen d'allèles privés. *H* = diversité haplotypique. π = diversité nucléotidique. * = statistiquement significatif à 5%.

Au niveau mitochondrial, les effectifs des groupes varient de 23 individus pour le groupe "novembre" à 78 pour "janvier" (Tableau 12). Le polymorphisme oscille entre Pfévrier = 3,32% et Pdécembre = 5,6%, le nombre d'haplotype entre 11 pour février et 21 pour décembre, la diversité haplotypique entre Hdécembre = 0,89 et Hnovembre = 0,94 et la diversité nucléotidique entre π février = 0,0065 et π novembre = 0,011. Le *Hst* est significatif alors que les deux autres tests de différenciation génétique ne détectent aucune différence entre les mois d'échouage. La représentation des groupes sur le réseau haplotypique (Figure 18) ne montre pas de différence notable dans la répartition des individus par mois d'échouage.

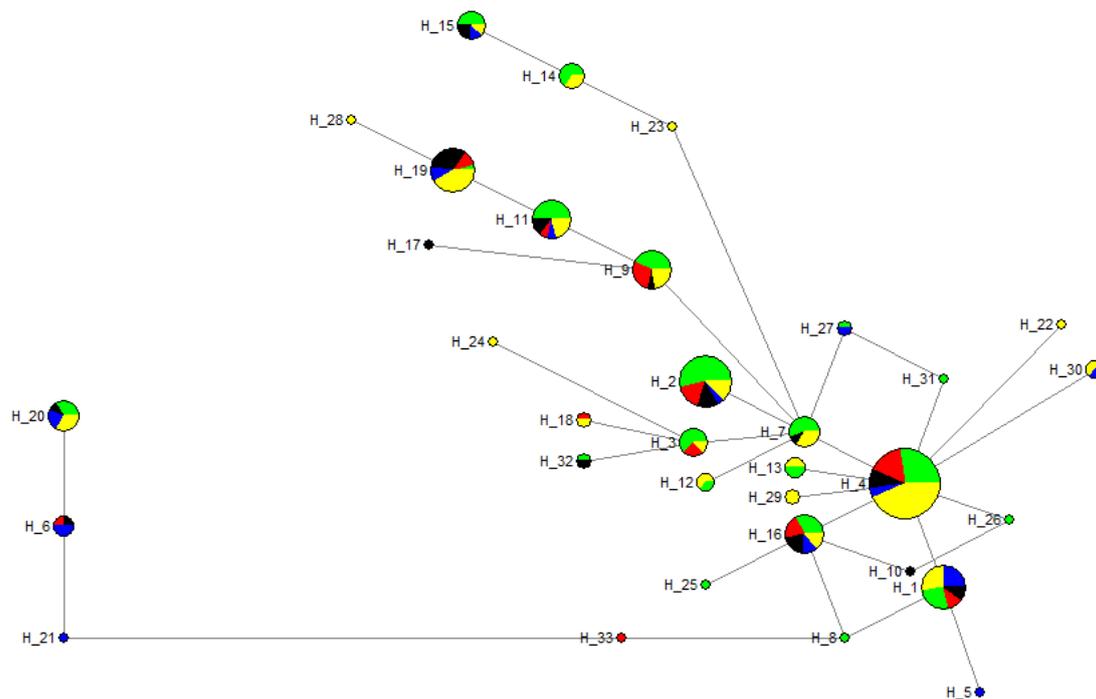


Figure 18 : Réseau haplotypique construit à partir de 223 séquences de MCR de phoques gris. Comparaison des mois d'échouages

Bleu : novembre. Jaune : décembre. Vert : janvier. Rouge : février. Noir : autres

Comparaison des zones d'échouages (Manche/Mer d'Iroise/ Golfe de Gascogne)

Trois groupes ont été définis en fonction de la zone d'échouage : Manche (façade nord de la Bretagne et nord de la France), mer d'Iroise (façade ouest de la Bretagne) et golfe de Gascogne (façade sud de la Bretagne et sud de la France). La limite entre la Manche et la mer d'Iroise est placée au niveau de Plougerneau et la limite entre la mer d'Iroise et le golfe de Gascogne se situe au niveau de la pointe du Raz. Les individus pour lesquels le lieu d'échouage n'est pas connu sont exclus de cette comparaison.

Au niveau des marqueurs microsatellites, le groupe Manche est constitué de 48 individus, mer d'Iroise de 82 et golfe de Gascogne de 108 (Tableau 13). Aucune différence de richesse génétique notable n'est observée. Le *Fis* est de -0,021 pour la Manche. Il est positif et statistiquement significatif pour la mer d'Iroise (*Fis*_{iroise} = 0,037) et le golfe de Gascogne (*Fis*_{gascogne} = 0,049). Aucune différenciation génétique entre les trois groupes n'est détectée par le *Fst*.

Tableau 13 : Statistiques descriptives et indicateurs de différenciation génétique. Comparaison des zones d'échouages

		Manche	mer d'Iroise	golfe de Gascogne
marqueurs microsatellites	nb d'individus	48	82	108
	<i>Ra</i>	7,25	7,63	7,79
	<i>Ap</i>	0,11	0,022	0,52
	<i>Fis</i>	-0,021	0,037*	0,049*
	<i>Fst</i>		0	
marqueurs mitochondriaux	nb d'individus	46	75	92
	nb sites variables	26	26	30
	polymorphisme	5,4	5,4	6,2
	nb d'haplotypes	18	20	25
	<i>H</i>	0,92	0,92	0,91
	π	0,0095	0,008	0,0078
	<i>Fst</i>		0	
	<i>Snn</i>		0,36	
	<i>Hst</i>		-0,0016	

Ra = Richesse allélique moyenne pour 48 individus. *Ap* = nombre moyen d'allèles privés. *H* = diversité haplotypique. π = diversité nucléotidique. * = statistiquement significatif à 5%.

Au niveau mitochondrial, le groupe Manche est constitué de 46 individus, mer d'Iroise de 75 et golfe de Gascogne de 92 (Tableau 13). Les groupes Manche et mer d'Iroise sont assez proches pour les différentes statistiques descriptives sauf pour la diversité nucléotidique qui est plus élevée pour la Manche (π_{manche} = 0,0095) que pour la mer d'Iroise (π_{iroise} = 0,008). Le golfe de Gascogne présente une plus grande variabilité avec notamment 25 haplotypes et un polymorphisme de 6,2%, sa diversité haplotypique (H_{gascogne} = 0,91) et nucléotidique (π_{gascogne} = 0,0078) sont proches de ceux de la mer d'Iroise. Les trois tests de différenciation génétique ne détectent aucune différence entre les 3 groupes. La représentation des groupes sur le réseau haplotypique (Figure 19) ne montre pas de différence notable dans la répartition des individus issus des trois zones d'échouages.

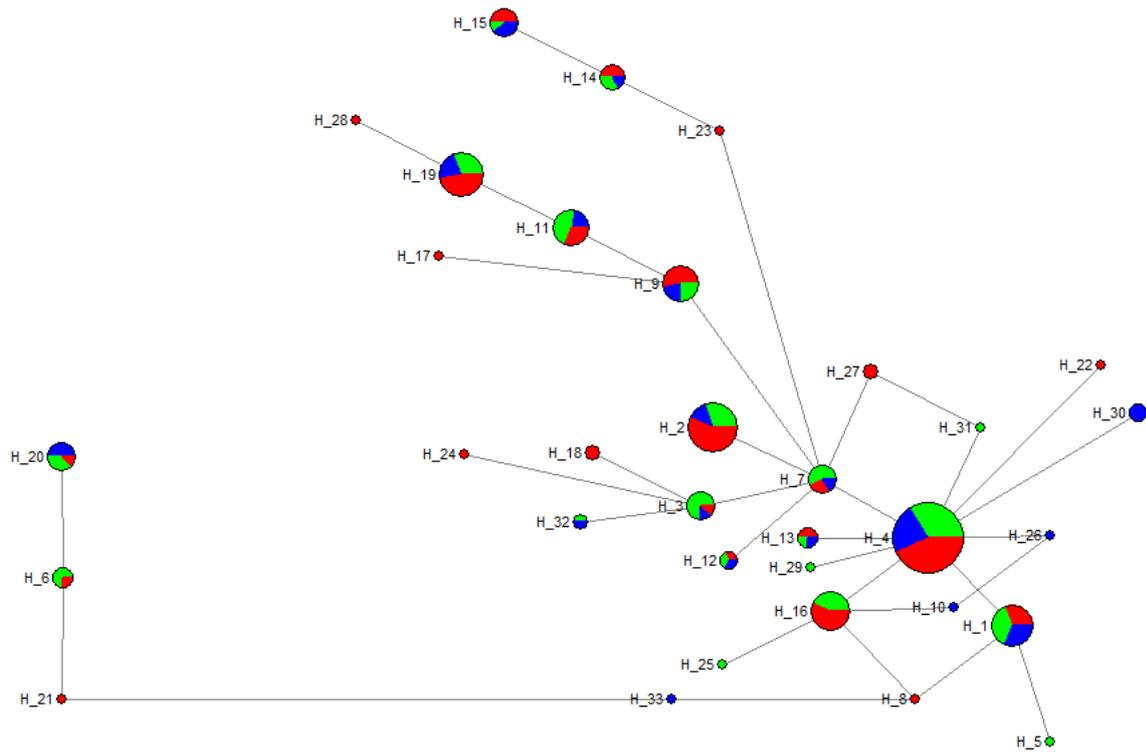


Figure 19 : Réseau haplotypique construit à partir de 213 séquences de MCR de phoques gris. Comparaison des zones d'échouages

Bleu : Manche. Vert : Mer d'Iroise. Rouge : Golfe de Gascogne.

Aucune différenciation génétique n'a été observée entre les trois zones géographiques d'échouage sur les deux types de marqueurs.

Ajout de séquences de MCR issues de fèces de phoques gris

Les fèces sont une source d'échantillons intéressante car ce sont des prélèvements non invasifs et qu'ils permettent de travailler sur des individus présents effectivement dans les colonies. Dans le cadre de cette étude, des séquences de MCR ont été amplifiées à partir d'ADN extraits de fèces de phoques gris collectés dans l'archipel de Molène et aux Sept Iles.

Dix-sept séquences issues de 17 fèces différents (voir Tableau 14) ont été ajoutées au 223 séquences de "Hgc "et "Hgs". Le résultat est un alignement de 240 séquences de 479 nucléotides. Des tests d'individualisation par analyse de loci microsatellites ont été effectués mais seuls 11 fèces ont pu être identifiés comme venant d'un individu original (résultats non présentés). Les autres peuvent être des doublons.

Tableau 14 : récapitulatif des séquences issues de fèces

Fèces	Lieu de collecte	Date de collecte	Haplotypes
HgF1	Molène	févr-06	18
HgF3	Molène	déc-06	18
HgF4	Molène	déc-06	1
HgF5	Molène	janv-07	1
HgF6	Molène	janv-07	19
HgF8	Molène	févr-07	18
HgF9	Molène	févr-07	29
HgF10	Molène	févr-07	17
HgF11	Molène	avr-07	2
HgF17	Molène	mars-08	18
HgF19	Molène	avr-08	18
HgF21	Molène	avr-08	18
HgF30	Molène	oct-10	6
HgF37	7 Iles	nov-12	18
HgF38	7 Iles	nov-12	8
HgF39	7 Iles	nov-12	18
HgF40	7 Iles	nov-12	18

Trente-trois sites variables sont retrouvés et forment 32 haplotypes (Figure 20). La forme du réseau issu des 223 séquences (Figure 8) n'est pas modifiée et aucun nouvel haplotype n'est apporté. Un haplotype, le 7 sur les réseaux issus des 223 séquences (Figure 8), a disparu avec la perte d'un site variable lors de la diminution de la taille de la séquence.

Les séquences issues de fèces se retrouvent dans huit haplotypes mais elles n'ont pas une répartition homogène dans le réseau. Par rapport aux quatre haplogroupes définis parmi les séquences de MCR, aucune n'est présente dans l'haplogroupe 3, seulement cinq dans l'haplogroupe 1, dont aucune dans l'haplotype 4 qui est le plus important. Le reste se répartit entre l'haplogroupe 2 (10 séquences) et l'haplogroupe 4 (deux séquences). La moitié du total (neuf séquences) se situe dans un seul haplotype, le 18. Il y a donc répartition très spécifique des séquences issues de fèces par rapport aux autres séquences de cette étude.

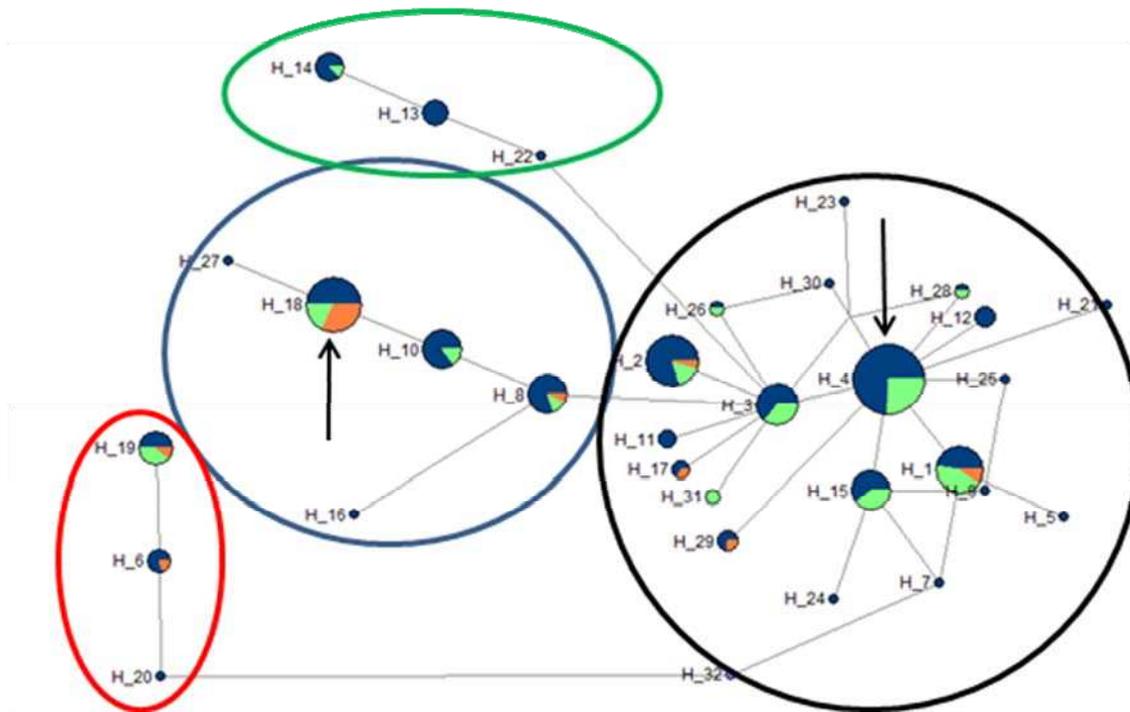


Figure 20 : Réseau haplotypique construit à partir de 240 séquences de phoques gris incluant les séquences de MCR issues des fèces de phoques gris aux deux autres sources d'échantillons

Bleu : animaux issus de la clinique des phoques d'Océanopolis (Hgc). *Vert* : animaux échoués morts issus du RNE (Hgs). *Orange* : séquences issues de fèces. Les ellipses représentent les haplogroupes. *Noir* : haplogroupe 1. *Bleu* : haplogroupe 2. *Vert* : haplogroupe 3. *Rouge* : haplogroupe 4. Les flèches noires indiquent l'haplotype 4 et l'haplotype 18 cités dans le texte.

Ajout des séquences de phoques gris de la mer Baltique

Pour une étude de génétique des populations du phoque gris en mer Baltique, Graves *et al.* (2009) ont séquencé la région de contrôle mitochondrial de 114 phoques gris de trois colonies de la mer Baltique (référence Genbank : AM287215 - AM287254). Ces séquences ont depuis été retravaillées et corrigées et 35 séquences d'haplotypes nous ont été transmis (M.T. Olsen, communication personnelle) pour comparaison des 33 haplotypes obtenus dans notre étude.

Une région commune de 388 nucléotides a été analysée pour ces 68 séquences. Quarante cinq positions variables forment 67 haplotypes différents (Figure 21). Un seul haplotype est commun entre les deux zones géographiques, l'haplotype 4 dans notre étude qui est aussi notre haplotype principal (Figure 21). Six haplogroupes différents peuvent être observés. Ils sont appelés de A à F. L'haplogroupe A regroupe le plus d'haplotypes différents, dont une grande partie d'haplotypes de Bretagne. Il correspond à notre haplogroupe 1 avec 6 haplotypes de mer Baltique en plus. Il contient le seul haplotype partagé entre les zones géographiques. L'haplogroupe B est très éloigné du A. Il correspond à notre haplogroupe 4 avec 11 haplotypes de Baltique en plus. L'haplogroupe C correspond à notre haplogroupe 3 avec sept haplotypes de Baltique en plus. L'haplogroupe D est un petit haplogroupe contenant seulement 3 haplotypes de Baltique. L'haplogroupe E est aussi uniquement composé d'haplotypes (6) de Baltique. Enfin l'haplogroupe F correspond à notre haplogroupe 2 en totalité. Aucun haplotype de Baltique n'y est présent. Au total il y a donc trois haplogroupes partagés entre Baltique et Bretagne, deux haplogroupes exclusivement Baltique et un exclusivement Bretagne.

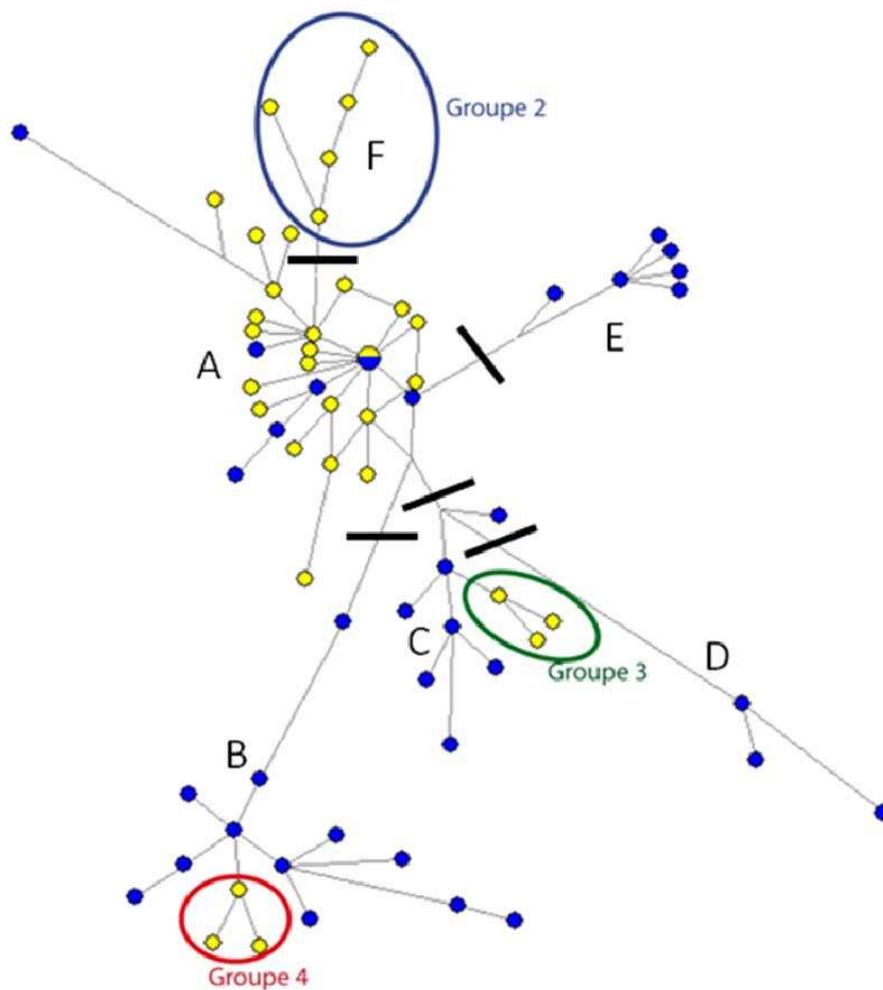


Figure 21 : Réseau haplotypique présentant les haplotypes de phoques gris échantillonnés en France et en Baltique

*Bleu : haplotypes retrouvés en mer Baltique (Graves et al., 2009 ; M.T. Olsen, communication personnelle).
 Jaune : haplotypes retrouvés le long des côtes françaises. Les traits noirs indiquent les séparations entre les haplogroupe de A à F. Les lettres indiquent les noms des haplogroupes définis par la comparaison des séquences de Baltique et de Bretagne. Les cercles représentent les haplogroupes définis par les séquences MCR de phoques gris des côtes françaises (Figure 8).*

Discussion

L'échantillonnage conséquent a permis une étude génétique portant sur les 10 dernières années

Deux sources principales d'échantillons différentes

Le suivi des échouages est un outil pertinent pour étudier les mammifères marins (Evans & Hammond 2004 ; Peltier *et al.* 2013) et les individus échoués sont souvent des sources de prélèvements pour des études de génétique, que ce soit des animaux échoués vivants (Kretzmann *et al.* 2006) ou morts (Fontaine, Baird, *et al.* 2007a). Le mélange des sources d'échantillons permet d'augmenter la taille de l'échantillonnage et d'affiner les résultats. Ainsi, l'ajout d'échantillons issus de marsouins échoués morts renforce les résultats obtenus sur les marsouins capturés accidentellement dans une étude en mer Baltique (Wiemann *et al.* 2010). Deux sources d'échantillons différentes ont été utilisées pour cette étude du phoque gris.

D'une part, 203 individus recueillis dans le cadre de la clinique des phoques d'Océanopolis ont été échantillonnés. Ce sont tous des individus juvéniles nés au cours de la saison de reproduction. Les animaux proviennent principalement de Bretagne (151 individus) mais aussi de toute la France, et même d'Espagne pour trois d'entre eux. L'effort d'échantillonnage a été constant sur l'ensemble de la période étudiée, de la saison de reproduction 2002/2003 à la saison 2011/2012 et la totalité des échantillons disponibles, a été utilisée lors cette étude.

D'autre part, 66 phoques gris, échantillonnés dans le cadre du Réseau National Echouage, ont été inclus dans cette étude. Il s'agit d'individus de tous âges, mais avec une majorité de juvéniles. En se basant sur des tailles limites pour définir des classes d'âge, 9 peuvent être considérés comme des adultes et 10 comme des sub adultes, les autres, 30, étant des juvéniles et 17 de taille indéterminée. L'ensemble des prélèvements de phoques gris disponibles dans la banque d'échantillons d'Océanopolis, qui regroupent les prélèvements de la partie bretonne du RNE, a été utilisé dans cette étude. Les protocoles de prélèvements sont standards sur la durée de l'étude.

Un échantillonnage pertinent pour une analyse génétique sur plus de 10 ans

Nos échantillons permettent de réaliser des extractions d'ADN et des amplifications de régions ciblées par PCR de bonne qualité, ceci même après plus de dix ans de conservation à -20°C, pour la majorité des échantillons. Cependant, le taux de séquençage et de génotypage est légèrement inférieur chez les animaux échoués morts que chez ceux échoués vivants, certainement à cause de l'état de dégradation de certains individus échoués morts.

Notre échantillonnage de 269 individus est consistant pour détecter une structure génétique. Nous avons cinq fois plus d'individus que pour l'analyse génétique du marsouin commun qui montrait une structure génétique avec 50 individus. L'étude génétique des phoques gris de Graves *et al.* (2009), portaient sur 131 individus provenant de trois colonies de la mer Baltique et une différenciation génétique est observée (Graves *et al.* 2009). Une étude montre que 25 à 30 individus suffisent pour estimer convenablement les fréquences alléliques de loci microsatellites au sein d'une population et donc de détecter des différenciations entre groupes s'il en existe (Hale *et al.* 2012). Pour les comparaisons des groupes définis à priori, notre échantillonnage permet d'avoir des groupes de taille suffisante pour des comparaisons significatives, que ce soit au niveau de la géographie, des paramètres biologiques ou des comparaisons temporelles. Seules les comparaisons par année ou par saison clinique, font apparaître certains groupes de moins de 10 individus, ce qui rend les comparaisons difficiles, mais le groupement d'années entre elles permet de limiter cette difficulté.

Un échantillonnage représentatif des phoques d'un peuplement plus large que la Bretagne

Une grande majorité des individus de notre étude sont des juvéniles de l'année et peu de sub-adultes et d'adultes sont présents. Cela peut aussi être un biais de représentativité. Cependant, génétiquement, les juvéniles sont représentatifs de leurs parents et donc de la population dans son ensemble. De plus, le travail sur des juvéniles de l'année, provenant de la clinique, permet d'avoir des résultats par cohortes puisque qu'il n'y a pas de mélange des cohortes entre elles. Le suivi des jeunes de l'année permet donc de suivre l'évolution de la structure génétique au cours du temps.

Les phoques gris sont capables de grands déplacements, que ce soit la première année ou durant le reste de leur vie, et de nombreux échanges ont été observés entre la Bretagne, et les Iles britanniques (Vincent *et al.* 2005). La majorité des jeunes de l'année observés en Bretagne sont des animaux issus des colonies britanniques (Prieur & Duguay 1978 ; Prieur 1984 ; Vincent 2001). Les phoques présents en mer d'Iroise ne forment donc pas un groupe isolé mais font partie d'un peuplement à une échelle géographique plus large. De plus, il a été montré, par méthode de marquage-recapture que les juvéniles réhabilités se retrouvaient pour une partie d'entre eux dans la mer d'Iroise et le long des côtes bretonnes et, pour une autre partie, dans les colonies britanniques (Vincent *et al.* 2002). Les individus de notre échantillonnage ne sont donc pas représentatifs des côtes bretonnes uniquement mais plutôt d'une population plus large du sud-ouest des Iles britanniques et de la Bretagne (Harkonen *et al.* 2007).

Une grande diversité génétique pour la région de contrôle mitochondriale

Le marqueur MCR est le plus polymorphe

Chez les mammifères marins, trois portions de l'ADN mitochondrial sont couramment utilisées comme marqueurs génétiques. Il s'agit de la région de contrôle mitochondriale (MCR), du gène codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase (*cox1*) et du gène codant pour le cytochrome b (*Cytb*). Ces trois marqueurs n'avaient jamais été comparés chez le phoque gris et nous ne savions pas lequel était le plus informatif, c'est à dire quel marqueur permettrait de mieux discriminer des groupes génétiques différents. Comme MCR est une région non codante de l'ADN mitochondrial, il était attendu que son polymorphisme soit plus important que pour les deux autres gènes (Arif *et al.* 2011). Par exemple dans le genre *Orcinus*, le taux moyen de substitution, par site et par millions d'années, de MCR est estimé à 0,00444, celui de COI à 0,00231 et celui de Cyt b à 0,00176 (Duchêne *et al.* 2011). Cependant un polymorphisme important, n'entraîne pas toujours une meilleure information génétique. Ainsi, le fort polymorphisme peut entraîner de l'homoplasie, c'est à dire des événements de mutations différents se produisant sur le même site. Lorsque l'homoplasie est trop importante, cela diminue la puissance de séparation génétique du marqueur. Par exemple à l'échelle de la famille des Delphinidés, le taux de substitution de MCR n'est plus deux fois plus élevé comme pour le genre *Orcinus* que celui des gènes mitochondriaux, mais seulement 1,2 fois plus élevé. Il y a eu une diminution de l'écart de polymorphisme dû à une saturation plus rapide du marqueur MCR (Duchêne *et al.* 2011). D'autre part, l'utilisation de marqueurs moins polymorphes peut aussi permettre de diminuer la variabilité, et ainsi, de simplifier l'analyse tout en conservant la discrimination des grands groupes génétiques.

Une étude pilote a été mise en place dès le début de cette étude dans ce but. Les 3 marqueurs ont été séquencés chez 40 individus. Des séquences exploitables ont été obtenues pour au moins 31 individus par marqueur. Comme cela était attendu, MCR est le marqueur le plus polymorphe avec 22 sites variables, 13 haplotypes, une diversité haplotypique importante et une diversité nucléotidique 5 fois plus forte que *cytb* et *Cox1*. C'est aussi le seul marqueur qui ne présente pas d'haplotype majoritaire dans le groupe d'échantillons. De plus, les réseaux haplotypiques construits à partir des séquences *cytb* et *Cox1* présentent une configuration en étoile ne faisant pas apparaître de groupes génétiques clairement séparés, contrairement à MCR. La concaténation des trois marqueurs apporte des informations supplémentaires par rapport à l'analyse du seul marqueur MCR mais peu de polymorphisme supplémentaire (10 positions variables et 3 haplotypes nouveaux) et ne permet pas d'observer d'autres haplogroupes. Nous avons choisi de poursuivre l'étude sur l'ensemble de nos individus sur le marqueur MCR uniquement.

Cependant, l'utilisation d'autres marqueurs que MCR est pertinente, notamment parce que les marqueurs soumis à sélection ne réagissent pas de la même manière que les marqueurs neutres. Mais aussi, parce qu'il a été montré qu'un seul marqueur n'est pas suffisant pour retranscrire l'information génétique du chromosome mitochondrial dans son ensemble (Duchêne *et al.* 2011). Il serait donc intéressant d'analyser les séquences des 269 phoques de cette étude, pour un autre marqueur. Des travaux, dans ce sens, sont en cours au laboratoire.

Une hétéroplasmie de taille présente chez un nombre important d'individus

L'hétéroplasmie est la présence de plusieurs génomes mitochondriaux différents au sein d'une cellule ou d'un individu. Elle peut être due à une recombinaison, une mutation ou une transmission paternelle de chromosome mitochondrial lors de la fécondation (Kmiec *et al.* 2006). La variabilité d'expression, entre individus ou au sein d'un individu, de certaines maladies, peut être due à la présence d'hétéroplasmie, comme par exemple pour le diabète avec surdité de transmission maternelle (Laloi-Michelin *et al.* 2009). La présence d'hétéroplasmie est sous estimée dans les études de génétique des populations et souvent confondue avec un artefact technique (Vollmer *et al.* 2011).

Dans notre étude, l'hétéroplasmie du marqueur MCR a été observée pour 17 individus, soit 7,1 %. Il s'agit, à chaque fois, d'une hétéroplasmie de taille qui se situe après une répétition du motif C (ou G sur le deuxième brin). Nous trouvons des hétéroplasmies dans les deux échantillonnages, chez des mâles et des femelles et tout le long de notre période d'étude. Des hétéroplasmies ont déjà été observées chez les mammifères marins, chez plusieurs espèces de cétacés et de pinnipèdes (Vollmer *et al.* 2011) mais cela n'a pas encore été décrit chez le phoque gris, à ma connaissance. Dans les travaux de génétique de population du phoque gris de la mer Baltique portant sur MCR, aucune hétéroplasmie n'est signalée (Graves *et al.* 2009). En comparaison des proportions observées chez les cétacés par Vollmer *et al.*, la proportion de phoques gris présentant cette hétéroplasmie est importante, bien en dessous de celle des dauphins tachetés de l'Atlantique (58,9%) mais supérieure à celle du grand dauphin (2,7%) par exemple.

Une forte richesse génétique mitochondriale

Les séquences de MCR déterminées à partir de 223 échantillons différents mettent en évidence plusieurs éléments. Tout d'abord, un haut niveau de polymorphisme au sein de l'échantillonnage : 7% des positions sont variables, et 33 haplotypes ont pu être définis. La comparaison des résultats obtenus avec d'autres études, menées chez différentes espèces de mammifères marins, confirme bien ce haut niveau de polymorphisme (Tableau 15). Par exemple, le lion de mer australien, sur une échelle géographique similaire, présente une plus faible richesse génétique et une diversité haplotypique indiquant la présence d'haplotype dominant (Lowther *et al.* 2012). Le marsouin commun le long des côtes atlantiques françaises qui accueillent deux populations différentes, d'origine ibérique ou de l'Atlantique nord ouest (voir chapitre 2), présente lui aussi une diversité génétique plus faible que le phoque gris. Si on s'intéresse à d'autres cétacés, on peut observer des diversités génétiques plus importantes chez le dauphin commun en Atlantique nord est, avec pourtant un nombre d'individus étudiés 3 fois plus petit mais à plus grande échelle géographique, cette étude recouvrant le plateau celtique et les côtes irlandaises (Mirimin *et al.* 2009), ou chez la baleine à bosse le long des côtes est de Madagascar (Mendez et Jung, communication personnelle). Sur le phoque gris, l'étude de Graves *et al.* (2009), menée sur les phoques de la Baltique met en évidence une

richesse génétique plus importante qu'en France : les séquences de MCR des phoques de la mer Baltique sont encore plus polymorphes, les haplotypes plus diversifiés et la diversité nucléotidique près de deux fois plus forte. Cependant les études n'ont pas été réalisées à échelle géographique équivalente, puisque l'étude de Graves porte sur trois colonies séparées de plus de 1000 km. L'étude de Walton et Stanley (non publiée, citée dans Ridoux *et al.* 2000) identifie 63 haplotypes différents sur 214 phoques gris du Canada, du Royaume Uni, de la Bretagne, de la Baltique et de la Norvège, dont 9 haplotypes spécifiques à la Baltique. Pour un nombre équivalent d'individus mais une zone géographique beaucoup plus vaste, ils identifient seulement le double d'haplotypes que dans notre étude.

En regard de ces comparaisons, la richesse génétique observée dans cette étude semble être importante pour une telle échelle géographique, notre étude se basant sur des échantillons de toute la côte Atlantique française mais dont la majorité (plus de 80%) provient de la région Bretagne.

Tableau 15 : comparaison du polymorphisme et des indices de diversité pour le marqueur MCR chez plusieurs espèces de mammifères marins

Espèce	Zone géographique	Nb de séquences	P	Nb haplotypes	H	π	Référence
Phoque gris	France	223	7,05	33	0,92	0,00816	cette étude
Phoque gris	Baltique	114	10.2	46	0,96	0,0156	(Graves <i>et al.</i> 2009)
Phoque gris	Europe et Canada	246	NI	63	NI	NI	Ridoux <i>et al.</i> , 2000
Lion de mer Australien	Sud de l'Australie	478	4,53	21	0,53	0,0069	(Lowther <i>et al.</i> 2012)
Dauphin commun	Nord Est Atlantique	78	NI	39	0,97	0,018	(Mirimin <i>et al.</i> 2009)
Marsouin commun	France	50	4,13	15	0,84	0,00638	(Alfonsi <i>et al.</i> 2012)
Baleine à bosse	Madagascar	60	7,5	36	0,90	0,016	Mendez et Jung, non publié

P = polymorphisme en %. H = diversité nucléotidique. π = diversité nucléotidique. NI = non indiqué par les auteurs

Un réseau présentant 4 haplogroupes différents sans explication

Le réseau haplotypique a montré que les 33 haplotypes, identifiés dans cette étude, ne forment pas un seul groupe homogène. Quatre haplogroupes ont été caractérisés sur la base de la proximité des haplotypes en leur sein par rapport à l'éloignement des autres. L'haplogroupe 4 est défini par le nombre important de mutations (5) qui le sépare de l'haplotype le plus proche. L'haplogroupe 3 est composé de trois haplotypes séparés chacun d'une mutation, mais

éloignés par 3 mutations au moins des haplotypes les plus proches. L'haplogroupe 2 est peu éloigné des autres haplotypes car le plus proche se situe à 2 mutations mais ces trois haplotypes principaux sont proches et composés d'un nombre conséquent d'individus, plus de 14 chacun. L'haplogroupe 1, composé de la majorité des individus (65%), est basé sur une charnière centrale de 6 haplotypes, dont 4 des 6 haplotypes ayant le plus d'individus, séparés par une mutation entre chaque haplotype avec autour de nombreux haplotypes minoritaires, que nous avons regroupés dans le même haplogroupe. Ces 4 haplogroupes, définis à partir de réseaux haplotypiques qui présentent des chemins mutationnels, sont aussi retrouvés dans l'analyse par positionnement multi dimensionnel non métrique. Cette analyse est basée sur un principe différent et utilise des données de distances génétiques entre les haplotypes. Néanmoins, elle permet de ré-identifier les 4 mêmes haplogroupes, dont un central et trois plus périphériques dans le graphique. Cette double caractérisation des 4 haplogroupes, à l'aide d'une méthode d'analyse des distances et d'une méthode de parcimonie, renforce très largement la probabilité d'une existence réelle de ces 4 groupes.

Les quatre haplogroupes sont donc bien définis en termes de distance génétique et de nombre de mutations. Des distances équivalentes séparaient les groupes alpha et beta chez le marsouin commun, expliqués par des origines géographiques différentes (Alfonsi *et al.* 2012). Cependant, chez le phoque gris, aucune explication claire ne semble provenir des recherches de liens entre les haplogroupes et les différents paramètres, temporels, géographiques ou biologiques que nous avons analysés,

Il est possible que des paramètres, que nous n'avons pas pu tester, expliquent cette séparation, comme par exemple des populations différentes, génétiquement distinguables, et dont seraient originaires nos individus. La mer d'Iroise étant la limite sud de répartition, les seules origines possibles à priori pour les phoques gris en Bretagne, sont les colonies britanniques, côté plateau celtique, ou éventuellement des individus de mer du Nord ayant traversé la Manche. Dans les suivis de télémétrie, la majorité des déplacements d'individus se fait au niveau du plateau Celtique (Vincent *et al.* 2005). Très peu d'individus marqués ou suivis par télémétrie en Bretagne se sont déplacés jusqu'à la mer du Nord (Vincent 2001 ; Vincent *et al.* 2005). Aussi, s'il y a plusieurs origines populationnelles, il s'agit, selon toute vraisemblance, de populations différentes du plateau celtique. Les phoques gris sont phylopatriques, c'est à dire qu'ils reviennent se reproduire sur leur lieu de naissance, et une phylopatricie régulière sur le long terme peut entraîner une structuration génétique, malgré des déplacements importants hors période de reproduction (Pomeroy *et al.* 2000). Aucune étude génétique du phoque gris à grande échelle géographique n'a encore été réalisée, et pour l'instant l'existence éventuelle de populations distinctes de phoques gris dans les colonies britanniques n'est pas connue.

Une deuxième hypothèse, qui pourrait expliquer les 4 haplogroupes observés, serait l'existence d'une structure génétique ancestrale issue d'une séparation ancienne de plusieurs populations de phoques gris, qui expliquerait cette richesse génétique actuelle importante. Au

vu des déplacements importants des phoques gris au sein du plateau Celtique (Vincent *et al.* 2005), des comportements individuels variés qui entraînent une phylopatricie seulement partielle (Pomeroy *et al.* 2000) et de l'écart génétique important existant entre les haplogroupes, l'hypothèse de la structure ancestrale me paraît la plus pertinente. La structuration génétique actuelle à l'échelle du plateau celtique, si elle existe, devrait plutôt s'observer à travers des différences de fréquences haplotypiques, qui sont des paramètres plus sensibles et qui nécessitent moins de différenciation génétique pour être significatifs (Moritz 1994).

Une absence de structure génétique détectée par les marqueurs nucléaires

Des loci polymorphes et une richesse génétique conséquente

Deux cent quarante neuf individus ont été génotypés pour sept loci. Les sept loci microsatellites analysés sont polymorphes et présentent de 7 à 12 allèles, pour une moyenne de 8,7 allèles par locus. L'indice de fixation *F_{is}* est positif pour six loci et négatif pour un seul (Hg6.1). Il est très fort et significatif pour Hg3.6, ce qui peut indiquer la présence d'allèles nuls. Le *F_{is}* global des 7 loci est, lui aussi, positif et significatif ; ce qui peut être le signe d'une structure génétique interne. Néanmoins, le locus Hg3.6 a une forte influence sur cette valeur globale. Lorsqu'il est retiré de l'analyse, le *F_{is}* total n'est plus significatif. Cependant, le fait que 5 autres loci présentent aussi une valeur de *F_{is}* positif peut aussi démontrer l'existence d'une structure interne, mais non significative, même sans considérer Hg3.6. Nous avons décidé de garder le locus Hg3.6 pour le reste de l'étude et de faire certains tests avec et sans, comme cela a été fait dans les deux autres études sur le phoque gris (Allen *et al.* 1995 ; Graves *et al.* 2009).

Les nombres d'allèles par locus sont relativement proches entre les trois études (Allen *et al.* 1995 ; Graves *et al.* 2009 ; cette étude), et donc entre les zones géographiques (Tableau 16). Il n'est pas possible de déterminer les correspondances exactes entre allèles dans les différentes études, car nous n'avons pas d'échantillons en commun pour calibrer les tailles d'allèles. Graves *et al.*, qui ont pu comparer les allèles obtenus dans leur étude à ceux de l'étude de Allen *et al.*, indiquent que sur 63 allèles observés en Baltique (un 8ème locus a été utilisé dans ces deux études mais pas dans la nôtre) 10 étaient spécifiques à la Baltique (16%) et 11 allèles supplémentaires (17%) étaient spécifiques à l'Ecosse. On peut supposer qu'il en est de même pour les allèles observés en France, c'est à dire qu'une petite partie de nos allèles sont spécifiques à la Bretagne. La richesse génétique est légèrement plus importante en France qu'en mer Baltique, où le nombre d'individus échantillonnés est moitié plus faible, ou en Ecosse, où le nombre d'individus échantillonnés est 4 fois plus important. Cependant, l'abondance du phoque gris est beaucoup plus faible en Bretagne, et même en tenant compte

de l'ensemble du plateau celtique, qu'en Ecosse où se regroupent 90% des phoques gris des îles britanniques, soit autour de 90 000 individus (SCOS, 2012). Il est donc surprenant que les richesses alléliques soient équivalentes entre les deux zones, cela renforce l'idée de la forte richesse génétique des phoques gris de cette étude.

Tableau 16 : Comparaison du nombre d'allèles et des écarts à l'équilibre de Hardy-Weinberg par loci

Etude	Cette étude		(Allen <i>et al.</i> 1995)		(Graves <i>et al.</i> 2009)	
Zone d'étude	France		Ecosse		mer Baltique	
Nb individus	249		1134		131	
	nA	Ecart HW	nA	Ecart HW	nA	Ecart HW
Hg4.2	8		8	*	6	*
Hg3.6	8	*	8		6	
Hgdii	9		8	*	6	*
SGPv9	7		7		8	*
Hg6.1	7		6		8	
Hg8.9	12		11		11	*
Hg8.10	10		10		9	*
total	61	*	58	NI	54	NI

nA = nombre d'allèle. * = écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg significatif. NI = non indiqué par les auteurs

Aucune structure génétique détectée dans l'analyse globale

Malgré la présence d'un *Fis* positif et significatif pour les 7 loci cumulés, l'analyse bayésienne par "clustering" ne détecte aucune structure génétique au sein de notre échantillonnage, ce qui montre une homogénéité génétique au sein de notre échantillonnage et implique un mélange génétique suffisant.

Puisque 4 haplogroupes génétiques ont été identifiés à l'aide du marqueur MCR, il était important de savoir si des différences étaient aussi retrouvées au niveau nucléaire. Aucune différenciation génétique entre les haplogroupes n'a été observée. Le modèle Locprior du logiciel structure permet d'améliorer la détection des faibles différenciations génétiques à l'aide d'un *a priori*, typiquement une suspicion de présence de groupes déjà définis (Hubisz *et al.* 2009). L'utilisation des 4 haplogroupes comme *a priori* n'a pas permis à l'analyse bayésienne par "clustering" de détecter une structuration correspondante au niveau des marqueurs microsatellites. Les haplogroupes mitochondriaux ne sont donc pas retrouvés au

niveau nucléaire. Comme les marqueurs mitochondriaux sont haploïdes, il n'y a pas de brassage entre les deux parents comme c'est le cas avec les marqueurs diploïdes, comme les microsatellites. Il est donc possible de conserver une structure ancestrale sur les marqueurs mitochondriaux, même après un mélange génétique entre les membres de populations différentes, car les individus seront toujours représentatifs de la lignée maternelle. Alors qu'il suffit d'un accouplement entre individus de deux populations différentes pour que soit brassés les marqueurs nucléaires, qui ne conserveront donc pas la structure ancestrale. Ceci conforte l'hypothèse que la richesse génétique mitochondriale est issue d'une structure ancestrale plutôt que de la présence de plusieurs populations différenciées au sein de notre échantillonnage.

Les paramètres géographiques, biologiques ou les types d'échantillonnages n'amènent pas de différenciation génétique marquée

Une comparaison de tous les paramètres disponibles

L'analyse totale des marqueurs nucléaires ne permet pas d'établir de structure génétique et celle des marqueurs mitochondriaux ne permet pas d'obtenir d'explications aux 4 haplogroupes. Aussi, des comparaisons de groupes, définis *a priori* à partir des informations disponibles sur les phoques échantillonnés, ont été effectuées :

- une comparaison des deux sources d'échantillonnages afin de s'assurer qu'elles ne présentent pas de différences génétiques, et donc, que l'on peut les rassembler pour renforcer le nombre d'échantillons
- une comparaison des mâles et des femelles car les comportements peuvent être différents entre les sexes, par exemple au moment du sevrage où les mâles peuvent parcourir de plus grandes distances que les femelles (Riedam 1990).
- Des différences génétiques liées à la géographie sont couramment observées (par exemple Fontaine, Baird, *et al.* 2007a). Une comparaison des zones géographiques a donc été faite, pour déterminer si les zones d'échouages présentent des différences génétiques. Afin d'avoir des groupes de tailles comparables, trois zones ont été définies. La zone mer d'Iroise est la plus proche du plateau celtique et de la colonie de Molène. La zone Manche est la plus proche de la mer du Nord et de la colonie des Sept-Îles. La zone golfe de Gascogne est la plus éloignée des colonies de phoques gris.
- Une comparaison des mois d'échouages car il a été montré que la période de reproduction n'avait pas lieu en même temps pour toutes les colonies (Bonner 1981)

- Une comparaison des saisons cliniques, c'est à dire des saisons de reproduction, pour déterminer s'il existe une variation entre les périodes de reproduction au cours des 11 ans. Une comparaison des saisons, en en prenant une sur deux, a aussi été effectuée.
- Une comparaison des années pour déterminer la présence de variations annuelles et d'enrichissement au cours du temps. Pour avoir des groupes de tailles comparables, un regroupement en deux groupes d'années (avant 2008 et de 2008 à 2012) a été fait.
- La comparaison des années semblant montrer une différence entre les années paires et impaires, un regroupement des deux à été fait.

Pour l'ensemble de ces groupes, le nombre d'individus est suffisant pour faire des comparaisons fiables, à l'exception des comparaisons de l'ensemble des années et des saisons cliniques où certains groupes sont trop petits. Le groupement des années permet de passer outre ce problème ; mais cela peut faire perdre une partie de l'information temporelle.

Pour chacune de ces comparaisons, plusieurs analyses ont été faites. Pour les marqueurs microsatellites, une comparaison de la richesse allélique et du nombre moyen d'allèles privés permet d'identifier des différences de richesse génétique et le calcul du *Fst* permet d'estimer s'il existe une différence significative entre groupes d'individus. Pour les marqueurs mitochondriaux ont été faites : une analyse graphique du réseau haplotypique pour identifier la présence spécifique de groupe au sein d'haplotype ou d'haplogroupe, la comparaison du polymorphisme, du nombre d'haplotype, de la diversité nucléotidique et de la diversité haplotypique pour identifier des différences de richesse et de diversité génétique et l'utilisation de trois tests de différenciation pour identifier s'il existe une différence génétique significative entre les groupes. Ces trois tests ne sont pas calculés de la même manière ce qui les rend complémentaires mais il est aussi possible qu'ils donnent des résultats différents. Le *Fst* mitochondrial est calculé à partir du nombre moyen de différences entre les individus et la significativité est déterminée par tests de permutations (Excoffier *et al.* 2005). Le *Snn* est calculé à partir des proportions d'individus présentant des séquences proches, c'est à dire que la valeur du *Snn* correspond à la probabilité que le plus proche voisin fasse partie du même groupe, la significativité est déterminée par tests de permutations (Hudson 2000). Le *Hst* est calculé à partir des fréquences haplotypiques avec une comparaison par un test de χ^2 (Hudson *et al.* 1992).

Peu de différenciations génétiques observées entre les différents groupes

La majorité des comparaisons génétiques effectuées ne montrent aucune différenciation génétique. Aucune différenciation n'a été observée entre les échantillons issus des phoques échoués vivants et ceux issus des phoques échoués morts, l'utilisation des deux sources d'échantillonnage conjointement, pour augmenter la puissance des analyses, est donc justifiée. Aucune différenciation entre les sexes, les zones d'échouages et les saisons de reproduction n'est observée. Une légère différenciation entre les mois d'échouages est estimé

pour un test de différenciation mitochondrial, cependant comme les autres tests ne sont pas significatifs, il s'agit, soit d'une très faible structure, soit d'un artefact.

Les tests de différenciations génétiques mitochondriaux, entre les années, sont les trois significatifs, ce qui indique la présence de variabilité entre les années. De plus le *Fst* nucléaire, bien que non significatif, est différent de 0, ce qui peut indiquer la présence d'une faible structure entre les années. La comparaison des richesses alléliques, du polymorphisme et du nombre d'haplotypes au cours des années ne montrent pas de tendance particulière. Les valeurs sont proches d'une année sur l'autre, et les années les plus récentes ne présentent pas une plus grande richesse génétique. Ceci se retrouve aussi dans l'analyse des saisons cliniques. La comparaison entre de nombreux groupes de petite taille peut fausser l'analyse, mais un résultat similaire (pas d'accroissement de la diversité génétique) est aussi retrouvé en formant seulement deux grands groupes, avant 2008 et entre 2008 et 2012. Les tests (non présentés ici) entre des groupes de deux années successives et ceux entre groupes de trois années successives, ne montrent pas non plus de variation de la richesse génétique. Il n'y a donc clairement pas eu d'enrichissement génétique au cours des dix dernières années, en parallèle de l'augmentation d'abondance des phoques gris en mer d'Iroise. Un autre schéma de variation temporelle est observé.

Une différence génétique périodique est identifiée par plusieurs types d'analyses entre les années paires et impaires

Deux groupes, formés, l'un des échantillons prélevés lors des années paires et l'autre de ceux prélevés lors des années impaires, montrent des richesses génétiques quasi similaires. Par contre, plusieurs tests de différenciation génétique montrent l'existence d'une structure entre les deux groupes pour les marqueurs nucléaires, avec un *Fst* positif et significatif ainsi que pour les marqueurs mitochondriaux un *Fst* et un *Hst*, tous deux significatifs. Seul le *Snn* n'est pas significatif. Les années impaires présentent aussi un *Fis* plus fort que les années paires. L'analyse du réseau haplotypique permet d'observer, malgré le faible nombre d'haplotypes privés, une répartition différente entre les deux groupes (années paires -années impaires) avec des dominances claires d'haplotypes. Selon l'AMOVA, 8,2% de variabilité mitochondriale est expliqué par la répartition en années paires et impaires, ce qui correspond quasiment à l'ensemble de la variabilité expliqué par la répartition en année. Il semble donc que la différence entre les années paires et impaires soit la principale raison de l'observation de la différenciation génétique temporelle. L'analyse bayésienne par "clustering" utilisant le modèle Locprior montre la présence d'une structure au sein des années paires et pas du tout pour les années impaires. Il semble donc que certains individus de notre étude soient différents génétiquement et qu'ils se soient échoués en très grande majorité les années paires ce qui entraîne la différenciation entre les deux groupes.

Cette différence détectée entre les années paires et impaires est très surprenante et inattendue et il est toujours possible que cette différenciation génétique soit un artefact d'échantillonnage ou due au hasard. De plus, cette différenciation n'est pas totale et la structure

observée est significative mais faible. Cependant, le fait d'observer une différenciation pour les deux marqueurs, par quatre analyses différentes (*Fis*, *Fst* nucléaires, test de différenciation mitochondriaux et analyse par clustering) et pour des groupes d'au moins 100 individus, renforce considérablement ce résultat.

Peu d'étude de génétique des populations effectuent des comparaisons temporelles à l'échelle des années, la majorité se concentrant sur des structures géographiques et/ou saisonnières ou sur des comparaisons avec des structures ancestrales datant de plusieurs dizaines ou centaines d'années, mais certaines le font. Par exemple, une étude sur le saumon d'Atlantique dans les rivières finlandaises a effectué des comparaisons génétiques temporelles entre 1977 et 2003 à partir de 29 loci microsatellites. La différenciation temporelle est quasi nulle et bien inférieure à la différenciation géographique entre les sites, les auteurs concluent donc que la structure génétique temporelle est stable sur les 26 ans (Vähä *et al.* 2008). Une autre étude portant sur 4 espèces de gastéropodes marins au Canada compare des échantillons de 1997 et de 2007 par l'analyse d'un gène mitochondrial et deux nucléaires. Deux espèces, celles présentant une phase juvénile planctonique, présentent une différenciation génétique temporelle significative et pas les deux autres. Les auteurs expliquent cela par la capacité de migration plus importante permettant un apport de richesse génétique (Lee & Boulding 2009). Ces différenciations génétiques s'observent de deux façons, par une variation de la richesse génétique (polymorphisme, nombre d'haplotypes, richesse allélique) et par des tests de différenciations génétiques (*Fst* par exemple) qui indique une modification de la structure et pas forcément une variation de la richesse.

En s'inspirant de la notion d'isolement par la distance (IBD), une notion d'isolement par le temps (IBT) a été mise en place (Hendry & Day 2005). Cet isolement repose sur un décalage temporel de la période de reproduction qui entraîne des différenciations génétiques entre les individus se reproduisant au début de la saison et ceux se reproduisant à la fin. Cette notion est, pour l'instant, principalement utilisée chez les plantes et les salmonidés et il s'agit plutôt d'un isolement par le temps au cours de l'année (Hendry & Day 2005). Dans le cas du phoque gris, nous sommes en présence d'une structure génétique temporelle à l'échelle de l'année et il serait intéressant, par la suite, de tester s'il existe un IBT significatif. Cependant l'alternance d'une année sur deux ne semble pas en accord avec un IBT puisque des années éloignées de deux ans sont plus proches que celles éloignées d'un an.

Dans les travaux étudiant la structure génétique temporelle, ceux portant sur les anguilles en Europe sont très intéressants. L'analyse de 6 loci microsatellites d'individus, prélevés au mêmes endroits mais à des années différentes, montre que la structure génétique temporelle est plus importante que la structure génétique géographique à l'échelle de l'Europe (Dannewitz *et al.* 2005). En ajoutant des marqueurs allozymiques, une étude montre qu'il existe un IBT significatif entre les années et un autre plus faible au sein des années. Les auteurs estiment que ce sont les variabilités du succès reproducteur des adultes qui expliquent cet isolement par le temps (Maes *et al.* 2006). Pour le phoque gris, plusieurs hypothèses

peuvent expliquer cette différenciation. Il pourrait s'agir d'une reproduction, une année sur deux, de certains phoques gris qui présenteraient une différenciation génétique et dont les petits ne seraient présents dans notre échantillonnage qu'une année sur deux. Cependant l'absence de différenciation au sein des saisons cliniques est un argument qui apparaît contradictoire à cette hypothèse. De même, les connaissances généralement admises sur le comportement reproducteur du phoque gris ne soutiennent pas, à priori cette idée de reproduction une année sur deux (Bonner 1981).

Il faut aussi émettre une hypothèse faisant intervenir des événements climatiques et/ou hydrodynamiques entraînant des différences dans les origines des individus échoués. Un exemple, très théorique, serait la présence d'un courant marin particulier, qui lorsqu'il est actif, entraîne des phoques juvéniles issus d'une colonie particulière à s'échouer en Bretagne et que ce courant ne soit pas présent chaque année. Toutefois, même si ce sont les années paires et impaires qui sont différentes génétiquement, il est possible que l'élément structurant ait suivi un schéma proche d'une année sur deux durant la durée de l'étude mais que cela ne soit pas toujours le cas.

Conclusions biologiques de l'analyse de génétique des populations des phoques gris échoués vivants et morts en Bretagne.

D'abord, les phoques gris, échoués en Bretagne et en France, montrent une forte richesse génétique. Au niveau mitochondrial, cette richesse semble issue d'une structure ancestrale car les haplogroupes n'ont pu être expliqués par des paramètres biologiques. Cette richesse montre que la, ou les, population(s) dont sont issus les individus échantillonnés, ne semble(nt) pas avoir connu de goulot d'étranglement génétique et présente une bonne diversité génétique. L'absence d'enrichissement, au cours des 11 ans de l'étude, indique que l'origine populationnelle des individus n'a pas évolué sur cette période. Ce qui veut dire aussi que l'augmentation de l'abondance des phoques gris en mer d'Iroise ne s'accompagne pas d'une augmentation de la richesse génétique. Cela peut être dû à deux raisons : soit l'augmentation de la richesse génétique, due à la colonisation, a eu lieu avant les années 2000 et notre étude, et la richesse génétique des phoques gris en Iroise a atteint un plateau. Soit l'échantillonnage de notre étude n'est pas représentatif des phoques gris de la mer d'Iroise, mais plutôt des phoques gris à l'échelle du plateau celtique qui ne présente pas de phénomène de colonisation. Enfin cette absence d'enrichissement génétique indique qu'il n'y a pas eu d'apport nouveau d'individus issus de populations extérieures au cours des 10 dernières années car ceux ci auraient entraîné une augmentation de cette richesse avec l'apport de nouveaux allèles ou haplotypes.

Au niveau de la structure génétique, globalement les individus de cette étude semblent tous appartenir à la même population, ce qui est en accord avec l'idée que les phoques gris en Bretagne appartiennent à une population plus large à l'échelle du plateau celtique (Harkonen *et al.* 2007). Cependant, une différenciation génétique a été observée, pour les deux types de marqueurs, entre les années paires et impaires. Cette différenciation génétique entre les années paires et impaires est pour le moins originale chez les mammifères marins et intrigante. L'analyse par clustering montre qu'une partie des individus échoués les années paires, près de 9% du nombre total des phoques étudiés, présente une différence de composition génétique et que c'est la présence de ces individus qui entraîne la différenciation entre les années paires et impaires. Il semblerait donc qu'une structure génétique, faible mais significative, soit présente au sein de notre échantillonnage. Il pourrait s'agir de phoques issus d'une colonie, du plateau celtique ou non, présentant des fréquences alléliques différentes et dont les individus s'échoueraient de temps en temps le long des côtes françaises. La question de la périodicité une année sur deux reste, pour le moment, sans réponse.

L'absence de différenciation entre les mâles et les femelles, indique que malgré des comportements différents entre les sexes à l'âge adulte (Gerondeau *et al.* 2007) ou durant la première année (Riedam 1990) les origines génétiques des mâles et des femelles, échoués le long des côtes françaises, sont les mêmes.

L'utilisation de fèces pourrait indiquer une spécificité des individus présents sur les reposoirs

Comme cela a été dit précédemment, notre échantillonnage n'est pas forcément représentatif des phoques gris présents dans les colonies bretonnes mais plutôt représentatif des phoques gris à l'échelle du plateau celtique. La part des adultes et sub-adultes dans notre échantillonnage étant faible (moins de 8% au total), il est difficile de faire des comparaisons entre les juvéniles et les autres. C'est pour ces deux raisons qu'il est important de renforcer l'échantillonnage, et surtout de le diversifier, pour compléter cette étude. Plusieurs types de prélèvements sont possibles. Les biopsies effectuées sur des adultes présents sur les reposoirs seraient très informatives mais nécessitent des moyens de prélèvements lourds ainsi que des autorisations administratives. Les prélèvements de poils de blanchons, collectés sur les colonies, sont plus simples à obtenir, représentent bien les individus nés dans les colonies bretonnes et font partie des perspectives de poursuite de ce travail. Enfin la collecte des fèces est un prélèvement non invasif qui permet une extraction et une amplification d'ADN (Chaves *et al.* 2012) et, dans notre cas, présente le fort avantage de concerner des individus ayant effectivement fréquenté les reposoirs. Dans la lignée de cette étude et pour renforcer les connaissances sur le phoque gris en Bretagne, des analyses génétiques sont prévues sur ces trois types de sources d'échantillons.

Une étude de faisabilité a été menée sur un petit nombre de fèces collectées dans l'archipel de Molène et aux Sept-Iles. L'ajout des 17 séquences de MCR, obtenues à partir des fèces, aux séquences de phoques échoués morts et vivants permet de les comparer. Les individus échantillonnés par les fèces ne se répartissent pas de manière homogène sur le réseau avec notamment une présence importante au sein des haplogroupes 2 et 4 et une absence de l'haplotype le plus important. Un seul test de différenciation sur les trois est significatif. Il est donc possible qu'il y ait une spécificité génétique des individus présents sur les repaires par rapport aux phoques échoués morts ou vivants. Toutefois, le faible nombre de séquences issues de fèces et la possibilité de présence de doublons au sein des fèces, empêchent de tirer des conclusions et des analyses supplémentaires sont nécessaires.

Structure génétique du phoque gris à l'échelle européenne

Une forte séparation entre les phoques de Bretagne et ceux de mer Baltique

La comparaison des haplotypes de MCR des phoques gris de Bretagne et de mer Baltique montre une très forte séparation entre les zones géographiques. Un seul haplotype sur 67 est partagé entre la Bretagne et la Baltique, et même si c'est l'haplotype regroupant le plus d'individus en Bretagne, plus de 80% des phoques gris de Bretagne ne partagent pas d'haplotype avec ceux de la Mer Baltique. Cette séparation est le signe d'une quasi absence d'échanges génétiques entre les deux groupes actuellement. Malgré cette franche séparation des haplotypes, il est intéressant de constater que les haplotypes ne se retrouvent pas à deux endroits différents du réseau mais mélangés. Notamment nos haplogroupes 3 et 4 sont plus proches d'haplotypes de mer Baltique que de ceux de Bretagne alors que des groupes d'haplotypes de mer Baltique sont, eux, plus proches de ceux de Bretagne. Cela va renforcer l'hypothèse de la structure ancestrale diversifiée qui explique nos haplogroupes. Par contre un haplogroupe est composé uniquement d'haplotype bretons et deux haplogroupes sont composés uniquement d'haplotypes de mer Baltique ce qui peut s'expliquer par une séparation sur le long terme entre les deux peuplements. Les phoques de mer Baltique et ceux de Bretagne seraient issus de la même population ancestrale diversifiée. La dérive génétique et les mutations ont amené, au cours du temps, cette différence génétique.

L'apparition du phoque gris est estimé avoir eu lieu dans l'Atlantique Nord il y a moins de 2 millions d'années (Fulton & Strobeck 2010) mais peu d'informations sur la phylogéographie de l'espèce sont disponibles. La comparaison des fragments de restriction de l'ADN mitochondrial permet d'estimer la séparation entre les phoques gris de Norvège et ceux de la mer Baltique à 300 000 ans (Boskovic *et al.* 1996). L'utilisation des marqueurs microsatellites permet une estimation de la date de séparation des individus de mer Baltique et d'Ecosse au sein d'une large fourchette de 1 000 000 à 11 000 ans (Graves *et al.* 2009). Ces estimations, bien que très différentes, sont cohérentes avec la grande séparation que l'on

observe entre les phoques en Bretagne et en mer Baltique, il ne semble pas y avoir d'échange entre les deux zones géographiques depuis longtemps.

Un besoin de connaissances sur la structure des populations de phoques gris au niveau de l'Europe et du monde

Peu d'étude de génétique des populations du phoque gris à l'échelle de l'Europe ont été réalisées. Des travaux montrent une différenciation entre les phoques de Norvège et de mer Baltique (Boskovic *et al.* 1996), d'autres, une différence entre les phoques de mer Baltique et d'Ecosse (Graves *et al.* 2009). Des travaux préliminaires montrent une différenciation génétique entre les phoques de Bretagne et ceux d'Ecosse (Becher *et al.* 2001), des travaux non publiés de Walton et Stanley montrent une séparation entre les colonies du plateau Celtique (Bretagne, Cornouailles et Pays de Galles) et celle de la façade est de la Grande Bretagne (décrit dans Ridoux *et al.* 2000) et enfin cette étude montre une différence génétique entre Bretagne et mer Baltique. A part pour l'étude de Boskovic *et al.* mais qui portait sur peu d'échantillons, chaque étude publiée consiste en un travail local. Aucune étude globale, à l'échelle européenne, de la structure génétique du phoque gris, n'a été menée. Or cette étude serait très pertinente pour la compréhension de la biologie du phoque gris et pour sa conservation. Une collaboration européenne est en train de se construire actuellement pour pouvoir mener cette étude.

Discussion générale

Les modifications de l'abondance du phoque gris et d'aire de répartition du marsouin commun sont liés à des modifications des écosystèmes

L'augmentation d'abondance de prédateurs est un changement important du milieu

L'augmentation de l'abondance de deux prédateurs supérieurs, le marsouin commun et le phoque gris, le long des côtes françaises est, en soi, un changement important pour les écosystèmes. Les prédateurs supérieurs ont un fort impact sur l'ensemble de la chaîne trophique par une consommation importante de proies (Trites *et al.* 1997) mais ils jouent aussi un rôle important dans l'équilibre des écosystèmes (Bowen, 1997). Cela entraîne une augmentation des interactions avec les pêcheries telles que les problématiques de captures accidentelles, de déprédation et de compétition. Au niveau de la compétition, même si une partie des proies consommées sont des espèces d'intérêt commercial, il ne s'agit que d'une minorité (Trites *et al.* 1997 ; Méheust *et al.* soumise) et des travaux ont montré que le retrait des mammifères marins de l'écosystème n'entraînaient pas d'augmentation de l'abondance des espèces commerciales (Morissette *et al.*, 2012).

Les mammifères marins sont aussi des espèces sentinelles des changements du milieu marin (Moore 2008), l'augmentation de leur abondance et le déplacement de l'aire de répartition est le signe de modifications des écosystèmes.

Les déplacements du marsouin commun sont certainement liés à des modifications de l'environnement

Les variations d'abondance du marsouin commun en Europe du Nord ont été observées à travers les campagnes SCANS 1 et 2. L'abondance totale du marsouin n'ayant pas changé entre 1994 et 2005, il s'agit d'un déplacement des zones de fortes densités. Les auteurs de ces travaux estiment que ce déplacement est une réponse à la diminution d'abondance des proies, notamment le merlan et la sardine, du marsouin commun dans le nord de la mer du Nord (Hammond *et al.* 2013).

Cependant, notre étude montre que le retour du marsouin commun le long des côtes françaises a une double origine, nord et sud, contribuant de manière égale. L'explication du déplacement en Europe du Nord n'est donc pas suffisante pour expliquer la totalité de ce retour. Des modifications des écosystèmes ont aussi dû se produire, soit en péninsule Ibérique : ce qui aurait entraîné un déplacement des individus vers le nord, soit le long des côtes françaises : ce qui aurait pu attirer une partie des marsouins communs de péninsule Ibérique.

Le plateau Celtique et le golfe de Gascogne ont connu des variations de température au cours des 100 dernières années. Notamment un réchauffement a eu lieu entre 1930 et 1960, puis une période de refroidissement entre 1963 et 1990 et enfin, depuis le début des années 1990 un nouveau réchauffement (Southward *et al.* 1995; Philippart *et al.* 2011). Les périodes plus fraîches sont plus favorables à la présence de hareng et celles plus chaudes à la présence de sardines dans le secteur plateau Celtique/ golfe de Gascogne (Philippart *et al.* 2011). Cependant, lors du refroidissement initié en 1963, la présence de la sardine s'est fortement réduite alors que celle du hareng n'a pas augmenté, peut être à cause de la surpêche (Philippart *et al.* 2011). La période de refroidissement, entre 1963 et 1990, correspond assez bien à la période de raréfaction du marsouin le long des côtes françaises. Le marsouin commun, en tant que homéotherme, n'est peut être pas directement influencé par la température mais plutôt à travers la chaîne trophique qui, elle, est influencée par la température de l'eau (Richardson & Schoeman 2004; Learmonth *et al.* 2006). Il est donc possible que la raréfaction du marsouin ait été causée par le non remplacement de la sardine par le hareng dans les années soixante et donc que la cause soit à la fois climatique et halieutique. Le retour du marsouin se serait fait en même temps que le retour de la sardine dû au réchauffement dans le milieu des années 90 (Philippart *et al.* 2011).

Un réchauffement de la température de l'eau et une diminution de la puissance de l'upwelling ont lieu actuellement, depuis 30 ans, le long de la péninsule Ibérique. Cela entraîne des modifications de l'écosystème, notamment depuis 15 ans le remplacement des espèces d'eaux froides par des espèces d'eaux chaudes, une diminution de la production primaire et un déplacement des espèces mobiles vers le golfe de Gascogne (Philippart *et al.* 2011). Ce pourrait être la raison du déplacement des marsouins de péninsule Ibérique vers les côtes françaises.

L'augmentation de l'abondance du phoque gris en Bretagne est très certainement le signe d'une politique de conservation efficace

Les variations d'abondance du phoque gris sont principalement liées à l'exploitation directe et à la protection des animaux face à la chasse. Les populations de phoques gris de la côte est de la mer du Nord ont ainsi disparu il y a plus de 100 ans, suite à une chasse excessive (Harkonen *et al.* 2007). La mise en place de loi de protection du phoque gris au Royaume-Uni, dès 1914, avec le "Grey Seals (protection) Act 1914" et ensuite, en 1970, le "Conservation of Seals Act (1970)" a entraîné une forte diminution de la pression de chasse et une augmentation de l'abondance régulière (SCOS, 2012). Au vu du faible nombre de naissances en Bretagne, l'augmentation de l'abondance des phoques gris semble directement liée la croissance des colonies britanniques (Prieur et Duguy 1978).

Cependant, l'augmentation de l'abondance du phoque gris en Bretagne est aussi le signe d'un environnement favorable à cette espèce. Les phoques gris sont protégés en France depuis l'arrêté du 27 juillet 1995 et cette protection a forcément eu un impact positif sur l'augmentation de l'abondance de l'espèce. L'installation de colonies, sur les archipels de

Molène et des Sept-îles et les comportements, de chasse et de repos, observés notamment par télémétrie (Vincent *et al.* 2005) montrent que ces écosystèmes apportent tout ce qui est nécessaire à la présence de mammifères marins, en termes de réseaux trophiques et d'habitat.

Apports de notre étude à la conservation

La conservation des mammifères marins, sous statuts nationaux et internationaux, nécessite des connaissances de la structure des populations

La protection des mammifères marins est une protection sous statut, c'est à dire qui est inscrite dans la loi française ainsi que dans plusieurs conventions internationales. Ces conventions listent les différents moyens à mettre en œuvre pour la conservation. Cette conservation nécessite d'accumuler suffisamment d'informations sur l'espèce et son milieu, les conventions internationales impliquent très souvent que les parties signataires fournissent des données sur la biologie de l'espèce. Par exemple, dans le plan de conservation d'ASCOBANS (Agreement on the Conservation of Small Cetaceans of the Baltic and North Seas), pour la protection des marsouins communs, il est demandé aux pays signataires de fournir des informations telles que l'abondance ou le taux de capture accidentelle, mais aussi des informations sur la structure des populations. Nos études de génétique sur le marsouin commun et le phoque gris permettent d'apporter ces informations pour les différentes conventions internationales.

La conservation des mammifères marins au niveau national nécessite aussi d'avoir suffisamment d'informations pour mettre en place des stratégies efficaces. Dans le cadre des espèces à large distribution, il est primordial de connaître la structure des populations, de comprendre les déplacements des animaux et d'identifier les zones à protéger en priorité. Les études de génétique des populations peuvent apporter des réponses et ces travaux sont inscrits au plan de gestion du Parc Naturel Marin d'Iroise.

La conservation du marsouin commun en France dépend de la conservation des deux populations sources, mais aussi de leur zone de rencontre

Notre étude montre que les marsouins communs, le long des côtes françaises ne sont pas uniquement issus d'ascendants de la population d'Europe du Nord mais aussi de la population de péninsule Ibérique, contrairement à ce qui était supposé jusque là (Fontaine, Baird, *et al.* 2007a). Cette donnée est très importante à prendre en compte dans la conservation, puisqu'elle implique certainement plusieurs unités de gestions différentes. La protection des espèces à grands déplacements doit se faire par le maintien de la connectivité entre zones fréquentées par l'espèce. Dans ce cas, il est fondamental de prendre en compte la connectivité entre les côtes françaises, la mer du Nord et les Iles Britanniques d'un côté et la péninsule Ibérique de l'autre côté. Toutefois, comme notre étude montre que les individus des

deux populations s'hybrident, il n'est clairement pas satisfaisant de simplement considérer les deux unités de gestion séparément, il faut prendre en compte leur mélange. Idéalement, la conservation du marsouin commun en France doit se baser sur une stratégie comprenant toute la façade atlantique européenne avec des stratégies identiques pour chaque pays. Enfin la taille de la population de péninsule Ibérique, qui semble contribuer, pour moitié, au retour du marsouin commun en France, est de taille efficace beaucoup plus faible que celle du nord de l'Europe (Fontaine *et al.* 2010). Elle est donc plus sensible aux impacts anthropiques, une réduction de son abondance pourrait avoir rapidement un impact sur la présence du marsouin en France.

La conservation du phoque gris en France est liée aux mesures de protections locales et européennes

Notre étude sur le phoque gris montre que globalement la majorité des phoques gris échoués en Bretagne semble appartenir à une même population, ce qui est cohérent avec l'idée d'une méta-population assez large, à l'échelle du plateau celtique. La conservation du phoque gris devrait donc être réfléchi à cette échelle, en cohésion entre le Royaume-Uni, l'Irlande et la France, même si des spécificités locales doivent être conservées. Un projet d'étude de l'espèce, à cette échelle géographique, est très pertinent. Notamment pour déterminer précisément les liens et échanges entre les différentes colonies du plateau celtique, mais d'ores et déjà, notre étude montre une richesse génétique forte pour les phoques gris du plateau celtique, ce qui est un atout pour la résistance de l'espèce aux variations du milieu et la survie de la population. A échelle plus large, les comparaisons d'haplotypes entre la Bretagne et la mer Baltique confirment bien qu'il s'agit de populations complètement différentes et donc qu'il n'est pas nécessaire d'incorporer les phoques de la Baltique dans la stratégie de gestion du phoque gris en Bretagne. Le groupe d'individus présentant une différenciation génétique lors des années paires reste quand même particulièrement intrigant. Ces individus peuvent être issus d'une colonie spécifique au niveau du plateau celtique, ou présentant peu d'échanges génétiques avec les autres, il est donc important de poursuivre l'étude de cette différenciation.

Toutefois, la conservation du phoque gris en Bretagne doit aussi comporter une stratégie locale forte. Tout d'abord parce que la politique globale de conservation d'une espèce ne peut être la même dans une zone, comme la mer d'Iroise, où l'abondance est faible et dans une zone où l'abondance est élevée, comme le nord de l'Ecosse. Même si les colonies britanniques, source principale quasi certaine de l'augmentation de l'abondance en Bretagne, sont en constante extension, la mise en place des colonies bretonnes a pris du temps, (une soixantaine d'années pour une colonie comportant moins de 200 individus), et la protection doit être axée sur le maintien de cette tendance à la hausse. D'autre part, cette stratégie locale est aussi rendue nécessaire par les spécificités de la colonie en mer d'Iroise. Ces spécificités se manifestent clairement au niveau du régime alimentaire mais aussi en termes de génétique, même si les éléments sont ténus. Les résultats préliminaires obtenus par l'analyse des fèces suggèrent une spécificité génétique des phoques présents sur les reposoirs des colonies bretonnes. Ces résultats nécessitent d'être confirmés, éventuellement en regard du groupe

d'individus différenciés les années paires, et selon les conclusions qui seront établies, ils justifieront aussi la mise en place d'une protection locale bien définie.

Perspectives

Poursuivre le suivi de la biodiversité génétique des mammifères marins échoués

L'étude pilote du suivi de la biodiversité génétique a permis de mettre en place un état initial de la biodiversité génétique des mammifères marins en Bretagne. Pour que ce suivi soit le plus pertinent possible, comme tout suivi de la biodiversité, il faut le poursuivre sur le long terme, afin de pouvoir faire des comparaisons au cours du temps et d'essayer de corrélérer les variations aux changements du milieu. L'idéal serait d'ajouter des informations génétiques pour chaque mammifère marin échoué et d'étendre aux autres échantillonnages comme les fèces, par exemple. De plus, le catalogue mondial de la biodiversité génétique des mammifères marins n'est pas encore exhaustif et il serait important de le compléter avec les espèces manquantes pour rendre les outils d'identification encore plus efficaces.

Comprendre les variations génétiques temporelles et géographiques du marsouin commun

L'étude de la structure génétique du marsouin commun en France a renforcé les connaissances sur l'espèce et mis en évidence une zone d'hybridation. Les perspectives de poursuite de l'étude peuvent se séparer en deux parties :

- D'un côté, l'analyse de cette zone d'hybridation et de ces limites : quelle est l'étendue de cette zone ? Comment est ce qu'elle évolue ? Est ce que le mélange des populations se fait, ou se fera, en péninsule Ibérique et dans la mer du Nord ? Quelle est la vitesse de déplacement des limites de la zone ? Pour répondre à ces questions, une analyse génétique des marqueurs mitochondriaux et nucléaires, d'échantillons issus d'autres zones géographiques est nécessaire et a déjà commencé au laboratoire avec des échantillons du Royaume-Uni et du Nord de la France.

- D'un autre côté, l'analyse des variations temporelles : Quelle était la structure génétique des marsouins communs le long des côtes françaises avant la raréfaction ? Est ce que les deux populations s'y mélangeaient déjà ? Si non, quelle était la population présente ? Pour répondre à ces questions, l'analyse du polymorphisme d'échantillons anciens (datant des années 1960 ou antérieures) est nécessaire.

Comprendre la structure des populations du phoque gris à l'échelle européenne et identifier la source de variabilité génétique des années paires

L'étude de génétique des populations du phoque gris peut être complétée de plusieurs moyens :

- L'ajout d'autres marqueurs génétiques, comme, par exemple, les séquences de *Cox1*, pour renforcer les résultats et apporter du polymorphisme supplémentaires ou complémentaire.
- L'ajout d'autres sources d'échantillonnage permettant d'avoir des informations sur des individus dont la présence dans les colonies bretonnes est attestée, comme les fèces, les poils de blanchons ou les biopsies d'adultes. Le travail sur les fèces a déjà commencé au laboratoire.
- La confirmation de la différenciation génétique d'une partie des phoques échoués les années paires et, si c'est le cas, la recherche de leur origine populationnelle. Des analyses statistiques complémentaires des résultats doivent être faites. Ensuite une comparaison génétique, nécessitant des prélèvements dans les différentes colonies d'origine probable, permettra de déceler l'origine.
- La certification que les phoques échoués appartiennent à une population à l'échelle du plateau celtique. Ceci nécessitera des échantillons représentatifs des colonies du plateau.
- Enfin une étude génétique globale à l'échelle européenne, pour identifier la structure génétique de l'espèce sur une plus large échelle et mieux comprendre les échanges entre les colonies. Encore une fois cela nécessitera des nouveaux prélèvements et cela permettra peut être de répondre aux questions précédentes. Une collaboration internationale, initiée par Cécile Vincent du Liens (Université de la Rochelle, CNRS) est en cours de construction dans ce sens actuellement.

Conclusions

La génétique des populations est un outil puissant qui apporte beaucoup à la compréhension des mammifères marins, des changements des écosystèmes et à la conservation. Même à partir d'un échantillonnage opportuniste, et parfois réduit, elle fournit des informations fondamentales. Dans le cadre de cette thèse, elle aura permis de suivre la biodiversité génétique, de mieux comprendre les déplacements des marsouins communs et leur reproduction, d'identifier des structures des populations et de suspecter la présence d'un groupe génétique différent chez les phoques gris. Bien que ces travaux ouvrent beaucoup de questions, ils apportent des nouvelles connaissances sur ces deux espèces de mammifères marins, et sur les changements des écosystèmes, en mer d'Iroise et le long de la façade atlantique.

Bibliographie

Aguilar A, Borrell A, Reijnders P (2002) Geographical and temporal variation in levels of organochlorine contaminants in marine mammals. *Marine Environmental Research*, **53**, 425-452.

Airoldi L, Beck MW (2007) Loss, status and trends for coastal marine habitats of Europe. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, **45**, 345-405.

Alfonsi E, Hassani S, Carpentier F, *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.

Allen P, Amos W, Pomeroy P, Twiss S (1995) Microsatellite variation in grey seals (*Halichoerus grypus*) shows evidence of genetic differentiation between two British breeding colonies. *Molecular Ecology*, **4**, 653-662.

Alongi DM (2008) Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **76**, 1-13.

Amaral AR, Beheregaray LB, Bilgmann K, *et al.* (2012a) Seascape Genetics of a Globally Distributed, Highly Mobile Marine Mammal: The Short-Beaked Common Dolphin (Genus *Delphinus*). *PLoS ONE*, **7**, e31482.

Amaral A, Jackson J, Möller L, Beheregaray L, Coelho M (2012b) Species tree of a recent radiation: the subfamily Delphininae (Cetacea, Mammalia). *Molecular Phylogenetics*, **64**, 243-253.

Amaral A, Sequeira M, Coelho M (2007a) 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.

Amstrup SC, Stirling I, Smith TS, Perham C, Thiemann GW (2006) Recent observations of intraspecific predation and cannibalism among polar bears in the southern Beaufort Sea. *Polar Biology*, **29**, 997-1002.

Andersen LW, Ruzzante DE, Walton M, *et al.* (2001) Conservation genetics of harbour porpoises, *Phocoena phocoena*, in eastern and central North Atlantic. *Conservation Genetics*, **2**, 309-324.

Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic Biology*, **55**, 539-552.

Antoine L et Goujon M (1993). Impact de la pêche thonière au filet maillant dérivant en Atlantique nord-est sur le dauphin commun et le dauphin bleu et blanc. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00069/18016/>

Arif IA, Khan HA, Bahkali AH, *et al.* (2011) DNA marker technology for wildlife conservation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **18**, 219-225.

Arnason U, Gullberg A, Janke A (2004) Mitogenomic analyses provide new insights into cetacean origin and evolution. *Gene*, **33**, 27-34.

Arnason U, Gullberg A, Janke A, *et al.* (2006) Pinniped phylogeny and a new hypothesis for their origin and dispersal. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **41**, 345-354.

Bacelar FS, Dueri S, Hernández-García E, Zaldívar J (2009) Joint effects of nutrients and contaminants on the dynamics of a food chain in marine ecosystems. *Mathematical Biosciences*, **218**, 24-32.

Baker CS, Clapham PJ (2004) Modelling the past and future of whales and whaling. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 365-371.

Baldwin R, Collins M, van Waerebeek K, Minton G (2004) The Indo-Pacific humpback dolphin of the Arabian region: A status review. *Aquatic Mammals*, **30**, 111-124.

Ballard JW, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, **13**, 729-744.

Beamish RJ, McFarlane GA, Benson A (2006) Longevity overfishing. *Progress in Oceanography*, **68**, 289-302.

Bearzi G, Politi E, Agazzi S, Azzellino A (2006) Prey depletion caused by overfishing and the decline of marine megafauna in eastern Ionian Sea coastal waters (central Mediterranean). *Biological Conservation*, **127**, 373-382.

Beaugrand G, Reid P, Ibanez F, Lindley J, Edwards M (2002) Reorganization of North Atlantic marine copepod biodiversity and climate. *Science*, **296**, 1692-1694.

Beaugrand G, Edwards M, Brander K *et al.* (2008) Causes and projections of abrupt climate-driven ecosystem shifts in the North Atlantic. *Ecology Letters*, **11**, 1157-1168.

Becher A, Graves J, Vincent C, Ridoux V (2001) Différentiation génétique de populations de phoques gris *Halichoerus grypus* de Bretagne et d'Ecosse. *Rapport FEOGA/DIREN Bretagne*, 1-9.

Belkin IM (2009) Rapid warming of Large Marine Ecosystems. *Progress in Oceanography*, **81**, 207-213.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. 1996-2004 GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Bellido JJ, Cabot J, Castillo JJ, *et al.* (2009) First record of the harp seal (*Pagophilus groenlandicus*) extralimital presence in the Mediterranean Sea. *Marine Biodiversity Records*, **2**, 1-2.

Benton MJ, Twitchett RJ (2003) How to kill (almost) all life: the end-Permian extinction event. *Trends in Ecology & Evolution*, **18**, 358-365.

Berggren P, Wade P, Carlström J, Read A (2002) Potential limits to anthropogenic mortality for harbour porpoises in the Baltic region. *Biological Conservation*, **103**, 313-322.

Berkelmans R, De'ath G, Kininmonth S, Skirving WJ (2004) A comparison of the 1998 and 2002 coral bleaching events on the Great Barrier Reef: spatial correlation, patterns, and predictions. *Coral Reefs*, **23**, 74-83.

Berrow S, O'Neill M, Brogan D (1998) Discarding practices and marine mammal by-catch in the Celtic Sea herring fishery. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, **98B**, 1-8.

Berta A, Churchill M (2012) Pinniped taxonomy: review of currently recognized species and subspecies, and evidence used for their description. *Mammal Review*, **42**, 207-234.

Berta A, Sumich J (1999) *Marine mammals. Evolutionary Biology*. Academic Press, London.

Bilgmann K, Möller LM, Harcourt RG, Kemper CM, Beheregaray LB (2011) The Use of Carcasses for the Analysis of Cetacean Population Genetic Structure: A Comparative Study in Two Dolphin Species. *PLoS ONE*, **6**, e20103.

Bindoff NL, Willebrand J, Artale V, Cazenave A, *et al.* (2007) Observations: Oceanic Climate Change and Sea Level. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.*, 1-48.

Boisseau O, Matthews J, Gillespie D, *et al.* (2007) A visual and acoustic survey for harbour porpoises off North-West Africa: further evidence of a discrete population. *African Journal of Marine Science*, **29**, 1-8.

Bonner N Grey Seal - *Halichoerus grypus*. In: *Handbook of Marine Mammals* (Ridgway S, Harrison Rtran.), pp. 111-144. Academic Press.

Booth S, Zeller D (2005) Mercury, Food Webs, and Marine Mammals: Implications of Diet and Climate Change for Human Health. *Environmental Health Perspectives*, **113**, 521-526.

- Boskovic R, Kovacs K, Hammill M, White B (1996) Geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in grey seals (*Halichoerus grypus*). *Canadian Journal of Zoology*, **74**, 1787-1796.
- Bourret V, Macé M, Bonhomme M, Crouau-Roy B (2008) Microsatellites in cetaceans: an overview. *Open Marine Biology*, **2**, 38-42.
- Bowen W (1997) Role of marine mammals in aquatic ecosystems. *Marine Ecology Progress Series*, **158**, 267-274.
- Branch T, Matsuoka K, Miyashita T (2004) Evidence for increases in Antarctic blue whales based on Bayesian modelling. *Marine Mammal Science*, **20**, 726-754.
- Brien Y, Prieur D (1973) Les phoques de Bretagne., **9**, 175-184.
- Brook B, Sodhi N, Bradshaw C (2008) Synergies among extinction drivers under global change. *Trends in Ecology & Evolution*, **23**, 453-460.
- Brown W, George M, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76**, 1967-1971.
- Bryden HL, Longworth HR, Cunningham SA (2005) Slowing of the Atlantic meridional overturning circulation at 25° N. *Nature*, **438**, 655-657.
- Budge SM, Iverson SJ, Koopman HN (2006) Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: a primer on analysis and interpretations. *Marine Mammal Science*, **22**, 759-801.
- Byrd B, Hohn A, Munden F, Lovewell G, Piccolo RL (2008) Effects of commercial fishing regulations on stranding rates of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Fishery Bulletin*, **106**, 72-81.
- Caballero S, Islas-Villanueva V, Tezanos-Pinto G, *et al.* (2012) Phylogeography, genetic diversity and population structure of common bottlenose dolphins in the Wider Caribbean inferred from analyses of mitochondrial DNA control region sequences and microsatellite loci: conservation and management implications. *Animal Conservation*, **15**, 95-112.
- Caldeira K, Wickett M (2003) Oceanography: anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, **425**, 365.
- Camphuysen C (2004) The return of the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in Dutch coastal waters. *Lutra*, **47**, 113-122.
- van Canneyt O, Dabin W, Demaret F, *et al.* (2012) *Les échouages de mammifères marins sur le littoral français en 2011*. Réseau National Echouages.

- Cardinale M, Svedäng H (2004) Modelling recruitment and abundance of Atlantic cod, *Gadus morhua*, in the eastern Skagerrak–Kattegat (North Sea): evidence of severe depletion due to a prolonged period of high fishing pressure. *Fisheries Research*, **69**, 263-282.
- Castège I, Soulier L, Hémerly G, *et al.* (2013) Exploring cetacean stranding pattern in light of variation in at-sea encounter rate and fishing activity: Lessons from time surveys in the south Bay of Biscay (East-Atlantic; France). *Journal of Marine Systems*, **109-110**, S284-S292.
- Catalán TP, Wozniak A, Niemeyer HM, Kalergis AM, Bozinovic F (2012) Interplay between thermal and immune ecology: Effect of environmental temperature on insect immune response and energetic costs after an immune challenge. *Journal of Insect Physiology*, **58**, 310-317.
- Chapin F, Zavaleta E, Eviner V, *et al.* (2000) Consequences of changing biodiversity. *Nature*, **405**, 234-242.
- Charlton-Robb K, Gershwin L, Thompson R, *et al.* (2011) A New Dolphin Species, the Burrunan Dolphin *Tursiops australis* sp. nov., Endemic to Southern Australian Coastal Waters. *PLoS ONE*, **6**, e24047.
- Chaves P, Graeff V, Lion M, Oliveira L, Eizirik E (2012) DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples. *Molecular Ecology Resources*, **12**, 18-35.
- Cheevaporn V, Menasveta P (2003) Water pollution and habitat degradation in the Gulf of Thailand. *Marine Pollution Bulletin*, **47**, 43-51.
- Chivers S, Baird R, McSweeney D, *et al.* (2007) Genetic variation and evidence for population structure in eastern North Pacific false killer whales (*Pseudorca crassidens*). *Journal of Zoology*, **85**, 783-794.
- Chivers S, Dizon A, Gearin P, Robertson KM (2002) Small-scale population structure of eastern North Pacific harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) indicated by molecular genetic analyses. *Journal of Cetacean Research and Management*, **4**, 111-122.
- Clapham P, Young S, Brownell R (1999) Baleen whales: conservation issues and the status of the most endangered populations. *Mammal Review*, **29**, 35-60.
- Clare EL, Lim BK, Engstrom MD, Eger JL, Hebert PD (2007) DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 184 - 190.
- Claudet J, Fraschetti S (2010) Human-driven impacts on marine habitats: A regional meta-analysis in the Mediterranean Sea. *Biological Conservation*, **143**, 2195-2206.

- Coleman F, Williams S (2002) Overexploiting marine ecosystem engineers: potential consequences for biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, **17**, 40-44.
- Coll M, Libralato S, Tudela S, Palomera I, Pranovi F (2008) Ecosystem overfishing in the ocean. *PLoS ONE*, **3**, e3881-10.
- Committee on Taxonomy (2011) List of marine mammal species and subspecies. Society for Marine Mammalogy, www.marinemammalscience.org, consulté le 12/06/2013.
- Cotter MP, Maldini D, Jefferson TA (2012) “Porpicide” in California: Killing of harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) by coastal bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Marine Mammal Science*, **28**, E1-E15.
- Couperus A (1997) Interactions between Dutch midwater-trawl and Atlantic white-sided dolphins (*Lagenorhynchus acutus*) southwest of Ireland. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, **22**, 209-218.
- Courtillot V, Gallet Y, Mouël J, Fluteau F, Genevey A (2007) Are there connections between the Earth's magnetic field and climate? *Earth and Planetary Science Letters*, **253**, 328-339.
- Couvet D, Devictor V, Jiguet F, Julliard R (2011) Scientific contributions of extensive biodiversity monitoring. *Comptes Rendus Biologies*, **334**, 370-377.
- Cox T, Ragen T, Read A, *et al.* (2006) Understanding the impacts of anthropogenic sound on beaked whales. *Journal of Cetacean Research Management*, **7**, 177-187.
- Crick H, Dudley C, Glue, Thomson D (1997) UK birds are laying eggs earlier. *Nature*, **388**, 526.
- Cronin MA (2011) The conservation of seals in Irish waters: How research informs policy. *Marine Policy*, **35**, 748-755.
- Cullon DL, Yunker MB, Christensen JR, *et al.* (2012) Biomagnification of polychlorinated biphenyls in a harbor seal food web from the strait of Georgia, British Columbia, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **31**, 2445-2455.
- Dalebout M, Mead J, Baker C, van Helden A (2002) A new species of beaked whale *Mesoplodon perrini* sp. n. (Cetacea: Ziphiidae) discovered through phylogenetic analyses of mitochondrial DNA sequences. *Marine Mammal Science*, **18**, 577-608.
- Dalebout M, Robertson K, Frantzis A, *et al.* (2005) Worldwide structure of mtDNA diversity among Cuvier's beaked whales (*Ziphius cavirostris*): implications for threatened populations. *Molecular*, **14**, 3353-3371.

- Dalebout M, Ross G, Baker C, *et al.* (2003) Appearance, distribution, and genetic distinctiveness of Longman's beaked whale, *Indopacetus pacificus*. *Marine Mammal Science*, **19**, 421-461.
- Dannewitz J, Maes GE, Johansson L, *et al.* (2005) Panmixia in the European eel: a matter of time... *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **272**, 1129-1137.
- DeMaster D, Fowler C, Perry S, Richlen MF (2001) Predation and competition: the impact of fisheries on marine-mammal populations over the next one hundred years. *Journal of Mammalogy*, **82**, 641-651.
- Deagle B, Kirkwood R, Jarnam S (2009) Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces. *Molecular Ecology*, **18**, 2022-2038.
- Dehnhardt G, Mauck B, Hanke W, Bleckmann H (2001) Hydrodynamic trail-following in harbor seals (*Phoca vitulina*). *Science*, **293**, 102-104.
- Dekker R, Beukema J (1999) Relations of summer and winter temperatures with dynamics and growth of two bivalves, *Tellina tenuis* and *Abra tenuis*, on the northern edge of their intertidal distribution. *Journal of Sea Research*, **42**, 207-220.
- Delbeke K, Joiris C (1988) Accumulation mechanisms and geographical distribution of PCBs in the North Sea. *Oceanis*, **14**, 399-410.
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, *et al.* (2008) Phylogeny. fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids*, **36**, 465-469.
- Derocher A, Lunn N, Stirling I (2004) Polar bears in a warming climate. *Integrative and Comparative Biology*, **44**.
- Doney SC, Fabry JV, Feely RA, Kleypas J (2009) Ocean Acidification: The Other CO₂ Problem. *Annual Review of Marine Science*, **1**, 169-192.
- Donovan GP, Bjorge A (1995) Harbour Porpoises in the North Atlantic. *Report of IWC Scientific Committee*, 1-11.
- Duchêne S, Archer F, Vilstrup J, Caballero S, Morin P (2011) Mitogenome phylogenetics: the impact of using single regions and partitioning schemes on topology, substitution rate and divergence time estimation. *PLoS ONE*, **6**, e27138.
- Ducrottoy J, Elliott M, Jonge V (2000) The North Sea. *Marine Pollution Bulletin*, **41**, 5-23.
- Duguay R (1977) Notes on the small cetaceans off the coasts of France., **27**, 500-501.
- Duguay R, Hussenot E (1991) Le statut du phoque gris (*Halichoerus grypus*) sur les côtes de France., **8**, 1-12.

- Eriksen M, Maximenko N, Thiel M, *et al.* (2013) Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre. *Marine Pollution Bulletin*, **68**, 71-76.
- Evans P, Hammond P (2004) Monitoring cetaceans in European waters. *Mammal Review*, **34**, 131-156.
- Evans PG, Pierce GJ, Panigada S (2010) Climate change and marine mammals. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **90**, 1483-1487.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis., **1**, 47-50.
- Fabry V, Seibel B, Feely R, Orr J (2008) Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES Journal of Marine Science*, **65**, 414-432.
- Falkowski P, Barber R, Smetacek V (1998) Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, **281**, 200-206.
- FAO, La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture, rapport 2012.
- Feder M, Blair N, Figueras H (1997) Natural thermal stress and heat shock protein expression in *Drosophila* larvae and pupae. *Functional Ecology*, **11**, 90-100.
- Felsenstein J (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, **5**, 164-166.
- Ferguson S, Stirling I, McLoughlin P (2005) Climate change and ringed seal (*Phoca hispida*) recruitment in western Hudson Bay. *Marine Mammal Science*, **21**, 121-135.
- Flynn J, Finarelli J, Zehr S, Hsu J, Nedbal M (2005) Molecular Phylogeny of the Carnivora (Mammalia): Assessing the Impact of Increased Sampling on Resolving Enigmatic Relationships. *Systematic Biology*, **54**, 317-337.
- Fontaine MC, Baird SJ, Piry S, *et al.* (2007a) Rise of oceanographic barriers in continuous populations of a cetacean: the genetic structure of harbour porpoises in Old World waters. *BMC biology*, **5**, 1-16.
- Fontaine MC, Snirc A, Frantzis A, *et al.* (2012) History of expansion and anthropogenic collapse in a top marine predator of the Black Sea estimated from genetic data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, E2569-E2576.
- 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, Tolley KA, Siebert U, *et al.* (2007b) Long-term feeding ecology and habitat use in harbour porpoises *Phocoena phocoena* from Scandinavian waters inferred from trace elements and stable isotopes. *BMC Ecology*, **7**, 1-12.

Footo 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.

Forcada J, Trathan P, Reid K, Murphy E (2005) The effects of global climate variability in pup production of Antarctic fur seals. *Ecology*, **86**, 2405-2417.

Ford SE (1996) Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the northeastern united states : Response to climate change ? *Journal of Shellfish Research*, **15**, 45-56.

Frankham R (2010) Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation*, **143**, 1919-1927.

Fulton TL, Strobeck C (2010) Multiple fossil calibrations, nuclear loci and mitochondrial genomes provide new insight into biogeography and divergence timing for true seals (Phocidae, Pinnipedia). *Journal of Biogeography*, **37**, 814-829.

Féral J (2002) How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **268**, 121_145.

Galloy V, Denoël M (2010) Detrimental effect of temperature increase on the fitness of an amphibian (*Lissotriton helveticus*). *Acta Oecologica*, **36**, 179-183.

Gambaiani D, Mayol P, Isaac S, Simmonds M (2009) Potential impacts of climate change and greenhouse gas emissions on Mediterranean marine ecosystems and cetaceans. *Journal of the Marine*, **89**, 179-201.

Gascuel O (1997) BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, **14**, 685-695.

Gaskin DE (1984) The Harbour Porpoise *Phocoena phocoena* (L.): Regional Populations, Status, and Information on Direct and Indirect Catches. *Report International Whaling Commission*, **34**, 569 - 586.

Georges J, Guinet C (2000) Maternal care in the subantarctic fur seals on Amsterdam Island. *Ecology*, **81**, 295-308.

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. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **87**, 365.

GIEC, 2007 : Bilan 2007 des changements climatiques. Contribution des Groupes de travail I, II et III au quatrième Rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat [Équipe de rédaction principale, Pachauri, R.K. et Reisinger, A.] GIEC, Genève, Suisse, 103 pages

Gill AB (2005) Offshore renewable energy: ecological implications of generating electricity in the coastal zone. *Journal of Applied Ecology*, **42**, 605-615.

Gilles A, Scheidat M, Siebert U (2009) Seasonal distribution of harbour porpoises and possible interference of offshore wind farms in the German North Sea. *Marine Ecology Progress Series*, **383**, 295-307.

Goloboff P, Farris J, Nixon K (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, **24**, 774-786.

Gormley A, Slooten E, Dawson S, *et al.* (2012) First evidence that marine protected areas can work for marine mammals. *Journal of Applied Ecology*, **49**, 474-480.

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>.

Gradinger R (2009) Sea-ice algae: Major contributors to primary production and algal biomass in the Chukchi and Beaufort Seas during May/June 2002. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, **56**, 1201-1212.

Graves JA, Helyar A, Biuw M, *et al.* (2009) Microsatellite and mtDNA analysis of the population structure of grey seals (*Halichoerus grypus*) from three breeding areas in the Baltic Sea. *Conservation Genetics*, **10**, 59-68.

Greene C, Pershing A (2004) Climate and the conservation biology of North Atlantic right whales: the right whale at the wrong time? *Frontiers in Ecology and the Environment*, **2**, 29-34.

Gregg W, Conkright M, Ginoux P, O'Reilly J, Casey N (2003) Ocean primary production and climate: Global decadal changes. *Geophysical Research Letters*, **30**, 1809-1812.

Grüss A, Kaplan DM, Guénette S, Roberts CM, Botsford LW (2011) Consequences of adult and juvenile movement for marine protected areas. *Biological Conservation*, **144**, 692-702.

Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, **52**, 696-704.

Guinotte JM, Fabry JV (2008) Ocean Acidification and Its Potential Effects on Marine Ecosystems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1134**, 320-342.

- Guénette S, Gascuel D (2012) Shifting baselines in European fisheries: The case of the Celtic Sea and Bay of Biscay. *Ocean & Coastal Management*, **70**, 10-21.
- Gómez-Campos E, Borrell A, Cardona L, Forcada J, Aguilar A (2011) Overfishing of Small Pelagic Fishes Increases Trophic Overlap between Immature and Mature Striped Dolphins in the Mediterranean Sea. *PLoS ONE*, **6**, e24554.
- Hale ML, Burg TM, Steeves TE (2012) Sampling for Microsatellite-Based Population Genetic Studies: 25 to 30 Individuals per Population Is Enough to Accurately Estimate Allele Frequencies. *PLoS ONE*, **7**, e45170.
- Hall AJ, Hugunin K, Deaville R, *et al.* (2006) The Risk of Infection from Polychlorinated Biphenyl Exposure in the Harbor Porpoise (*Phocoena phocoena*): A Case–Control Approach. *Environmental Health Perspectives*, **114**, 704-711.
- 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.
- Halsband-Lenk C, Hirche H, Carlotti F (2002) Temperature impact on reproduction and development of congener copepod populations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **271**, 121-153.
- 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.
- Hammond P, Berggren P, Benke H, *et al.* (2002) Abundance of harbour porpoise and other cetaceans in the North Sea and adjacent waters. *Journal of Applied Ecology*, **39**, 361-376.
- Harkonen T, 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 Scientific Publications*, **6**, 57-68.
- Hartl D, Clark A (2007) *Principles of population genetics*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Harvell D, Altizer S, Cattadori I, Harrington L, Weil E (2009) Climate change and wildlife diseases: when does the host matter the most? *Ecology*, **90**, 912-920.
- Harwood J (2001) Marine mammals and their environment in the twenty-first century. *Journal of Mammalogy*, **82**, 630-640.
- Hassani S, Dupuis L, Elder J, *et al.* (2008) A note on harbour seals (*Phoca vitulina*) distribution and abundance in France and Belgium. *NAMMCO Scientific Publications*, **8**, 107-116.

- Hassani S, Kerviel V, Le Borgne G, Jung J (2008) Homogeneity of stranded common dolphins and porpoises along Brittany coasts: a preliminary molecular analysis. In:, p. 5pp.
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, 313-321.
- Hebert PD, Ratnasingham S, Waard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, S96-S99.
- Hebert P, Stoeckle M, Zemplak T, Francis C (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology*, **2**.
- Heide-Jørgensen MP, Iversen M, Nielsen NH, *et al.* (2011) Harbour porpoises respond to climate change. *Ecology and Evolution*, **1**, 579-585.
- Heller NE, Zavaleta ES (2009) Biodiversity management in the face of climate change: A review of 22 years of recommendations. *Biological Conservation*, **142**, 14-32.
- Hendry A, Day T (2005) Population structure attributable to reproductive time: isolation by time and adaptation by time. *Molecular Ecology*, **14**, 901-916.
- Higdon JW, Bininda-Emonds OR, Beck RM, Ferguson SH (2007) Phylogeny and divergence of the pinnipeds (Carnivora: Mammalia) assessed using a multigene dataset. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 216-235.
- Hill H, Greer T, Solangi M, Kuczaj S II (2007) All mothers are not the same: Maternal styles in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *International Journal of Comparative Psychology*, **20**, 35-54.
- Hoegh-Guldberg O, Bruno JF (2010) The Impact of Climate Change on the World's Marine Ecosystems. *Science*, **328**, 1523-1528.
- Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hooten AJ, *et al.* (2007) Coral Reefs Under Rapid Climate Change and Ocean Acidification. *Science*, **318**, 1737-1742.
- Hoelzel A (1999) Impact of population bottlenecks on genetic variation and the importance of life history; a case study of the northern elephant seal. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**, 23-39.
- Hoelzel A, Fleischer R, Campagna C *et al.* (2002) Impact of a population bottleneck on symmetry and genetic diversity in the northern elephant seal. *Journal of Evolutionary Biology*, **15**, 567 - 575.
- Hoffmann AA, Sgrò CM (2011) Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, **470**, 479-485.

- Hubisz M, Falush D, Stephens M, Pritchard J (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, **9**, 1322-1332.
- Hudson R (2000) A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics*, **155**, 2011-2014.
- Hudson R, Slatkin M, Maddison W (1992) Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, **132**, 583-589.
- Huppopp O, Popp KH (2003) North Atlantic Oscillation and timing of spring migration in birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, 233-240.
- Hymery N, Alfonsi E, Jamin C, *et al.* (2013) Isolation of CD34+ cells from peripheral blood and bone marrow of *Tursiops truncatus*. *Marine Mammal Science*, **29**, 195-203.
- Ivanov KP (2006) The development of the concepts of homeothermy and thermoregulation. *Journal of Thermal Biology*, **31**, 24-29.
- Ivanova N, Zemlak T, Hanner R, Hebert P (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 544-548.
- Jackson J, Kirby M, Berger W, *et al.* (2001) Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science*, **293**, 629-637.
- Jauniaux T, Petitjean D, Brenez C, *et al.* (2002) Post-mortem Findings and Causes of Death of Harbour Porpoises (*Phocoena phocoena*) Stranded from 1990 to 2000 along the Coastlines of Belgium and Northern France. *Journal of Comparative Pathology*, **126**, 243-253.
- Jayasankar P, Anoop B, Vivekanandan, *et al.* (2008) Molecular identification of delphinids and finless porpoise (Cetacea) from the Arabian Sea and Bay of Bengal. *Zootaxa*, **1853**, 57-67.
- Jefferson T, Curry B (1994) A global review of porpoise (Cetacea: Phocoenidae) mortality in gillnets. *Biological Conservation*, **67**, 167-183.
- Jefferson T, Leatherwood S, Webber M (1993) *FAO species identification guide. Marine mammals of the world* (FO Nations, Tran.). FAO of the United Nations, Roma.
- Jensen AE, Cheville NF, Thoen CO, MacMillan AP, Miller WG (1999) Genomic Fingerprinting and Development of a Dendrogram for *Brucella* spp. Isolated from Seals, Porpoises, and Dolphins. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **11**, 152-157.
- Johannessen O, Bengtsson L, Miles M, *et al.* (2004) Arctic climate change: Observed and modelled temperature and sea-ice variability. *Tellus*, **56A**, 328-341.

Johnston D, Meisenheimer P, Lavigne D (2000) An Evaluation of Management Objectives for Canada's Commercial Harp Seal Hunt, 1996–1998. *Conservation in Practice*, **14**, 729-737.

Jones P, (2001) Marine protected area strategies: issues, divergences and the search for middle ground. *Reviews in fish biology and fisheries*, **11**, 197-216.

de Juan S, Demestre M (2012) A Trawl Disturbance Indicator to quantify large scale fishing impact on benthic ecosystems. *Ecological Indicators*, **18**, 183-190.

Jung J (1998) Amplification de séquences inter-microsatellites et empreintes génétiques chez les végétaux., **1**, 13-19.

Das K, Siebert U, Fontaine M, *et al.* (2004) Ecological and pathological factors related to trace metal concentrations in harbour porpoises *Phocoena phocoena* from the North Sea and adjacent areas. *Marine Ecology*, **281**, 283-295.

Kastelein RA, Verboom WC, Jennings N, Haan D, Heul S (2008) The influence of 70 and 120kHz tonal signals on the behavior of harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) in a floating pen. *Marine Environmental Research*, **66**, 319-326.

Kastelein R, Hardeman J, Boer H Food consumption and body weight of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). In: *The biology of harbour porpoise* (Read A, Wiepkema P, Natchtigall Ptran.), pp. 217-233. De Spil Publishers.

Kenney R, Payne P, Heinemann D (1996) Shifts in Northeast shelf cetacean distributions relative to trends in Gulf of Maine/Georges Bank finfish abundance. In: *The northeast shelf ecosystem: assessment, sustainability and management*. (Science Btran.), pp. 169-196. Cambridge.

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.

Kiszka JJ, Haelters J, Jauniaux T (2004a) The harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in the southern North Sea: a come-back in northern French and Belgian waters? *ASCOBANS 11th Advisory Committee Meeting*.

Kiszka J, Hassani S, Pezeril S (2004b) Distribution and status of small cetaceans along the French Channel coasts: using opportunistic records for a preliminary assessment. *Lutra*, **47**, 33-46.

Kiszka J, Macleod K, van Canneyt O, Walker D, 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. *ICES Journal of Marine Science*, **64**, 1-11.

- Klanderud K, Totland Ø (2007) The relative role of dispersal and local interactions for alpine plant community diversity under simulated climate warming. *Oikos*, **116**, 1279-1288.
- Kleivane L, Skaare J (1998) Organochlorine contaminants in northeast Atlantic minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*). *Environmental Pollution*, **101**, 231-239.
- Kmiec B, Woloszynska M, Janska H (2006) Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Current genetics*, **50**, 149-159.
- Kooyman G, Castellini M, Davis R (1981) Physiology of diving in marine mammals. *Annual Review of Physiology*, **43**, 343-356.
- Kovacs K, Lydersen C (2008) Climate change impacts on seals and whales in the North Atlantic Arctic and adjacent shelf seas. *Science Progress*, **91**, 117-150.
- Kovacs KM, Aguilar A, Aurioles D, *et al.* (2012) Global threats to pinnipeds. *Marine Mammal Science*, **28**, 414-436.
- Kretzmann M, Mentzer L, DiGiovanni R, Leslie MS, Amato G (2006) Microsatellite Diversity and Fitness in Stranded Juvenile Harp Seals (*Phoca groenlandica*). *Journal of Heredity*, **97**, 555-560.
- Krützen M, Barré LM, Connor RC, Mann J, Sherwin WB (2004) “O fat-”r: where art thou?”- Paternity assessment in an open fission-fusion society of wild bottlenose dolphins (*Tursiops sp.*) in Shark Bay, Western Australia. *Molecular Ecology*, **13**, 1975-1990.
- Laist D, Knowlton A, Mead J, Collet A, Podesta M (2001) Collisions between ships and whales. *Marine Mammal Science*, **17**, 35-75.
- Laloi-Michelin M, Meas T, Ambonville C, *et al.* (2009) The Clinical Variability of Maternally Inherited Diabetes and Deafness Is Associated with the Degree of Heteroplasmy in Blood Leukocytes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **94**, 3025-3030.
- Larsen F, Eigaard OR, Tougaard J (2007) Reduction of harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) bycatch by iron-oxide gillnets. *Fisheries Research*, **85**, 270-278.
- Lau MC, Chan KM, Leung KM, *et al.* (2007) Acute and chronic toxicities of tributyltin to various life stages of the marine polychaete *Hydroides elegans*. *Chemosphere*, **69**, 135-144.
- Law RJ, Barry J, Barber JL, *et al.* (2012) Contaminants in cetaceans from UK waters: Status as assessed within the Cetacean Strandings Investigation Programme from 1990 to 2008. *Marine Pollution Bulletin*, **64**, 1485-1494.
- Le Duff M (1999) Environnement naturel de l'Iroise : Bilan des connaissances et intérêt patrimonial., **2**.

- LeDuc RG, Robertson KM, Pitman RL (2008) Mitochondrial sequence divergence among Antarctic killer whale ecotypes is consistent with multiple species. *Biology Letters*, **4**, 426-429.
- LeDuc R, Perrin W, Dizon A (1999) Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome b sequences. *Marine Mammal Science*, **15**, 619-648.
- Learmonth J, MacLeod C, Santos M, *et al.* (2006) Potential effects of climate change on marine mammals. *Oceanography and Marine Biology*, **44**, 431-464.
- Lee H, Boulding E (2009) Spatial and temporal population genetic structure of four northeastern Pacific littorinid gastropods: the effect of mode of larval development on variation at one mitochondrial and two nuclear DNA markers. *Molecular Ecology*, **18**, 2165-2184.
- Leeney RH, Amies R, Broderick AC, *et al.* (2008) Spatio-temporal analysis of cetacean strandings and bycatch in a UK fisheries hotspot. *Biodiversity and Conservation*, **17**, 2323-2338.
- Lepetz V, Massot M, Schmeller DS, Clobert J (2009) Biodiversity monitoring: some proposals to adequately study species' responses to climate change. *Biodiversity and Conservation*, **18**, 3185-3203.
- Letcher RJ, Bustnes JO, Dietz R, *et al.* (2010) Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish. *Science of The Total Environment*, **408**, 2995-3043.
- Levitus S, Antonov JI, Wang J, *et al.* (2001) Anthropogenic Warming of Earth's Climate System. *Science*, **292**, 267-270.
- Li L, Ainsworth C, Pitcher T (2010) Presence of harbour seals (*Phoca vitulina*) may increase exploitable fish biomass in the Strait of Georgia. *Progress in Oceanography*, **87**, 235-241.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
- Lischer HEL and Excoffier L (2012) PGDSpider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics* **28**: 298-299.
- Link J (2002) Does food web theory work for marine ecosystems? *Marine Ecology Progress Series*, **230**, 1-9.
- Linnenschmidt M, Teilmann J, Akamatsu T, Dietz R, Miller LA (2013) Biosonar, dive, and foraging activity of satellite tracked harbor porpoises (*Phocoena phocoena*). *Marine Mammal Science*, **29**, E77-E97.

- Liret C (2001) *Domaine vital, utilisation de l'espace et des ressources : les grands dauphins, Tursiops truncatus de l'île de Sein*. Thèse de doctorat.
- Litt M, Luty J (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, **44**, 397-401.
- Liu J, Morton B (1998) The impacts of pollution on the growth, reproduction and population structure of Hong Kong limpets. *Marine Pollution Bulletin*, **36**, 152-158.
- Lockyer C, Heide-Jørgensen M, Jensen J, Kinze C, Sorensen TB (2001) Age, length and reproductive parameters of harbour porpoises *Phocoena phocoena* (L.) from West Greenland. *ICES Journal of Marine Science*, **58**, 154-162.
- Lopez A, Santos P M, Pierce P G, *et al.* (2002) Trends in strandings and by-catch of marine mammals in north-west Spain during the 1990s. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **82**, 513-521.
- Lopez J, Culver M, Stephens J, Johnson W, O'Brien S (1997) Rates of nuclear and cytoplasmic mitochondrial DNA sequence divergence in mammals. *Molecular biology and evolution*, **14**, 277-286.
- Loreau M, Naeem S, Inchausti P, *et al.* (2007) Biodiversity and Ecosystem Functioning: Current Knowledge and Future Challenges. *Science*, **294**, 804-808.
- Lotze HK, Coll M, Magera AM, Ward-Paige C, Airoidi L (2011) Recovery of marine animal populations and ecosystems. *Trends in Ecology & Evolution*, **26**, 595-605.
- Lowther AD, Harcourt RG, Goldsworthy SD, Stow A (2012) Population structure of adult female Australian sea lions is driven by fine-scale foraging site fidelity. *Animal Behaviour*, **83**, 691-701.
- Luna C, Godman S, Thatcher O, *et al.* (2012) Phenotypic and genetic divergence among harbour porpoise populations associated with habitat regions in the North Sea and adjacent seas. *Journal of Evolutionary Biology*, **25**, 674-681.
- Luo A, Zhang A, Ho SY, *et al.* (2011) Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals. *BMC Genomics*, **12**, 84.
- Lusseau D (2005) Residency pattern of bottlenose dolphins *Tursiops* spp. in Milford Sound, New Zealand, is related to boat traffic. *Marine Ecology Progress Series*, **295**, 265-272.
- Lusseau D, Williams R, Wilson B, *et al.* (2004) Parallel influence of climate on the behaviour of Pacific killer whales and Atlantic bottlenose dolphins. *Ecology Letters*, **7**, 1068-1076.

- Ma G, Ma C (2012) Effect of acclimation on heat-escape temperatures of two aphid species: Implications for estimating behavioral response of insects to climate warming. *Journal of Insect Physiology*, **58**, 303-309.
- MacLeod C (2009) Global climate change, range changes and potential implications for the conservation of marine cetaceans: a review and synthesis. *Endangered Species Research*, **7**, 125-136.
- 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.
- MacLeod C, Bannon S, Pierce G, *et al.* (2005) Climate Change And The Cetacean Community Of North-West Scotland. *Biological Conservation*, **124**, 477-483.
- Maes G, Pujolar J, Hellemans B, Volckaert A (2006) Evidence for isolation by time in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Molecular Ecology*, **15**, 2095-2107.
- Maldini D, Mazzuca L, Atkinson S (2005) Odontocete Stranding Patterns in the Main Hawaiian Islands (1937-2002): How Do They Compare with Live Animal Surveys? *Pacific Science*, **59**, 55-67.
- 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.
- Martineau D, Lemberger K, Dallaire A, *et al.* (2002) Cancer in wildlife, a case study: beluga from the St. Lawrence estuary, Quebec, Canada. *Environmental Health Perspectives*, **110**, 285-292.
- Matear R, Hirst A, McNeil B (2000) Changes in dissolved oxygen in the Southern Ocean with climate change. *Geochemistry Geophysics Geosystems*, **1**.
- Matthiessen P, Law R (2002) Contaminants and their effects on estuarine and coastal organisms in the United Kingdom in the late twentieth century. *Environmental Pollution*, **120**, 739-757.
- Mayot N, Boudouresque C, Leriche A (2005) Unexpected response of the seagrass *Posidonia oceanica* to a warm-water episode in the North Western Mediterranean Sea. *Comptes Rendus Biologies*, **328**, 291-296.
- McClenachan L, Cooper AB (2008) Extinction rate, historical population structure and ecological role of the Caribbean monk seal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **275**, 1351-1358.

- McGowen MR (2011) Toward the resolution of an explosive radiation—A multilocus phylogeny of oceanic dolphins (Delphinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **60**, 345-357.
- McGowen MR, Spaulding M, Gatesy J (2009) Divergence date estimation and a comprehensive molecular tree of extant cetaceans. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **53**, 891-906.
- McKenna MF, Cranford TW, Berta A, Pyenson ND (2012) Morphology of the odontocete melon and its implications for acoustic function. *Marine Mammal Science*, **28**, 690-713.
- Méheust E, Alfonsi E, LeMenec P *et al.* (soumise) DNA-based identification soft remains of prey in the stomach contents of grey seals (*Halichoerus grypus*) and harbour porpoises (*Phocoena phocoena*).
- Meusnier I, Singer GA, Landry J, *et al.* (2008) A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*, **9**, 214-217.
- Mirimin L, Westgate A, Emer R, *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.
- Mizroch S, Rice D, Zwiefelhofer D, Waite J, Perryman W (2009) Distribution and movements of fin whales in the North Pacific Ocean. *Mammal Review*, **39**, 193-227.
- Mollenhauer MA, Carter BJ, Peden-Adams MM, Bossart GD, Fair PA (2009) Gene expression changes in bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, skin cells following exposure to methylmercury (MeHg) or perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Aquatic Toxicology*, **91**, 10-18.
- Molnar JL, Gamboa RL, Revenga C, Spalding MD (2008) Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment*, **6**, 485-492.
- Montefalcone M, Parravicini V, Vacchi M, *et al.* (2010) Human influence on seagrass habitat fragmentation in NW Mediterranean Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **86**, 292-298.
- Montier LLC, Deng JJ, Bai Y (2009) Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *Journal of Genetics and Genomics*, **36**, 125-131.
- Moore S (2008) Marine mammals as ecosystem sentinels. *Journal of Mammalogy*, **89**, 534-540.
- Moore S, Grebmeier J, Davies J (2003) Gray whale distribution relative to forage habitat in the northern Bering Sea: current conditions and retrospective summary. *Canadian Journal of Zoology*, **81**, 734-42.

- Mora C, Metzger R, Rollo A, Myers RA (2007) Experimental simulations about the effects of overexploitation and habitat fragmentation on populations facing environmental warming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **274**, 1023-1028.
- 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.
- Moritz C (1994) Defining“evolutionarily significant units” for conservation. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **9**, 373-375.
- Morissette L, Christensen V, Pauly D (2012) Marine Mammal Impacts in Exploited Ecosystems: Would Large Scale Culling Benefit Fisheries? *PLoS ONE*, **7**, e43966.
- de Muizon C (2009) L“origine et l”histoire évolutive des Cétacés. *Comptes rendus palevol*, **8**, 295-309.
- Murphy, Murphy S, Pierce, *et al.* (2010) Assessing the effect of persistent organic pollutants on reproductive activity in common dolphins and harbour porpoises. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, **42**, 153-173.
- Möller LM, Bilgmann K, Charlton-Robb K, Beheregaray L (2008) Multi-gene evidence for a new bottlenose dolphin species in southern Australia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **49**, 674-681.
- Mössner S, Ballschmiter K (1997) Marine mammals as global pollution indicators for organochlorines. *Chemosphere*, **34**, 1285-1296.
- Natoli A, Canadas A, Peddemors M, *et al.* (2006) Phylogeography and alpha taxonomy of the common dolphin (*Delphinus* sp.). *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 943-954.
- Natoli A, Cañadas A, Vaquero C, *et al.* (2008) Conservation genetics of the short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) in the Mediterranean Sea and in the eastern North Atlantic Ocean. *Conservation Genetics*, **9**, 1479-1487.
- Nehring S (1998) Establishment of thermophilic phytoplankton species in the North Sea: biological indicators of climatic changes? *ICES Journal of Marine Science*, **55**, 818-823.
- Neumann DR (2001) Seasonal movements of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) in the north-western Bay of Plenty, New Zealand: Influence of sea surface temperature and El Nino/La Nina. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **65**, 371-374.
- Noyes PD, McElwee MK, Miller HD, *et al.* (2009) The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environment International*, **35**, 971-986.

de Oliveira LR, Arias-Schreiber M, Meyer D, Morgante JS (2006) Effective population size in a bottlenecked fur seal population. *Biological Conservation*, **131**, 505-509.

de Oliveira LR, de Castro RL, Cardenas-Alayza S, Bonatto SL (2012) Conservation genetics of South American aquatic mammals: an overview of gene diversity, population structure, phylogeography, non-invasive methods and forensics. *Mammal Review*, **42**, 275-303.

Oremus M, Poole MM, Albertson GR, Baker CS (2012) Pelagic or insular? Genetic differentiation of rough-toothed dolphins in the Society Islands, French Polynesia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **432-433**, 37-46.

Osinga N, Ferdous MM, Morick D, *et al.* (2012a) Patterns of Stranding and Mortality in Common Seals (*Phoca vitulina*) and Grey Seals (*Halichoerus grypus*) in The Netherlands between 1979 and 2008. *Journal of Comparative Pathology*, **147**, 550-565.

Osinga N, Nussbaum SB, Brakefield PM, de Haes HA, Haes HAU (2012b) Response of common seals (*Phoca vitulina*) to human disturbances in the Dollard estuary of the Wadden Sea. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde*, **77**, 281-287.

Palkovacs EP (2011) The overfishing debate: an eco-evolutionary perspective. *Trends in Ecology & Evolution*, **26**, 616-617.

Palsbøll P, Allen J, Berube M, *et al.* (1997) Genetic tagging of humpback whales. *Nature*, **388**, 767-769.

Palsbøll P, Berube M, Allendorf F (2007) Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology & Evolution*, **22**, 11-16.

Palumbi A, Cipriano F (1998) Species identification using genetic tools: the value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. *Journal of Heredity*, **89**, 459-464.

Pardo M, Jiménez-Pinedo C, Palacios D (2009) The false killer whale (*Pseudorca crassidens*) in the southwestern Caribbean: first stranding record in Colombian waters. *Latin American Journal of Aquatic Mammal*, **7**, 63-67.

Parmesan C (2006) Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **37**, 637-669.

Parsons K (2001) Reliable microsatellite genotyping of dolphin DNA from faeces. *Molecular Ecology Notes*, **1**, 341-344.

Pauls SU, Nowak C, Bálint M, Pfenninger M (2013) The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Molecular Ecology*, **22**, 925-946.

Pauly D, Trites A, Capuli E, Christensen V (1998) Diet composition and trophic levels of marine mammals. *ICES Journal of Marine Science*, **55**, 467-481.

Peltier H, Baagøe HJ, Camphuysen KC, *et al.* (2013) The Stranding Anomaly as Population Indicator: The Case of Harbour Porpoise *Phocoena phocoena* in North-Western Europe. *PLoS ONE*, **8**, e62180.

Peltier H, Dabin W, Daniel P, *et al.* (2012) The significance of stranding data as indicators of cetacean populations at sea: Modelling the drift of cetacean carcasses. *Ecological Indicators*, **18**, 278-290.

Pereira H, Cooper D (2006) Towards the global monitoring of biodiversity change. *Trends in Ecology & Evolution*, **21**, 123-129.

Perry AL, Low PJ, Ellis JR, Reynolds JD (2005) Climate Change and Distribution Shifts in Marine Fishes. *Science*, **308**, 1912-1915.

Peñuelas J, Sardans J, Estiarte M, *et al.* (2013) Evidence of current impact of climate change on life: a walk from genes to the biosphere. *Global Change Biology*, n/a-n/a.

Philippart CJ, Anadón R, Danovaro R, *et al.* (2011a) Impacts of climate change on European marine ecosystems: Observations, expectations and indicators. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **400**, 52-69.

Pichler FB, Baker CS (2012) Loss of genetic diversity in the endemic Hector's dolphin due to fisheries-related mortality. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **267**, 97-102.

Pierce GJ, Caldas M, Cedeira J, *et al.* (2010) Trends in cetacean sightings along the Galician coast, north-west Spain, 2003–2007, and inferences about cetacean habitat preferences. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **90**, 1547-1560.

Pierce GJ, Santos MB, Smeenk C, Saveliev A, Zuur AF (2007) Historical trends in the incidence of strandings of sperm whales (*Physeter macrocephalus*) on North Sea coasts: An association with positive temperature anomalies. *Fisheries Research*, **87**, 219-228.

Pierce GJ, Santos MB, Murphy S, *et al.* (2008) Bioaccumulation of persistent organic pollutants in female common dolphins (*Delphinus delphis*) and harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from *Environmental Pollution*, **153**, 401-415.

Pikesley S, Witt M, Hardy T, *et al.* (2012) Cetacean sightings and strandings: evidence for spatial and temporal trends. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **92**, 1809-1820.

PNMI (2008) Parc Naturel Marin d'Iroise : Plan de gestion 2010-2025, Etat initial. Disponible sur : <http://www.parc-marin-iroise.fr>

Polovina JJ, Howell EA, Abecassis M (2008) Ocean's least productive waters are expanding. *Geophysical Research Letters*, **35**.

- Pomeroy L (1974) The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience*, **24**, 499-504.
- Pomeroy P, Twiss S, Redman P (2000) Philopatry, site fidelity and local kin associations within grey seal breeding colonies. *Ethology*, **106**, 899-919.
- Pounds J, Fogden M, Campbell J (1999) Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature*, **398**, 611-615.
- Prieur D (1984) Reproduction du phoque gris en France durant l'hiver 1983-1984 Nouvelles réflexions sur le statut de l'espèce., **7**, 1-6.
- Prieur D, Duguay R (1978) le statut du phoque gris (*Halichoerus grypus*) en France., **10**, 1-4.
- Prieur D, Hussenot E (1983) Les mammifères marins de l'Archipel de Molène., **110**, 144-148.
- Pritchard J, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Provan J (2013) The effects of past, present and future climate change on range-wide genetic diversity in northern North Atlantic marine species. *Frontiers of Biogeography*, **5**, 60-66.
- Pusineri C, Magnin V, Meynier L, *et al.* (2007) Food and feeding ecology of the common dolphin (*Delphinus delphis*) in the oceanic northeast atlantic and comparison with its diet in neritic areas. *Marine Mammal Science*, **23**, 30-47.
- Raffin C (2003) Bases biologiques et écologiques de la conservation du milieu marin en mer d'Iroise. Thèse de doctorat.
- Ratnasingham S, Hebert P (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, **7**, 355-364.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- 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.
- Read A, Westgate A (1997) Monitoring the movements of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) with satellite telemetry. *Marine Biology*, **30**, 315-322.
- Read A, Drinker P, Northridge S (2006) Bycatch of Marine Mammals in U.S. and Global Fisheries. *Conservation Biology*, **20**, 163-169.
- Reeves R (2002) The origins and character of "aboriginal subsistence"whaling: a global review. *Mammal Review*, **32**, 71-106.

- Reichert BK (2002) Global ocean warming tied to anthropogenic forcing. *Geophysical Research Letters*, **29**.
- Reid PC, Colebrook JM, Matthews JB, Aiken J, Team CP (2003) The Continuous Plankton Recorder: concepts and history, from Plankton Indicator to undulating recorders. *Progress in Oceanography*, **58**, 117-173.
- Reidenberg JS (2007) Anatomical adaptations of aquatic mammals. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, **290**, 507-513.
- Reijnders P (1986) Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature*, **324**, 456-457.
- Reijnders P (1992) Harbour porpoises *Phocoena phocoena* in the North Sea: Numerical responses to changes in environmental conditions. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, **26**, 75-85.
- Richardson A, Schoeman D (2004) Climate impact on plankton ecosystems in the Northeast Atlantic. *Science*, **305**, 1609-1612.
- Ridoux V, Liret C, Creton P, Hassani S (2000) *Les mammifères marins de Bretagne*. Brest.
- 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 UK*, **87**, 255.
- Riedam M (1990) *The pinnipeds: seals, sea lions and walruses*. University of California Press, Berkeley.
- Rodhouse PGK (2012) Role of squid in the Southern Ocean pelagic ecosystem and the possible consequences of climate change. *Deep Sea Research Part II*.
- Roemmich D, McGowan J (1995) Climatic warming and the decline of zooplankton in the California Current. *Science*, **267**, 1324-1326.
- Rogan E, Mackey M (2007) Megafauna bycatch in drift nets for albacore tuna (*Thunnus alalunga*) in the NE Atlantic. *Fisheries Research*, **86**, 6-14.
- Roger F, Godhe A, Gamfeldt L (2012) Genetic Diversity and Ecosystem Functioning in the Face of Multiple Stressors. *PLoS ONE*, **7**.
- Roman J, Palumbi SR (2003) Whales Before Whaling in the North Atlantic. *Science*, **301**, 508-510.

- Romano T, Keogh M, Kelly C, *et al.* (2004) Anthropogenic sound and marine mammal health: measures of the nervous and immune systems before and after intense sound exposure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **61**, 1124-1134.
- Rosa S, Milinkovitch M, Waerebeek K, *et al.* (2005) Population structure of nuclear and mitochondrial DNA variation among South American Burmeister's porpoises (*Phocoena spinipinnis*). *Conservation Genetics*, **6**, 431-443.
- Rosel P (2003) PCR-based sex determination in Odontocete cetaceans. *Conservation Genetics*, **4**, 647-649.
- Rosel P, Dizon A, Haygood MG (1995) Variability of the mitochondrial control region in populations of the harbour porpoise, *Phocoena*, on interoceanic and regional scales. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **52**, 1210-1219.
- Rosel P, France S, Wang J, Kocher TD (1999a) Genetic structure of harbour porpoise *Phocoena phocoena* populations in the northwest Atlantic based on mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Ecology*, **8**, 541-554.
- Rosel P, Tiedemann R, Walton M (1999b) Genetic evidence for limited trans-Atlantic movements of the harbor porpoise *Phocoena phocoena*. *Marine Biology*, **133**, 583-591.
- 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 H, Brownell R, Brown M, *et al.* (2000) World-wide genetic differentiation of *Eubalaena*: questioning the number of right whale species. *Molecular Ecology*, **9**, 1793-1802.
- Ross H, Lento G, Dalebout M, *et al.* (2003) DNA Surveillance: Web-Based Molecular Identification of Whales, Dolphins, and Porpoises. *Journal of Heredity*, **94**, 111-114.
- Ross P (2000) Marine mammals as sentinels in ecological risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment*, **6**, 29-46.
- Roux F (1957) Sur la présence des phoques à l'île d'Ouessant., **11**, 13-18.
- Russell DJ, McConnell B, Thompson D, *et al.* (2013) Uncovering the links between foraging and breeding regions in a highly mobile mammal. *Journal of Applied Ecology*, **50**, 499-509.
- Sakahira F, Niimi M (2007) Ancient DNA analysis of the Japanese sea lion (*Zalophus californianus japonicus* Peters, 1866): Preliminary results using mitochondrial control-region sequences. *Zoological science*, **24**, 81-85.
- Samaran F, Adam O, Guinet C (2010) Detection range modeling of blue whale calls in Southwestern Indian Ocean. *Applied Acoustics*, **71**, 1099-1106.

Santamaria M, Lanave C, Vicario S, Saccone C (2007) Variability of the mitochondrial genome in mammals at the inter-species/intra-species boundary. *Biological Chemistry*, **388**, 943-946.

Santos M, Pierce G (2003) The diet of harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in the northeast Atlantic. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*, **41**, 355-390.

Santos M, Learmonth RM, Pierce G, Patterson DG, Learmonth J (2004) Variability in the diet of harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) in Scottish waters 1992–2003. *Marine Mammal Science*, **20**, 1-27.

Scheffer M, Carpenter S, de Young B (2005) Cascading effects of overfishing marine systems. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 579-581.

Schultz JK, Baker JD, Toonen RJ, Bowen BW (2008) Extremely Low Genetic Diversity in the Endangered Hawaiian Monk Seal (*Monachus schauinslandi*). *Journal of Heredity*, **100**, 25-33.

Schwartz M, Luikart G, Waples R (2007) Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology & Evolution*, **22**, 25-33.

SCOS (Special Committee on Seals), Scientific Advice on Matters Related to the Management of Seal Populations: 2012. Disponible à l'adresse suivante : <http://www.smru.st-andrews.ac.uk/pageset.aspx?psr=411>

Shearer T, Coffroth M (2008) DNA BARCODING: barcoding corals: limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 247-255.

Shirihai H, Jarrett B (2007) *Guide des mammifères marins du monde*. Delachaux et Niestlé, Paris.

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.

Siebert U, Wünschmann A, Weiss R, *et al.* (2001) Post-mortem Findings in Harbour Porpoises (*Phocoena phocoena*) from the German North and Baltic Seas. *Journal of Comparative*, **124**, 102-114.

Sih A, Jonsson BG, Luikart G (2000) Habitat loss: ecological, evolutionary and genetic consequences. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**, 132-134.

Simmonds MP, Elliott W (2009) Climate change and cetaceans: concerns and recent developments. *Journal of the Marine Biological*, **89**, 203-210.

- Simmonds MP, Isaac S (2007) The impacts of climate change on marine mammals: early signs of significant problems. *Oryx*, **41**, 19-26.
- Simmonds MP (2006) Into the brains of whales. *Applied Animal Behaviour Science*, **100**, 103-116.
- Singer GA, Hajibabaei M (2009) iBarcode.org: web-based molecular biodiversity analysis. *BMC Bioinformatics*, **10**, S14.
- Singh J (2002) The biodiversity crisis: a multifaceted review. *Current Science*, **82**, 638-647.
- Skeate ER, Perrow MR, Gilroy JJ (2012) Likely effects of construction of Scroby Sands offshore wind farm on a mixed population of harbour Phoca vitulina and grey Halichoerus grypus seals. *Marine Pollution Bulletin*, **64**, 872-881.
- Slooten E, Dawson SM (2010) Assessing the effectiveness of conservation management decisions: likely effects of new protection measures for Hector's dolphin. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, **20**, 334-347.
- Sonntag R, Benke H, Hiby A, Lick R, Adelung D (1999) Identification of the first harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) calving ground in the North Sea. *Journal of Sea Research*, **41**, 225-232.
- Southward A, Hawkins S, Burrows M (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 *Journal of thermal Biology*, **20**, 127-155.
- Steneck R, Graham M, Bourque B, *et al.* (2002) Kelp forest ecosystems: biodiversity, stability, resilience and future. *Environmental*, **39**, 436-459.
- Stenevik EK, Sundby S (2007) Impacts of climate change on commercial fish stocks in Norwegian waters. *Marine Policy*, **31**, 19-31.
- Sveegaard S, Andreassen H, Mouritsen KN, *et al.* (2012a) Correlation between the seasonal distribution of harbour porpoises and their prey in the Sound, Baltic Sea. *Marine Biology*, **159**, 1029-1037.
- Sveegaard S, Nabe-Nielsen J, Stæhr K, *et al.* (2012b) Spatial interactions between marine predators and their prey: Herring abundance as a driver for the distributions of mackerel and harbour porpoise. *Marine Ecology Progress Series*, **468**, 245-253.
- Szpiech Z, Jakobsson M, Rosenberg N (2008) ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. *Bioinformatics*, **24**, 2498-2504.

- Särnblad A, Danbolt M, Dalén L, Amir OA, Berggren P (2011) Phylogenetic placement and population structure of Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) off Zanzibar, Tanzania, based on mtDNA sequences. *Marine Mammal Science*, **27**, 431-448.
- Taguchi M, Chivers SJ, Rosel PE, Matsuishi T, Abe S (2010) Mitochondrial DNA phylogeography of the harbour porpoise *Phocoena phocoena* in the North Pacific. *Marine Biology*, **157**, 1489-1498.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and*, **28**, 2731-2739.
- Tautz D, Renz M (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic acids research*, **12**, 4127-4138.
- Thompson D, Hammond P, Nicholas K, Fedak MA (1991) Movements, diving and foraging behaviour of grey seals (*Halichoerus grypus*). *Journal of Zoology*, **224**, 223-232.
- 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 research*, **11**, 4673-4680.
- Thompson K, Baker CS, van Helden A, *et al.* (2012) The world's rarest whale. *Current Biology*, **22**, R905-R906.
- Thompson K, Millar C, Baker CS, *et al.* (2013) A novel conservation approach provides insights into the management of rare cetaceans. *Conservation*, **157**, 331-340.
- Thompson P, Ingram S, Lonergan M, *et al.* (2007) Climate change causing starvation in harbour porpoises? *Biology*, **3**, 533-535.
- Thomsen F, Laczny M, Piper W (2007) The harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in the central German Bight: phenology, abundance and distribution in 2002–2004. *Helgoland Marine Research*, **61**, 283-289.
- Thrush S, Hewitt J, Funnel G, *et al.* (2001) Fishing disturbance and marine biodiversity: the role of habitat structure in simple soft-sediment systems. *Marine Ecology Progress Series*, **223**, 277-286.
- Thrush S, Gray J, Hewitt J, Ugland K (2006) Predicting the effects of habitat homogenization on marine biodiversity. *Ecological Applications*, **16**, 1636-1642.
- Thrush S, Hewitt J, Cummings V, *et al.* (1998) Disturbance of the marine benthic habitat by commercial fishing: impacts at the scale of the fishery. *Ecological Applications*, **8**, 866-879.

- 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. *Z. Säugetierkunde*, **61**, 104-111.
- Toews DP, Brelsford A (2012) The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*, **21**, 3907-3930.
- Toft JD, Cordell JR, Simenstad CA, Stamatiou LA (2007) Fish Distribution, Abundance, and Behavior along City Shoreline Types in Puget Sound. *North American Journal of Fisheries Management*, **27**, 465-480.
- 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.
- Tolley KA, Rosel PE, Walton M, Oein N (1999) Genetic population structure of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in the North Sea and Norwegian waters. *Journal of Cetacean Research and Management*, **1**, 265-274.
- Tolley KA, Víkingsson G, Rosel PE (2001) Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeographic patterns in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the North Atlantic. *Conservation Genetics*, **2**, 349-361.
- Tonay A, Öztürk A (2012) Historical records of cetacean fishery in the Turkish seas. *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, **18**, 388-399.
- Travis JM (2003) Climate change and habitat destruction: a deadly anthropogenic cocktail. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, 467-473.
- Tripovich JS, Canfield R, Rogers TL, Arnould JP (2008) Characterization of Australian fur seal vocalizations during the breeding season. *Marine Mammal Science*, **24**, 913-928.
- Trites A, Christensen V, Pauly D (1997) Competition between fisheries and marine mammals for prey and primary production in the Pacific Ocean. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, **22**, 173-187.
- Turner A (2010) Marine pollution from antifouling paint particles. *Marine Pollution Bulletin*, **60**, 159-171.
- Turvey ST, Pitman RL, Taylor BL, *et al.* (2007) First human-caused extinction of a cetacean species? *Biology Letters*, **3**, 537-540.
- Twiss S, Poland V, JA G, Pomeroy P (2006) Finding fathers: spatio-temporal analysis of paternity assignment in grey seals (*Halichoerus grypus*). *Molecular Ecology*, **15**, 1939-1953.

- Uhen MD (2007) Evolution of marine mammals: Back to the sea after 300 million years. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, **290**, 514-522.
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, **24**, 110-117.
- Vianna J, Bonde R, Caballero S, *et al.* (2006) Phylogeography, phylogeny and hybridization in trichechid sirenians: implications for manatee conservation. *Molecular Ecology*, **15**, 433-447.
- Viaud-Martínez KA, Vergara MM, Gol'din PE, *et al.* (2007) Morphological and genetic differentiation of the Black Sea harbour porpoise *Phocoena phocoena*. *Marine Ecology Progress Series*, **338**, 281-294.
- Vilà C, Walker C, Sundqvist A, *et al.* (2003) Combined use of maternal, paternal and biparental genetic markers for the identification of wolf–dog hybrids. *Heredity*, **90**, 17-24.
- Vincent C (2001) *Bases écologiques de la conservation du phoque gris Halichoerus grypus en Mer d'Iroise*. Thèse de doctorat.
- 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.
- Vincent C, Ridoux V, Fedak M, Hassani S (2002) Mark-recapture and satellite tracking in rehabilitated juvenile grey seals (*Halichoerus grypus*): dispersal and potential effects on wild populations. *Aquatic mammals*, **28**, 121-130.
- Viricel A, Rosel PE (2012) Evaluating the utility of *cox1* for cetacean species identification. *Marine Mammal Science*, **28**, 37-62.
- Viricel A, Strand AE, Rosel PE, Ridoux V, Garcia P (2008) Insights on common dolphin (*Delphinus delphis*) social organization from genetic analysis of a mass-stranded pod. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **63**, 173-185.
- Vitousek P (1994) Beyond global warming: ecology and global change. *Ecology*, **75**, 1861-1876.
- Vollmer N, Viricel A, Wilcox L, Moore M, Rosel P (2011) The occurrence of mtDNA heteroplasmy in multiple cetacean species. *Current genetics*, **57**, 115-131.
- Vähä J, Erkinaro J, Niemelä E, Primmer CR (2008) Temporally stable genetic structure and low migration in an Atlantic salmon population complex: implications for conservation and management. *Evolutionary Applications*, **1**, 137-154.

- Waddell V, Milinkovitch M, Bérubé M, Stanhope M (2000) Molecular phylogenetic examination of the Delphinoidea trichotomy: congruent evidence from three nuclear loci indicates that porpoises (Phocoenidae) share a more recent common ancestry with white whales (Monodontidae) than they do with true dolphins (Delphinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **15**, 314-318.
- Waerebeek K, Read A (1994) Reproduction of dusky dolphins, *Lagenorhynchus obscurus*, from coastal Peru. *Journal of Mammalogy*, **75**, 1054-1062.
- Walther G, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C (2002) Ecological responses to recent climate change. *Nature*, **416**, 389-385.
- Walton M (1997) Population structure of harbour porpoises *Phocoena phocoena* in the seas around the UK and adjacent waters. *Proceedings of the Royal Society of London*, **264**, 89-94.
- Wang J, Berggren P (1997) Mitochondrial DNA analysis of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in the Baltic Sea, the Kattegat–Skagerrak Seas and off the west coast of Norway. *Marine Biology*, **127**, 531-537.
- Wang J, de Gaskin, White B (1996) Mitochondrial DNA analysis of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, subpopulations in North American waters. *Canadian Journal of*, **53**, 1632-1645.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **360**, 1847-1857.
- Weller D, Burdin A, Wursig B, Taylor B, Brownell R (2002) The western gray whale: A review of past exploitation, current status and potential threats. *Journal of Cetacean Research and Management*, **4**, 7-12.
- Westlake G, Corry-Crowe (2002) Macrogeographic structure and patterns of genetic diversity in harbor seals (*Phoca vitulina*) from Alaska to Japan. *Journal of Mammalogy*, **83**, 1111-1126.
- Whitehead H (2002) Estimates of the current global population size and historical trajectory for sperm whales. *Marine Ecology Progress Series*, **242**, 295-304.
- Whitehead H, McGill B, Worm B (2008) Diversity of deep-water cetaceans in relation to temperature: implications for ocean warming. *Ecology Letters*, **11**, 1198-1207.
- 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.

- Wildsmith MD, Rose TH, Potter IC, Warwick RM, Clarke KR (2011) Benthic macroinvertebrates as indicators of environmental deterioration in a large microtidal estuary. *Marine Pollution Bulletin*, **62**, 525-538.
- Wiley D, Asmutis R, Pitchford T, Gannon D (1995) Stranding and mortality of humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, in the mid-Atlantic and southeast United States, 1985-1992. *Fishery Bulletin*, **93**, 196-205.
- Willis P, Crespi B, Dill L, Baird R, MB H (2004) Natural hybridization between Dall's porpoises (*Phocoenoides dalli*) and harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *Canadian Journal of zoology*, **82**, 828-834.
- Wilson H, Joseph L, Moore al, Possingham H (2011) When should we save the most endangered species? *Ecology Letters*, **14**, 886-890.
- Winder M, Schindler (2004) Climate change uncouples trophic interactions in an aquatic ecosystem. *Ecology*, **85**, 2100-2106.
- Wing S, Wing E (2001) Prehistoric fisheries in the Caribbean. *Coral Reefs*, **20**, 1-8.
- Wise L, Silva A, Ferreira M, Silva M, Sequeira M (2007) Interactions between small cetaceans and the purse-seine fishery in western Portuguese waters. *Scientia Marina*, **71**, 405-412.
- Worm B, Barbier EB, Beaumont N, *et al.* (2006) Impacts of Biodiversity Loss on Ocean Ecosystem Services. *Science*, **314**, 787-790.
- Yasuhara M, Yamazaki H (2005) The impact of 150 years of anthropogenic pollution on the shallow marine ostracode fauna, Osaka Bay, Japan. *Marine Micropaleontology*, **55**, 63-74.
- Zacharias M, Roff J (2001) Use of focal species in marine conservation and management: a review and critique. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, **11**, 59-76.
- Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G (2008) Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*, **606**, 135-150.

Liste des figures

Figure 1 : Schéma des différents impacts du changement global sur les mammifères marins	35
Figure 2: Lieux d'échouages des individus de cette étude	143
Figure 3 : A : chromatogramme présentant une hétéroplasmie de taille au nucléotide 177 de la séquence du brin sens de MCR de Hgc293. B : chromatogramme présentant une hétéroplasmie de taille au nucléotide 481 de la séquence du brin complémentaire de MCR de Hgc293. La suite de la séquence est difficilement analysable pour les deux brins.	151
Figure 4 : Réseau haplotypique réalisé à partir des séquences de MCR de 31 phoques gris	154
Figure 5 : Réseau haplotypique réalisé à partir des séquences de cox1 de 39 phoques gris	155
Figure 6 : réseau haplotypique réalisé à partir des séquences de cytb de 34 phoques gris	156
Figure 7 : réseau haplotypique réalisé à partir des séquences issues de la concaténation de cox1/cytb/MCR déterminées chez 26 phoques gris	157
Figure 8 : Réseau haplotypique, construit à partir des séquences de MCR de 223 phoques gris, et présentant une grande diversité génétique et quatre haplogroupes bien séparés	159
Figure 9 : Analyse par positionnement multidimensionnel (nMDS) des distances génétiques calculées entre les 223 séquences de MCR de phoques gris. Les haplogroupes sont bien séparés	160
Figure 10: Représentation graphique d'un exemple de résultat d'analyse réalisée par le logiciel Structure	162
Figure 11 : Probabilités de justesse des groupes génétiques prédits par le logiciel Structure, en fonction de K pour l'analyse de 7 loci microsatellites pour 249 phoques gris	163
Figure 12 : Réseau haplotypique construit à partir de 223 séquences de MCR de phoques gris. Comparaison des échantillons issus de la clinique des phoques et de ceux issus d'animaux échoués morts	166
Figure 13 : Réseau haplotypique construit à partir de 205 séquences de MCR de phoques gris. Comparaison des individus mâles et femelles	169
Figure 14 : Réseau haplotypique construit à partir de 223 séquences de MCR de phoques gris. Comparaison des années d'échouages	171
Figure 15 : Fis en fonction des années pour 249 phoques gris	172
Figure 16 : Réseau haplotypique construit à partir de 223 séquences de MCR de phoques gris. Comparaison des années d'échouage paires et impaires	174
Figure 17 : Représentation graphique d'un exemple de résultat d'analyse réalisée par le logiciel Structure avec le modèle Locprior pour les années paires et impaires	175
Figure 18 : Réseau haplotypique construit à partir de 223 séquences de MCR de phoques gris. Comparaison des mois d'échouages	177
Figure 19 : Réseau haplotypique construit à partir de 213 séquences de MCR de phoques gris. Comparaison des zones d'échouages	179

<i>Figure 20 : Réseau haplotypique construit à partir de 240 séquences de phoques gris incluant les séquences de MCR issues des fèces de phoques gris aux deux autres sources d'échantillons</i>	<i>181</i>
<i>Figure 21 : Réseau haplotypique présentant les haplotypes de phoques gris échantillonnés en France et en Baltique</i>	<i>182</i>
<i>Figure 22 : Schéma synoptique de l'échouage aux séquences et profils microsatellites</i>	<i>244</i>
<i>Figure 23 : Exemple de réseau haplotypique</i>	<i>245</i>
<i>Figure 24 : Schéma synoptique des séquences à l'analyse</i>	<i>246</i>
<i>Figure 25 : Schéma synoptique des profils microsatellites à l'analyse</i>	<i>248</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Origine des échantillons utilisés</i>	144
<i>Tableau 2 : Récapitulatif du nombre d'extraits d'ADN obtenus et des taux de réussite des analyses de marqueurs moléculaires</i>	150
<i>Tableau 3 : Individus sélectionnés pour l'étude pilote portant sur trois marqueurs mitochondriaux</i>	152
<i>Tableau 4 : Polymorphismes et indices de diversités pour différents marqueurs</i>	153
<i>Tableau 5 : Polymorphismes et indices de diversités de MCR chez 223 phoques gris</i>	158
<i>Tableau 6 : Statistiques descriptives pour les 7 loci microsatellites analysés chez 249 phoques gris</i>	161
<i>Tableau 7 : Statistiques descriptives pour 7 loci microsatellites en fonction des haplogroupes mitochondriaux</i>	164
<i>Tableau 8: statistiques descriptives et indicateurs de différenciation génétique. Comparaison des échantillons issus de la clinique des phoques (Hgc) et de ceux issus d'animaux échoués morts (Hgs)</i>	165
<i>Tableau 9 : Statistiques descriptives et indicateurs de différenciation génétique. Comparaison des individus mâles et femelles</i>	168
<i>Tableau 10 : Statistiques descriptives et indicateurs de différenciation génétique. Comparaison des années d'échouages</i>	170
<i>Tableau 11 : Statistiques descriptives et indicateurs de différenciation génétique. Comparaison des années d'échouages paires et impaires</i>	173
<i>Tableau 12 : Statistiques descriptives et indicateurs de différenciation génétique. Comparaison des mois d'échouages</i>	176
<i>Tableau 13 : Statistiques descriptives et indicateurs de différenciation génétique. Comparaison des zones d'échouages</i>	178
<i>Tableau 14 : récapitulatif des séquences issues de fèces</i>	180
<i>Tableau 15 : comparaison du polymorphisme et des indices de diversité pour le marqueur MCR chez plusieurs espèces de mammifères marins</i>	187
<i>Tableau 16 : Comparaison du nombre d'allèles et des écarts à l'équilibre de Hardy-Weinberg par loci</i>	190

Annexes

Annexe 1 : Matériel et méthodes

Annexe 2 : Tableau des amorces utilisées dans cette thèse

Annexe 3 : Publication : Hassani *et al.* (2011), Utilisation du "code barre ADN" pour la reconnaissance et le suivi des populations d'espèces animales : application au marsouin commun (*Phocoena phocoena*) en Bretagne. *Arvicola*. **20**, 10-12

Annexe 4 : Publication : Hymery *et al.* (2013) Isolation of CD34+ cells from peripheral blood and bone marrow of *Tursiops truncatus*. *Marine Mammal Science*, **29**, 195-203.

Matériels et méthodes

Echouages

Pour chaque échouage de mammifères marins signalé le long des côtes françaises, un correspondant du Réseau National Echouages (RNE), géré au niveau national par l'UMS Pélagis, se rend sur place pour collecter des données et si possible des échantillons. Les données collectées sont : l'espèce, le sexe, le lieu d'échouage, le degré de décomposition, les traces de captures accidentelles, des mesures biométriques... Chaque catégorie est remplie si possible. Les informations sont ensuite rentrées dans une base de données. Des prélèvements peuvent aussi être effectués, soit externes (dents, peau, lard, muscle, melon) soit internes dans le cadre d'une dissection ou d'une autopsie (Cœur, poumons, foie, rein, estomac, gonades...). Ces prélèvements seront stockés soit à -20°C, soit dans l'éthanol à 95°. Pour la région Bretagne, la banque de prélèvement se situe à Océanopolis, le coordinateur régional. Dans le cas d'un jeune phoque échoué vivant, si l'animal présente des signes de faiblesse, il est ramené à la clinique des phoques d'Océanopolis pour des soins. Dans ce cadre, plusieurs prises de sang seront faites sur l'animal pour des raisons de suivi vétérinaire.

Prélèvement d'échantillons

Des sous échantillonnages pour les études de génétique se font sur les échantillons de la banque de prélèvements (RNE) et de sang de la clinique des phoques, à l'aide de matériel (scalpel, tubes, gants) neuf et sont ramenés au laboratoire. Ils seront conservés au congélateur ou dans l'éthanol 95° et peuvent être découpés en plusieurs morceaux. La quantité sous échantillonnée est variable, en général quelques grammes, mais ne dépasse jamais la moitié du prélèvement de la banque d'échantillons. Plusieurs tissus différents (peau, lard, muscle, rein, dent...) et des prélèvements de sang ont été utilisés en fonction de ce qui était disponible.

Extraction d'ADN

Les extractions d'ADN ont été réalisées grâce au kit DNeasy blood and tissue (Qiagen) selon le protocole du kit. Vingt cinq mg de tissu, ou 75µL de sang, sont utilisés pour l'extraction. Ils sont d'abord incubés dans un tampon de lyse, pour les tissus, le temps d'incubation est en moyenne de 2h, pour le sang de 10 min puis on ajoute un tampon de fixation. Ensuite le tout est déposé sur une colonne de silice ou passeront deux solutions de nettoyage. Enfin 2 éluats successifs (a et b) sont récupérés pour chaque extraction, à l'aide d'un tampon d'éluion. La qualité des extraits est visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose révélée à l'aide de bromure d'éthidium. La concentration d'ADN extrait est mesurée par spectrométrie UV avec un nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Des aliquots d'ADN extraits, dilués à 5ng/µL pour ceux présentant une concentration initiale supérieure, purs pour les autres, sont prélevés et le reste de l'extrait stocké à -20°C.

Amplification de l'ADN

L'amplification de l'ADN se fait dans des tubes 0,2mL (en barrette ou en plaque), le volume réactionnel étant compris entre 10 et 50µL. Pour la plupart des amplifications, les conditions de réactions sont les suivantes : concentration de l'ADN de 1ng/µL, mix réactionnel Hotgoldstar master mix X1 (Eurogentec), 10 min à 95°C au début de l'amplification pour activer l'enzyme et un cycle comprenant 30 secondes à 95°C de dénaturation et une minute à 72°C d'élongation. Les couples d'amorces, leurs concentrations, la concentration de MgCl₂, le nombre de cycles, la température d'hybridation sont variables entre les réactions (voir annexe 2). Les amplifications de loci microsatellites se sont faites de deux manières différentes : soit en utilisant une amorce spécifique portant le fluorochrome soit avec un trio d'amorces : deux amorces spécifiques au microsatellite dont une avec une queue universelle et une amorce universelle portant le fluorochrome (Schuelke, 2000).

Visualisation par électrophorèse

La visualisation des amplicons se fait la plupart du temps, par électrophorèse de 5µL de produit PCR sur gel d'agarose à 2% (m/v) avec du tampon Tris Acétate EDTA ou Tris Borate EDTA 0,5X, durant 15 minutes de migration à 100V. La visualisation de l'ADN se fait sous les UV après révélation au bromure d'éthidium. Une photographie du résultat est prise et conservée.

Séquençage

Pour le séquençage, les produits PCR sont d'abord purifiés à l'aide du kit Minelute purification (Qiagen) selon le protocole du fabricant afin de supprimer les amorces et autres résidus de la réaction d'amplification. La purification consiste en une fixation de l'ADN sur une colonne de silice à l'aide d'un tampon spécifique. Puis un nettoyage de l'ADN par le passage d'un tampon de lavage sur la colonne et enfin d'une récupération de l'ADN dans un petit volume grâce à un tampon d'éluion. Après la purification, chaque produit PCR est mis dans un microtube de 1,5mL, l'amorce de séquençage étant soit rajoutée dans le même tube, soit préparée dans un tube à part en fonction du séquençage. Ces tubes sont ensuite envoyés au prestataire (Macrogen ou GATC) pour le séquençage par méthode de Sanger. Les fichiers produits (fichier de séquence en .ab1, fichier de qualité de séquence...) sont ensuite récupérés sur le site internet du prestataire pour être analysés.

Génotypage de loci microsatellites

Après l'amplification, 1µL de produit PCR est déposé dans un puits d'une plaque 96 puits. 17µL de formamide et 0,5 µL de marqueur de taille MapMarker 400 Rox (BioVentures, Inc) sont ajoutés. Le génotypage est souvent réalisé en multiplex, des produits PCR portant des fluorochromes différents sont alors déposés dans le même puits et seront génotypés en même temps. Sur chaque plaque deux témoins négatifs sont placés. De même 4 produits PCR de référence sont insérés, ceux ci sont les mêmes sur toutes les plaques et servent à s'assurer qu'il n'y a pas de décalage entre deux passages au séquenceur. Le génotypage se fait au sein de l'unité Inserm U1078 sur un appareil 4 capillaires, Applied Biosystems 3130 Genetic

Analyser, après la dénaturation de l'ADN amplifié. Les fichiers produits sont ensuite récupérés. La Figure 22 résume l'ensemble des manipulations entre l'échouage et l'obtention des séquences et des profils microsatellites.

Traitement des séquences

Les fichiers ab1 sont ouverts à l'aide de Séquence Scanner (Applied Biosystems), la qualité de la séquence est déterminée et la partie utilisable est définie. Le début est choisi comme étant l'endroit de la séquence où la qualité devient suffisante pour ne pas avoir d'ambiguïté, la fin est déterminée par le début du reverse complément d'une des amorces d'amplification si la qualité est suffisante jusqu'à la fin. Sinon la fin est choisie comme étant l'endroit de la séquence où la qualité n'est plus suffisante pour ne pas avoir d'ambiguïtés. Entre ces deux bornes, la séquence est analysée, les nucléotides posant problème sont identifiés, référencés et corrigés. Une fois nettoyée, la séquence est enregistrée en format ab1 et en format fasta. Les séquences qui ne sont pas sûres sont séquencées à nouveau, à partir de la première amplification ou à partir d'une nouvelle amplification. Les individus présentant des séquences de mauvaises qualités ou jugées trop incertaines ne seront pas pris en compte dans la suite de l'analyse. Des individus sont séquencés plusieurs fois à partir d'amplifications différentes pour s'assurer qu'il n'y a pas d'erreur lors du protocole de laboratoire. Les séquences obtenues sont comparées à celles présentes dans le banque de séquences Genbank par un Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pour s'assurer qu'il s'agit bien de l'espèce d'intérêt et pas d'une contamination. Une vérification d'au moins 10% des séquences est effectuée par une personne qui n'a pas pris part au traitement initial afin de s'assurer qu'il n'y pas d'erreur de traitement des séquences.

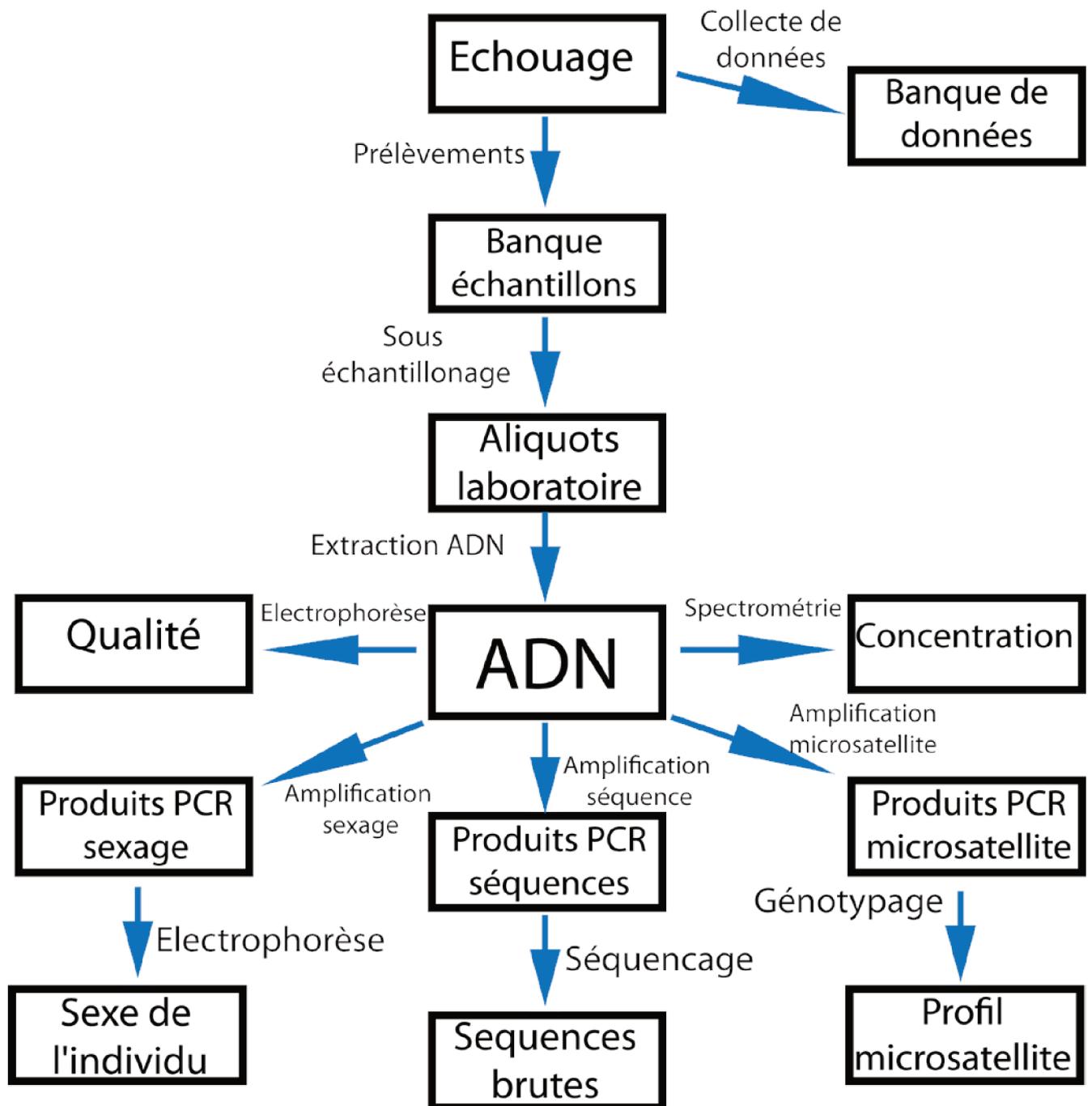


Figure 22 : Schéma synoptique de l'échouage aux séquences et profils microsatellites

Analyses des séquences

Toutes les séquences, d'une même étude, sont ouvertes sur le logiciel Bioedit (Hall 1999) et alignées à l'aide de Clustal W (Thompson *et al.* 1994). Les individus présentant des séquences trop courtes par rapport aux autres sont éliminés de l'alignement. La partie commune aux séquences est alors définie et les morceaux de séquences avant et après la partie commune sont supprimés pour le reste de l'analyse. Les haplotypes sont déterminés à l'aide du logiciel DnaSP (Librado & Rozas 2009). Chaque haplotype sera séquencé sur les deux brins pour au moins un individu. Différents indicateurs (polymorphisme, diversité

nucléotidique, diversité haplotypique...) de diversité génétique sont déterminés à l'aide de DnaSP et un fichier d'haplotype est produit. Le logiciel DnaSP permettra aussi le calcul de différents indicateurs de différenciation génétique et de flux de gènes comme le *Hst* ou le *Snn*. Le calcul du *Fst* mitochondrial et de l'AMOVA sera réalisé à l'aide du logiciel Arlequin (Excoffier *et al.* 2005). Le fichier d'haplotype est ensuite traité par le logiciel Network (Fluxus Technology) pour produire un réseau haplotypique par median joining avec star contraction. Le réseau pourra ensuite être mis en forme sur ce même logiciel. Un exemple de réseau est présenté en Figure 23.

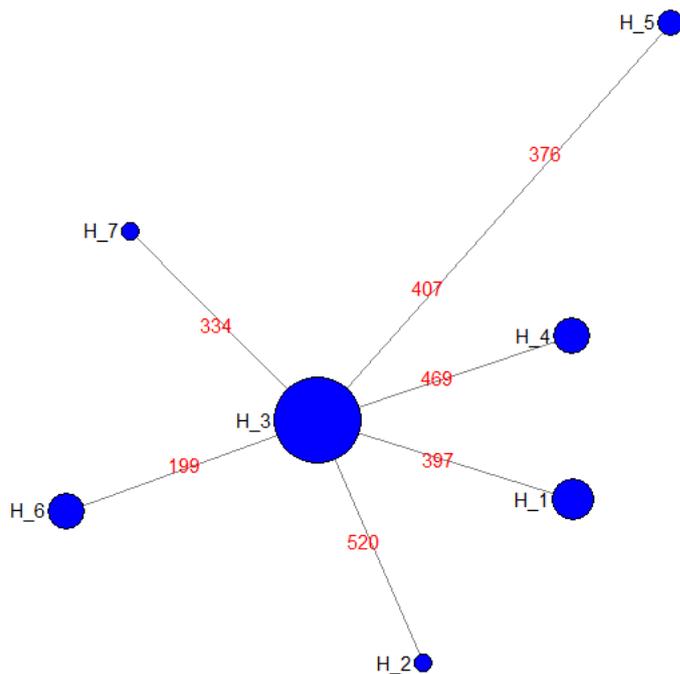


Figure 23 : Exemple de réseau haplotypique

Chaque cercle correspond à une séquence partagée par un nombre plus ou moins important d'individus. La taille du cercle est proportionnelle au nombre d'individus. Les noms d'haplotypes sont indiqués en noir à côté de chaque cercle. Les branches sont proportionnelles au nombre de mutations entre haplotypes. Les chiffres en rouge indiquent le numéro de nucléotide présentant la mutation.

A partir du fichier d'alignement de séquences, des arbres phylogénétiques sont produits soit sur le site internet phylogeny.fr (Dereeper *et al.* 2008), soit à l'aide du logiciel Mega (Tamura *et al.* 2011). Les arbres peuvent être réalisés par parcimonie (Goloboff *et al.* 2008), par Neighbor-Joining (Gascuel 1997) ou par maximum de vraisemblances (Guindon & Gascuel 2003). La robustesse des arbres est mesurée par bootstrapp like (Anisimova & Gascuel 2006). DNAdist (Felsenstein 1989) sera utilisé pour produire une matrice de distance à partir des séquences qui permettront la réalisation d'une analyse par Multi-Dimensional

Scaling à l'aide de Statistica (Statsoft, 2005). Les analyses seront effectuées par une deuxième personne à partir du fichier de séquence pour être sûr qu'il n'y ait pas eu d'erreur au cours du processus. Dans certains cas, il peut être intéressant de comparer nos séquences avec des séquences issues d'autres études. Une recherche est alors réalisée par mots clés sur Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La Figure 24 résume la démarche entre l'obtention des séquences et l'interprétation qui en est faite.

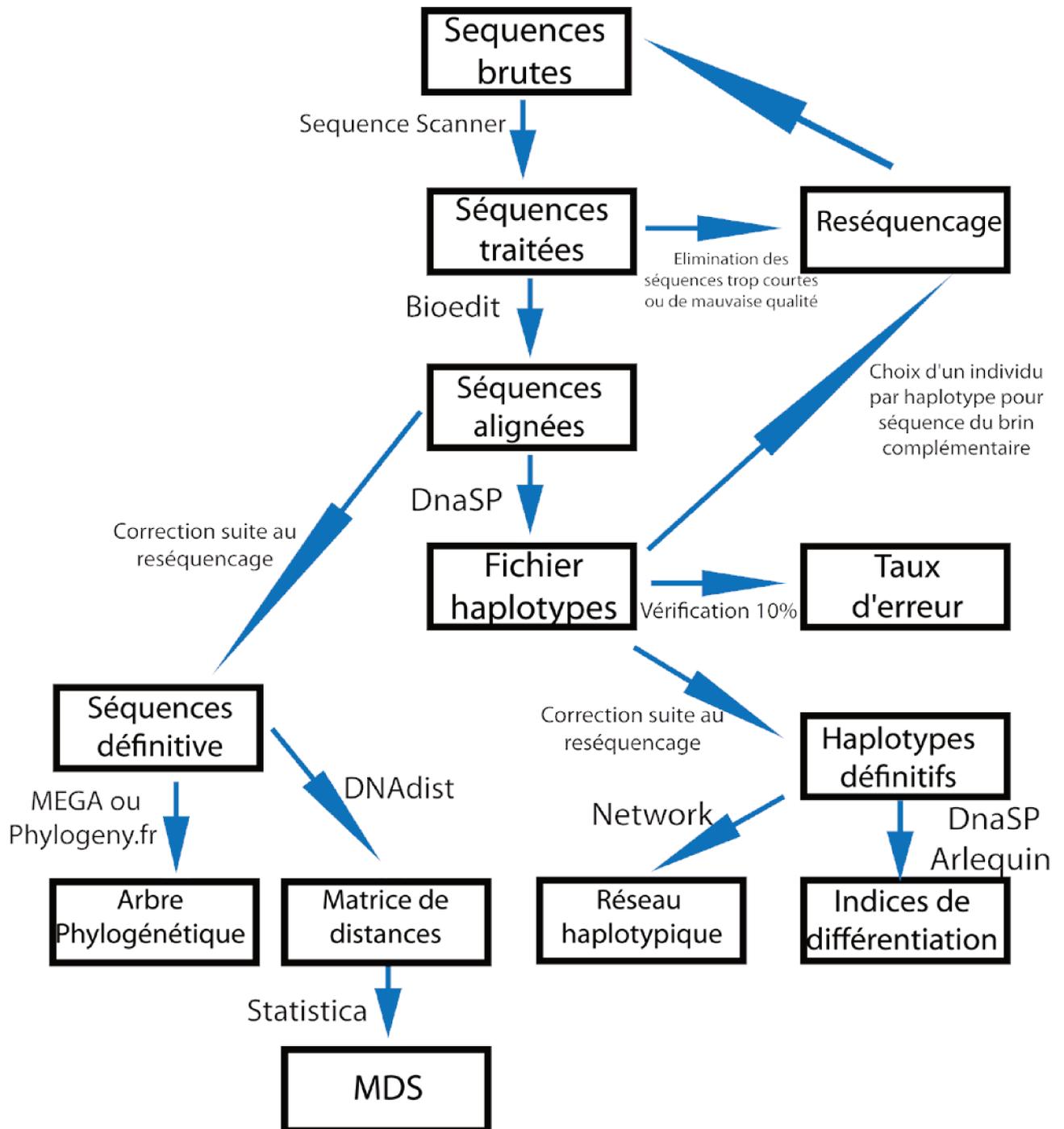


Figure 24 : Schéma synoptique des séquences à l'analyse

Lecture des microsatellites

Les fichiers ab1 de sortie de séquenceur sont ouverts avec le logiciel Genemarker (Softgenetics), les valeurs des pics du marqueur de taille ont été enregistrées comme référence et l'analyse se fait selon les paramètres standards du logiciel. Chaque profil est observé et la taille des allèles est déterminée à l'œil. Pour chaque couple individu/loci, sont enregistrées dans un tableur la zygote, la taille des allèles et la qualité du profil. Les allèles sont arrondis à l'entier le plus proche en s'assurant que les allèles entre eux gardent un écart de 2 nucléotides (dans le cas des loci dinucléotides). Une fois tous les loci lus, chaque allèle en taille est transformé en nombre de répétitions, les données sont regroupées et mises en forme pour être au format du logiciel Fstat (Goudet, 2001). Les individus pour lesquels plus de 75% des loci ne fonctionnent pas sont effacés. On peut ajouter une indication de groupe auprès de nos individus (groupe géographique, sexe...) Une fois ce format obtenu, le fichier peut être converti dans de nombreux fichiers d'entrée d'autres logiciels grâce au logiciel PGD spider (Lischer, 2009).

Statistiques descriptives

Plusieurs statistiques descriptives peuvent être calculées, que ce soit avec Fstat, Genepop (Raymond & Rousset 1995) ou Genetix (Belkhir *et al.* 1996). Il s'agit du *F_{is}*, du *F_{st}* pour comparer deux groupes et indiquer s'ils sont différents génétiquement l'un de l'autre, du déséquilibre de liaison entre les loci, du nombre d'allèle par loci et par groupe, de l'hétérozygotie observée, de l'hétérozygotie attendue. De nombreux groupes ont été testés que ce soit chez les marsouins ou chez les phoques gris (année d'échouage, sexe, groupe mitochondriaux, origine des échantillons...). La différence de richesse allélique et de nombres d'allèles privés entre deux groupes peut être évaluée par le logiciel AZDE (Szpiech *et al.* 2008).

Analyses bayésiennes

Les données microsatellites sont converties en format d'entrée du Logiciel Structure (Pritchard *et al.* 2000) grâce à PGD spider. Un fichier de description de projet est réalisé avec les métadonnées. Des analyses bayésiennes de proximité génétique sont réalisées à l'aide de chaînes de montecarlo. Les analyses sont faites selon deux modèles, l'un sans admixture, c'est à dire sans reproduction entre individus de clusters différents, et l'un avec admixture possible. Le nombre de groupe va de $K=1$ à $K=5$ au minimum, le nombre de chaîne est de 1 000 000 avec une période de Burnin de 100 000. L'analyse est réalisée en cinq itérations pour chaque condition différente. La Figure 25 résume la démarche entre l'obtention des profils microsatellites et leur interprétation.

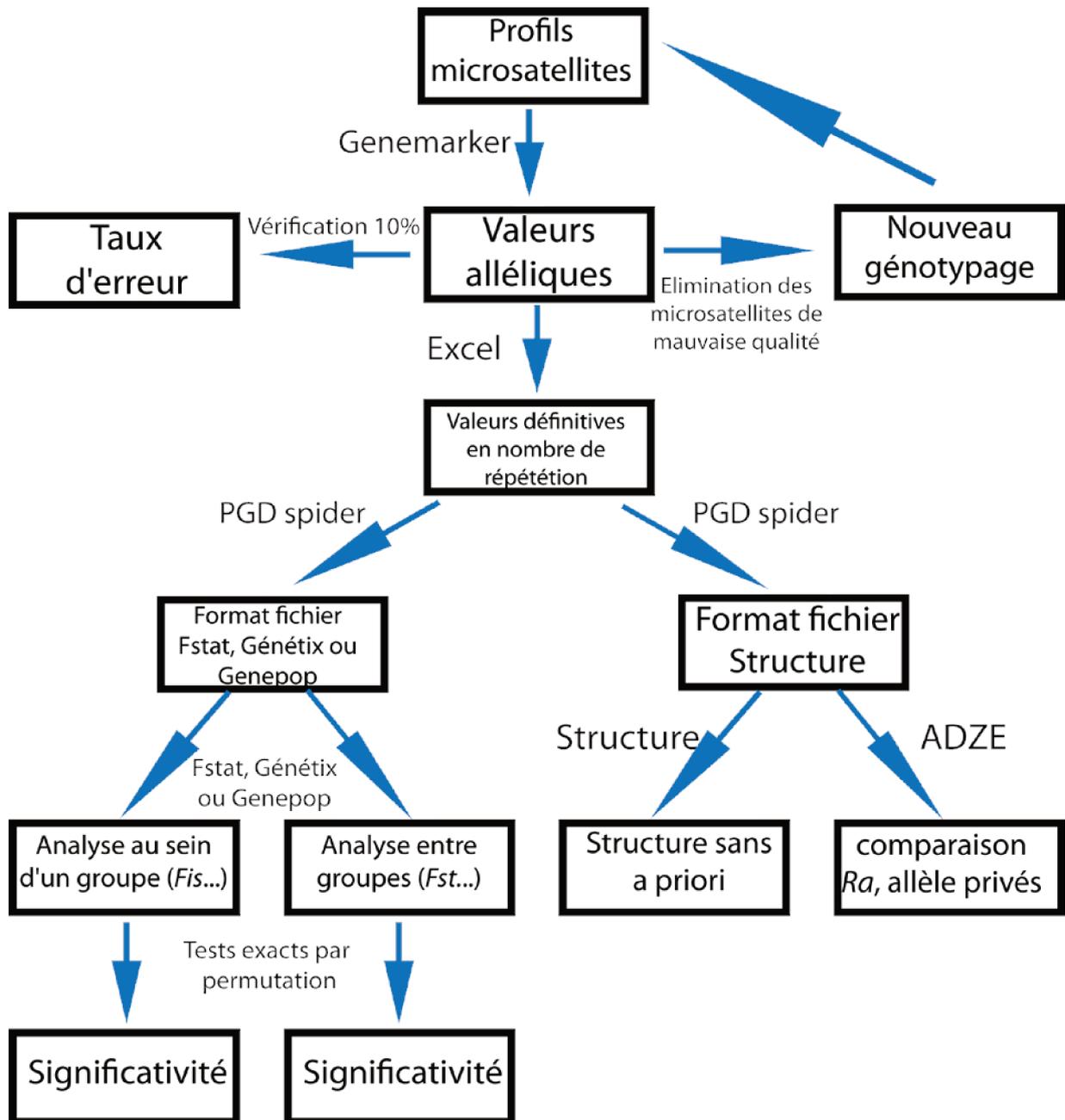


Figure 25 : Schéma synoptique des profils microsatellites à l'analyse

Annexe 2 : tableaux des amorces utilisées

manip	espèce	amorce	séquence amorces	concentration d'amorce finale par amorce en pmol/µl	concentration en MgCl ² (en mM)	nombre de cycles	température d'hybridation (en °C)	particularités	
sexage moléculaire	cétacés	SRYsens	CCCATGAACGGCTTTCATTGTGTGG	1	1,5	30	62		
		SRYas	TCTTTGGCCCTCCGACGAGGTGCATA						
		ZFYsens	ACAACCACCTGGAGAGCCACAAAGCT						
		ZFYas	GCACCTCTTTGGTATCTGAGAAAGT						
MCR	cétacés	L mcrrf	ACCTCGGTCTGTAAACC	1	2,5	5 puis 27	46 puis 53		
		H mcrr	TACCAAATGAATGAAATCTCAG						
Cox 1	cétacés	L COleasens	TCGGCCATTTACCTATGTTCAATA	0,5	2,5	32	53		
		H BCUem	GGTGGCCGGAAGAATCAGAATA						
MCR	Phoques	L MCR Hg f	TCATACCATTGCCAGCATTAT	0,5	2	35	52		
		H MCR Hg r	TACCAAATGCATGACACCACAG						
Cox 1	Phoques	L COleasens	TCGGCCATTTACCTATGTTCAATA	0,5	2,5	35	53		
		H BCUem	GGTGGCCGGAAGAATCAGAATA						
Cytochrome b	Phoques	L cytbs	TGACTTGAARAACCCAYCGTTG	0,5	2,5	40	48		
		H cyba	CCTTTCCGGTTTTACAAGAC						
Microsatellites	marsouins communs	Pp HO110Eaf	CTACACAAACCTATAAATGAGATAAA	0,4	2,5	35	55	QUF	
		Pp HO110EAR	TAGTCGACGACCGTTAGACCTTATCCGTTCTCACC						
		universelle Fam	GTCGTAGTCGACGACCGTTA					0,4	Fam en 5'
		Pp HO130Eaf	CTACACACACCTCTATTCAAGCCC						
Microsatellites	marsouins communs	Pp HO130EAR	TCGGATAGCTAGCTAGATAATGTCCAACACAGAGCAG	0,004	2,5	35	55	QUF	
		universelle Hex	GACTTCGGATAGTAGTCGT						0,4
		PpHO137Eaf	AGTGTGACAGAAATGGCCCTCA					0,4	
		PpHO137EAR	TCGGATAGCTAGCTAGCTAGCTTGGCTCCCT						0,004
universelle Hex	GACTTCGGATAGTAGTCGT	0,4	QUF						

manip (suite)	espèce	amorces	séquence amorces	concentration d'amorce finale par amorce en pmol/µL	concentration en MgCl ² (en mM)	nombre de cycles	température d'hybridation (en °C)	particularités
Microsate lites	marsouins communs	Pp HO102EAF	CCTATCAACACCCTGGAGTTATGC	0,4	2,5	35	55	QUF
		Pp HO102EAR	TCGGATAGCTGTAAGGAGAACAGGAGGAGGAGG	0,004				
Microsate lites	marsouins communs	universelle Hex	GACTTCGGATAGCTAGTCGT	0,4	2,5	35	55	QUF
		Pp HO142EAF	AAATAACACACACGCCGCA	0,4				
Microsate lites	marsouins communs	Pp HO142EAR	TAGTCGACGCGTTAAACCGTTCCCAACTGGTTTGC	0,004	2,5	35	55	Fam en 5'
		universelle Fam	GTCGTAGTCGACGACCCGTTA	0,4				
Microsate lites	marsouins communs	Pp HO104EAF	TCGGATAGCTAGTCGTTGTGTGGCTGAGAAAAGCACTGA	0,004	2,5	35	55	QUF
		Pp HO104EAR	TTTATGGCCCTGCTGGGTACAA	0,4				
Microsate lites	marsouins communs	universelle Hex	GACTTCGGATAGCTAGTCGT	0,4	2,5	35	55	Hex en 5'
		Pp HO131EAF	TAGTCGACGACCGTTAGCORTCAATCAGGACGACACCTA	0,004				
Microsate lites	marsouins communs	Pp HO131EAR	GCGCTGGAGATTTCCGACGTA	0,4	2,5	35	55	QUF
		universelle Fam	GTCGTAGTCGACGACCCGTTA	0,4				
Microsate lites	Phoques gris	HG4.2_f	AATCGAAATGCTGAGCCCTCC	1	2,5	28	50	Fam en 5'
		HG4.2_r	TGATTTGACTTCCCTCCCTG	1				
Microsate lites	Phoques gris	HG3.6_f	AGATCACATCTTTTATGGCTG	1	2,5	30	50	Hex en 5'
		HG3.6_r	GATTGGATAAAGAAGATGTGAGGG	1				
Microsate lites	Phoques gris	HgDii_f	ACCTGCCATAGTGTCTATC	1	2,5	30	50	Hex en 5'
		HgDii_r	GAGCCAACTAAGACAAGCC	1				
Microsate lites	Phoques gris	SGPv9_f	TAGTGTGGAAATGAGTTGGC	1	1,5	28	50	Fam en 5'
		SGPv9_r	CTGATCCTTGTGAATCCGACG	1				
Microsate lites	Phoques gris	Hg6.1_f	TGCACAGAGCCTAAGCAGACTG	1	3	28	50	Fam en 5'
		Hg6.1_r	CCACCAGCCAGTTCACCCAG	1				
Microsate lites	Phoques gris	Hg8.9_f	TGTTAACTATCTGCACAGAGTAAG	1	3	31	50	Dragonfly en 5'
		Hg8.9_r	TTTCTATGGTTCTACTCTCAG	1				
Microsate lites	Phoques gris	Hg8.10_f	AAITCTGAAGCAGCCCAAG	1	2,5	30	50	Hex en 5'
		Hg8.10_r	GAATCTTTTCTAGCATAGTTG	1				

QUF = Queue portant fluorochrome

Bibliographie

- Harrington L.A., Harrington A.L. & Macdonald D.W., 2008. Distinguishing tracks of mink *Mustela vison* and polecat *M. putorius*. *Eur. J. Wildl. Res.*, 54(2) : 367-371.
- Ibarra J.T., Fasola L., Macdonald D.W., Rozzi R. & Bonacic C., 2010. Invasive American mink *Mustela vison* in wetlands of the Cape Horn Biosphere Reserve, southern Chile : what are they eating ? *Fauna Flora Int.*, 43(1) : 87-90.
- Léger F. & Ruelle S., 2005. Le Vison d'Amérique, une espèce qui se développe en France... résultat d'une enquête nationale réalisée en 1999. *Faune sauv.*, 266 : 29-36.
- Lomolino M.V., 2005. Body size evolution in insular vertebrates: generality of the island rule. *J. Biogeogr.*, 32(10) : 1683-1699.
- Lyras G.A., Van der Geer A.A.E. & Rook L., 2010. Body size of insular carnivores: evidence from the fossil record. *J. Biogeogr.*, 37(6) : 1007-1021.
- Meiri S., Dayan T. & Simberloff D., 2006. The generality of the island rule reexamined. *J. Biogeogr.*, 33(9) : 1571-1577.
- Mission Vison d'Europe, 2003. *Plan national de restauration du Vison d'Europe Mustela lutreola (Linnaeus, 1761) - 1999/2003 - Bilan*. S.F.E.P.M., Paris, 113p.
- Reynolds J.C., Short M.J. & Leigh R.J., 2004. Development of population control strategies for mink *Mustela vison*, using floating rafts as monitors and trap sites. *Biol. Conserv.*, 120(4) : 533-543.
- Scherrer B., 1984. *Biostatistique*. Montréal, Québec, 850p.
- Sidorovich V.E., 1999. How to identify Mustelid tracks. *Small Carniv. Conserv.*, 20 : 22-27.
- Stevens R.T. & Kennedy M.L., 2006. Geographic variation in body size of American mink (*Mustela vison*). *Mammalia*, 70(1-2) : 145-152.
- Van Valen L., 1973. A new evolutionary law. *Evol. Theory*, 1(1) : 1-30.



Laetitia PECHEUR ¹, Pascal FOURNIER ¹, Estelle LAOUE ¹,
Emmanuel. MOUTON ¹ Charlène VIELET ² & Stéphane
AULAGNIER ³

¹ G.R.E.G.E. – A.R.P.E.N., Route de Préchac, 33730 Villandraut

² Réserve zoologique de Calviac, 24370 Calviac en Périgord

³ Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage, I.N.R.A., B.P.
52627, 31326 Castanet Tolosan cedex

Utilisation du "code barre ADN" pour la reconnaissance et le suivi des populations d'espèces animales : application au Marsouin commun (*Phocoena phocoena*) en Bretagne.

L'accès aux séquences d'ADN s'est grandement simplifié depuis l'invention de la réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR) puis grâce aux progrès des techniques de séquençage automatique. Aujourd'hui, déterminer la séquence d'un fragment d'ADN à partir d'un échantillon biologique nécessite moins d'une journée et a un coût réduit.

Les données de séquences d'ADN de toutes sortes et origines sont regroupées dans des banques informatiques, accessibles le plus souvent librement (*i.e.* Benson *et al.* 2011) et les outils informatiques de comparaisons de séquences sont de plus en plus efficaces et rapides. Les données de séquences d'ADN sont largement utilisées pour décrire différents niveaux d'organisation de la phylogénie, et cette démarche peut être concomitante à celles basées sur des données morphologiques.

Un exemple récent et spectaculaire en est donné par la détermination d'un arbre phylogénétique de plus de 73 000 taxons eucaryotes, établi en travaillant en parallèle sur des critères morphologiques et des séquences d'ADN (Goboloff *et al.* 2009). La démarche "classique" de la systématique par analyse de critères morphologiques et la démarche qui consiste à analyser des séquences d'ADN sont donc complémentaires.

La reconnaissance des espèces et le code barre ADN

En 2003, Hebert *et al.* ont formalisé un concept sous le nom de "DNA barcoding" qui peut être traduit par "code barre ADN" : il repose sur l'utilisation d'une région d'ADN standard, présente dans le génome mitochondrial des cellules eucaryotes, comme outil d'identification des espèces. La région d'ADN choisie correspond à une partie du gène codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome C Oxydase (COI).

Une banque de données, accessible à l'adresse <http://www.barcodinglife.org> regroupe et organise les séquences de COI (Ratnasingham & Hebert 2007). À ce jour (mai 2011), plus de 1,2 million de séquences concernant plus de 102 000 espèces y sont regroupées. Un outil d'identification d'espèces efficace y est proposé et accessible librement. Dans beaucoup de cas et avec une bonne probabilité de réussite, il est donc possible d'identifier l'espèce dont provient un échantillon biologique en suivant un protocole simple, peu onéreux et relativement standardisé d'extraction d'ADN, d'amplification par PCR et de séquençage d'une partie du COI.

Cette approche est discutée à plusieurs niveaux : par exemple, le gène choisi est-il le meilleur candidat (sachant qu'il ne peut être utilisé que pour les animaux), un seul gène est-il suffisant, le choix d'un gène mitochondrial est-il le plus

pertinent ? Telles sont quelques-unes des critiques qui peuvent être émises.

Mais l'interrogation la plus importante, dans le cadre précis de la reconnaissance d'espèces et pour une pleine efficacité de la méthode, est d'arriver à définir une "valeur seuil" de similarité entre deux séquences : deux individus appartiendraient à la même espèce au-dessus de cette valeur, à deux espèces différentes au-dessous. Cela reviendrait, en résumé et exprimé de manière quelque peu abrupte, à définir la notion d'espèce en fonction d'un pourcentage de ressemblance entre séquences d'une toute petite fraction du génome. Ceci est clairement réducteur, et une telle valeur seuil ne sera jamais applicable de manière générale.

Par contre, l'expérience montre que l'accumulation de données concernant un groupe phylogénique particulier peut, de manière empirique, amener à distinguer et quantifier variations intra-spécifiques *versus* variations interspécifiques. Les résultats de Borisenko *et al.* (2008) en montrent un exemple typique concernant les mammifères : les codes barres d'ADN peuvent confirmer, et même corriger dans certains cas, des identifications faites sur le terrain en conditions matériellement difficiles.

Codes barre d'ADN et mammifères marins des côtes de la Bretagne

Malgré les perfectionnements encore nécessaires à la démarche, la détermination d'une séquence courte du gène COI reste techniquement simple et extrêmement informative sur l'échantillon biologique dont elle provient. Les données de séquences s'accumulent régulièrement, et plusieurs projets sont en cours, qui visent aussi bien des études de biodiversité que d'écologie (e.g. Valentini *et al.* 2008, Viricel & Rosel 2012).

Nous avons comme projet d'utiliser cette approche, en plus du suivi classique dans le cadre du Réseau National Echouage (RNE-CRMM La Rochelle), pour étudier en routine les mammifères marins échoués le long des côtes de Bretagne. Compte tenu de sa position géographique, la Bretagne est connue pour être la région de France où les mammifères marins sont le plus diversifiés. En effet, 25 espèces différentes ont été observées au moins une fois dont une dizaine de manière régulière, constituant le noyau de la faune régionale de mammifères marins (Ridoux *et al.* 2000). Parmi les espèces recensées, certaines sont exotiques, c'est le cas pour quatre espèces de phoques arctiques et deux espèces de dauphins tropicaux.

La détermination spécifique de chacun des animaux échoués n'est pas toujours aisée lorsque la carcasse est en mauvais état, notamment lorsqu'elle est en état de dégradation avancée ou que la tête est manquante.

Un suivi de routine par code barre ADN permettra d'analyser concrètement et plus finement la biodiversité des mammifères marins le long des côtes de Bretagne, au regard des individus échoués quel que soit leur état.

Comme premier exemple, nous pouvons montrer les résultats d'études en cours pour le Marsouin commun (*Phocoena phocoena*), une espèce de retour le long des côtes bretonnes depuis quelques années, alors qu'elle en avait disparu depuis les années cinquante (Jung *et al.* 2009). Se posent les questions de l'origine géographique de cette nouvelle population ainsi que de sa structure génétique.

Nous avons pu déterminer et comparer 623 paires de nucléotides (nt) de séquences de COI de 24 individus échoués depuis 2000 le long des côtes de Bretagne au Nord Pas de

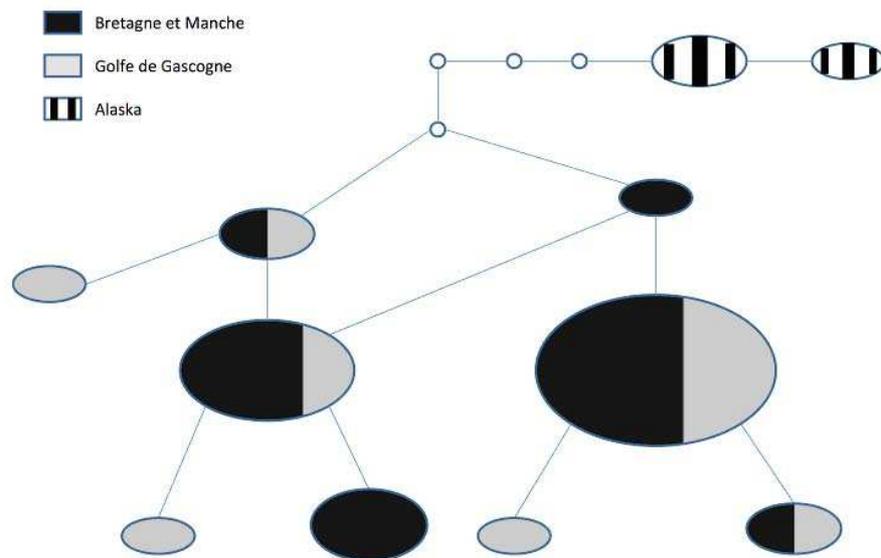


Fig. 1 : Réseau d'haplotypes de marsouins communs échoués le long des côtes françaises de la Bretagne au Nord-Pas de Calais (Bretagne et Manche), du Golfe de Gascogne et d'Alaska. Chaque ovale représente une séquence particulière de COI (un "haplotype"), la surface de chacun est proportionnelle au nombre d'individus chez qui cette séquence a été retrouvée. Le remplissage des ovales marque les origines géographiques des individus et chaque trait séparant les ovales ou les cercles vides marque un changement de 1 nucléotide sur la séquence de COI étudiée.

Tous les individus sont clairement identifiés dans l'espèce Marsouin commun (*Phocoena phocoena*) ; des différences apparaissent en fonction de l'origine géographique (côte française ou Alaska).

Calais, et les confronter à celles de marsouins échoués dans le golfe de Gascogne dans une période similaire, ainsi qu'à celles de trois marsouins communs provenant d'Alaska (contenues dans la banque de données "Genbank", Benson *et al.* 2011).

Nous avons identifié tous les individus analysés comme *Phocoena phocoena* par le système BOLD (Ratnasingham & Hebert 2007), mais les marsouins d'Europe et d'Alaska sont clairement discriminés les uns des autres (fig. 1). Quatorze nucléotides sont variables sur les 623 nt déterminés (soit 2,2% de positions variables au total) dont 5 sont spécifiques aux animaux d'Alaska. L'écart maximum entre individus échoués en France est de 5 nt variables au maximum (soit 0,8% de divergence), et augmente à 8 nt variables lorsque l'on inclut les marsouins communs d'Alaska (1,3% de divergence). Une analyse plus fine de la structure génétique du groupe de marsouins communs est en cours.

Quelques éléments de perspective

L'utilisation des codes barres ADN se développe de plus en plus car elle présente l'avantage de regrouper les efforts, et donc les données disponibles, autour d'un gène ciblé. Elle est d'un intérêt majeur dans tous les cas où les échantillons biologiques à analyser sont difficiles à identifier (à cause du stade des cycles de vie de l'organisme ou dans le cas d'espèces difficiles à reconnaître les unes des autres, lors de la transformation des organismes à des fins appliquées, par l'industrie agro-alimentaire par exemple, ou lors de la recherche de cas d'utilisation d'espèces protégées à différentes fins,...). Elle permet aussi, comme dans notre cas, de prévoir un suivi de routine nécessaire pour établir des catalogues cohérents de biodiversité, avec des déterminations d'espèces rigoureuses, sans que le taxonomiste spécialiste ne soit obligatoirement présent dans tous les cas.

Les codes barres ADN, en s'ouvrant à d'autres gènes, permettent des démarches nouvelles d'analyse de la biodiversité, soit dans le cas de recherche de toutes les

espèces présentes dans un biotope donné, soit par exemple, dans l'analyse de régimes alimentaires (Valentini *et al.* 2008).

Remerciements : Eric Alfonsi bénéficie d'une Bourse CIFRE de l'A.N.R.T. Les travaux décrits dans cet article sont menés en collaboration et avec le soutien du Parc Naturel Marin d'Iroise.

Bibliographie

- Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J. & Sayers E.W., 2011. GenBank. *Nucleic Acids Res.*, 39(Database issue): D32-7.
- Borisenko A.V., Lim B.K., Ivanova N.V., Hanner R.H. & Hebert P.D.N., 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Mol. Ecol. Res.*, 8(3) : 471-479.
- Goboloff P.A., Catalano S.A., Mirande J.M., Szumik C.A., Arias J.S., Källersjö M. & Farris J.S., 2009. Phylogenetic analysis of 73 060 taxa corroborates major eukaryotic groups. *Cladistics*, 25(3) : 211-230.
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S. & Waard J.R. de, 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc., B Biol. Sci.*, 270(suppl.1) : S96-S99.
- Jung J-L., Stephan 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. *J. mar. Biol. Assoc. UK*, 89(5) : 1045-1050.
- Ratnasingham S. & Hebert P.D.N., 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes*, 7(3) : 355-364.
- Ridoux V., Liret C., Creton P. & Hassani S, 2000. *Etudes et conservation des mammifères marins de Bretagne*. Cahiers naturalistes de Bretagne, Biotope, Mèze, 144p.
- Valentini A., Pompanon F. & Taberlet P., 2008. DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol. Evol.*, 24(2) : 110-117.
- Viricel A. & Rosel P.E., 2012. Evaluating the utility of *cox1* for cetacean species identification, *Mar. Mammal Sci.*, 28(1) : 37-62.

Sami HASSANI ¹, Eric ALFONSI ¹ & Jean-Luc JUNG ²

¹ Laboratoire d'Etude des Mammifères Marins, Océanopolis, port de plaisance, B.P. 91039, 29210 Brest cedex 1. sami.hassani@oceanopolis.com,

² EA3880, Faculté des Sciences, Université de Bretagne Occidentale, 6 avenue Victor Le Gorgeu, CS93837, 29238 Brest cedex 3. jean-luc.jung@univ-brest.fr,





MARINE MAMMAL SCIENCE, 29(1): 195–203 (January 2013)

© 2011 by the Society for Marine Mammalogy

DOI: 10.1111/j.1748-7692.2011.00540.x

Isolation of CD34⁺ cells from peripheral blood and bone marrow of *Tursiops truncatus*

NOLWENN HYMERY

EA 3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne,
IFR148 ScInBioS, ESMISAB,
Université Européenne de Bretagne & Université de Bretagne Occidentale,
Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

ERIC ALFONSI

Laboratoire d'Etude des Mammifères Marins,
Océanopolis, port de plaisance,
BP 91039, 29210 Brest cedex1, France

and

LEMAR,

Université Européenne de Bretagne & Université de Bretagne Occidentale,
IUEM, 29238 Brest Cedex3, France

and

EA3880,

Université Européenne de Bretagne & Université de Bretagne Occidentale,
UFR Sciences et Techniques,
6 Av. Victor Le Gorgeu,
CS93837, 29238 Brest Cedex3, France

CHRISTOPHE JAMIN

EA2216 “Immunology and Pathology” and IFR 148 ScInBioS,
Université Européenne de Bretagne & Université de Bretagne Occidentale,
5 avenue Foch,
BP 824, 29285 Brest Cedex, France

CHRISTINE DUMAS

Laboratoire d'Etude des Mammifères Marins,
Océanopolis, port de plaisance,
BP 91039, 29210 Brest cedex1, France

THIERRY CHAMBON

Clinique Vétérinaire Montaigne,
66 boulevard Montaigne,
29200 Brest, France

SAMI HASSANI

Laboratoire d'Etude des Mammifères Marins,
Océanopolis, port de plaisance,
BP 91039, 29210 Brest cedex1, France

JEAN-LUC JUNG¹

EA3880,

Université Européenne de Bretagne & Université de Bretagne Occidentale,

UFR Sciences et Techniques,

6 Av. Victor Le Gorgeu, CS93837,

29238 Brest Cedex3, France

E-mail: jung@univ-brest.fr

Marine mammals are often exposed to marine pollutants of diverse types and origins. Organochlorines such as polychlorinated biphenyls (PCBs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals have all been detected in marine mammal tissues and their toxicity highlighted (O'Shea and Tanabe 2003). Such toxicity has been, at least in part, attributed to immunosuppressive effects of the different compounds, and linked to increased susceptibilities to naturally occurring pathogens (e.g., De Guise *et al.* 1995, 2003; Jepson *et al.* 2005). But despite the great interest in studying immunotoxic effects of pollutants in marine mammals, ethical and practical factors strongly limit the possibilities to plan and perform experiments (De Swart *et al.* 1994), especially on free ranging animals.

Because of these limitations, toxicological studies performed on *in vitro* cultivated cells could represent a good alternative to experiments on whole animals. In fact, cell cultures have been valued for many years as tools for toxicological studies. Toxic effects of different classes of compounds have been demonstrated in human or rodent cells, cultivated *in vitro*, which belong to the myeloid and immune systems. As recent examples, myelotoxic and immunotoxic effects of naturally occurring mycotoxins (Le Dréan *et al.* 2005; Hymery *et al.* 2006, 2009; Batina *et al.* 2008) and of environmental contaminants (Van Grevenynghe *et al.* 2005, Vernhet *et al.* 2008) have been highlighted on human myeloid progenitors and differentiated cells of the immune system cultivated *in vitro*. Such studies are very informative, because they allow not only the ability to detect strong toxic effects on survival and proliferation of the cultivated cells, but also more discrete perturbations of cell differentiation. Toxic-induced apoptosis and/or necrosis can also be detected, and in addition, transcriptomic and proteomic approaches can be used to characterize variations in gene expression (Brenez *et al.* 2004, Bourdonnay *et al.* 2009, Sparfel *et al.* 2010).

In cetaceans, only a few types of cells have been used for *in vitro* primary cell cultures. Fibroblast cell cultures have been developed from skin biopsies (Marsili *et al.* 2000) and used in toxicological studies on delphinids (e.g., Spinsanti *et al.* 2008, Mollenhauer *et al.* 2009). Differentiated red and white blood cells have also been isolated and cultivated from blood samples of several cetacean species on the basis of morphological and density characteristics of the cell types (Levin *et al.* 2007, Mori *et al.* 2008). *In vitro* effects of some organochlorines on immune system cells have thus been demonstrated, including direct toxicity but also intracellular Ca⁺⁺ concentration modulations. Significantly, these studies also showed there were some major differences in the responses of mouse cells, used as a model, and marine mammal cells (Levin *et al.* 2007, Mori *et al.* 2008). These results strengthened the need to develop new toxicological models specifically on marine mammals, especially on cetaceans.

¹ Author to whom correspondence should be addressed.

In this context, our first interest was to isolate and cultivate progenitor cells of the myeloid lineage. Their use in *in vitro* toxicological studies would allow the detection of myelotoxic effects, that can be clearly linked to variations in the functioning of the immunological system. The CD34 antigen is a membrane protein expressed on a fraction of human leucocytes and on few other specific cell types like some endothelial cells, fibroblasts or tumors cells of epithelial origin (Lanza *et al.* 2001). In human and model mammals, CD34 positive cells (CD34⁺), characterized by the expression of the immaturity marker CD34, have been shown *in vivo* as well as *in vitro* as being able to differentiate into different hematological cell lineages (Lanza *et al.* 2001). Such progenitor cells constitute a relevant model for analyzing the effects of xenobiotics at an early stage of hematopoiesis (Bartolovic *et al.* 2004, Le Dréan *et al.* 2005, Van Grevenynghe *et al.* 2005, Vernhet *et al.* 2008). For example, PAHs exerted a marked toxicity toward human CD34⁺ cells cultivated *in vitro*, at the level of proliferation as well as differentiation (Van Grevenynghe *et al.* 2005), and inorganic arsenic, a major environmental contaminant, inhibits CD34⁺ cell proliferation (Verhnet *et al.* 2008). In humans, CD34⁺ cells are often isolated from bone marrow or umbilical cord blood, but peripheral blood and fetal liver have also been considered (Emerson *et al.* 1985, Broxmeyer *et al.* 1989, Gabbianelli *et al.* 1990). Isolation of CD34⁺ cells from blood or disrupted tissue samples is performed using immunomagnetic methods (Cagnoni and Shpall 1996), and the cells can then be cultivated in defined proliferating medium. Flow cytometric immunolabeling assays can be used to characterize the population of cells after this cultivation step (Le Dréan *et al.* 2005, Van Grevenynghe *et al.* 2005). Recently, Segawa *et al.* (2011) cloned two forms of CD34 cDNA of the bottlenose dolphin using primers designed from published CD34 sequences of different mammals. The putative dolphin CD34 protein possesses the overall characteristics of CD34 of other mammals. A truncated form of the protein was deduced from the sequence of the shorter cDNA, where, as in humans, the cytoplasmic region of the protein is shortened (Segawa *et al.* 2011).

We developed a method of detecting CD34⁺ cells in the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, which we could then isolate and cultivate. Cross reactivity of some antibodies between human and cetacean antigens has been demonstrated, including markers of differentiated cells of the immune system (De Guise *et al.* 1997, Jaber *et al.* 2003). This possibility is strengthened for the CD34 protein by the similarity existing between the deduced dolphin CD34 protein sequence and the human sequence (Segawa *et al.* 2011). We therefore tested the cross reactivity of commercially available antibodies directed against the human CD34 marker with bottlenose dolphin cells.

On 28 September 2010, a female bottlenose dolphin died after stranding on the beach near the town of Trégunc in Brittany on the northwest coast of France. The stranding was reported by the local correspondent of the stranding network organized by Océanopolis in Brittany (described in Jung *et al.* 2009). The animal was brought into the laboratory and autopsied. No specific signs explaining the causes of death were detected. The only peculiarity was that milk was detected in the mammary glands indicating that the animal had given birth some time ago. Within 4 h after discovery of the animal, approximately 100 mL of peripheral blood were collected near the left front flipper into trisodium citrated tubes (0.109 M) and 10 mL of bone marrow was extracted from the inside part of the left lower jaw. Bone marrow was mixed with 40 mL of an IMD (Iscove's Modified Dulbecco) medium supplemented with 20% fetal bovine serum, 4% citrate, 1% penicillin/streptomycin mixture, and

1% amphotericin B, and filtered on a BD Falcon cell strainer (mesh size 100 μm ; Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ).

Mononuclear cells were then purified on the basis of their density. Half the volume of lymphocyte separation medium (density = 1.077 g/mL; Laboratoires Eurobio, Les Ulis, France) was added to both peripheral blood and bone marrow samples, mixed and centrifuged at $400 \times g$ for 30 min. Mononuclear cells, clearly visible as a ring above the lymphocyte separation medium, were removed by pipetting, pooled in a new tube, and again centrifuged ($400 \times g$, 15 min.). They were then suspended in 1 mL of Phosphate Buffered Saline supplemented with 6% Fetal Bovine Serum (PBS-FBS). After counting the cell using Türk's solution (around 1.8×10^7 cells were isolated from blood and 4×10^4 cells from bone marrow), mononuclear cells were incubated for 30 min, at 4°C in the dark in the presence of 20 μL of FcR-Blocking Reagent and 20 μL of anti-CD34 antibody-coated magnetic microbeads (CD34 microbead kit; Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). After incubation, the magnetic labeled CD34⁺ cells were retained in a column placed in a magnetic field, and then eluted as described by the manufacturer. 3×10^3 CD34⁺ cells were isolated from bone marrow mononuclear cells and 4×10^4 CD34⁺ cells from peripheral blood cells. Yields of CD34⁺ cell isolation, calculated as the total number of CD34⁺ cells isolated among the whole mononuclear cells, were 0.22% for peripheral blood and 7.5% for bone marrow. These yields are consistent with some results obtained previously in human studies (*e.g.*, Chachques *et al.* 2008 determined 8% of CD34⁺ in bone marrow mononuclear cells). Under microscopic observation, freshly isolated CD34⁺ appeared as a homogeneous population, slightly larger than lymphocytes, and possessing a high nucleocytoplasmic ratio and visible nucleoli.

After this initial purification step, bottlenose dolphin CD34⁺ cells were cultivated in conditions similar to those favoring the proliferation of human CD34⁺ cells (Le Dréan *et al.* 2005). They were plated at 6,500 cells/mL in the Stemspan SFEM liquid medium supplemented with 1% CC100 Cytokine Cocktail (Stemspan, Stemcell Technologies Inc., Vancouver, Canada) containing human recombinant Flt-3 ligand, Stem cell factor, Interleukin-3 and Interleukin-6. Penicillin and streptomycin (GibcoBRL, Life technologies, Inchinnan, Scotland) were added at a 1% final concentration. Cultures were incubated at 37°C in a 100% relative humidity atmosphere containing 5% CO_2 .

After 5 d of culture, the cells had proliferated in both cultures. Multiplication factors of 12 were calculated. During such proliferation phase, human CD34⁺ cells also undergo a partial differentiation, which can be reflected in the disappearance of the CD34⁺ marker at the cell surface (Van Grevenynghe *et al.* 2005). We used a flow cytometry analysis to determine the continued presence of the CD34 marker on the surface of the cells and the size and granularity of the cells. CD34⁺ cells were labeled using the FITC-coupled anti-human CD34 antibody (CD34-FITC; Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) using the conditions given by the manufacturer for human CD34 cells: briefly, after washing, the cells were incubated for 30 min at 4°C in PBS-FBS, in the presence of FITC-conjugated anti-CD34 antibody. After washing, cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer using Cell Quest Software (Becton Dickinson Biosciences). FITC-conjugated anti-CD34 fluorescence (FL1-H) was collected through a 530/30 nm bandpass filter. Parameter list-mode files of 10,000 events were collected from each sample and results were expressed as a percentage of positive cells. Isotypic control labeling had been performed previously, and fluorescence quadrants were set using the mouse

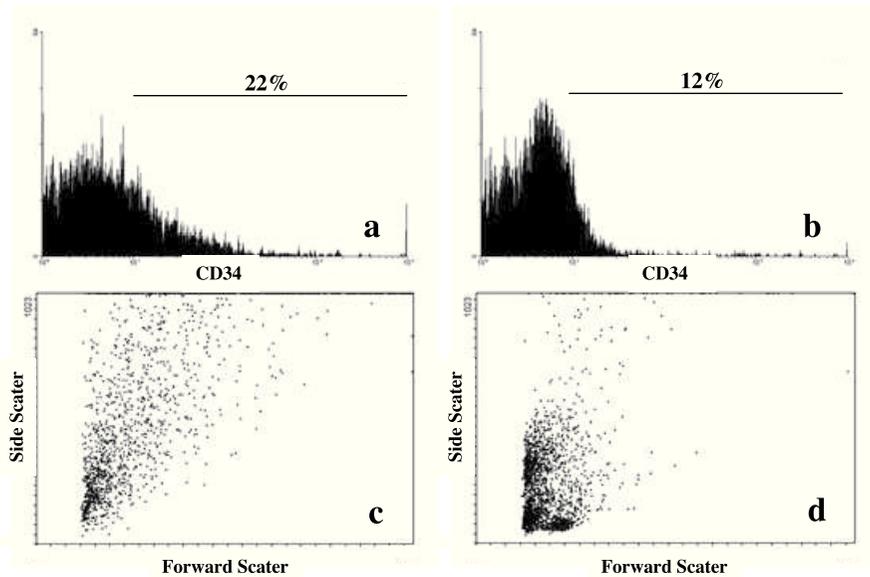


Figure 1. Phenotypic characterization of *in vitro* cultivated bottlenose dolphin progenitor CD34⁺ cells. CD34⁺ cells were isolated from a female bottlenose dolphin peripheral blood (a and c) and bone marrow (b and d), and cultivated for 5 d in conditions favoring human CD34⁺ cells proliferation. After these 5 d of culture, the cells were labeled with a FITC-coupled anti-CD34 antibody, and analyzed by flow cytometry. The percentage of CD34⁺ cells were determined and indicated on the flow cytometric graphs for cells isolated from peripheral blood (a) and bone marrow (b). Side scatter (measure of granulometry) and forward scatter (estimate of cell sizes) were also determined and these allowed estimates of the homogeneity of the cell populations originating from peripheral blood (c) and bone marrow (d) CD34⁺ cells. After 5 d of proliferation, 12% of CD34⁺ cells isolated from bone marrow still present the CD34 marker, 22% for the cells originating from the peripheral blood. Size and granulometry graphs seem to highlight that the cell populations are somewhat heterogeneous. This effect seems to be more pronounced for peripheral blood cells.

IgG1-isotype negative control antibody (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany).

Figure 1 shows the flow cytometric graphs depicting the characteristics of the bottlenose dolphin CD34⁺ progenitor cells after the 5 d of culture. The percentages of cells still presenting a CD34⁺ phenotype have been determined (Fig. 1a, b): 12% of the cells derived from the bone marrow, and 22% of the cells derived from peripheral blood were CD34⁺. The overall homogeneity of the cell populations can be deduced from the graphs representing the granulometry and the size of the cells (Fig. 1c, d). After the 5 d of culture in the specified conditions, cells derived from peripheral blood appear more heterogeneous than the ones derived from bone marrow. This could reflect either a more advanced differentiation process in peripheral blood derived cells, or the highlighting of different subpopulations of cells. A more precise study will have to be performed in the future in order to characterize the *in vitro* differentiation behavior of the dolphin CD34⁺ cells.

This study shows that bottlenose dolphin cells that are candidates for progenitor cells of the immunological system can be isolated and cultivated using technical approaches derived from human and model mammals. Samples can be peripheral blood as well as bone marrow. Dolphin cells can be isolated on the basis of the presence of a specific cell surface marker, the CD34 protein, using immunological methods and a commercially available standard kit (CD34 microbead kit; Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). The kit performs a positive selection, *i.e.*, only the cells that are recognized by the anti-CD34⁺ antibody are retained. The human CD34-specific antibody is thus here proved to cross react with an epitope present on the dolphin cells surface, which must most likely be found on the dolphin CD34 protein. This confirms the cross reactivity of some antibodies directed against human cell surface markers that have been reported on cetacean cells (Jaber *et al.* 2003). Our results are further reinforced by the fact that a second anti-human CD34 antibody, used in the flow cytometry analysis, also recognized a cell surface marker of bottlenose dolphin. In fact, anti-CD34 antibodies are classified into different classes depending on the sensitivity of their epitopes to *Vibrio* sialidase and *Pasteurella* glycoprotease treatments (Lanza *et al.* 2001). The mouse antibody QBEnd10, used for cell separation in the CD34 microbead kit, is a class II antibody that recognizes a glycoprotease-sensitive epitope located in the N-terminal part of the CD34 protein (Lanza *et al.* 2001). The AC136 antibody, used in flow cytometric analysis, is, for its part, a class III CD34-specific antibody specific for a sialidase and glycoprotease-insensitive epitope. Although the two antibodies can be used for cell recognition, QBEnd10 and AC136 recognized two different epitopes of the same human cell surface protein, the CD34 marker (Lanza *et al.* 2001), and therefore almost certainly similarly on dolphin cells.

After 5 d of culture, the bottlenose dolphin CD34⁺ cells had proliferated strongly, by factors of 12 for both blood and bone marrow cells. Flow cytometric analysis showed that, as expected, only a proportion of these cells were still detected as CD34⁺.

The CD34⁺ cell populations isolated from peripheral blood and bone marrow have been shown to be heterogeneous, and to contain both early and committed progenitors (D'Arena *et al.* 1996). In humans, their *in vitro* proliferation is then associated with a partial myeloid differentiation, which is reflected by a decrease in the percentage of CD34⁺ cells and an increase in the presence of cell differentiation markers. Van Grevenynghe *et al.* (2005) showed that there is only 16.3% of CD34⁺ cells in a 5 d culture of CD34⁺ cells isolated from human blood. After 10 d of culture, this percentage falls to 4.5% of the cells.

Our observations show that bottlenose dolphin CD34⁺ cells proliferate and differentiate *in vitro* in a way very similar to human CD34⁺ cells. One very interesting aspect of the work we plan to do now consists of characterizing the differentiation of dolphin CD34⁺ cells cultivated *in vitro*, which can be evaluated by studying the loss of the immaturity marker CD34. Class III CD34 antibodies have been shown to detect the larger human CD34⁺ cell subpopulations (Lanza *et al.* 2001). It is likely that the low percentages of cells detected as CD34⁺ after 5 d of culture are due, at least in part, to a real disappearance of the CD34 marker rather than to a difference in the specificity of the two antibodies.

These results clearly open new possibilities for studying the immunotoxicity of environmental contaminants in bottlenose dolphins. Peripheral blood of stranded animals can be used as a relatively accessible source of samples for CD34⁺ cells. The effect of xenobiotics can thus be studied in experiments similar to those performed on

human cells, *i.e.*, with sufficient amounts of cells to perform experiments in triplicate, and to study the effects of different amounts of compounds added to the culture medium (Le Dréan *et al.* 2005, Van Grevenynghe *et al.* 2005, Vernhet *et al.* 2008).

Added to the study of Segawa *et al.* (2011), who cloned and analyzed the expression of two forms of CD34 mRNA in the bottlenose dolphin, our results confirmed the usefulness of CD34 as a marker for hematopoietic progenitor cells in this species. As it has been demonstrated that mouse cells, used as a model mammal, failed to reveal some effects of pollutants that nevertheless appeared to affect marine mammals cells (Mori *et al.* 2008), the need to develop new *in vitro* models specific for marine mammals is obvious. In this context, the new possibilities offered by culturing bottlenose dolphin hematopoietic progenitor cells, isolated due to the presence of the immaturity marker CD34, will be of primary importance.

ACKNOWLEDGMENTS

We are especially grateful to Aurore Toulot and Yann Quillivic, who made the first observation of the animal, brought it to the laboratory, and helped during the autopsy. Special thanks are due to all the members of the marine mammals team of Océanopolis and of the Brittany Stranding Network (member of the French Stranding Network, CRMM, La Rochelle, France). Eric Alfonsi was supported by a grant “CIFRE” of the ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie). We are grateful to Delphine Fejan and Martin Boye (Planète sauvage Safari Park, Port Saint Père, France) for sharing with us a small blood sample of *T. truncatus*, taken for medical monitoring, for the isotypic control.

LITERATURE CITED

- Bartolovic, K., S. Balabanov, U. Hartmann, *et al.* 2004. Inhibitory effect of imatinib on normal progenitor cells *in vitro*. *Blood* 103:523–529.
- Batina, P., N. Hymery, R. Froquet, Y. Sibiril and D. Parent-Massin. 2008. Human myelotoxicity of two phycotoxins, okadaic acid and domoic acid. An *in vitro* study. *Toxicological and Environmental Chemistry* 90:141–152.
- Bourdonnay, E., C. Morzadec, O. Fardel and L. Vernhet. 2009. Redox-sensitive regulation of gene expression in human primary macrophages exposed to inorganic arsenic. *Journal of Cellular Biochemistry* 107:537–547.
- Brenez, C., P. Gerkens, G. Mazzucchelli, T. Jauniaux, G. Eppe, E. D. Pauw and M. C. Pauw-Gillet. 2004. A strategy to identify specific biomarkers related to the effects of a PCDD/F mixture on the immune system of marine mammals. *Talanta* 63:1225–1230.
- Broxmeyer, H. E., G. W. Douglas, G. Hangoc, *et al.* 1989. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:3828–3832.
- Cagnoni, P. J., and E. J. Shpall. 1996. Mobilization and selection of CD34-positive hematopoietic progenitors. *Blood Reviews* 10:1–7.
- Chachques, J. C., J. C. Trainini, N. Lago, M. Cortes-Morichetti, O. Schussler and A. Carpentier. 2008. Myocardial assistance by grafting a new bioartificial upgraded myocardium (MAGNUM Trial): Clinical feasibility study. *The Annals of Thoracic Surgery* 85:901–908.
- D’Arena, G., P. Musto, N. Cascavilla, G. Di Giorgio, F. Zendoli and M. Carotenuto. 1996. Human umbilical cord blood: Immunophenotypic heterogeneity of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Haematologica* 81:404–409.
- De Guise, S., D. Martineau, P. Beland and M. Fournier. 1995. Possible mechanisms of action of environmental contaminants on St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Environmental Health Perspectives* 103 (suppl. 4):73–77.

- De Guise, S., J. Bernier, D. Martineau, P. Béland and M. Fournier. 1997. Phenotyping of beluga whale blood lymphocytes using monoclonal antibodies. *Developmental and Comparative Immunology* 21:425–433.
- De Guise, S., K. B. Beckmen and S. D. Holladay. 2003. Contaminants and marine mammal immunotoxicology and pathology. Pages 38–54 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.
- De Swart, R. L., P. S. Ross, L. J. Vedder, *et al.* 1994. Impairment of immune function in harbour seals (*Phoca vitulina*) feeding on fish from polluted waters. *AMBIO* 23:155–159.
- Emerson, S. G., C. A. Sieff, E. A. Wang, G. G. Wong, S. C. Clark and D. G. Nathan. 1985. Purification of fetal hematopoietic progenitors and demonstration of recombinant multipotential colony-stimulating activity. *Journal of Clinical Investigation* 76:1286–1290.
- Gabbianelli, M., M. Sargiacomo, E. Pelosi, U. Testa, G. Isacchi and C. Peschle. 1990. Pure human hematopoietic progenitors: Permissive action of basic fibroblast growth factor. *Science* 249:1561–1564.
- Hymery, N., Y. Sibiril and D. Parent-Massin. 2006. Improvement of human dendritic cell culture for immunotoxicological investigations. *Cell Biology and Toxicology* 22:243–255.
- Hymery, N., K. Léon, F. G. Carpentier, J. L. Jung and D. Parent Massin. 2009. T-2 toxin inhibits the differentiation of human monocytes into dendritic cells and macrophages. *Toxicology in vitro* 23:509–519.
- Jaber, J. R., A. Fernandez, P. Herraes, *et al.* 2003. Cross-reactivity of human and bovine antibodies in striped dolphin paraffin wax-embedded tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 96:65–72.
- Jepson, P. D., P. M. Bennett, R. Deaville, C. R. Allchin, J. R. Baker and R. J. Law. 2005. Relationships between polychlorinated biphenyls and health status in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in the United Kingdom. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:238–248.
- Jung, J. L., E. Stéphan, M. Louis, E. Alfonsi, C. Liret, F. G. Carpentier and S. Hassani. 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.
- Lanza, F., L. Healy and D. R. Sutherland. 2001. Structural and functional features of the CD34 antigen: An update. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 15:1–13.
- Le Dréan, G., M. Auffret, P. Batina, F. Arnold, Y. Sibiril, D. Arzur and D. Parent-Massin. 2005. Myelotoxicity of trichothecenes and apoptosis: An *in vitro* study on human cord blood CD34⁺ hematopoietic progenitor. *Toxicology in vitro* 19:1015–1024.
- Levin, M., B. Morsey and S. De Guise. 2007. Non-coplanar PCBs induce calcium mobilization in bottlenose dolphin and beluga whale, but not in mouse leukocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 70:1220–1231.
- Marsili, L., M.C. Fossi, G. Neri, *et al.* 2000. Skin biopsies for cell cultures from mediterranean free-ranging cetaceans. *Marine Environmental Research* 50:523–526.
- Mollenhauer, M. A., B. J. Carter, M. M. Peden-Adams, G. D. Bossart and P. A. Fair. 2009. Gene expression changes in bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, skin cells following exposure to methylmercury (MeHg) or perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Aquatic Toxicology* 91:10–18.
- Mori, C., B. Morsey, M. Levin, T. S. Gorton and S. De Guise. 2008. Effects of organochlorines, individually and in mixtures, on B-cell proliferation in marine mammals and mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 71:266–275.
- O'Shea, T. J., and S. Tanabe. 2003. Persistent ocean contaminants and marine mammals: A retrospective overview. Pages 99–134 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.
- Segawa, T., T. Itou, Y. Echigoya, M. Suzuki, K. Horoshi and T. Sakai. 2011. Molecular cloning and expression of bottlenose dolphin CD34. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 139:303–307.
- Sparfel, L., M. L. Pinel-Marie, M. Boize, S. Koscielny, S. Desmots, A. Pery and O. Fardel. 2010. Transcriptional signature of human macrophages exposed to the environmental contaminant benzo (a) pyrene. *Toxicological Sciences* 114:247–259.
- Spinsanti, G., C. Panti, D. Bucalossi, L. Marsili, S. Casini, F. Frati and M. C. Fossi. 2008. Selection of reliable reference genes for qRT-PCR studies on cetacean fibroblast cultures exposed to OCs, PBDEs, and 17beta-estradiol. *Aquatic Toxicology* 87:178–186.
- Van Grevenynghe, J., M. Bernard, S. Langouet, C. Le Berre, T. Fest and O. Fardel. 2005. Human CD34-positive hematopoietic stem cells constitute targets for carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 314:693–702.
- Vernhet, L., C. Morzadec, J. Van Grevenynghe, B. Bareau, M. Corolleur, T. Fest and O. Fardel. 2008. Inorganic arsenic induces necrosis of human CD34-positive haematopoietic stem cells. *Environmental Toxicology* 23:263–268.

Received: 17 December 2010

Accepted: 1 September 2011

Le marsouin commun et le phoque gris en Mer d'Iroise et le long de la façade Atlantique française : génétique des populations et modifications de l'écosystème

Mots clefs : Biodiversité génétique, variations environnementales, suivi systématique, marqueurs mitochondriaux, microsatellites, *Phocoena phocoena*, *Halichoerus grypus*

Les mammifères marins sont des espèces clés des écosystèmes. Ils subissent un nombre important de modifications de leur milieu qui nécessitent la mise en place de stratégie de conservation. Pour cela la connaissance de la structure des populations est primordiale. Une étude de génétique des populations a été menée sur deux espèces emblématiques de la mer d'Iroise. Pour le marsouin commun, espèce connaissant un retour le long des côtes françaises, nos travaux montrent, de manière inattendue, que ce retour est le résultat de deux déplacements différents et qu'il y a une hybridation entre les individus issus de la population de la péninsule Ibérique et ceux du Nord de l'Europe. Ces déplacements sont certainement liés à des modifications de la disponibilité des proies suite à des changements du milieu. Pour le phoque gris, nos résultats montrent une grande richesse génétique, avec une structure ancestrale pour la région de contrôle mitochondriale et une panmixie pour les loci microsatellites, indiquant la présence d'une population à l'échelle du plateau Celtique. Une différenciation est observée entre les années d'échouages paires et impaires ainsi qu'une signature génétique potentielle d'individus issus d'une autre population. Enfin nous avons mené une étude pilote pour un observatoire de la biodiversité génétique des mammifères marins par la technique de code barres ADN. Cette étude montre que cet observatoire serait une manière innovante et pertinente pour suivre la biologie des mammifères marins. L'ensemble de nos résultats permettent de mieux comprendre les modifications de l'écosystème et sont un support à la mise en place de stratégie de conservation.

Key words: Genetic biodiversity, environmental variations, systematic monitoring, mitochondrial markers, microsatellites, *Phocoena phocoena*, *Halichoerus grypus*

Marine mammals are key species of ecosystems. They undergo numerous environment modifications which require conservation plans. For that, the knowledge about population structure is primary. Studies of population genetic were led about two flagship species of the Iroise Sea. For the harbour porpoise, a specie who know a return along french coasts, our works unexpectedly show this return is the result of two movements and an hybridization between individuals of the Iberia population and those of North Europe population. These movements are, probably, linked to modifications of prey's availability caused by environment changes. For the grey seal, our works show a great genetic richness, with an ancestral structure for the mitochondrial control region and a panmixia for the microsatellites loci, which are signs of a population at the scale of Celtic Shelf. A differentiation was observed between the stranding years even and odd and a possible genetic signal of individuals from another population. Finally we led a pilot study for marine mammal genetic biodiversity observatory with the DNA barcoding technique. This study shows this observatory may be a relevant and innovative means to follow the marine mammal biology. All our results bring new information about ecosystem variations and are a help for the establishment of conservation strategy.