



HAL
open science

Étude comportementale des capacités chimio-sensorielles des cétacés

Bertrand Bouchard

► **To cite this version:**

Bertrand Bouchard. Étude comportementale des capacités chimio-sensorielles des cétacés. Biologie animale. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT119 . tel-01705457

HAL Id: tel-01705457

<https://theses.hal.science/tel-01705457>

Submitted on 9 Feb 2018

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Écologie, Évolution, Ressources génétiques, Paléobiologie

École doctorale GAIA

Unité de recherche : Centre d'Écologie Fonctionnelle et Évolutive, UMR CNRS 5175

Étude Comportementale des Capacités Chimio-sensorielles des Cétacés

Présentée par Bertrand Bouchard
Le 07 Novembre 2017

Sous la direction d'Aurélie Célérier

Devant le jury composé de

Aurélie Célérier, Maître de Conférences, Université de Montpellier

Anne Charmantier, Directrice de Recherche, CNRS – CEFE

Vincent Ridoux, Professeur des Universités, Université de La Rochelle

Olivier Adam, Professeur des Universités, Université Pierre et Marie Curie

Benoist Schaal, Directeur de Recherche, CNRS – CSGA

Directrice de thèse

Présidente du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER



Humpback Whale, Thomas Lisney, 2017

« To do good, you actually have to do something »

Yvon Chouinard

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	5
LISTE DES CO-AUTEURS.....	6
TABLE DES MANUSCRITS	7
TABLE DES PRESENTATIONS ET COMMUNICATIONS	8
INTRODUCTION.....	10
A. La perception chimique, un sens crucial et ancestral	11
1. Définition de la perception chimique et de la communication chimique.....	11
2. Diversité des sens chimiques chez les mammifères terrestres.....	13
3. Fonctions biologiques de la chémoréception dans l'environnement marin.....	22
B. Ecologie sensorielle des cétacés.....	29
1. Des mammifères adaptés à l'environnement aquatique.....	30
2. Des sens chimiques globalement réduits.....	38
C. Approche expérimentale.....	49
1. Intérêt d'une étude multidisciplinaire	49
2. Modèles et sites d'étude.....	50
CHAPITRE 1 : REACTIONS COMPORTEMENTALES A DES STIMULI CHIMIQUES DANS UN CONTEXTE ALIMENTAIRE.....	54
MANUSCRIT 1 : Perception d'extraits de proies dans l'eau par le grand dauphin (<i>Tursiops truncatus</i>) en milieu captif	56
MANUSCRIT 2 : Réponses comportementales des cétacés odontocètes et des goélands au sulfure de diméthyle dans leur milieu naturel	77
MANUSCRIT 3 : Réponse comportementale et acoustique de la baleine à bosse (<i>Megaptera novaeangliae</i>) à des stimuli chimiques en zone de reproduction et d'alimentation.....	109
CHAPITRE 2 : DESCRIPTION DES BASES ANATOMIQUES ET CHIMIQUES POTENTIELLES DE LA CHEMORECEPTION CHEZ LES CETACES	140
MANUSCRIT 4 : Identification de structures chimio-sensorielles dans la cavité orale et les voies aériennes supérieures de cétacés odontocètes.....	142
MANUSCRIT 5 : Exploration par GC-MS des composés présents dans les excréta de marsouins communs morts échoués. Une solution pour déterminer la présence de phéromones chez les cétacés ?	165

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	202
A. Contribution de l'étude à une meilleure compréhension de l'écologie et des comportements des cétacés	202
1. La chémoréception intervient dans une perception multisensorielle	202
2. Description de potentielles structures chémoréceptrices dans la cavité orale et les voies aériennes supérieures	207
3. Des sécrétions caractérisées par une importante diversité chimique	210
B. Potentielles applications pour la conservation des cétacés.....	214
1. Utilisation de répulsifs chimiques pour réduire la mortalité due aux activités humaines..	214
2. Prédiction des déplacements et de l'utilisation de l'habitat.....	216
3. Applications pour les programmes de réhabilitation et de ré-introduction.....	217
C. Conclusion générale	220
ANNEXES	222
A. Etude des excréta de cétacés par une technique alternative à la chimie : utilisation d'un chien de détection.....	222
B. Test de choix appliqué aux odontocètes sauvages	225
C. Imagerie par drone : un outil performant pour l'étude de réponses comportementales chez les cétacés	233
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	240

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont en premier lieu à celle qui est à l'origine de ce projet et qui l'a conçu comme « la thèse qu'elle aurait rêvé de faire » : Aurélie Célérier. La confiance totale qu'elle m'a accordée ainsi que nos discussions passionnées ont alimenté sans cesse ma motivation et ma créativité pour aborder cette question de recherche ambitieuse. Ce projet a ainsi été l'occasion de trouver de nombreuses solutions en équipe, en particulier lors des missions de terrain, et ce toujours dans la bonne humeur grâce à son sourire contagieux. Des souvenirs inoubliables et une belle amitié à la clé.

Merci également aux autres membres de notre petite équipe « mammifères marins » : à Sylvia Campagna dont les remarques ont été précieuses notamment pour la rédaction des articles et de cette thèse, à Thomas Lisney pour son aide, ses conseils et nos grandes discussions, et à Marianne Gabirot qui s'est attelée avec patience à l'analyse de nos échantillons qui ne sentaient pas vraiment la rose.

Je tiens aussi à remercier Anne Charmantier, Olivier Adam, Vincent Ridoux et Benoist Schaal pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse. Leur lecture critique m'a permis d'apporter de nombreuses améliorations à ce manuscrit et de nouvelles perspectives à cette recherche.

Tous mes remerciements aux membres de mon comité de thèse pour leurs conseils avisés : Isabelle Charrier, Peter Tyack et Jehan-Hervé Lignot.

J'aimerais remercier l'équipe d'écologie comportementale du CEFÉ et particulièrement Francesco Bonadonna pour son travail de coordination avec le laboratoire ainsi que Simon Benhamou pour ses conseils sur le terrain et son aide dans l'analyse des images aériennes. Je tiens aussi à souligner les contributions cruciales de l'équipe gestion et du terrain d'expérience du CEFÉ : ces gens qui travaillent dans l'ombre rendent possible notre recherche, en particulier sur le terrain. Merci donc à Marguerite Platon, Natacha Bertrand, Marjorie Gadéa, Odile Turpin, David Degueldre, Pierrick Aury et Thierry Mathieu pour avoir répondu à mes appels à l'aide, souvent un peu « dernière minute ». Merci également à Richard Joffre qui a accepté de porter le chapeau de directeur de thèse jusqu'à ce qu'Aurélie puisse le faire officiellement, et merci également à sa souriante équipe.

Du fond du cœur, merci vivement à toutes les personnes qui m'ont tant aidé sur terrain et en particulier Pauline Gauffier, Philippe Verborgh, Arnaud Lecorps, Sara Torres Ortiz, Pedro García, Jose-Luis Murcia et toute l'équipe de l'association ANSE, Anjara Saloma, Sophia Rakotoharimalala, Henri Bellon, François-Xavier Mayer, Didier Cabocel et tous les volontaires de l'association CETAMADA, Marianne Rasmussen, Malicia Besnard et tous les volontaires de la station de recherche de Húsavík, Nicolas Keck et l'équipe du laboratoire vétérinaire de l'Hérault, Nathalie Espuno et Stéphane Hello du CEFÉ et enfin Laura Smith, Federico Guerrero, Miguel Isla Casares, Annie Ford et tout l'équipage de Ocean Tramp. Echanger et vivre avec vous, par tous vents, resteront certainement ce qui m'a le plus formé au cours de cette thèse.

Pour avoir accepté de relire ce manuscrit, et m'avoir soutenu à plusieurs stades de ce projet, un grand merci à Christelle Clérandeau.

D'un point de vue personnel, je tiens à remercier Pimsie d'embellir ma vie et de me tirer sans cesse vers le haut. Merci aux Skravik boyz, Aurélien et Tangi, pour leur amitié et leur confiance qui nous mèneront vers de joyeux horizons. Et merci à Shaïma de venir nous bousculer avec sa soif de liberté.

Je dédie ce manuscrit à deux passionnés des cétacés prêts à partir de l'autre côté de la terre pour les étudier, Magalie Chaigneau et Romain Bollon. Vous nous manquez.

LISTE DES CO-AUTEURS

Jean-Yves Barnagaud, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE, CNRS UMR 5175)

Sylvie Campagna, Université de Nîmes, CEFE (CNRS UMR 5175)

Aurélie Célérier, Université de Montpellier, CEFE (CNRS UMR 5175)

Marianne Gabirot, CEFE (CNRS UMR 5175)

Pauline Gauffier, Conservación, Investigación y Estudio sobre los Cetáceos (CIRCE)

Hervé Glotin, Laboratoire des Sciences de l'Information et des Systèmes (LSIS, CNRS UMR 7296)

Lonneke L. IJsseldijk, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University

Thierry Jauniaux, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Liège University

Thomas J. Lisney, Université de Montpellier, CEFE (CNRS UMR 5175)

Marion Poupard, LSIS (CNRS UMR 7296)

Sara Torres Ortiz, Marine Biological Research Centre, University of Southern Denmark

Marianne Rasmussen, Húsavík Research Centre, University of Iceland

Philippe Verborgh, Conservación, Investigación y Estudio sobre los Cetáceos (CIRCE)

TABLE DES MANUSCRITS

Manuscrit 1

Bouchard, B., Lisney, T. J., Campagna, S. and Célérier, A. (2017). Do bottlenose dolphins display behavioural response to fish taste? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 194. 120-126.

Manuscrit 2

Bouchard, B. Verborgh P., Gauffier P., Campagna S., Célérier A. Behavioural responses of odontocete cetaceans and seagulls to dimethyl sulfide. *En soumission*

Manuscrit 3

Bouchard, B., Barnagaud J-Y., Glotin H., Poupard, M., Gauffier, P., Torres Ortiz, S., Rasmussen, M., Célérier, A. Behavioural and acoustic responses of humpback whales to food-related chemical stimuli in their feeding and breeding grounds. *En préparation .*

Manuscrit 4

Lisney, T. J.[#], **Bouchard B.**[#], Haas R., Galia J., Jauniaux T., Campagna S., Givalois L. Célérier A. **Identification of chemosensory structures in the oral cavity and the upper airways of odontocete cetaceans.** *En préparation .*

Manuscrit 5

Gabirot M., **Bouchard B.**, IJsseldijk L. L., Célérier A, Campagna S.. **Exploration of the chemical compounds in stranded harbour porpoises' excreta using GC-MS: one possible means of finding pheromones in cetaceans?** *En préparation .*

[#] Contribution égale des auteurs

TABLE DES PRESENTATIONS ET COMMUNICATIONS

Communications orales

- **B. Bouchard**, A. Célérier. 2015. **Les échouages de mammifères marins: une opportunité unique pour sensibiliser le grand public à la protection de l'environnement.** Séminaire annuel du Réseau National Echouage. Le Conquet, France.
- B. Bouchard, S. Campagna, A. Célérier. 2016. **Finding food in the ocean: could cetaceans use chemical cues?** 30th Annual Conference of the European Cetacean Society. Funchal, Portugal.

Posters

- **B. Bouchard**, S. Campagna, A. Célérier. 2015. **Can cetaceans perceive taste?** A behavioral study on bottlenose dolphins. 29th Annual Conference of the European Cetacean Society. Saint Julians, Malta.
- **B. Bouchard**, A. Célérier. **Raising public awareness during stranding events using posters.** Workshop on Bottlenose Dolphin Conservation and Monitoring in Marseille, France (December 1-2, 2015)

Vacation d'enseignement

- **B. Bouchard.** **Biologie, écologie et conservation des pinnipèdes et des siréniens.** Option « Cétologie », Licence « Science de la Vie » 2^e année, Université de Montpellier.

Interventions grand public

- **B. Bouchard.** **Les sens chimiques des cétacés.** Sorties naturalistes en mer avec Découverte du vivant. Canet-en-Rousillon et Sanary-Sur-Mer. Été 2015 – Printemps 2017.
- **B. Bouchard.** **A la découverte des cétacés.** Ateliers pour élèves de primaire. Ecoles primaires de Boutonnet et d'Aiguelongue, Montpellier. Automne 2015 – Printemps 2017.

Médias grand public

- **B. Bouchard.** 2016. **Sous l'océan, on ne s'entend plus chanter.** Oiseau Magazine. 124 (Automne)
Disponible : <https://drive.google.com/file/d/0B38oZC0YO4k7TVRNbjNFRVZEc2M>
- A. Diguët, C. Frésillon Cyril Frésillon. 2017. **Les globicéphales ont-ils du nez ?** In : Carnet de Sciences #2. CNRS Editions, Paris, France. 237 pp. ISBN : 978-2070128649
- C. Delhaye, C. Gombert, D. Boclet. Sens cachés des cétacés. 2018. CNRS Images.
- C. Dupuyds, V. Pfannerstill, M. Vergniol, L. Chab. 2016. **Cétacé comment tu t'sens ?** Ateliers Films d'Animation Scientifiques. Université de Montpellier.
Disponible : <https://youtu.be/8okoyiTmBEw>

INTRODUCTION

Parmi les mammifères marins, les cétacés sont probablement ceux dont les adaptations au milieu aquatique sont les plus marquées. Celles-ci concernent tous les aspects de leur biologie, autant au niveau anatomique, physiologique que comportemental. Le développement de capacités auditives d'une acuité exceptionnelle, dans un milieu très favorable à la propagation des ondes sonores, est l'un des exemples les plus frappants de l'importance des bouleversements survenus dans leur écologie sensorielle. Celles-ci ont d'ailleurs fait l'objet d'un grand nombre d'étude depuis plus d'un demi-siècle et sont aujourd'hui très bien décrites. En revanche, d'autres aspects de leur perception de l'environnement, notamment l'utilisation des signaux chimiques pour trouver leurs proies, s'orienter ou communiquer avec leurs congénères, restent encore obscurs. Pourtant, une meilleure connaissance de l'utilisation de ce canal sensoriel pourrait améliorer la compréhension de leurs comportements et leurs déplacements et ainsi contribuer significativement à établir des mesures efficaces de gestion et de conservation.

Dans cette thèse, je décris mes travaux de recherche sur la perception des stimuli chimiques (chémo-réception) chez les cétacés. En introduction, après avoir défini la notion de chémo-réception, je présenterai l'organisation anatomique et structurale des différents sens chimiques (olfaction, gustation et perception trigéminal) chez les mammifères terrestres, pour lesquels les données sont aujourd'hui les plus complètes. Pour mieux appréhender l'utilisation potentielle de ces sens par les cétacés, je développerai les fonctions biologiques dans lesquelles ils sont impliqués chez les autres grands prédateurs marins. Enfin, je présenterai les connaissances actuelles sur l'écologie sensorielle des cétacés, et détaillerai particulièrement les rares études anatomiques, génétiques et comportementales ayant porté sur leurs capacités chimio-sensorielles.

De cette revue de la littérature se dégageront les grandes lacunes et paradoxes qui subsistent encore à l'heure actuelle et qui constituent les grandes questions de ma thèse. Je présenterai alors l'approche méthodologique utilisée, en justifiant notamment le choix des modèles d'études et des techniques expérimentales. Finalement, après avoir présenté mes travaux de recherche sous forme d'articles scientifiques, je discuterai des implications des résultats obtenus et de leur contribution à une meilleure compréhension de l'écologie des cétacés. Je conclurai finalement sur les possibles applications de ces nouvelles connaissances fondamentales dans le domaine de la gestion et de la conservation de ces espèces menacées.

A. La perception chimique, un sens crucial et ancestral

1. Définition de la perception chimique et de la communication chimique

Pour survivre et se reproduire, les animaux doivent répondre de façon adaptée à leur environnement et communiquer avec leurs congénères. La perception des stimuli chimiques (chémoréception) est la première forme de communication et de perception du milieu à être apparue au cours de l'évolution des êtres vivants. Ainsi, elle joue un rôle crucial autant chez les bactéries que chez les animaux vertébrés : la transduction d'un stimulus chimique en un signal nerveux menant ultimement à une réponse biologique (Zufall & Munger 2016).

Bien qu'il existe une forme de chémoréception interne chez les animaux pluricellulaires, utile au maintien de l'homéostasie et basée sur des récepteurs chimiques sensibles aux molécules présentes dans les fluides biologiques, nous nous intéresserons ici à la perception des stimuli provenant du milieu extérieur. C'est en effet ce système qui permet aux animaux de répondre aux indices et signaux chimiques auxquels ils sont exposés. Pour autant de façon générale, le principe de détection reste le même pour les différentes formes de chémoréception : l'interaction entre une molécule chimique (ligand) avec une cellule équipée d'un récepteur membranaire spécifique.

En écologie comportementale, on distingue deux grands types de molécules chimiques : les signaux et les indices. Définir une substance comme un signal ou comme un indice dépend des pressions sélectives que l'on considère (Steiger et al. 2011) :

- Un **signal** repose sur une molécule (ou un mélange) produite **intentionnellement** par un individu émetteur et qui **a évolué spécifiquement pour être perçue par un animal récepteur** dans le cadre d'une communication chimique. Ce signal a été sélectionné au cours de l'évolution car il augmente la valeur adaptative¹ de l'émetteur et du récepteur. Un exemple de signal intra-spécifique est le signal d'alarme ((Z)-11-eicosen-1-ol) émis par l'abeille mellifère (*Apis mellifera*), qui attire les congénères vers l'individu émetteur et entraîne ainsi un comportement de défense collectif synchronisé.

¹ Capacité à survivre et se reproduire (« fitness » en anglais)

- Un **indice** chimique est quant à lui une molécule (ou mélange) qui transmet une information **sans avoir été sélectionnée au cours de l'évolution pour assurer cette fonction**. Ces substances peuvent être d'origine biologique et transmises de façon **non-intentionnelle** de la part de l'émetteur : par exemple, les molécules émises par des tissus lésés (blessure) peuvent constituer un indice attractif pour les prédateurs. Un indice chimique peut également être d'origine abiotique (émis par l'environnement), telle la salinité de l'eau qui peut constituer un indice de la présence d'un estuaire pour des poissons migrateurs.

De façon intéressante, certains signaux peuvent être utilisés comme indices par d'autres espèces « à l'insu » de l'émetteur. C'est le cas du (Z)-11-eicosen-1-ol évoqué précédemment qui constitue un indice attractif inter-spécifique pour une guêpe prédatrice (*Philanthus triangulum*), car elle l'utilise pour localiser les abeilles dont elle se nourrit. Par ailleurs on considère qu'au cours de l'évolution, certains indices sont des précurseurs des signaux : par exemple, des sous-produits métaboliques volatiles peuvent évoluer en signaux d'attraction inter-spécifique (après un processus d'amplification) (Steiger et al. 2011).

Il existe aujourd'hui très peu de données sur la chémoréception chez les cétacés. Les causes de ce désintérêt sont multiples et incluent probablement le véritable défi que constitue l'étude du comportement de ces espèces en milieu naturel, qui nécessite des moyens logistiques importants. Egalement, la faible disponibilité des prélèvements anatomiques, pour la plupart effectués sur des animaux échoués (et par conséquent dans un état de conservation très variable) de façon opportuniste, a certainement contribué à limiter les travaux de recherche dans ce domaine. Enfin, l'effort de recherche sur l'écologie sensorielle des cétacés s'est naturellement concentré sur leurs exceptionnelles capacités acoustiques, qui ont suscité un fort intérêt et des financements importants. L'essentiel de nos connaissances s'inspire donc de comparaisons avec les mammifères terrestres, chez qui l'organisation structurale et fonctionnelle de la perception chimique a été plus largement étudiée.

2. Diversité des sens chimiques chez les mammifères terrestres

Chez les mammifères, on retrouve trois grands systèmes principaux de chémoréception : l'olfaction, la gustation et la perception trigéminal. Bien que ces trois systèmes soient distincts sur le plan anatomique, ils sont complémentaires et intégrés conjointement pour créer une sensation unique. Par exemple, la sensation provoquée par un goût est modulée en fonction des stimuli olfactifs et trigéminaux reçus simultanément.

a) Olfaction

Chez les vertébrés terrestres, l'olfaction permet la perception de substances chimiques volatiles présentes dans l'air inhalé, qui circule dans les cavités nasales. Le stimulus olfactif est ainsi créé par l'association entre un ligand de faible poids moléculaire (généralement inférieur à 300 Da) et le site spécifique d'un récepteur. Celui-ci est exprimé par un neurone olfactif qui permet la transmission du signal au bulbe olfactif dans le cerveau. Il existe plusieurs classes de récepteurs olfactifs, caractérisées par des propriétés et des localisations variées. On distingue ainsi les récepteurs olfactifs (OR) et les récepteurs associés aux amines traces (Trace-Amine Associated Receptors, TAAR) qui appartiennent tous deux au **système olfactif principal**, ainsi que les récepteurs de l'organe voméronasal (V1R et V2R) et les récepteurs aux peptides N-formylés impliqués dans le **système olfactif accessoire**.

- Le système olfactif principal

Ce système met en jeu la muqueuse olfactive située sur le plafond de la cavité nasale et comprend deux principaux types de récepteurs (OR et TAAR) qui transmettent le stimulus chimique au bulbe olfactif principal dans l'encéphale via le nerf olfactif (nerf crânien I).

Les récepteurs olfactifs (OR) sont les plus nombreux, avec 2130 gènes identifiés jusqu'à présent chez les vertébrés, et ils constituent les composants principaux du sens de l'odorat (Kaupp 2010). Chaque espèce de mammifère possède un répertoire distinct d'OR, allant de 600 chez le macaque à plus de 1700 chez le rat (Nei et al. 2008). Une des caractéristiques de ce répertoire de gènes est une forte proportion

de pseudogènes² : de 19.7% chez l'opossum à plus de 50% chez les primates ou l'ornithorynque (Nei et al. 2008). De façon surprenante, la différence de proportion de pseudogènes entre deux espèces ne se traduit pas nécessairement sur le plan fonctionnel et notamment en terme d'acuité olfactive (Laska et al. 2005). Ceci est principalement dû aux processus d'intégration centrale qui jouent un rôle primordial dans la perception sensorielle, comme nous le verrons plus loin. Les OR sont des protéines transmembranaires appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines-G (RCPG). Ils sont principalement localisés dans les terminaisons libres du nerf olfactif (nerf crânien I), qui innerve la muqueuse olfactive située sur la partie dorsale de la cavité nasale. Chaque neurone n'exprime qu'un seul type d'OR et projette dans l'encéphale au niveau du bulbe olfactif, en passant par les perforations de la lame criblée de l'os ethmoïde. Alors que certains OR ne se lient qu'avec un ligand spécifique (« spécialistes »), d'autres ont un spectre beaucoup plus large (« généralistes »). Cependant, le fait qu'un OR soit généraliste ou spécialiste peut dépendre du contexte, tel que la concentration de la substance ou le nombre de molécules perçues simultanément (Kaupp 2010). Le système olfactif des mammifères utilise donc différents mécanismes pour encoder la diversité chimique des odorants, et la capacité de discrimination olfactive d'une espèce est par conséquent bien supérieure à la somme des OR qu'elle exprime. On estime par exemple que les rongeurs, ou même les humains, pourraient distinguer plusieurs milliers, voire dizaines de milliers de molécules (Kaupp 2010).

A l'instar des OR, les récepteurs TAAR sont des RCPG qui se trouvent également dans l'épithélium olfactif principal et répondent à la règle « un neurone – un récepteur ». Cependant, ces récepteurs semblent fonctionner uniquement comme des spécialistes, car tous les TAAR testés jusqu'à présent n'ont répondu qu'à un seul ligand (Kaupp 2010). Comme leur nom l'indique, ils détectent principalement les amines volatiles. Par exemple, le TAAR-4 se lie spécifiquement à la 2-phenylethylamine présente dans l'urine de prédateurs, entraînant un comportement d'aversion stéréotypé chez les rongeurs. Le TAAR-13c détecte quant à lui la cadavérine dans les tissus en

² gènes devenus non fonctionnels au cours de l'évolution

décomposition, et son activation provoque une réaction d'aversion autant chez la souris (*Mus musculus*) que chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Liberles 2015).

Un troisième type de neurones a été récemment découvert en faible quantité dans l'épithélium olfactif principal, exprimant le récepteur à activité guanylate cyclase (GC-D). Ce récepteur est activé par au moins deux peptides, l'uroguanyline et la guanyline, impliqués dans les transports d'eau et de sels minéraux dans l'intestin et le rein. Bien que son rôle reste à déterminer précisément, il semble contribuer à la fois à un système de maintien de l'équilibre hydrique et électrolytique ainsi qu'à la détection de signaux chimiques reliés à la faim, la satiété et la soif (Leinders-Zufall et al. 2007).

- Le système olfactif accessoire

Le système olfactif accessoire (ou secondaire) repose sur l'épithélium sensoriel de l'organe voméronasal (ou organe de Jacobson) qui existe chez la plupart des reptiles et des mammifères. Il se trouve chez les mammifères autour du canal naso-palatin qui relie le palais dur au plancher de la cavité nasale. Deux familles de récepteur voméronasal, V1R et V2R, sont exprimées par des neurones situés respectivement dans les zones apicales et basales de cet organe. Les axones de ces neurones projettent dans le bulbe olfactif accessoire, situé au niveau dorso-postérieur du bulbe olfactif principal. Puisque les ligands de V1R et V2R sont principalement des composés à fonctions sociales et reproductives (ex. dérivés stéroïdes), l'organe voméronasal a longtemps été considéré comme un organe spécialisé dans la détection des phéromones³. Cependant, ses fonctions semblent être plus diversifiées et il présente d'autres types de récepteurs comme certains OR (Kaupp 2010). De plus, certaines phéromones stimulent le système principal alors que certaines odeurs sans fonction hormonale peuvent moduler le comportement en activant uniquement le système secondaire (Su et al. 2009). La distinction

³ Une phéromone est un signal chimique définie par plusieurs critères (Beauchamp et al. 1976) :

Etre **simple chimiquement** : basée sur une molécule unique ou un faible nombre de molécules dans une proportion donnée

- Elle doit provoquer une **réponse comportementale constante et non ambiguë** dans un contexte donné
- La perception doit être **spécifique**
- Elle doit être **conservée** dans une espèce donnée
- Elle ne doit **pas dépendre, ou dans une faible mesure, d'une exposition ou un apprentissage** préalable.

fonctionnelle entre les systèmes olfactifs principal et accessoire est donc plus floue que ce qui était communément admis auparavant.

Des récepteurs olfactifs aux localisations atypiques

Alors que la plupart des récepteurs aux molécules volatiles se trouvent dans l'épithélium olfactif situé sur le plafond de la cavité nasale ou dans l'organe voméronasal, des recherches récentes ont montré leur expression à d'autres endroits. Par exemple, dans la cavité nasale des rongeurs, deux organes chimiosensoriels ont été découverts : le ganglion de Grüneberg qui détecte les phéromones d'alarme sécrétées par les congénères via des TAAR et un V2R, et l'organe septal de Masera qui exprime différents OR, mais dont les fonctions restent incertaines (Su et al. 2009, Kaupp 2010). Pour l'instant, aucune étude n'a montré l'existence de ces deux organes chez d'autres espèces de mammifères. Par ailleurs, certains OR exprimés dans d'autres parties du corps ont une fonction non olfactive: certains semblent impliqués dans la régulation de la pression artérielle et la réabsorption du glucose (dans le rein) ou le chimiotactisme du sperme par l'ovule (dans les spermatozoïdes) (Shepard & Pluznick 2016, Flegel et al. 2016).

- L'intégration centrale des signaux olfactifs

Une fois le récepteur activé par une molécule chimique, le signal est transmis par les axones des neurones olfactifs. Ceux-ci se regroupent en plusieurs nerfs qui traversent l'os ethmoïde, avant d'arriver directement dans le bulbe olfactif du côté ipsilatéral. Il reste encore beaucoup à découvrir sur les mécanismes de traitement de l'information olfactive, mais il semble qu'il se fasse de manière intégrative grâce à des étapes successives dans de nombreuses régions cérébrales. Le traitement du stimulus olfactif commence dans le bulbe olfactif, où le signal est condensé et amplifié. En effet, le bulbe comprend de nombreux glomérules : zones de contact entre les axones des neurones olfactifs et les cellules mitrales. Chaque glomérule collecte tous les axones des nerfs olfactifs qui expriment un même OR. Plusieurs milliers d'axones convergent vers un unique glomérule où ils font synapse avec les dendrites d'environ 5 à 25 cellules mitrales (Firestein 2001). Il existe donc une « carte olfactive » dans le bulbe olfactif, car chaque odeur active une zone spécifique des glomérules. Les cellules mitrales projettent ensuite leur axone vers le cortex piriforme, qui se trouve à la jonction entre le lobe frontal et le lobe temporal, via le

pédoncule olfactif (Lundström et al. 2011). Le cortex piriforme rassemble cette information et crée une représentation de l'identité et de la qualité perceptuelle de l'odeur. Le cortex orbito-frontal (COF) est le dernier maillon de la chaîne de transmission de l'information olfactive. Il module le signal provenant du cortex pyriforme selon des processus cognitifs supérieurs qui font intervenir l'expérience passée, la connotation affective et l'influence d'autres systèmes sensoriels (on parle alors de convergence multimodale) (Rolls 2004). L'amygdale notamment intervient à ce niveau en signalant au COF la dimension émotionnelle du stimulus : son activité est modulée en fonction de la concentration des odeurs ayant une valence hédonique (i.e. odeur jugée agréable ou désagréable) (Winston et al. 2005). Les rôles précis d'autres régions impliquées dans la modulation du signal olfactif comme le cortex entorhinal, l'hypothalamus et le tubercule olfactif sont encore à déterminer.

b) Gustation

- Perception des goûts dans la cavité orale

La perception gustative joue un rôle clé dans l'alimentation, l'évitement des toxines et la régulation de l'état de satiété. On définit aujourd'hui 5 goûts principaux : le sucré, le salé, l'acide, l'amer et l'umami⁴. D'une façon générale, le goût d'une substance reflète sa potentielle action sur l'organisme : par exemple, son apport en énergie (sucré), la maintenance de l'équilibre électrolytique (salé) ou du pH corporel (acide) et la présence de toxines (amer).

La détection des saveurs a lieu principalement sur la langue, où les bourgeons du goût sont associés à des papilles gustatives : les papilles foliées, caliciformes et fongiformes. Ces bourgeons sont constitués d'environ 50-150 cellules réceptrices du goût, chacune étant particulièrement sensible à un goût spécifique, et d'un pore s'ouvrant sur la cavité orale (Lundström et al. 2011). D'autres bourgeons du goût se trouvent sur le palais mou, l'oropharynx (épiglotte), le larynx et l'œsophage proximal. La corde du tympan et le nerf grand pétreux superficiel, issus du nerf facial (nerf crânien VII), innervent la partie antérieure de la langue et le palais, respectivement. La branche linguale du nerf glossopharyngien (nerf

⁴ Terme décrivant le goût des glutamates et des nucléosides

crânien IX) innerve la partie postérieure de la langue, alors que la branche laryngée supérieure du nerf vague (nerf crânien X) innerve différents bourgeons du goût situés dans la langue, le palais, le larynx et l'œsophage.

Du point de vue moléculaire, la perception du stimulus gustatif met en jeu l'interaction de molécules chimiques avec des récepteurs protéiques situés dans les cellules du goût. La perception des goûts attractifs comme l'umami et le sucré est basée sur deux dimères de récepteurs du goût de type 1 (TR1, des récepteurs couplés à une protéine G ou RCPG) dont il existe 3 variants : le dimère T1R1+T1R3 permet la perception du glutamate, alors que T1R2+T1R3 détecte les composés sucrés comme les glucides simples, les édulcorants (aspartame...), les protéines sucrées (moneline...) et certains acides aminés (D-alanine...) (Yarmolinsky et al. 2009). De façon similaire, la réception de l'amer requiert la formation d'un dimère de récepteurs de type 2 (TR2) dont il existe environ 30 variants sensibles à une grande diversité de molécules. Chaque cellule réceptrice de l'amer exprime la majorité des T2R : l'information transmise au système nerveux est donc peu spécifique avec pour conséquence une absence de discrimination des composés amers. En revanche, la perception des composés amers est caractérisée par une grande sensibilité avec des seuils de détection beaucoup plus bas que ceux des autres goûts, en relation avec sa fonction d'évitement de composés toxiques (Mombaerts 2004).

La perception des substances acides reste encore à préciser. Le canal ionique PKD2L1 semble nécessaire à la perception de ce goût, en provoquant une acidification intracellulaire. Cependant, d'autres candidats ont été suggérés, qui fonctionneraient comme des récepteurs extracellulaires, comme HCN1 et HCN4. Par ailleurs, les cellules réceptrices à l'acide expriment en grande quantité une anhydrase carbonique, Car4, suggérant qu'elles sont également responsables de la détection du dioxyde de carbone (CO₂) (Zufall & Munger 2016).

Enfin, le salé est perçu par le canal à sodium épithélial ENaC, et est attractif à faibles concentrations chez les mammifères (10 – 150 mM NaCl). Cependant, à fortes concentrations, le chlorure de sodium est généralement aversif, et cet effet répulsif n'est pas aboli par l'inactivation de ENaC, suggérant l'existence d'autres types de récepteurs au salé (Mombaerts 2004).

- Intégration centrale des signaux gustatifs

La première étape d'intégration du signal gustatif semble se trouver au niveau du bourgeon du goût lui-même. Chaque bourgeon est en effet composé de plusieurs cellules réceptrices aux différents goûts, regroupées et en contact rapproché entre elles. Ainsi le signal émis par une cellule réceptrice pourrait être modulé par les cellules à proximité, qui produisent une grande variété de neurotransmetteurs (Lundström et al. 2011). Des synapses entre les cellules réceptrices et les neurones gustatifs permettent la transmission de l'information jusqu'au noyau du tractus solitaire dans la moelle allongée du tronc cérébral. L'information est ensuite transmise et traitée dans le noyau parabrachial puis le thalamus, avant d'être intégrée par le cortex gustatif dans le cortex orbitofrontal et l'insula. Finalement, la sensation gustative perçue par l'animal sera la résultante de l'intégration de ce stimulus avec l'information provenant des autres systèmes sensoriels (odeur, texture, température, etc.) (Yarmolinsky et al. 2009).

Des récepteurs aux fonctions variées

Comme dans le cas des récepteurs olfactifs, on retrouve des récepteurs du goût en dehors de la cavité orale. On retrouve des TR1 et TR2 dans différents segments du tube digestif comme l'estomac et l'intestin. De plus, TR2 est présent dans les cellules de voies aériennes supérieures telles que la muqueuse nasale et la trachée. Ils ne participent donc pas directement à la perception du goût, mais à une détection des composés chimiques présents dans la lumière de ces organes. Leur détection provoque des cascades biochimiques intracellulaires similaires à celles retrouvées dans les bourgeons du goût, mais qui sont suivies d'une émission de neurotransmetteurs ou d'hormones permettant de diffuser cette information vers d'autres cellules ou organes. (Finger & Kinnamon 2011)

c) Perception trigéminal

Le troisième système de chémoréception, également appelé « sens chimique général » ou « chemesthesis », fait intervenir exclusivement les fibres sensibles du nerf trigéminal (nerf crânien V) logées dans les muqueuses des cavités orale et nasale (Lundström et al. 2011). Ce système encore relativement méconnu interagit avec la gustation et l'olfaction grâce à différents niveaux d'intégration,

et joue un rôle important dans le comportement alimentaire, notamment dans l'évitement de toxines. En effet, il est responsable de la perception d'une grande variété de composés piquants, astringents, épicés, rafraichissants, irritants, mais également des sensations mécaniques et thermiques dans les cavités orale et nasale. Les molécules exerçant une forte stimulation sur le système trigéminal sont généralement perçues comme répulsives (Glendinning 2007). Cependant, de récentes études chez l'humain et l'animal ont montré que des individus anosmiques (i.e. ayant un système olfactif non fonctionnel) peuvent discriminer une grande variété de composés grâce au système trigéminal. Ce sens chimique permet donc, en complément de la gustation et l'olfaction, de percevoir et de coder efficacement des composés chimiques (Frasnelli et al. 2007, Lübbert et al. 2013).

Sur le plan neuro-anatomique, le signal est initialement détecté par les récepteurs des terminaisons nerveuses libres du nerf trigéminal (branches ophtalmiques, maxillaires et mandibulaires) dans les muqueuses nasale et orale. Le signal reçu est ensuite transmis dans le ganglion trigéminal situé dans le tronc cérébral, via les réseaux nerveux impliqués dans le traitement de la douleur. Son intégration a ensuite lieu grâce à deux trajets corticaux: l'un vers l'insula et le cortex orbitofrontal, l'autre vers les cortex somatosensoriels (Lundström et al. 2011).

Le cortex insulaire qui est activé par les trois systèmes de chémoréception apparaît comme un site jouant un rôle primordial dans l'intégration des informations gustatives, olfactives et trigéminales.

3. Fonctions biologiques de la chémoréception dans l'environnement marin

De nombreuses études d'écologie sensorielle ont démontré l'importance majeure de la perception chimique dans l'écologie de différentes espèces de vertébrés, cependant les données chez les cétacés sont quasi-inexistantes, notamment du point de vue comportemental (cf. partie B de l'introduction). Par ailleurs, on sait que l'adaptation au milieu aquatique peut entraîner des modifications majeures des systèmes sensoriels⁵. Ainsi, afin de bien appréhender l'importance potentielle de la chémoréception chez les cétacés, il m'a paru important de faire une revue des connaissances actuelles sur ses fonctions

⁵ Cette notion est bien illustré par l'évolution de l'audition chez les cétacés, ayant abouti à l'apparition de capacités exceptionnelles comme l'écholocation (biosonar)

biologiques chez les autres mammifères, et plus largement les autres vertébrés, qui vivent dans l'environnement marin. Ceux-ci appartiennent à quatre grandes classes : les poissons, les reptiles, les oiseaux et les mammifères marins autres que les cétacés. Ces derniers comprennent l'ordre des siréniens (dugong et lamantins) et la superfamille des phocoidae (communément appelés « pinnipèdes »), issue de l'ordre des carnivores, qui comprend les phoques vrais (phocidae), les otaries et lions de mer (otariidae) ainsi que les morses (odobenidae).

a) *La recherche de nourriture*

La plupart des études sur la chémoréception se sont intéressées à son rôle dans la recherche de nourriture. Elles permettent de mieux comprendre comment les prédateurs marins localisent leurs zones d'alimentation éparses dans un environnement caractérisé par de vastes espaces homogènes. Les molécules émises directement par leurs proies, ou bien les marqueurs chimiques des zones de forte productivité primaire, représentent donc des indices cruciaux pour les guider vers leurs sources d'alimentation.

L'orientation vers un stimulus chimique permet à un animal de retrouver la source d'émission et implique des déplacements spécifiques lui permettant de remonter les courants qui véhiculent ce signal, que ce soit dans l'air (« anemotaxie ») ou dans l'eau (« rhéotaxie »). Ainsi, à la manière d'une orientation à la boussole, l'animal effectue des mouvements latéraux en alternance pour se réajuster selon l'information perçue par ses organes chémorécepteurs (Bell & Tobin 1982).

La plupart des poissons, et en particulier les sélaciens (requins et raies), se basent sur cette « chémo-orientation » pour trouver leurs proies en détectant leurs sécrétions, que ce soient des métabolites physiologiques ou des signaux d'alarmes (Ferrari et al. 2010, Elvidge & Brown 2012). Le principal type de composés chimiques émis par les proies et détecté par les prédateurs via leurs narines semble correspondre à des peptides de faible poids moléculaire, que les poissons détectent à des concentrations infimes : de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-7} M (Hara 1994, Hay & Kubanek 2002). En association avec les informations hydro-mécaniques (issues de la ligne latérale) et la vision, qui permettent l'orientation dans

le courant, les prédateurs peuvent de cette façon remonter ces gradients de concentration sur plusieurs centaines de mètres, voire des kilomètres (Montgomery et al. 1997, Hammerschlag et al. 2006, Gardiner & Atema 2007). Les requins filtreurs semblent également percevoir les signaux chimiques émis par le plancton, constituant la base de leur alimentation. Cela a été récemment démontré en aquarium chez le requin baleine qui répond à l'exposition à de très faibles concentrations d'extraits de krill, par des comportements associés à la prise alimentaire tels que l'ouverture de la gueule et la filtration de l'eau par les branchies (Dove 2015). Dans la même expérience, les auteurs ont démontré que l'utilisation d'un composé chimique précis, le sulfure de diméthyle (DMS) provoquait des réactions similaires, bien que moins intenses. Le DMS est un composé produit par le phytoplancton lorsqu'il est consommé par le zooplancton. Cette molécule volatile est ainsi considérée comme un indicateur chimique de zones de forte productivité primaire dans l'océan (Cantin et al. 1996). Ensembles, ces travaux indiquent que cette espèce de requin filtreur détecte et associe la présence de DMS à une zone d'alimentation où le zooplancton se concentre.

Les tortues marines utilisent également la chémoréception en complément de la vision pour localiser leur nourriture. Il a été démontré par exemple que des tortues caouannes et des tortues luth, qui sont exposées à un courant contenant des extraits solubles de leurs proies (calmars, méduses, etc.), réagissent en remontant ce courant jusqu'à la source (Constantino & Salmon 2003, Southwood et al. 2007). La perception de molécules dans l'eau semble mettre en jeu principalement l'organe voméronasal, mais également la gustation (Southwood et al. 2008). Des expériences en bassin ont montré qu'elles détectent également des molécules volatiles, car elles sont attirées par le DMS et pourraient donc repérer, dans l'air, les indicateurs des zones de forte productivité primaire où elles sont susceptibles de trouver leurs proies (Endres & Lohmann 2012).

De façon similaire les oiseaux marins, et particulièrement les procellariiformes (pétrels, puffins, albatros) qui présentent des narines très développées, disposent d'une grande sensibilité olfactive et semblent notamment utiliser l'odorat pour trouver leur nourriture dans l'océan. Ils peuvent en effet détecter l'odeur de leurs proies sur de très longues distances, comme cela a été démontré expérimentalement en utilisant des extraits de poisson (morue, hareng), de calmar, de krill ou des

molécules dérivées comme la pyrazine et la triméthylamine (Dell'Araccia et al. 2014). Tout comme les requins filtreurs, ils présentent également une grande sensibilité aux indices de zones de forte productivité comme le DMS (Nevitt et al. 1995, 2004).

Il existe peu d'études sur les capacités de perception chimique chez les pinnipèdes dans un contexte alimentaire. Des seuils de détections des goûts ont été déterminés expérimentalement chez l'otarie de Californie et ont révélé l'absence de perception du goût du sucré (en utilisant des solutions de sucrose jusqu'à 2 mol / L) (Friedl et al. 1990) comme c'est le cas chez la plupart des mammifères ayant un régime carnivore strict (Jiang et al. 2012). Les autres goûts sont effectivement perçus mais avec une sensibilité inférieure à celle des humains. Les pinnipèdes semblent en revanche être dotés d'une grande sensibilité aux molécules volatiles dans l'environnement comme le DMS qu'ils peuvent détecter à des concentrations infimes (8 pmol / m³ d'air contre 1.7 x 10⁷ pmol / m³ chez l'humain). Ce seuil de détection leur permet ainsi de détecter aisément les zones productives en mer (concentrations environnementales de l'ordre de 8 x 10³ pmol / m³ d'air) en utilisant l'olfaction (Kowalewsky et al. 2006, Laska et al. 2008, 2010). Il existe peu de données chez les siréniens, qui semblent pourtant détecter la présence de biotoxines dans leur nourriture et posséder plus de bourgeons du goût que les autres mammifères marins (Levin & Pfeiffer 2002).

b) L'orientation et la navigation

La perception de molécules chimiques permet également aux animaux de s'orienter dans leur environnement, notamment durant les grandes migrations. Les poissons qui naviguent sur de longues distances s'orientent grâce aux signaux chimiques (Paris et al. 2013). Les espèces les plus étudiées sont les salmonidés, les lamproies et les anguilles chez qui les adultes peuvent retrouver leurs sites de ponte en suivant leur signature olfactive (DeBose & Nevitt 2008). Les tortues marines (notamment la tortue caouanne et la tortue verte) semblent également utiliser des signaux chimiques pour retrouver leurs sites de pontes, même si la perception du champ magnétique terrestre leur permet de s'orienter sur de plus longues distances (Lohmann et al. 1999). Chez les oiseaux, les recherches ont porté sur les pigeons

voyageurs (*Columba livia*), qui peuvent trouver leur destination en associant la direction du vent à des odeurs environnementales auxquelles ils ont été préalablement exposés (Papi 1990). Il a également été montré récemment que plusieurs espèces d'oiseaux migrateurs, comme le Moqueur chat (*Dumetella carolinensis*) et le goéland brun (*Larus fuscus*), utilisent l'odorat pour retrouver leurs zones d'hivernage (Holland et al. 2009, Wikelski et al. 2015). Les oiseaux procellariiformes comme le puffin cendré peuvent également s'orienter vers leur colonie en utilisant les signaux olfactifs sur des distances de plusieurs centaines de kilomètres (Gagliardo et al. 2013), et chaque nid porte une signature chimique unique permettant aux poussins et aux adultes de le retrouver à distance dans la colonie (Minguez 1997, Bonadonna et al. 2003). L'orientation se fait en vol grâce à la perception d'odeurs provenant du corridor migratoire ou du site de nidification, nécessitant donc un apprentissage préalable (Safi et al. 2016). A ce jour, il existe peu d'études chez les mammifères marins, excepté celles sur la grande sensibilité olfactive des pinnipèdes citées précédemment. On peut cependant raisonnablement penser qu'ils perçoivent d'autres molécules volatiles environnementales utiles pour l'orientation. De plus, les pinnipèdes possèdent une très grande sensibilité aux variations de salinité de l'eau, qui constitue également une source d'information sur les caractéristiques du milieu (estuaires, courants, couverture de glace, etc.) (Sticken & Dehnhardt 2000).

c) *Evitement des toxines*

La chémoréception joue également un rôle essentiel dans l'aversion pour des aliments toxiques qui peuvent dégrader l'état de santé d'un animal, voire le tuer. Pour certaines espèces, la concentration de molécules toxiques dans leurs tissus constitue une stratégie défensive contre les prédateurs. Mais il existe également des toxiques environnementaux qui peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire et rendre les proies toxiques, comme c'est le cas des toxines produites lors des floraisons (« blooms ») algales, qui relarguent de fortes concentrations en composés toxiques tels que les brevetoxines, saxitoxines, ciguatoxines, l'acide domoïque et okadaïque. Par conséquent, ces floraisons phytoplanctoniques peuvent provoquer des épisodes de mortalité massive parmi les populations de vertébrés marins comme les poissons, les tortues, les oiseaux ainsi que les mammifères marins incluant

les cétacés (Shumway et al. 2003, Flewelling et al. 2005, Landsberg et al. 2009). Les sens chimiques, en permettant d'éviter l'ingestion des proies toxiques ou de fuir les zones contaminées, jouent donc un rôle déterminant dans la survie des individus.

D'une part, les composés toxiques provoquent généralement une aversion chimiosensorielle chez les prédateurs via leur détection par les récepteurs chimiques liée à un signal répulsif comme le récepteur au goût amer TR2, ou par une stimulation forte du système trigéminal (Glendinning 2007). De plus, la présence d'une toxine dans la nourriture peut également être associée, par apprentissage, à d'autres goûts ou à des odeurs spécifiques, que les animaux peuvent reconnaître après l'avoir ingérée et avoir survécu à sa toxicité. La présence de récepteurs TR2 dans le système digestif pourrait contribuer à ce conditionnement après ingestion. Il existe peu d'exemples d'évitement de toxine rapportés dans la littérature chez les vertébrés marins, mais il a toutefois été montré que les oiseaux aquatiques (goélands, canards) peuvent éviter les mollusques contaminés par des toxines algales après une exposition préalable (Shumway et al. 2003).

d) Communication chimique et évitement des prédateurs

Pour la plupart des espèces de vertébrés marins, la communication chimique entre individus d'une même espèce joue un rôle primordial dans la reproduction. Chez les poissons, les femelles sécrètent diverses substances avant l'ovulation (principalement des hormones stéroïdes et leurs dérivés) par les branchies, l'urine et les fèces. Celles-ci augmentent les comportements d'agressivité chez les mâles et stimulent la poursuite des femelles aussi bien que les comportements de parade. En période post-ovulatoire, les femelles émettent des prostaglandines qui déclenchent la spermatogénèse et l'évacuation du sperme chez les mâles (Chung-Davidson et al. 2010). Ces différentes substances modifient ainsi directement la physiologie et le comportement des mâles qui les perçoivent par voie olfactive (Hara 1994, Brönmark & Hansson 2000). D'autres composés chimiques classés comme phéromones sont également impliqués dans la formation des bancs, la migration, et les interactions entre parents et juvéniles. Chez les perciformes (ex. *Tilapia sp.*) et les siluriformes (poissons-chats et silures), il semble également que des

composés chimiques spécifiques influent sur les relations de dominance et de territorialité (Stacey & Sorensen 2009).

Chez les reptiles en général, il semble que les phéromones sont émises au niveau de la zone cloacale et sont perçues essentiellement par l'organe voméronasal (Fadool et al. 2001). Cela explique que les mâles poursuivent les femelles en orientant leur tête vers le cloaque, à la manière du comportement de « sniffing » (ou reniflage) observé chez les mammifères (Mason & Parker 2010). Des tests de choix ont montré que les tortues mâles réagissent différemment aux phéromones selon la saison. Pendant la saison de reproduction, les mâles sont attirés par les eaux où une femelle s'est baignée mais sont repoussés par l'odeur des autres mâles. A l'opposé, les femelles ont tendance à préférer les traces chimiques des autres femelles plutôt que celles des mâles. En revanche, en dehors de la période de reproduction, les deux sexes évitent les odeurs du sexe opposé (Muñoz 2004, Lewis et al. 2007). Il semble donc que la communication chimique permette la synchronisation des comportements de reproduction chez ces reptiles aquatiques, mais contribue également aux interactions sociales chez des espèces dans lesquelles les mâles forment des hiérarchies dominantes (Mason & Parker 2010).

Chez les oiseaux marins, les odeurs jouent aussi un rôle primordial dans la reconnaissance du partenaire sexuel. Pour plusieurs espèces de procellariiformes, il a été montré que les individus sont attirés par l'odeur spécifique de leur partenaire sexuel (Bonadonna & Nevitt 2004, Mardon & Bonadonna 2009). Plus précisément, la reconnaissance individuelle et le choix du partenaire sexuel semblent être basés, chez de nombreuses espèces d'oiseaux marins, sur les sécrétions lipidiques de la glande uropygiale, qui porte une signature chimique de l'espèce, du sexe et de l'individu lui-même (Mardon & Bonadonna 2009, Caro & Balthazart 2010).

Chez les mammifères marins, les études sont rares, mais elles semblent toutes mettre en évidence l'utilisation de signatures chimiques individuelles jouant un rôle dans la reproduction. Ceci est notamment démontré chez les pinnipèdes qui présentent une forte odeur musquée liée aux sécrétions sébacées faciales et aux glandes apocrines. Les relations de dominance entre mâles semblent ainsi être régies entre autre par la sécrétion d'odeurs sociales (Ryg et al. 1992). De plus, la reconnaissance du jeune au sein d'une colonie requiert une perception multimodale incluant non seulement des signaux

visuels et auditifs (vocalisations du jeune) mais également une perception de la signature olfactive spécifique (Dobson & Jouventin 2003, Pitcher et al. 2011). Le choix d'un partenaire sexuel compatible génétiquement (qui permet d'optimiser le degré d'hétérozygotie de la progéniture), et la reconnaissance de l'appartenance à la colonie semblent également être basés sur l'olfaction chez l'otarie à fourrure antarctique (Stoffel et al. 2015). Chez les siréniens, la présence d'une communication chimique paraît également très probable : par exemple, les lamantins présentent des glandes anales avec une fonction essentiellement apocrine, émettant une substance lipidique riche en protéines (Bills et al. 2013). Le volume de ces glandes augmente pendant la saison de reproduction. Or, la seule fonction des glandes anales décrite à ce jour est la sécrétion de phéromones. L'implication potentielle de phéromones sécrétées par la glande anale dans la communication sexuelle de cette espèce est d'ailleurs corroborée par le fait que les lamantins frottent cette zone anatomique contre différents objets de leur environnement (rochers, troncs d'arbres) pendant la saison de reproduction. D'autres signaux chimiques sexuels semblent être présents dans l'urine, car l'exposition de lamantins mâles à une urine de femelle en œstrus provoque des réactions d'attraction et d'exploration, alors que cet effet n'existe pas lorsqu'il s'agit de l'urine d'une femelle en anœstrus (Bills 2011).

En ce qui concerne l'évitement des prédateurs, il est chez les poissons principalement basé sur la reconnaissance des composés chimiques que ces derniers émettent (appelés « kairomones »), en particulier au stade juvénile lorsqu'ils sont le plus vulnérables (Chivers et al. 2001). La reconnaissance des kairomones nécessite généralement un apprentissage, mais il existe une réponse innée chez plusieurs espèces de poissons (Larson & McCormick 2005). De plus, l'émission de signaux chimiques par les poissons blessés (« signaux d'alarme »), notamment présents dans leurs tissus endommagés, permettent à leurs congénères d'adapter leur comportement à la présence d'un prédateur en déclenchant par exemple la fuite, une diminution de leurs mouvements ou le refuge dans un abri de protection (Wisenden et al. 2004). Les signaux d'alarme émis par des individus d'autres espèces appartenant à la même guildes de poisson peuvent également être perçus et améliorer la survie des individus (Ferrari et al. 2010). Cependant, des signaux d'alarme sont également reconnus par certains prédateurs qui les suivent pour

trouver une proie blessée (Wisenden & Thiel 2002). Si plusieurs prédateurs sont attirés, cela peut provoquer une compétition entre eux pour le même animal blessé et ainsi augmenter les chances de fuite des autres proies. Chez les reptiles, la présence de kairomones a également été suggérée. Cependant une étude expérimentale a montré que les tortues caouannes captives ne sont pas repoussées par des proies traitées avec des extraits de prédateurs (requins tigres) (Southwood et al. 2007). La reconnaissance de la signature chimique des prédateurs semble en revanche exister chez les oiseaux marins, notamment les procellariiformes, qui sont repoussés par l'odeur de requin (Pierre & Norden 2006). Il n'existe pour l'instant aucune étude sur l'utilisation de kairomones ou de signaux d'alarme chez les mammifères marins.

B. Ecologie sensorielle des cétacés

1. Des mammifères adaptés à l'environnement aquatique

a) Histoire évolutive

Comme nous l'avons vu précédemment, le groupe des mammifères marins comprend 3 taxons principaux : l'ordre des siréniens, les pinnipèdes (ordre des carnivores) et les cétacés (ordre des cétartiodactyles). Tous se sont adaptés secondairement et indépendamment à une vie aquatique, il y environ 50 à 60 millions d'années (Graphodatsky et al. 2011).

Alors que les pinnipèdes ont un mode de vie amphibie et mettent bas sur terre, les siréniens et les cétacés ont évolué vers une vie strictement aquatique : au cours de l'évolution, ils ont ainsi perdu leurs membres postérieurs et développé une nageoire caudale adaptée à la propulsion dans l'eau. Concernant le régime alimentaire, les pinnipèdes et les siréniens ont conservé un régime similaire à celui de leurs ancêtres terrestres (respectivement carnivore et herbivore) alors que les cétacés font figure d'exception, étant passés d'un régime herbivore à un régime carnivore strict (poissons, céphalopodes, mammifères marins et zooplancton) (Fig. 1). De plus, les deux sous-groupes (ou parvordres) de cétacés se distinguent par leur stratégie alimentaire : les odontocètes sont des prédateurs qui capturent leurs proies grâce à leur

dents et/ou par aspiration, alors que les mysticètes ont développé une stratégie de filtration active de l'eau via des fanons, de longues plaques cornées ornant leur mâchoire supérieure, se nourrissant de zooplancton et de petits poissons.

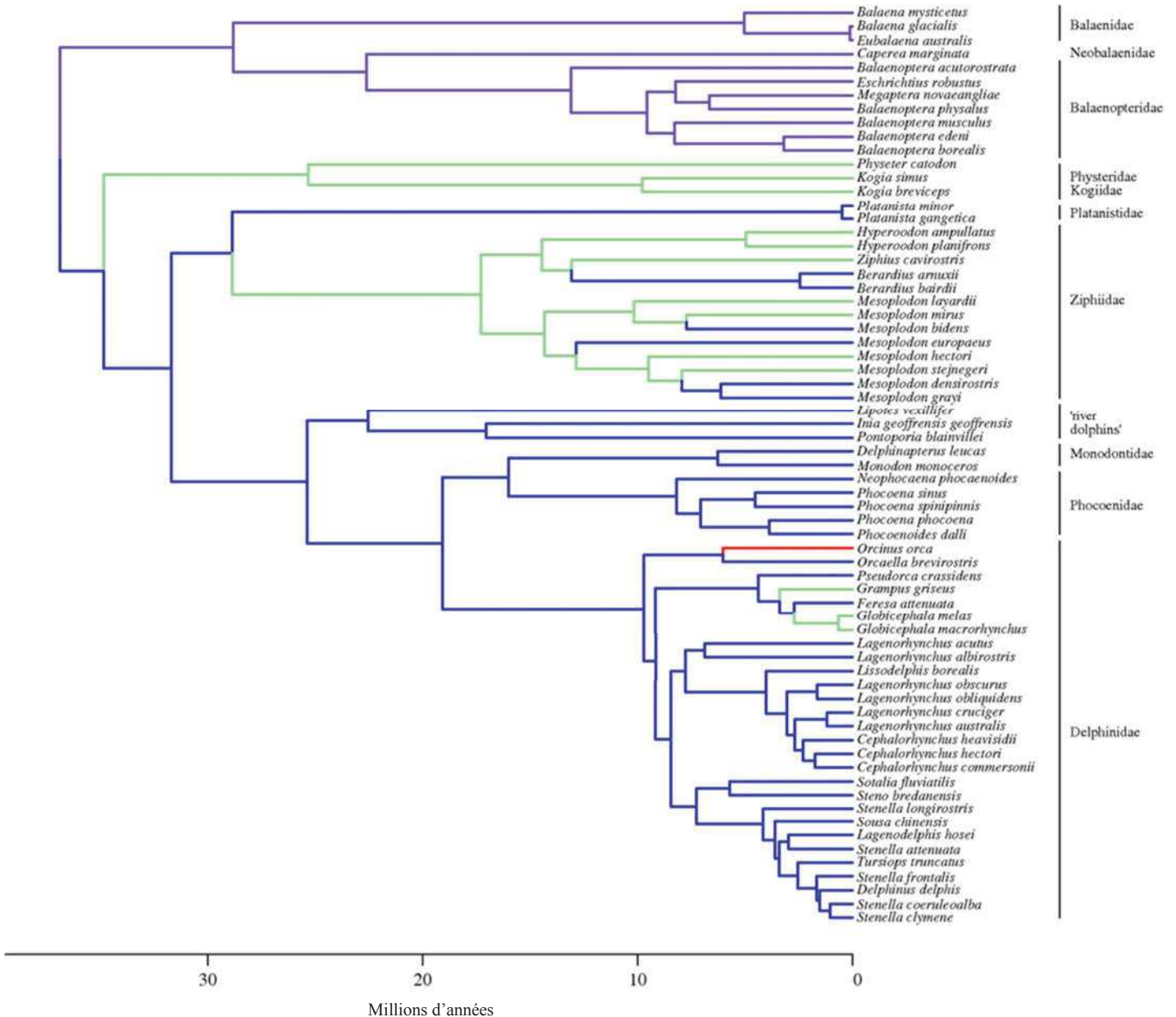


Figure 1. Arbre phylogénétique des cétacés issu de Slater et al. (2010). Le régime alimentaire est indiqué sur les branches : piscivore généraliste (bleu), filtreur (violet), céphalopodes (vert) et mammifères marins (rouge). Les cétacés appartiennent à l'ordre des Cétartiodactyles, et les espèces actuelles les plus proches génétiquement sont les hippopotames (Hippopotamidae), puis les bovins (Bovidae).

Ce groupe de mammifères marins présente donc des modifications anatomiques et des adaptations physiologiques très importantes, consécutives à ces changements de milieu et de régime alimentaire. L'étude de leurs systèmes sensoriels, qui a débuté il y a un siècle environ, montre que les structures impliquées dans la perception de l'environnement ont également été bouleversées pour s'adapter aux diverses contraintes imposées par le milieu aquatique.

b) Un sens de l'audition très développé

La vitesse de propagation d'une onde sonore dépend de la densité et de la compressibilité du milieu. L'eau est beaucoup plus dense que l'air et quasiment incompressible, ce qui permet la propagation du son sur de longues distances et à une vitesse élevée. Au cours de leur évolution, l'ouïe et la production sonore chez les mammifères marins en général, et chez les cétacés en particulier, se sont adaptés à ces propriétés acoustiques. Les espèces actuelles utilisent prioritairement leur sens aigu de l'audition pour communiquer et percevoir leur environnement (Wartzok & Ketten 1999). Si l'enregistrement et la mesure des sons émis par les cétacés est aujourd'hui techniquement possible et relativement aisée, leur signification comportementale est en revanche loin d'être élucidée.

Les mysticètes produisent une grande variété de sons qui semblent participer à synchroniser leurs comportements lors de la reproduction ou l'alimentation. La plupart de ces vocalisations, comme les grognements ou « moans » sont émises dans les basses fréquences (moins de 200 Hz) et sur des durées relativement longues (1-30 secondes). D'autres vocalisations comme les sons pulsés ou « knocks » et « thumps » sont au contraire relativement courtes (<1 seconde) (Dudzinski et al. 2009). Ces sons peuvent se propager sur des distances extrêmement grandes, pouvant atteindre plusieurs centaines voire des milliers de kilomètres (Stafford et al. 1998). La plupart des baleines émettent aussi des sons aigus très brefs (moins de 0.1 seconde) appelés sifflements, qui diffusent sur des distances bien inférieures. Enfin, les sons les plus emblématiques sont probablement les chants produits par les mâles baleines à bosse (*Megaptera novaengliae*) pendant la saison de reproduction. Ceux-ci représentent un signal très évolué

qui semble transmettre, aux femelles et autres mâles alentours, de l'information sur leur fitness et leur localisation (Dudzinski et al. 2009).

Les odontocètes communiquent quant à eux grâce à deux grands types de sons : des sifflements et des sons pulsés. Les sifflements, émis par certaines espèces seulement, ont une fréquence de 5 à 20 kHz et peuvent durer de quelques millisecondes à plusieurs secondes (Wartzok & Ketten 1999). Chez le grand dauphin (*Tursiops truncatus*), chaque individu semble utiliser un sifflement unique (« signature vocale ») permettant une reconnaissance individuelle (Janik et al. 2006). Toutes les espèces d'odontocètes produisent des sons pulsés dont le pic de fréquence peut varier entre 5 et 150 KHz. D'une part, ces sons peuvent constituer des trains de clics impliqués dans l'écholocation : la perception de leurs échos permet la localisation et l'identification des constituants de leur environnement. D'autre part, ils peuvent être émis sous la forme de « burst » très rapides (avec un intervalle inter-pulse $< 5 \mu\text{s}$) principalement émis dans un contexte social, notamment lors d'interactions agonistes entre individus (Lammers et al. 2003, Blomqvist & Amundin 2004). La production des sons d'écholocation fait intervenir deux lèvres phoniques situées sous l'évent. Les ondes sonores traversent ensuite une couche de graisse acoustique (dont l'impédance acoustique est similaire à celle de l'eau) placée devant l'os frontal et appelé « melon » (Fig. 3). Celui-ci constitue un organe focalisateur qui agit comme une lentille acoustique, en orientant les sons d'écholocation. Les sifflements, quant à eux, semblent être produits par le passage d'air entre les 4 paires de sacs aériens qui entourent les lèvres phoniques sous l'évent (Berta et al. 2014).

La perception des sons ne met pas en jeu l'oreille externe, les cétacés étant dépourvus de pavillons auriculaires, mais implique l'os mandibulaire, qui transmet l'énergie sonore au tympan via un coussin de graisse acoustique (Wartzok & Ketten 1999).

Une communication sonore non vocale

Différents comportements de surface génèrent des sons permettant une communication non vocale. Les sauts (en anglais : « breach » ou « leap ») produisent des sons, lors de l'impact, qui peuvent diffuser à plusieurs kilomètres sous l'eau. Ils sont principalement observés au cours de phases de stimulation sexuelle, de localisation de proies ou en réponse à un dérangement. Les frappes de nageoires caudales sont principalement observées lors de comportements agonistiques, alors que les frappes de pectorales peuvent également constituer des signaux d'invitation au jeu ou à la socialisation (Dudzinski et al. 2009).

c) Une utilisation limitée des signaux visuels

La vision en milieu aquatique est soumise à des contraintes de diffusion de la lumière. En effet, l'intensité lumineuse diminue très rapidement avec la profondeur (ex : à 100 m sous la surface, il ne reste que 0.5% de l'intensité lumineuse). De plus, son spectre se réduit à la couleur bleue car les grandes longueurs d'ondes sont absorbées par l'eau, et la turbidité peut limiter grandement la visibilité même proche de la surface dans les eaux riches en matières en suspension (zones riches en nutriments, eaux côtières, etc.).

Les yeux des cétacés présentent des adaptations à ces contraintes, privilégiant la sensibilité à la lumière par rapport à l'acuité visuelle. Ils possèdent ainsi une membrane réfléchissante derrière la rétine (*tapetum lucidum*) et une vision principalement basée sur les bâtonnets, les cellules photoréceptrices qui permettent la vision en faible luminosité (Cozzi et al. 2016). Une étude récente a montré que le pigment qu'ils contiennent (la rhodopsine) a un maximum de sensibilité décalé vers la lumière bleue (longueur d'onde $\lambda=488$ nm) par rapport aux mammifères terrestres (Meredith et al. 2013). A l'inverse, les cônes, qui sont impliqués dans la perception des couleurs lorsque la luminosité est élevée, ne représentent que 1-2% des cellules photoréceptrices de la rétine. De plus, sur les deux gènes codant pour les opsines (pigment des cônes) chez les artiodactyles, l'un est non-fonctionnel chez toutes les espèces de cétacés (SWS1) alors que l'autre (LWS) est également inactivé chez les espèces évoluant à forte profondeur (en zone « aphotique ») comme le cachalot, la plupart des baleines à bec et tous les mysticètes sauf la baleine

pygmée (Peichl et al. 2001, Meredith et al. 2013). Ceci indique qu'au cours de l'évolution les cétacés ont perdu la vision en couleur et sont devenus monochromates. Enfin, la forme même de leur cristallin est sphérique comme celui des poissons (Mass & Supin 2007), plutôt que lenticulaire comme c'est le cas chez les mammifères terrestres. Ceci leur permet d'avoir une vision emmétrope (sans accommodation) dans l'eau, qui présente un indice de réfraction plus important que l'air (1.34 vs. 1.00).

Le sens de la vue chez les cétacés est donc adapté aux contraintes du milieu aquatique. En interaction avec les autres sens et notamment l'audition, il leur permet de percevoir leur environnement, de s'orienter et d'identifier leurs proies sous l'eau même à de grandes profondeurs. Ils se servent également de ce sens pour communiquer sur de courtes distances en adoptant des postures spécifiques comme l'ouverture de la gueule (menace), différents sauts, l'écartement des pectorales, ou des postures corporelles en « S ». Enfin, les différences de coloration entre individus et entre mâles et femelles semblent également jouer un rôle dans la reconnaissance inter-individuelle, la communication sociale et la reproduction (Dudzinski et al. 2009).

L'œil des cétacés présente toutes les caractéristiques requises pour une bonne sensibilité visuelle dans l'eau, mais ils disposent également d'une vision relativement efficace dans l'air. La myopie excessive en milieu aérien, qui pourrait être induite par la forme sphérique du cristallin, est évitée grâce à trois mécanismes principaux : une cornée dont les bords nasaux et temporaux sont aplatis, un cristallin qui possède un indice de réfraction hétérogène, ainsi qu'une constriction intense de la pupille due à la forte luminosité au-dessus de la surface (Mass & Supin 2007). Les cétacés peuvent donc utiliser la vision pour inspecter des objets dans l'air en adoptant la position de la chandelle (« spyhopping »)⁶ ou éventuellement pour capturer des proies hors de l'eau par des stratégies d'échouages volontaires (orques *Orcinus orca*, grands dauphins) (Dudzinski et al. 2009).

⁶ L'animal est en position verticale avec la tête élevée au-dessus de la surface

d) Autres sens : mécanoréception, électroréception passive, et magnétoréception

Le sens du toucher est également important chez les cétacés pendant les activités de socialisation et de reproduction. Bien qu'il n'y ait pas d'observation de « grooming » (toilettage mutuel) à proprement parler, des contacts tactiles sont fréquents entre individus, notamment entre la mère et son petit. De plus, une grande sensibilité tactile, notamment autour de la tête, permet probablement une perception fine de l'écoulement de l'eau lors de la nage, fournissant des informations sur la vitesse de nage et la profondeur (Ridgway & Carder 1993). Alors que les ancêtres des cétacés étaient couverts de poils, ceux-ci sont absents ou quasiment chez les espèces modernes (ils disparaissent lors du développement embryonnaire). Des vibrisses sont cependant présentes chez tous les cétacés, sauf les odontocètes adultes, chez lesquels demeurent néanmoins des cryptes vibrissales bilatérales sur le rostre, probablement impliquées dans l'électroréception passive chez certaines espèces (cf. paragraphe suivant). Lorsqu'elles existent, les vibrisses présentent un follicule densément innervé et entouré d'un sinus veineux permettant une perception vibro-tactile fine des mouvements : elles jouent ainsi probablement un rôle dans la perception générale de l'environnement à l'instar de la ligne latérale des poissons. La baleine noire du Groenland possède de nombreuses vibrisses, particulièrement autour de l'évent. Celles-ci apportent probablement des informations utiles à la respiration telles que la proximité de la surface lorsqu'elles émergent, ou la détection de glace au-dessus d'elles. Leur éventuelle sensibilité à la vitesse du vent et à sa direction sont également susceptibles de fournir des informations complémentaires à la perception chimique de molécules volatiles. Les vibrisses du rostre pourraient quant à elles jouer un rôle dans l'ingestion de nourriture chez cette espèce qui filtre passivement le plancton en surface, en détectant les proies ou les matières non comestibles comme la glace (Berta, Ekdale, Zellmer, et al. 2015, Drake et al. 2015).

L'électroréception passive, c'est-à-dire la perception d'un champ électrique dans l'environnement, est répandue chez les poissons éleuthérobranchés qui possèdent des organes récepteurs spécifiques dans leur tégument, appelés ampoules de Lorenzini. Ces organes permettent de détecter les mouvements des proies sur de courtes distances, lorsque la luminosité est faible, ou lorsqu'elles sont enfouies dans le

substrat. De façon similaire, le dauphin de Guyane (*Sotalia Guianensis*) est capable de détecter des champs électriques avec un seuil bien inférieur à celui des courants générés par les mouvements des poissons (4.6 $\mu\text{V}/\text{cm}$ vs. 90 à 1000 $\mu\text{V}/\text{cm}$) (Czech-Damal et al. 2013). La suppression de cette capacité par l'application d'un moule de plastique sur le rostre suggère que les cryptes vibrissales constituent effectivement les organes récepteurs impliqués dans cette électro-sensibilité. Ces cryptes, innervées par le nerf trigéminal, sont retrouvées chez de nombreux delphinidés, mais des études fonctionnelles complémentaires sont nécessaires afin d'établir la généralité de ce sens particulier.

La perception du champ magnétique terrestre a été suggérée chez les cétacés dès les années 1980, suite à des échouages inexplicables (Klinowska 1985). Il semble en effet que les rorquals suivent des lignes de minima d'intensité géomagnétique lors de leur migration (Walker et al. 1992), comme s'ils étaient équipés d'une « boussole » interne leur permettant de s'orienter dans la direction Nord-Sud. Certaines anomalies géomagnétiques locales pourraient ainsi les désorienter et les conduire sur des zones de faible profondeur, ce qui provoquerait des échouages massifs (Kirschvink et al. 1986). Cette hypothèse est appuyée par deux études récentes montrant que les flux d'énergie magnétique provenant du soleil, et notamment les éruptions solaires, sont corrélés avec le nombre d'échouages de cétacés, tant d'un point de vue temporel que quantitatif (Vanselow et al. 2009, Ferrari 2017). Les bases anatomiques de la magnétoréception sont encore mal connues chez les vertébrés en général, et plusieurs hypothèses ont été avancées. Les études les plus convaincantes ont mis en évidence un mécanisme basé sur la magnétite, un oxyde de fer biogénique (Fe_3O_4), qui a été localisé dans le bec des pigeons voyageurs et les narines de la truite arc-en-ciel (Diebel et al. 2000, Wiltschko et al. 2010). Le stimulus serait transmis au cerveau via la branche ophtalmique du nerf trigéminal (Wiltschko & Wiltschko 2007). Chez les cétacés, de la magnétite a été retrouvée dans la dure-mère, sous le crâne, chez le dauphin commun (*Delphinus delphis*) (Zoeger et al. 1981). Du matériel magnétique a également été observé dans les méninges chez le grand dauphin, la baleine à bec de Cuvier (*Ziphius cavirostris*), le marsouin de Dall (*Phocoenoides dalli*) et la baleine à bosse (*Megaptera novaeangliae*) (Wartzok & Ketten 1999). Une expérience chez le grand dauphin a récemment suggéré qu'il pourrait discriminer un dispositif contenant un bloc de néodyme magnétisé (1.2 Tesla) d'un contrôle non magnétisé (Kremers et al. 2014), mais les bases anatomiques

précises de ce sens présumé des cétacés restent encore à déterminer, ainsi que des preuves expérimentales d'une perception de champs magnétiques environnementaux.

2. Des sens chimiques globalement réduits

a) *Etudes anatomiques*

Nous avons vu qu'au cours de l'adaptation des cétacés au milieu aquatique, des modifications majeures de leur anatomie ont eu lieu, concernant en particulier leurs systèmes sensoriels. Les sens chimiques ne font pas exception, notamment pour ce qui concerne les structures anatomiques associées à la perception des molécules dans l'air. Notamment la migration des narines sur le sommet du crâne (Fig. 2) et l'apparition des systèmes de vocalisation dans le larynx et la cavité nasale ont profondément impacté la structure des voies aériennes supérieures. Par exemple, et contrairement aux mammifères terrestres, il existe une séparation anatomique entre les voies digestives et respiratoires dans l'oropharynx : le larynx vient s'insérer directement dans le passage nasal grâce à une élongation des cartilages épiglottique et cunéiforme, empêchant le passage d'air de la cavité buccale vers la cavité nasale (rétroolfaction) et le passage de nourriture dans la trachée (fausse déglutition) (Fig. 3).

Les structures anatomiques périphériques impliquées dans l'olfaction ne sont pas seulement profondément modifiées, mais elles ont également fortement régressé au cours de l'évolution des cétacés par rapport aux mammifères terrestres, et ce de façon plus marquée chez les odontocètes. Chez ces derniers, les os nasaux sont compressés dans le plan antéro-postérieur (Fig. 2) et n'ont pas de lames osseuses formant des cornets nasaux comme chez les mammifères terrestres. De plus, le nerf olfactif (nerf crânien I) régresse durant l'embryogénèse, tout comme le bulbe olfactif (Oeschlager & Buhl 1985, Oeschlager & Oeschlager 2009). De façon surprenante, les zones cérébrales impliquées dans le traitement de l'information olfactive (rhinencéphale ou « cerveau olfactif ») comme les tubercules olfactifs, le cortex pyriforme et l'amygdale, demeurent relativement devloppees (Jacobs et al. 1971, Ridgway 1988).

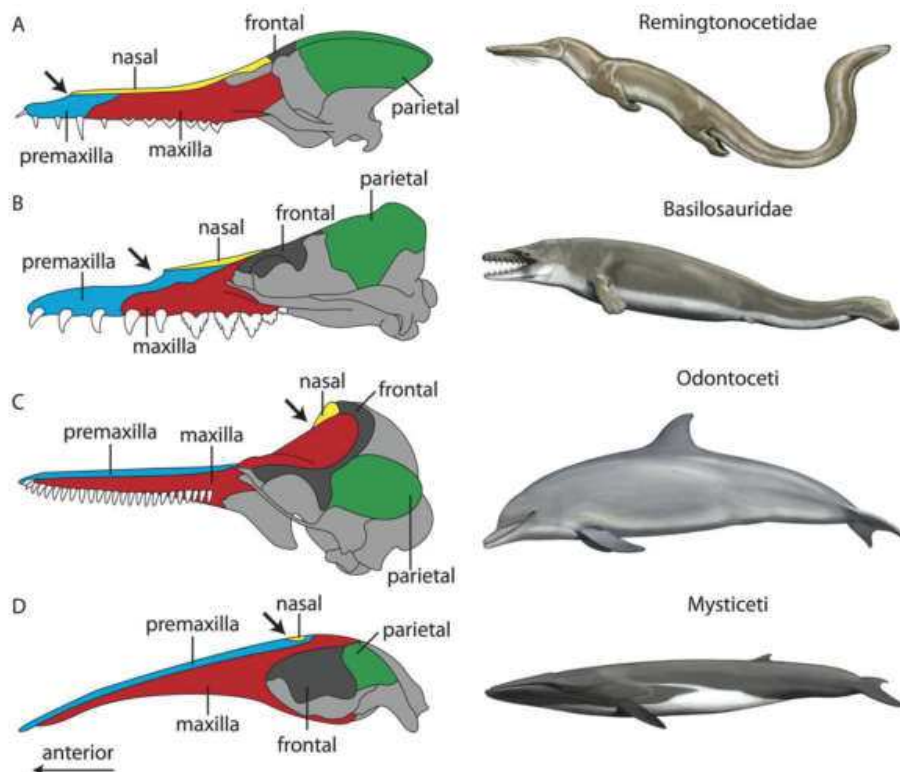


Figure 2. Représentation schématique des os crâniens des cétacés actuels (c et d) et de leurs ancêtres (a et b) (Berta et al. 2014). On distingue les changements anatomiques intervenus au cours de l'adaptation des espèces à un mode de vie entièrement aquatique, avec l'allongement caudal de l'os prémaxillaire (bleu) au-dessus de l'os maxillaire (rouge) ainsi que la compression antéro-postérieure de l'os nasal. L'ouverture des narines migre donc progressivement vers le haut du crâne, permettant une respiration dans l'air avec la tête quasi-entièrement immergée.

Le nerf trigéminal pourrait également intervenir dans la perception des stimuli chimiques, comme c'est le cas chez les mammifères terrestres car il constitue le plus développé des nerfs crâniens chez les mysticètes et n'est supplanté que par le nerf auditif chez les odontocètes (Ridgway et al. 1988). Il est également possible que d'autres nerfs projettent des fibres sensibles dans les voies aériennes supérieures et notamment le nerf terminal (nerf crânien 0). Ce nerf, qui a été décrit chez de nombreux vertébrés, projette à la fois dans la muqueuse nasale en suivant le nerf olfactif ainsi que dans les aires limbiques et olfactives du cerveau, notamment dans l'hypothalamus où il semble stimuler la sécrétion de la gonadolibérine (GnRH) (Schwanzel-Fukuda et al. 1987). Bien que ses fonctions n'aient pas été encore précisément décrites, de nombreux auteurs considèrent qu'il pourrait jouer un rôle de neuro-modulateur

de la perception de molécules odorantes ayant une action sur le système reproducteur telles que les phéromones (Bordoni & Zanier 2013, Vilensky 2014). Bien qu'il ait été suggéré que le nerf terminal a perdu sa composante olfactive chez les odontocètes (Oeschlager et al. 1987), des images obtenues par tomodensitométrie (CT scan), chez le grand dauphin, confirment que ce nerf traverse l'éthmoïde pour innervier la cavité nasale (Colbert et al. 2005).

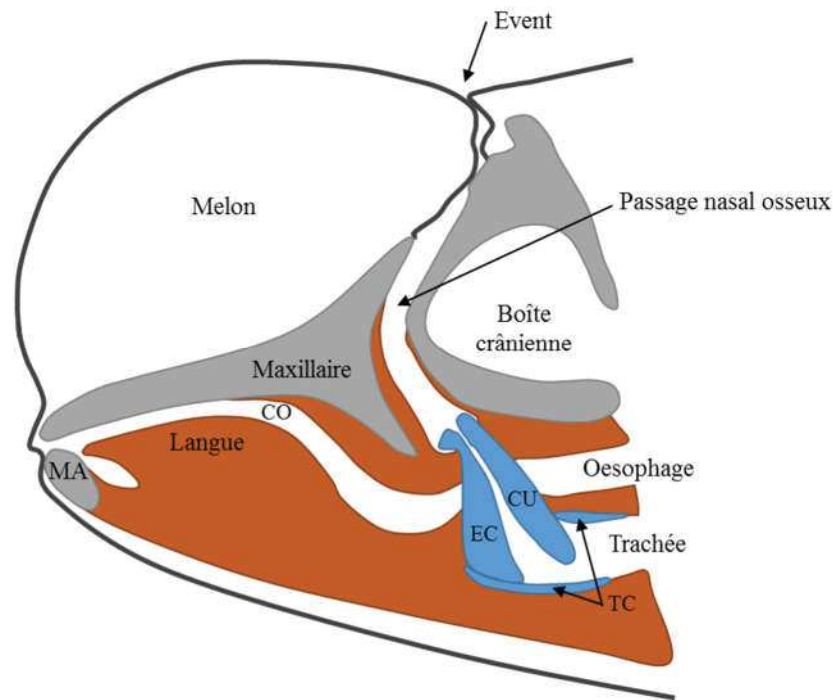


Figure 3. Représentation schématique des cavités orale et nasale chez une espèce de cétacé odontocète, le globicéphale noir (*Globicephala melas*). On distingue l'allongement des cartilages épiglottique et cunéiforme qui viennent connecter directement la trachée au passage nasal, séparant physiquement les voies respiratoire et digestive et empêchant toute rétroflection ou fausse déglutition. CU : cartilage cunéiforme, EC : cartilage épiglottique, TC : cartilage tympanohyal, (adapté de Cozzi et al. 2016).

Chez les mysticètes, les structures olfactives présentent un développement plus important. L'étude la plus complète a été effectuée chez la baleine noire du Groenland, pour laquelle les bulbes olfactifs sont relativement volumineux par rapports aux autres espèces de mammifères (0.13% du poids total du cerveau vs. 0.008% chez l'humain) et se trouvent au fond d'un canal osseux de la boîte crânienne (Fig.

4). La dure-mère qui les entoure est perforée, laissant passer des fibres nerveuses qui se prolongent à travers la lame criblée de l'os ethmoïde jusqu'à un récessus dans le canal nasal appelé « chambre nasale », où se trouvent plusieurs os turbinés (Thewissen et al. 2011). Ces structures semblent exister chez la plupart des mysticètes, car leur présence a également été rapportée chez d'autres espèces comme le petit rorqual (Godfrey et al. 2013), le rorqual commun et la baleine à bosse (Breathnach 1960). En revanche, une étude récente suggère que la partie dorsale des bulbes olfactifs principaux, connue notamment pour son implication dans la perception des signaux d'alarme chez les rongeurs, est absente chez les mysticètes (Kishida, Thewissen, Hayakawa, et al. 2015, Kishida, Thewissen, Usip, et al. 2015). Alors que l'organe voméronasal semble avoir totalement régressé chez les odontocètes adultes (Buhl & Oelschläger 1986), sa présence chez les mysticètes est encore controversée. Récemment, des conduits naso-palatins aveugles, similaires à ceux des chevaux, ont été décrits chez un nouveau-né de baleine grise (Berta, Ekdale, Zellmer, et al. 2015). Cette découverte vient compléter d'anciennes descriptions de structures similaires chez d'autres espèces comme le rorqual commun (*Balaenoptera physalis*), le rorqual bleu (*Balaenoptera musculus*), le rorqual boréal (*Balaenoptera borealis*) et la baleine à bosse (*Megaptera novaeangliae*). Cependant l'absence de données précises et complètes sur cette question semble être liée à la rareté d'études anatomiques détaillée de la cavité orale de ces animaux. En effet, les nécropsies des spécimens échoués représentent des défis logistiques et techniques importants chez ces animaux de grande taille, et la langue notamment subit une décomposition rapide après la mort. Cette lacune pourrait également être expliquée par une variation interspécifique ou interindividuelle, comme c'est le cas chez l'humain (Jacob et al. 2000). Des études histologiques complémentaires sont maintenant nécessaires pour confirmer que la structure de ces conduits récemment décrits présente bien les caractéristiques de l'organe de Jacobson.

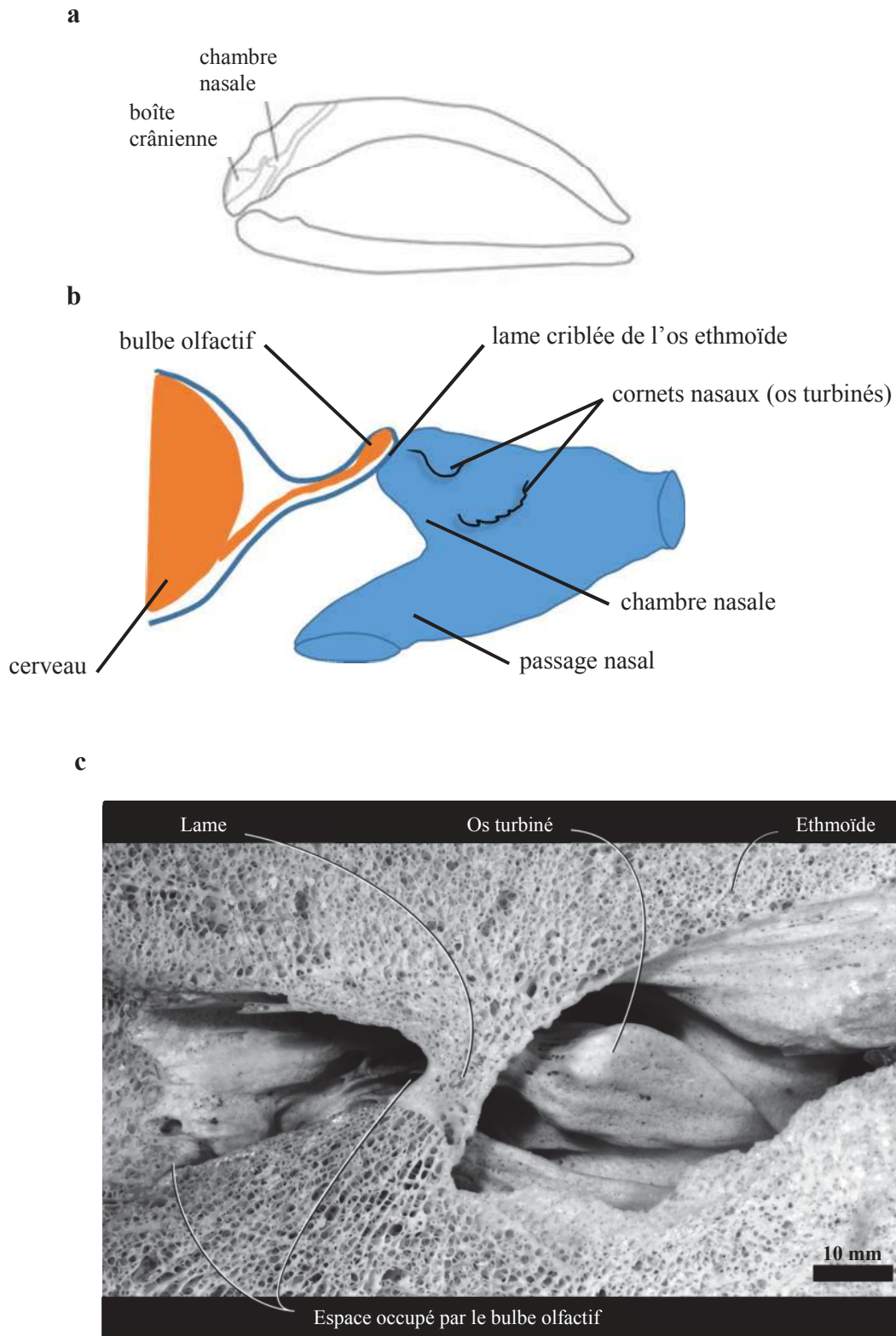


Figure 4. Schémas des structures olfactives présentes chez les mysticètes (a et b), adaptés de Thewissen et al. (2011), et coupe parasagittale du crâne d'un petit rorqual (c) (Godfrey et al. 2013)

Concernant la gustation, les bourgeons du goût ont été décrits, bien qu'en quantité réduite, chez plusieurs espèces de cétacés odontocètes comme le grand dauphin, le dauphin bleu et blanc (*Stenella coeruleoalba*), le marsouin commun (*Phocoena phocoena*), le dauphin à flancs blancs du Pacifique (*Lagenorhynchus obliquidens*) et la baleine à bec de Stejneger (*Mesoplodon mirus*) (Komatsu & Yamasaki 1980, Behrmann 1988, Kuznetsov 1990, Yoshimura & Kobayashi 1997, Shindo et al. 2008). Ils ont été localisés principalement dans les sillons en forme de V situés au niveau de la racine de la langue, alors que la partie distale de la langue est recouverte d'un épithélium stratifié plus épais (Ferrando et al. 2010). Certains auteurs rapportent une absence de bourgeons du goût chez plusieurs espèces d'odontocètes qui pourrait être expliquée par une tendance de ces structures à régresser chez l'adulte (Komatsu & Yamasaki 1980, Kuznetsov 1990, Shindo et al. 2008). Chez les mysticètes, l'unique étude approfondie de la langue réalisée à ce jour, chez une baleine grise nouveau-né, a mis en évidence de nombreuses papilles fongiformes, généralement associées à des bourgeons du goût chez les mammifères (Berta, Ekdale, Deméré, et al. 2015).

La dent du narval : un organe de chémoréception atypique

Une étude multidisciplinaire a récemment montré que la dent du narval, une canine supérieure gauche hypertrophiée principalement chez les mâles, serait impliquée dans la chémoréception. Sa couche externe est percée de multiples canaux pénétrant jusqu'à la pulpe où se trouvent des structures nerveuses sensibles à la salinité, innervées par le système trigéminal. Des expériences comportementales ont confirmé cette fonction chémosensorielle, les animaux réagissant à l'irrigation de leur corne avec une solution salée par une augmentation de leur rythme cardiaque (Nweeia et al. 2014).

b) Etudes génétiques

De façon générale, on retrouve au niveau moléculaire ce qui est observé au niveau anatomique.

Les gènes des OR et des TAAR présentent des taux élevés de pseudogénération chez les odontocètes (74 – 100%) alors qu'ils sont plus faibles chez les mysticètes (29 - 58%) (Kishida et al. 2007, McGowen et al. 2008, Hayden et al. 2010, Kishida, Thewissen, Hayakawa, et al. 2015). De plus, plusieurs gènes

reliés à l'olfaction comme OMACS (Olfactory medium-chain acyl-CoA synthetase) et NQ01 (NADPH dehydrogenase quinone 1) semblent être inactivés chez l'ancêtre commun des cétacés (Kishida, Thewissen, Hayakawa, et al. 2015) (Fig. 5).

Les gènes des récepteurs voméronasaux, V1R et V2R, semblent également être inactivés avant la séparation entre les odontocètes et les mysticètes qui ne possèdent qu'un ou deux gène V1R encore intact dans leur génome (McGowen et al. 2008, Yu et al. 2010, Kishida, Thewissen, Usip, et al. 2015) (Fig. 5).

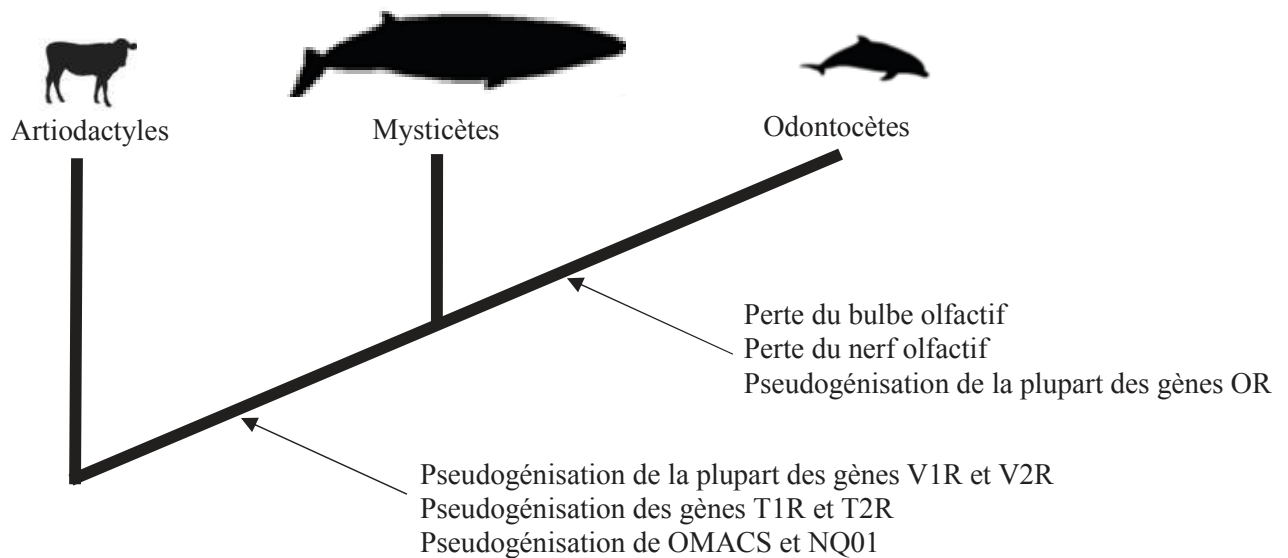


Figure 5. Evolution des structures anatomiques et génétiques chez les cétacés, adapté de (Kishida, Thewissen, Usip, et al. 2015)

Du point de vue des capacités gustatives, on observe comme pour l'olfaction des taux de pseudogénération importants. Ainsi, les gènes des récepteurs du sucré, umami, amer et acide semblent non fonctionnels, alors que le gène canal salé est intact (Feng et al. 2014, Zhu et al. 2014, Liu et al. 2016). Etant donné que certaines de ces mutations sont communes aux mysticètes et odontocètes, il est probable qu'elles soient apparues chez les ancêtres communs aux deux groupes, il y a environ 45 millions d'années (Kishida, Thewissen, Hayakawa, et al. 2015) (Fig. 5).

c) *Etudes comportementales*

Bien que des préférences de goût aient été rapportées de façon empirique chez les dauphins captifs durant la seconde moitié du XX^e siècle (se référer à Lowell & Flanigan (1980) pour une revue de la littérature à ce sujet), les premières études comportementales sur ce sujet n'ont été effectuées qu'à partir des années 1980 grâce à des expériences de conditionnement. Aux USA, Friedl et al (1990) ont entraîné des grands dauphins à mordre une plaque dans laquelle des perforations permettaient de diffuser un flux contrôlé de solutions plus ou moins concentrées des quatre goûts de base (acide, sucré, salé et amer) ou de l'eau distillée (contrôle). Ils les ont ensuite conditionnés à maintenir cette position s'ils percevaient un goût ou bien à relâcher la plaque s'ils ne percevaient pas de stimulation chimique (expérience de conditionnement opérant de type « go/no-go »). Ces tests ont permis de déterminer les seuils de détection de ces goûts basiques, qui se sont avérés légèrement supérieurs à ceux des humains. Avec un protocole semblable, Kuznetsov (1990) a globalement pu confirmer ces observations chez de grands dauphins de la mer noire. Les résultats obtenus étaient globalement identiques, à l'exception de la saveur sucrée pour laquelle le chercheur Russe n'a pas observé de réponse pour des solutions contenant du sucrose ou du glucose, à des concentrations allant jusqu'à 0.6 M, alors que l'équipe américaine avait déterminé un seuil d'environ 0.1 M (Friedl et al. 1990). Malgré cette discordance et le fait que le goût umami (glutamate) n'ait pas été testé à cette époque, il apparaît clairement que les dauphins peuvent détecter les principaux goûts primaires grâce à des récepteurs présents dans leur cavité orale.

Une expérience plus récente, utilisant des glaçons aromatisés comme stimulus, a été effectuée chez des grands dauphins, toujours en captivité. Dans cette étude, le paramètre mesuré comme indice comportemental de la perception du goût est le temps passé avant que l'animal ne « quémande » (réclame en ouvrant la gueule) un nouveau glaçon. Les résultats suggèrent que les animaux testés présentent une préférence pour les goûts de poisson par rapport au goût de crevette ou à un contrôle (glaçon non aromatisé) (Kremers et al. 2016). Ceci tend à prouver que les dauphins peuvent également détecter des goûts artificiels par la cavité orale, dans un contexte alimentaire. De plus, malgré une rétroolfaction impossible à cause de la structure du larynx, il semblerait que les grands dauphins

puissent percevoir, via leur cavité buccale, des molécules odorantes présentes dans l'eau. En effet, Kuznetsov (1990) a observé que des réactions physiologiques autonomes, telles qu'une réponse galvanique et une augmentation des rythmes cardiaque et respiratoire, étaient déclenchées lorsqu'on irrigue la cavité orale d'un grand dauphin avec des substances odorantes comme le camphre, la triméthylamine, l'indole et l'acide valérique. Il a par conséquent nommé « quasi-olfaction » cette capacité à détecter, dans l'eau, des substances généralement perçues dans l'air par les espèces terrestres (notamment grâce à la stimulation du système trigéminal).

Les études comportementales concernant la perception de molécules dans l'air via les voies respiratoires chez les cétacés sont encore plus rares. Leur présence dans des zones de forte productivité primaire, comme par exemple dans les agrégations de krill (Nowacek et al. 2011), de sardines (« sardine run ») (O'Donoghue et al. 2010) ou de harengs (Willson & Womble 2006), suggèrent qu'ils peuvent percevoir des signaux à longue distance, comme les oiseaux et probablement les pinnipèdes. Ils se basent vraisemblablement sur une perception multisensorielle pour repérer ces sites d'alimentation, en combinant la chémoréception et les signaux acoustiques ou visuels émis par les proies ou les autres prédateurs présents sur la zone (poissons, oiseaux ou mammifères marins, etc.) (Torres 2017). Chez les odontocètes, une expérience récente en captivité a suggéré que les grands dauphins perçoivent, dans l'air, l'odeur du poisson décomposé (Kremers et al. 2016). Chez les mysticètes, aucune expérience n'a été menée sur ce sujet, mais leurs structures anatomiques olfactives relativement développées, ainsi qu'une moindre proportion de gènes OR pseudogénisés, ont poussé plusieurs auteurs à émettre l'hypothèse que ces animaux filtreurs pourraient utiliser les odeurs (ex. DMS) pour trouver les zones de nourrissage, comme cela a été démontré chez les oiseaux marins (Thewissen et al. 2011, Berta, Ekdale, Zellmer, et al. 2015, Kishida, Thewissen, Usip, et al. 2015, Drake et al. 2015, Torres 2017). De plus, des observations chez la baleine à bosse en zone d'alimentation ont montré que ces animaux suivent préférentiellement des trajectoires contre le sens du vent, suggérant une orientation des déplacements permettant la détection d'une piste olfactive (Hagelin et al. 2012).

La communication chimique inter-individuelle, à la fois dans l'air et dans l'eau, a été suggérée chez plusieurs espèces de cétacés, à la suite d'observations empiriques. Par exemple, les belugas ont tendance

à réagir au sang de leurs congénères dissous dans l'eau par une réaction de fuite ou d'excitation, suggérant la sécrétion de signaux d'alarme (Lowell & Flanigan 1980, Dudzinski et al. 2009). La présence de phéromones a également été suggérée par plusieurs auteurs. Par exemple, chez plusieurs espèces d'odontocètes, les mâles suivent les femelles mûres en chaleur en approchant leur rostre de la fente génitale (un comportement appelé « goosing ») ou même en l'apposant directement dessus (« genital tracking »), alors que cela n'est pas observé en dehors de la saison de reproduction, ou pour les femelles immatures (Dudzinski 1998, Muraco & Kuczaj 2015). De façon similaire, chez les mysticètes, les rorquals (notamment le rorqual bleu) mâles poursuivent les femelles, de près, dans leur sillage, suggérant la sécrétion de substances sexuelles informatives (Richard Sears 2015, communication personnelle). Enfin, des molécules chimiques pourraient également jouer un rôle dans la communication sociale en général. Ceci est suggéré par des observations dans le milieu naturel comme chez les dauphins à long bec (*Stenella longirostris*) qui semblent nager « délibérément » au travers des fèces de leurs congénères (Norris et al. 1994). Une étude expérimentale menée par Kuznetsov (1990) a montré que l'urine et les fèces de congénères, lorsqu'ils sont perfusés dans la cavité orale même à faible concentration (jusqu'à 1:100), provoquent une réaction du système nerveux autonome (augmentation des fréquences cardiaque et respiratoire, et de la réponse galvanique) chez le grand dauphin et le dauphin commun.

Il est ainsi possible que les cétacés détectent les substances chimiques présentes dans les excréments des congénères, ou sécrétées par des glandes annexes comme les glandes péri-anales, jouant un rôle dans la reproduction ou le statut hiérarchique chez les artiodactyles terrestres (Müller-Schwarze 1991, Archunan et al. 2014). Ceruti et al. (1985) ont par ailleurs montré que la composition des urines, des fèces et des sécrétions des glandes anales étaient comparables à celles de mammifères terrestres. De plus, la communication chimique est susceptible de jouer un rôle dans les relations entre la mère et le jeune, comme c'est le cas chez la plupart des mammifères terrestres et notamment les artiodactyles. Tel que mentionné précédemment (paragraphe 2.a), les structures gustatives sont plus développées chez les juvéniles que chez les adultes. Ceci pourrait être lié à la détection des substances présentes dans le lait, ou émises par des glandes dans la région mammaire, un processus déterminant chez les ongulés terrestres

(Schaal 2010). On peut également émettre l'hypothèse que les femelles détectent les molécules émises dans l'urine ou la région génitale de leur nouveau-né. Ceci est suggéré par l'observation fréquente de comportements de « goosing » pendant les mois qui suivent la naissance (Muraco & Kuczaj 2015). Cependant, hormis les expériences anciennes de Kuznetsov portant sur les réponses physiologiques induites par la détection des fèces et de l'urine de congénères par les dauphins, aucune validation expérimentale n'existe sur l'existence d'une potentielle communication chimique chez les cétacés.

A la lumière des données et connaissances rassemblées dans cette introduction, les objectifs principaux de cette thèse étaient 1) d'établir si les cétacés présentent une réponse comportementale spécifique à des stimuli chimiques liés à leur alimentation, attestant de capacités chimio sensorielles fonctionnelles puis 2) d'initier l'exploration des substrats anatomiques et chimiques sous-tendant l'émission, la réception et l'intégration des signaux et indices chimiques.

C. Approche expérimentale

1. Intérêt d'une étude multidisciplinaire

Nous avons pu constater dans les parties précédentes que, malgré le fait que la chémoréception soit cruciale pour la survie et la reproduction des autres taxons de vertébrés aquatiques, ce sujet n'a pas encore fait l'objet de recherches approfondies chez les cétacés. Les interrogations restent nombreuses car les rares études sur le sujet apportent des résultats contradictoires : par exemple, les données génétiques et anatomiques montrent une tendance à la régression voire une disparition des sens chimiques notamment chez les odontocètes, mais les quelques études et observations comportementales dont nous disposons suggèrent pourtant qu'ils réagissent aux stimuli chimiques. Au cours de cette recherche, j'ai donc cherché à apporter de nouveaux éléments de réponse à cette question toujours controversée.

En écologie comportementale, la communication se définit comme l'émission d'un signal par un individu (émetteur) provoquant une réponse comportementale ou physiologique chez l'individu qui le perçoit (receveur) (Scott-Phillips 2008). Afin de couvrir ces différentes phases depuis l'émission de signaux chimiques jusqu'à leur perception et la réponse comportementale induite, il a été nécessaire de faire appel aux méthodes et concepts issus de différentes disciplines scientifiques complémentaires. Cette approche pluridisciplinaire inclut : (a) des études comportementales (b) des investigations anatomo-histologiques des structures réceptrices grâce aux techniques d'immunohistochimie, (c) ainsi qu'une description chimique des composés émis via leurs sécrétions, dans le cadre d'une potentielle communication inter-individuelle.

L'approche comportementale est une étape cruciale pour l'étude du fonctionnement d'un canal sensoriel. En effet, les caractéristiques anatomiques, génétiques et moléculaires d'un système sensoriel ne prédisent pas nécessairement s'il est fonctionnel ou non. L'étude de la gustation chez le colibri (*Archilochus colubris*) constitue un excellent exemple pour illustrer cette dissociation entre structure et fonction : malgré l'absence de récepteur au goût sucré (T1R2) chez cette espèce, des chercheurs ont montré que les animaux pouvaient discriminer le sucrose. Cette observation comportementale a conduit

à une investigation plus poussée des récepteurs du goût et à la découverte inattendue d'une modification génétique des deux sous-unités du récepteur à l'umami T1R1-T1R3, permettant au final de détecter le sucré (Baldwin et al. 2014). Dans cet esprit d'ouverture, il m'a paru nécessaire d'établir clairement dans un premier temps, si les cétacés réagissent à des stimuli chimiques par une réponse comportementale. Cette première étape a constitué la majeure partie du travail expérimental de ma thèse, car elle a nécessité de conséquentes étapes de mise au point de protocoles expérimentaux totalement nouveaux, à la fois dans des conditions contrôlées et dans le milieu naturel. J'ai choisi de travailler chez des odontocètes et chez des mysticètes afin de déterminer les similitudes et les différences dans les capacités chimio-sensorielles de ces deux groupes de cétacés. Une fois établie la réalité de cette réponse comportementale aux indices chimiques, j'ai initié deux études visant à éclaircir les bases anatomiques et chimiques susceptibles d'être impliquées dans la chémoréception chez ces espèces.

2. Modèles et sites d'étude

Comme indiqué plus haut, pour une approche globale de la chémoréception dans l'ordre de cétacés, j'ai inclus dans mon étude, des espèces appartenant aux deux groupes actuels, les odontocètes et les mysticètes.

Pour les études comportementales chez les odontocètes, mon choix s'est porté vers deux espèces ayant des écologies alimentaires bien distinctes. Le grand dauphin est une espèce au comportement alimentaire très plastique, qui se nourrit d'une grande variété de proies (poissons, céphalopodes) principalement dans les 50 - 100 premiers mètres sous la surface (Blanco et al. 2001). Cette espèce constitue un modèle répandu pour les études comportementales et physiologiques chez les cétacés, de par sa grande aire de distribution et surtout sa disponibilité en captivité. Une étude comportementale préalable, en milieu contrôlé a ainsi été effectuée avec les dauphins du Marineland d'Antibes, avec qui une collaboration avait déjà été établie.

L'autre espèce ciblée est le globicéphale noir, une espèce qui se nourrit quasi exclusivement de calmar (teutophage) à des profondeurs de plusieurs centaines de mètres (Astruc, 2005; Canadas & Sagarminaga, 2000; De Stephanis et al., 2008; Quick et al., 2017). L'étude des réactions comportementales à des stimuli chimiques identiques chez ces deux espèces permettrait donc de déterminer si les différences d'écologie alimentaire se reflètent dans une utilisation différentielle des sens chimiques. La méditerranée occidentale, et notamment la côte andalouse, a été choisie comme site d'étude car elle abrite des populations résidentes de grands dauphins et de globicéphales noirs (*Globicephala melas*), qui sont fréquemment observés dans les mêmes zones.

Chez les mysticètes, mon choix s'est porté sur la baleine à bosse, largement distribuée et dont les populations sont en augmentation à l'échelle mondiale (Zerbini et al. 2010). Son comportement a fait l'objet d'un grand nombre de recherches car elle est relativement facile à observer lorsqu'elle se rapproche des côtes en période de reproduction et d'alimentation. C'est également la seule espèce de mysticète qui a fait l'objet d'une étude comportementale (préliminaire) reliée à l'olfaction. Celle-ci a suggéré que ces baleines pourraient utiliser des pistes olfactives en se déplaçant dans le sens contraire du vent (Hagelin et al. 2012). Autre argument en faveur de cette espèce : elle se reproduit l'hiver dans des eaux chaudes proches des tropiques et migre chaque été pour s'alimenter aux hautes latitudes. De ce fait, cette migration annuelle offrait donc la possibilité d'étudier la chémoréception de la baleine à bosse dans différentes conditions environnementales et lors de stades distincts de son cycle reproducteur. J'ai ainsi réalisé une étude multi-sites sur deux années consécutives. D'une part, j'ai mis en place des expériences durant la saison de reproduction dans des eaux oligotrophes où elles ne se nourrissent jamais, et dont l'environnement ne comporte pas (ou peu) de stimulus chimie lié à l'alimentation (Océan Indien). D'autre part, j'ai étudié leur capacités chimio-sensorielles dans des zones où elles se nourrissent principalement de poisson (Islande) et de krill (Antarctique) durant des périodes d'« engraissement » cruciales pour la constitution de leurs réserves énergétiques, et où les substances chimiques alimentaires sont alors fortement concentrées.

Pour des analyses histologiques et chimiques, j'ai participé à différentes collaborations afin de maximiser le nombre d'échantillons collectés. Sur le territoire national, nous avons intégré le Réseau

National Echouage (RNE), qui gère la prise en charge des animaux échoués (principalement cétacés, pinnipèdes et tortues marines) et l'exploitation scientifique des données collectées. J'ai également établi une collaboration avec le département de pathologie de la faculté vétérinaire d'Utrecht qui effectue la plupart des nécropsies des mammifères marins échoués aux Pays-Bas. Cela a permis la collecte d'échantillons biologiques de marsouin commun, une espèce qui s'échoue fréquemment sur les côtes hollandaises, en vue de l'analyse chimique des composés présents dans ces prélèvements.

CHAPITRE 1 : REACTIONS COMPORTEMENTALES A DES STIMULI CHIMIQUES DANS UN CONTEXTE ALIMENTAIRE

L'étude du comportement des cétacés est le socle de cette thèse, et l'essentiel de mon travail a consisté à investiguer la réaction des cétacés exposés à différents stimuli chimiques alimentaires. D'autres approches comme les études d'électrophysiologie, généralement utilisées chez les rongeurs ou les amphibiens pour mesurer les réponses nerveuses, ne sont pas concevables en pratique chez ces grands animaux aquatiques pour des raisons pratiques et éthiques. De plus, l'étude des réactions spontanées offrent l'opportunité de déterminer à la fois si les animaux peuvent percevoir un composé chimique dans son environnement, et quels sont les comportements qui sont associés à la perception de ce stimulus. Ces observations peuvent ensuite guider d'autres études, notamment anatomiques, afin d'explorer les structures potentiellement impliquées dans cette perception.

Dans ce chapitre, je présente trois études comportementales réalisées chez les cétacés odontocètes et mysticètes. La première a été réalisée en milieu contrôlé chez une espèce d'odontocète (le grand dauphin) afin de mesurer des réactions individuelles, sur des animaux isolés lors des tests, et donc de s'affranchir des biais liés aux interactions entre les individus chez ces espèces aux structures sociales complexes (**Manuscrit 1**). Réaliser des tests en milieu contrôlé permet également d'établir des protocoles expérimentaux simples et rigoureux, de maîtriser la plupart des paramètres expérimentaux et d'améliorer la reproductibilité des résultats (présentation des stimuli, qualité de l'eau, etc.). Ce type d'expérience "en laboratoire" constitue ainsi une première approche exploratoire permettant d'aborder les aspects théoriques et méthodologiques de notre projet dans un contexte environnemental simplifié. Cependant, travailler avec des animaux élevés en captivité comporte des inconvénients majeurs pour les études en écologie comportementale. En effet, ces individus, tous nés en delphinarium, n'ont jamais été exposés aux mélanges de goûts et d'odeurs présents dans le milieu marin. En outre ils ne présentent que peu ou pas de comportements alimentaires naturels puisqu'ils sont exclusivement nourris de poissons congelés et sont exposés à une faible diversité de proies (une ou deux espèces généralement). Enfin, la

simplification des conditions environnementales en captivité ne permet pas nécessairement d'extrapoler les résultats aux individus sauvages qui doivent interagir avec un milieu complexe et changeant (Brakes & Simmonds 2011). Ces limites du travail en captivité m'ont donc poussé, dans un deuxième temps, à étudier la réponse comportementale d'odontocètes sauvages à des stimuli chimiques dans leur milieu naturel, en m'inspirant d'expériences réalisées depuis de nombreuses années par notre équipe sur la chémoréception des oiseaux (**Manuscrit 2**). Afin de compenser la grande variabilité des paramètres environnementaux (vent, courant, température, etc.) et des sujets d'étude (comportement, sexe, âge, statut reproducteur, etc.) j'ai répliqué autant que possible les essais malgré des conditions météorologiques parfois difficiles, et j'ai dû limiter le nombre de composés chimiques testés par rapport aux ambitions initiales. Ainsi, grâce à l'expérience acquise avec les odontocètes lors de deux campagnes en mer Méditerranée, j'ai pu améliorer les protocoles et les adapter à l'étude des capacités de chémoréception chez une espèce de mysticète, la baleine à bosse, dans des zones de reproduction (Madagascar) et d'alimentation (Islande et Péninsule Antarctique) (**Manuscrit 3**).

MANUSCRIT 1 : Perception d'extraits de proies dans l'eau par le grand dauphin (*Tursiops truncatus*) en milieu captif

Résumé français de l'étude :

L'utilisation des sens chimiques (goût, odorat et sensibilité trigéminale) par les cétacés odontocètes a été très peu explorée jusqu'à présent. Alors que les quelques études anatomiques et génétiques ayant porté sur ce sujet suggèrent qu'ils sont peu équipés pour percevoir les stimuli chimiques, l'approche comportementale reste indispensable pour explorer la fonctionnalité de cette modalité sensorielle. Nous avons élaboré un test de choix spontané chez des grands dauphins (*Tursiops truncatus*) afin de déterminer s'ils perçoivent et sont attirés par un extrait de poisson (maquereau), leur nourriture habituelle. L'expérience a été menée sur quatre animaux maintenus en captivité : deux mâles adultes et deux femelles juvéniles. Nos résultats montrent que lorsqu'on leur présente simultanément deux flotteurs identiques, l'un diffusant un goût de poisson et l'autre une solution contrôle, les femelles interagissent significativement plus avec le stimulus gustatif associé au goût de poisson. En revanche, les mâles adultes ne présentent pas de préférence entre les deux diffuseurs. Par ailleurs, les femelles juvéniles interagissent plus longtemps avec les deux diffuseurs en les manipulant avec leur bouche deux fois plus souvent que les adultes, ce qui peut être interprété comme une plus forte motivation pour la tâche de discrimination. Ces résultats confirment que les dauphins, au moins au stade juvénile, peuvent percevoir un mélange chimique complexe dans l'eau. Le comportement d'attraction qu'ils ont montré envers l'extrait d'une proie suggère qu'ils utilisent ce sens pour trouver leur nourriture. Finalement, le protocole que nous avons développé et validé ne nécessite aucun conditionnement et peut donc maintenant être facilement étendu à de nouvelles études sur l'utilisation du goût dans des contextes alimentaires et sociaux. Par ailleurs, ce dispositif expérimental nouveau pourrait être inclus dans les mesures d'enrichissement de l'environnement sensoriel et ainsi contribuer à améliorer le bien-être des mammifères marins en captivité.

Présentation de l'article (en anglais) :

Titre : Do bottlenose dolphins display behavioural response to fish taste?

Auteurs : **Bertrand Bouchard**, Thomas J. Lisney, Sylvie Campagna, Aurélie Célérier

Statut de publication : Publié

Journal : Applied Animal Behaviour Science. 194 (2017) 120–126



Photo : Bertrand Bouchard

Do bottlenose dolphins display behavioural response to fish taste?

Bertrand Bouchard^{1,2}, Thomas J. Lisney^{1,2}, Sylvie Campagna^{1,3}, Aurélie Célérier^{1,2*}

¹ CEFE UMR 5175, CNRS - Université de Montpellier - Université Paul-Valéry Montpellier - EPHE –
1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France

² Université de Montpellier, 2 Place Eugène Bataillon, 34090 Montpellier, France

³ Université de Nîmes, Département Sciences et Arts, Rue du Docteur Georges Salan, 30021 Nîmes
Cedex 1, France

* Corresponding author: Tel.: +33 467 613 317; Email: aurelie.celerier@cefe.cnrs.fr

KEYWORDS

Sensory stimulation; Toothed whales; Taste; Enrichment; Spontaneous behaviour; Chemoreception.

A. ABSTRACT

The chemosensory abilities (i.e. taste, smell and trigeminal perception) of odontocete cetaceans are still widely unknown. However, a better understanding of their potential use of these senses would not only improve our knowledge of their behavioural ecology, but also allow us to develop behavioural enrichment strategies for captive odontocetes using sensory stimulation. While studies on taste bud anatomy and the taste receptor genes in these animals have provided useful information, ultimately behavioural experiments are crucial to assess whether odontocetes use their sense of taste in water. Go/no go and conditioning experiments in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) have previously shown that they can perceive basic tastes, but it is still unclear whether they are able to detect food-related chemical mixtures. We thus designed a spontaneous choice experiment using floating taste diffusers in order to test whether captive bottlenose dolphins could detect and display attraction behaviours towards a natural fish taste stimulus. Four dolphins, two adult males and two juvenile females, were involved in the experiment. Our results show that the juvenile females interacted with the fish taste diffuser significantly more than with the control. However, the adult males did not seem to make a clear choice. Also, the juvenile females showed a significantly greater level of motivation towards the test, spending more time interacting with the diffusers and holding them in their open mouth more often than the adult males. These findings corroborate previous behavioural studies suggesting that taste perception is functional in bottlenose dolphins, at least in young individuals. They also suggest that the taste of their natural prey could be attractive to them. Finally, the methodology used in this study proved to be easy to implement in captive odontocetes and will allow for investigating further their use of taste in feeding and social contexts without the need for conditioning experiments that require long periods of training. This experimental design could also be included in behavioural enrichment initiatives in captive marine mammals.

B. INTRODUCTION

Animals gain information about their environment through a variety of different sensory modalities. In captive animals, knowledge of a species' sensory capabilities is important for a number of reasons. Various sensory stimuli (or a lack thereof) can act as significant stressors for captive animals (Morgan & Tromborg 2007). In addition, sensory enrichment using biologically relevant stimuli may be used to stimulate 'natural' behavioural expression in captive animals (Wells 2009, Mills et al. 2010), and it may be possible to incorporate natural sensory stimuli into cognitive enrichment strategies.

Various species of toothed whale (odontocetes), such as beluga whales (*Delphinapterus leucas*), killer whales (*Orcinus orca*), and, in particular, bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), are held in captivity in zoos and aquariums around the world (Clark et al. 2013). While we are accumulating increasingly detailed knowledge about the sensory systems of these animals, in particular audition and vision (see Kremers et al., 2016a, for a recent review) very little is known about the chemical senses (taste, smell and trigeminal perception) in odontocetes. In terrestrial mammals, these senses are involved in a wide range of biological functions such as foraging, reproduction and orientation. This is also true for many marine vertebrates including fish, turtles, birds and pinnipeds (Grassman & Owens 1987, Hara 1994, Nevitt et al. 2004, Pitcher et al. 2011, Stoffel et al. 2015).

In contrast, odontocetes are thought to have very limited chemosensory abilities (Lowell & Flanigan 1980). For example, these animals lack the canonical neuroanatomical structures necessary for olfaction as found in other vertebrates, e.g., olfactory epithelium, bulbs, nerves and tract (Jacobs et al. 1971, Oelschläger & Buhl 2008), although these structures may be present embryonically (Oelschläger & Buhl 2008). In addition, odontocetes also appear to have a poor sense of taste. Juveniles possess small numbers of taste buds, which diminish in number or even totally disappear in adults (Komatsu & Yamasaki 1980, Li 1983, Behrmann 1988, Kuznetzov 1990, Yoshimura & Kobayashi 1997, Werth 2004, Shindo et al. 2008). Moreover, they usually swallow their food whole (Perrin et al. 2009) and appear to lack functional taste receptor genes for four of the five basic vertebrate tastes (sweet, bitter, umami, sour, and salt; odontocetes only have functional salt taste receptor genes) (Feng et al. 2014, Zhu et al. 2014, Liu et al. 2016). Because these animals are thought to have such limited chemosensory

abilities, very few studies have focused on this sensory system in comparison to the large number of studies performed on other modalities like audition or vision (e.g., Supin et al., 2001; Thomas et al., 1992; Thomas and Kastelein, 1990)

The extent to which odontocetes can perceive chemical signals, however, is still controversial. For example, while most of the taste receptor genes (except those implicated in salt taste) are pseudogenized in the bottlenose dolphin (Feng et al. 2014), this species has a well-developed gustatory thalamus (Kruger 1959). Behavioural observations have suggested that bottlenose dolphins, as well as other dolphin species, have taste preferences and can potentially perceive chemical signals from congeners' secretions including faeces, urine and blood (Dudzinski et al., 2009; Gubbins, 2002; Muraco and Ii, 2015; Norris et al., 1994). Indeed, in bottlenose dolphins, some of these biological secretions (urine and faeces) can induce an autonomous physiological response (such as an increase in heart rate, respiratory rate and skin conductivity) when they are irrigated as dilute solutions in the oral cavity (Kuznetsov 1990).

Concerning the perception of the five basic tastes, experiments using go/no go operant conditioning in bottlenose dolphins indicate that these dolphins could detect at least four of them (sweet, salt, bitter and sour) at thresholds similar to those of humans (Friedl et al. 1990, Kuznetsov 1990). Kuznetsov (1990) termed this ability "quasi-olfaction" instead of gustation, mainly because the dolphins seemed to perceive in their oral cavity some compounds that are usually perceived through olfaction in terrestrial mammals. In a recent preliminary study, food preference was also tested in the same species (Kremers et al., 2016b), the results of which suggest that bottlenose dolphins can discriminate artificial fish flavour from shrimp flavour or water. However, while these aforementioned studies using conditioning and/or go/no go experiments inform us about the ability of bottlenose dolphins to perceive some chemical compounds, they give limited information about whether or not these compounds will naturally influence their behaviour.

In this study, we implemented an experiment using captive bottlenose dolphins where the animals were free to spontaneously interact with two devices (floating diffusers containing ice cubes consisting of either natural fish mixture or a control solution) without any conditioned behaviour. This innovative,

direct choice experiment was based on this species' spontaneous tendency to play with floating objects (Greene et al. 2011). We hypothesized that if the dolphins can discriminate the taste diffuser from the control, they would interact with them differently. Furthermore, if they perceive the food-related stimulus (fish mixture solution) as biologically relevant, the animals should display more attraction/interaction behaviours towards the taste diffuser compared to the control. Bottlenose dolphins were the focus of this study because most of the previous behavioural (conditioning) experiments on odontocetes' chemoreception have been performed on this species. As well as providing fundamental biological information, this study on the chemoreceptive capabilities of captive bottlenose dolphins could contribute to improve the welfare of such animals in captivity and above all, to contribute to the conservation and management of wild populations.

C. MATERIALS AND METHODS

1) Study animals and facilities

This study was performed at Marineland, Antibes, France, and involved four captive-born bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). Two of the dolphins (A1 and A2, aged 22 and 24 years old, respectively) were adult males and the other two were juvenile females (J1 and J2, aged 7 and 4, respectively). These animals were kept together in a social group in a main lagoon pool (43 x 40 m with a maximum depth of 4 m) with another eight-year-old male which was not included in the experiment because of its tendency to destroy floating objects. None of the dolphins housed in the lagoon pool were part of the daily shows, which made them available for behavioural experiments.

2) Chemical stimuli

A natural fish taste stimulus (Fish) and a control stimulus (Control) were used. Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) was chosen as the fish stimulus because this species had already been included in the diet of the dolphins, thus preventing a neophobic reaction. At the same time, as the dolphins' regular diet consisted mostly of capelin (*Mallotus villosus*) and sprat (*Sprattus spp.*), we expected the dolphins to have a higher level of motivation towards a less-common fish stimulus (e.g., Epstein et al., 2007). The Fish solution was prepared by mixing 500 g of fresh mackerel in commercial spring water (Cristaline®, Saint Yorre, France) to a final volume of 1300ml. This fish mixture was then filtered through a 200 micron sieve and 10mL of red dye (natural beetroot extract, Terre Exotique, Rochecorbon, France) was added to produce a homogenous and uniformly coloured solution. For the Control solution, the spring water was coloured with the red dye in the same concentration as the fish solution. Ice cubes were prepared by freezing 100ml of each solution at -20°C for at least 72 hours, which allowed the destruction of potential parasites in the fish mixture.

Two stimulus presentation devices, or 'diffusers' were built using modified commercially available floating chlorine diffusers for outdoor swimming pools, painted either red or blue (RAL 3000 and RAL 5019 respectively, Nuance, Motip Dupli, GmbH, Hassmersheim, Germany) to assist identification during video analysis (Fig. 1). The hue of these two colours was chosen because they had identical brightness, so avoiding a possible visual bias (bottlenose dolphins are cone monochromats; Fasick et al.,

1998). During each experimental trial, each diffuser contained one 100 ml ice cube that was not visible through the narrow openings at the bottom. A rubber band was added to the screw-on cap so it remained tightly in place during manipulation by the subjects. In order to habituate the dolphins to the diffusers prior to the start of the trials, they were introduced while empty to the dolphins' pool for five minutes twice a day on the two consecutive days before the start of the trials.

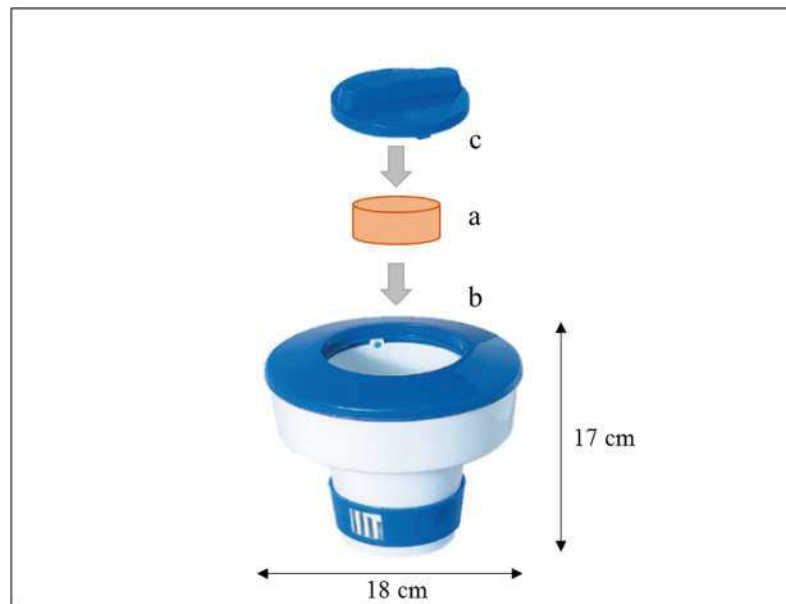


Figure 1. Schematic view of the floating diffuser used in the spontaneous choice experiment. (a) 100ml ice cube of taste (fish mixture) or control solution. (b) Modified PVC chlorine dispenser with (c) screwable cap reinforced with a rubber band.

3) Experimental design

Each spontaneous choice experiment consisted of a four-minute trial conducted in an experimental pool (11 x 11 m, 2.5 m deep) that was separated from the lagoon pool by a stainless steel gate. In order to participate in a trial, each dolphin was asked by a trainer to enter alone the experimental pool using a visual signal (pointing arm), while the others remained in the lagoon pool. A total of 48 trials were undertaken by testing each individual during 12 sessions across 10 days. The trials were run mostly during the late morning between 10:00 and 13:00, but also during the afternoon between 15:00 and 16:30. The dolphins were fed in the lagoon pool a light meal of fish (a quarter of their daily ration) on average 108 minutes (range: 15 – 213 minutes) before their participation in the experiment, which

replaced the routine training sessions. The temperature of the air and water varied between 14-17°C and 15-17°C, respectively. The trials were performed with the assistance of 6 trainers although two trainers were involved in only one trial each. We utilized two established command signals used by the trainers for many years, ‘free-time’ (the trainer indicates the training session has stopped) and ‘retrieve’ (the trainers ask the dolphin to retrieve an item in the pool). At the beginning of each trial, the dolphin stationed in front of a blind-folded trainer (starting place), while the two diffusers (Fish and Control) were placed by an experimenter at the opposite side of the pool equidistant from the starting place. The identity of the dolphin, the colour of the Fish and Control taste diffusers (red or blue) as well as their position (to the left or to the right of the subject) were all chosen in a random balanced order to avoid a side- or colour- preference effect. Once the trainer gave the dolphin the signal for free time and walked away, the dolphin was left alone to freely interact with the two diffusers for the whole duration of the trial. The movements and the behaviour of the dolphin during each trial were recorded using two GoPro digital cameras (GoPro Hero 4 Black Edition, GoPro Inc., San Mateo, CA, USA) placed facing in opposite directions above the pool. Additional environmental data were also recorded to control for their respective influence on the dolphins’ behaviours, including their prandial state (i.e., the amount of time since their last meal), the weather conditions (presence of rain or wind > 10 km/h), and the identity of the trainer. After four minutes, the trainer came back and, again using signals, asked the dolphin to retrieve both diffusers. The dolphin was rewarded with one fish upon retrieving the diffusers and the keeper asked to transfer to the lagoon pool after the gate was opened. The presence of a remaining ice cube of a similar size in both diffusers was then checked to confirm that there was no temperature difference around the two diffusers during the experiment.

4) Data collection

The video recordings were analyzed by a blind experimenter. Firstly, trials deemed as invalid due to a protocol problem (e.g., a diffuser was opened by the dolphin or became stuck in the pool skimmer, or the trainer used an incorrect command signal sequence) were identified and discarded. For the remaining 37 valid trials (10 trials each for A1 and A2, 9 and 8 for J2 and J1, respectively), the number and duration of the behavioural interactions with each diffuser were measured. These interactions were divided into

three categories: (1) ‘bite’ (the dolphin held the diffuser in its mouth); (2) ‘push’ (the dolphin pushes the diffuser using its rostrum); and (3) ‘throw-follow’ (the dolphin throws the diffuser away using its mouth and then swims back to it). The total exploration time was defined as the total time of interaction with both diffusers and was used as an indicator of the exposure of the dolphins to both the stimulus and the control. The taste preference (P) was calculated as the difference in the duration of all the interactions between the Fish and the Control stimuli. The number of switches between the diffusers (where the dolphin goes from one diffuser to the other) was also measured as a potential indicator of the dolphins’ interest in finding the chemical cue.

5) Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using R 3.1.2 (R Development Core Team 2015). Arithmetic means and \pm standard errors are presented. The data were tested for normality using a Shapiro–Wilk test prior to all analyses. Non-normal distributions were transformed using either square-root (exploration time and number of switches) or arcsine (proportion of biting behaviour) transformations. The effects of the trial session and the prandial state on the behavioural parameters were analyzed using Pearson’s correlation coefficient and the effects of both environmental (weather conditions, prandial state) and protocol (presentation side and colour of the Fish diffuser, identity of the trainer) variables were assessed using Kruskal Wallis’ H-test. The differences in these parameters between the two age/sex groups (adult/male and juvenile/female) were tested using two-tailed Student’s t-tests. Taste preference was tested against the theoretical value of zero using a Student’s t-test.

6) Ethical approval

This experiment was approved by the French national ethical committee (Comité Consultatif National d’Ethique, permit APAFIS #5392-2016051717525952v3) and was in accordance with the European directive 86/609/CEE. The subjects’ participation in research was entirely voluntary, with the experiment described here replacing routine training sessions.

D. RESULTS

1) Environmental and protocol variables

None of the measured behavioural parameters (preference, time of exploration, and number of switches) was significantly affected by any of the environmental and protocol variables (Table 1).

Environmental & protocol variable	Statistical test	Behavioural parameter		
		Preference	Exploration time	Switches
Rain	Two-samples t-test	0.07	0.64	0.11
Wind	Two-samples t-test	0.78	0.56	0.83
Keeper	Kruskal Wallis' H-test	0.43	0.69	0.84
Prandial state	Pearson's correlation	0.11	0.89	0.34
Side of diffuser	Two-samples t-test	0.52	0.68	0.64
Color of diffuser	Two-samples t-test	0.63	0.41	0.71

Table 1. Influence of environmental and protocol variables on the dolphins' behavioral parameters. *P*-values are presented for each statistical analysis. Two-sample Student's t-test have been used for means comparison between two categories (Presence of rain or wind, side and color of the fish diffuser). Kruskal-Wallis H-test was used for multiple categories (keepers) and Pearson's correlation for numeric data (prandial state, i.e. time since the last meal)

2) Behavioural interactions

Bite was by far the most common behavioural interaction, accounting for on average $70.0 \pm 4.1\%$ of the total interactions across the four dolphins. The two juvenile females displayed bite behaviour significantly more frequently than the two adult males (81% of the interactions vs. 60% in the juvenile females and adult males, respectively; $t = 2.37$; $df = 32.5$; $P = 0.02$; Student's two-tailed t-test on arcsines, Fig. 2a). The push behaviour was observed more frequently in adult males (31.4% vs. 13.6%; $t = 2.39$; $df = 22.4$; $P = 0.03$; Student's two-tailed t-test on arcsines, Fig. 2b) while there was no difference in the throw-follow behaviour between the two groups ($t = 1.35$; $df = 28.6$; $P = 0.19$; Student's two-tailed t-test on arcsines, Fig. 2c).

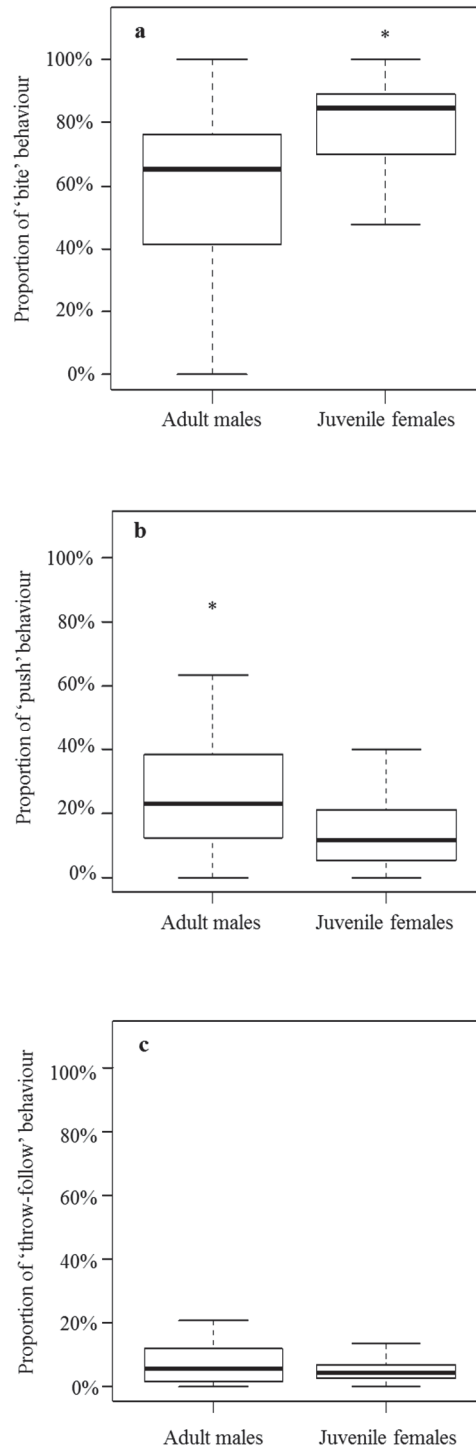


Figure 2. Proportion of the total exploration time spent exhibiting ‘bite’ (a), ‘push’ (b) and ‘throw-follow’ behaviours in the two age/sex groups of dolphins. (a) The ‘bite’ behaviour was the most frequently observed, and was observed significantly more in the juvenile females ($t = 2.37$; $df = 32.5$; $P = 0.02$; Student’s two-tailed t-test on arcsines). (b) The ‘push’ behaviour was proportionally more frequent in the adult males than in the juvenile females ($t = 2.39$; $df = 22.4$; $P = 0.03$; Student’s two-tailed t-test on arcsines). (c) No difference was observed in the ‘throw-follow’ behaviour between the two groups ($t = 1.35$; $df = 28.6$; $P = 0.19$; Student’s two-tailed t-test on arcsines).

3) Total exploration time

The four dolphins manipulated both diffusers extensively, with an average of 19.2 ± 2.1 contacts per trial. On average, total exploration time was significantly higher in the juvenile females than in the adult males (153 seconds per trial vs. 82 seconds per trial, respectively; $t = 2.81$, $df = 32.5$; $P = 0.008$; Student's two-tailed t-test on square roots, Fig. 3a). The exploration time did not change throughout the sessions in both groups (Pearson's $r^2 = 0.003$ on square roots, $P = 0.76$; Fig. 3b).

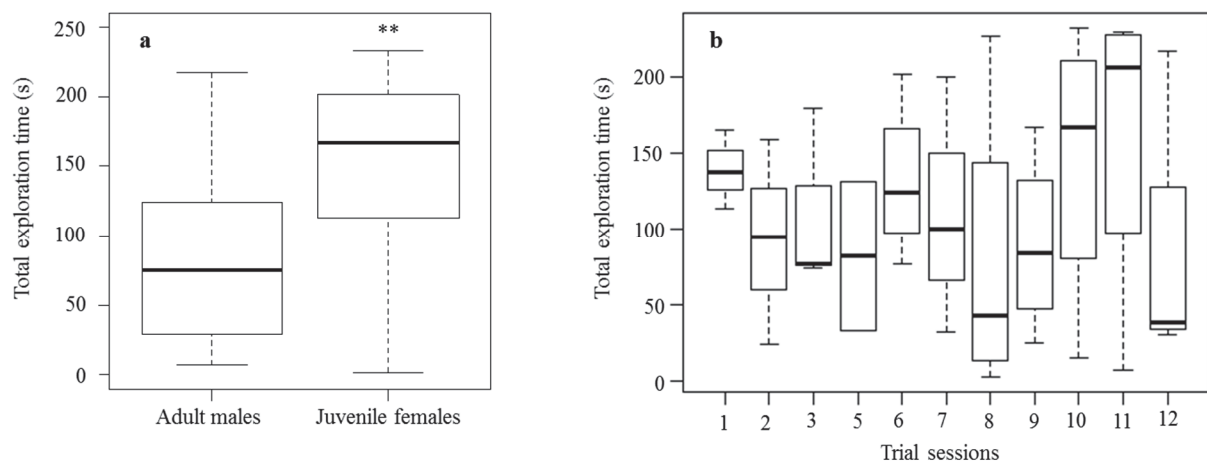


Figure 3. Total exploration time (time spent interacting with both Control and Fish diffusers) during the four-minute trials in the two age/sex groups of dolphins. (a) This behavioural parameter was significantly higher in the juvenile females than in the adult males ($t = 2.81$, $df = 32.5$; $P = 0.008$; Student's two-tailed t-test on square roots). (b) No significant evolution was observed throughout the trial sessions (Pearson's $r^2 = 0.003$ on square roots, $P = 0.76$).

4) Taste preference

On average, the taste preference P (i.e. the difference in the time spent with the Fish diffuser and the Control) was 18.4 ± 17.1 seconds across the four animals but this did not differ significantly from 0 ($t = 1.079$; $df = 36$; $P = 0.29$; one sample Student's two-tailed t-test). However, we observed a significant difference in taste preference between the two age/sex groups. With the mature males, no difference was found in the time spent with each diffuser ($t = 1.014$; $df = 19$, $P = 0.32$; one sample Student's two-tailed t-test) while the two juvenile females showed a significant preference towards the Fish diffuser: they

interacted about one minute more with the Fish diffuser than with the Control diffuser (107.8 vs. 45.3 seconds; $t = 2.345$; $df = 16$; $P = 0.03$; one sample Student's two-tailed t-test) resulting in an average taste preference P of 62.5 ± 26.7 seconds (Fig. 4). Similar results were obtained when considering the number of contacts with the floaters instead of the time spent interacting with them (data not shown). There was no significant change in taste preference through the different trial sessions in adult males or in juvenile females (Pearson's $r^2 = 0.10$; $P = 0.18$ and $r^2 = 9.10^{-4}$; $P = 0.91$, respectively).

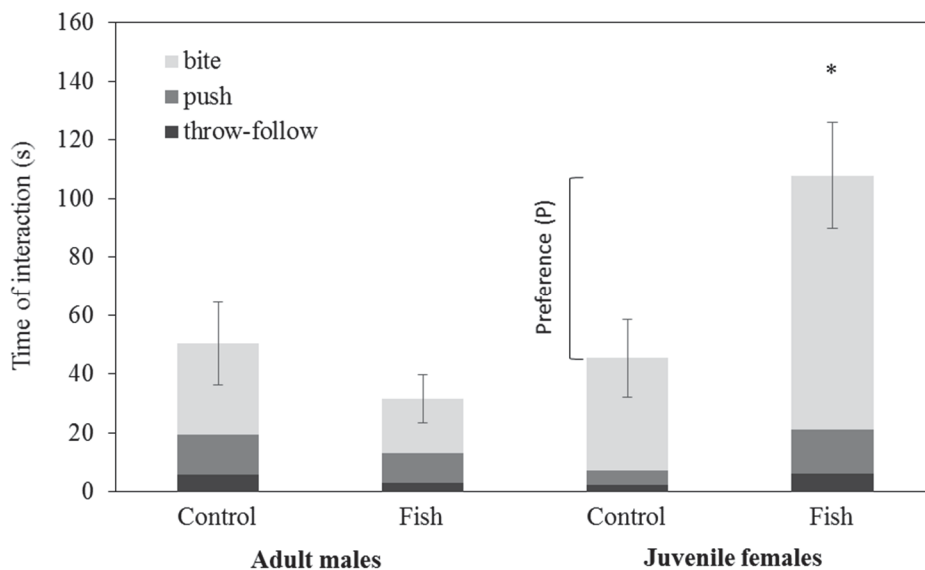


Figure 4. Average time spent with the Control and Fish taste diffusers in adult males and juvenile females bottlenose dolphins over 12 sessions of four-minute trials. The preference was defined as the difference in time spent with the Fish and Control diffusers, and significantly differed from 0 only in juvenile females ($t = 2.345$; $df = 16$; $P = 0.03$; one sample Student's two-tailed t-test). The three different behaviours observed 'bite', 'push' and 'throw-follow' are detailed in light grey, grey and dark grey, respectively. Error bars represent the standard error of the mean.

5) Switches

The dolphins switched between the two diffusers 2.4 ± 0.49 times per trial on average with no difference found between the two age/sex categories ($t = 0.92$, $df = 28.2$; $P = 0.37$; Student's t-test (two-tailed) on square roots) (Fig. 5a). However, we observed a progressive decline in the number of switches through the trial sessions (Pearson's $r^2 = 0.17$; $P = 0.01$) (Fig. 5b).

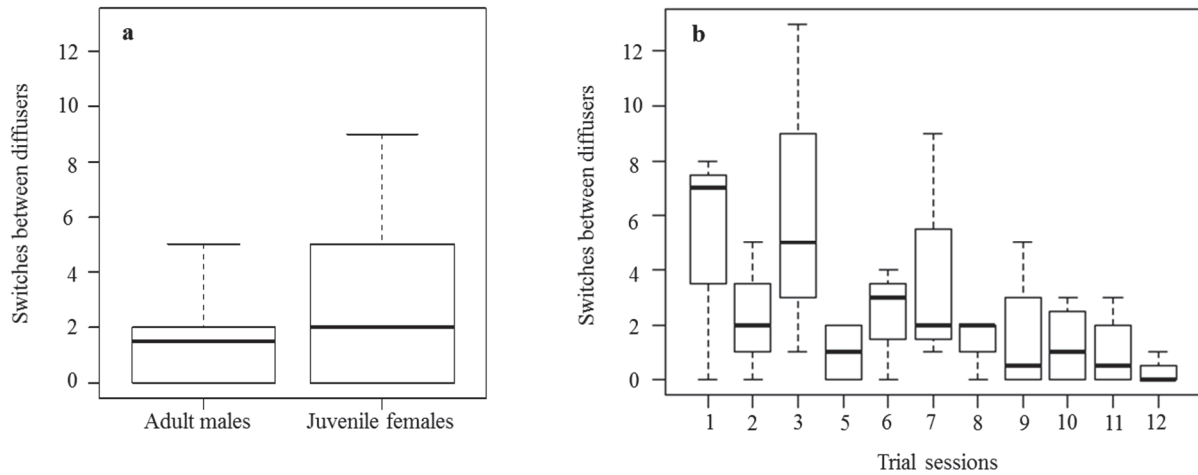


Figure 5. Number of switches observed during the four-minute trials in the two age/sex groups of dolphins. (a) No significant difference was observed between juvenile females and adult males ($t = 0.92$, $df = 28.2$; $P = 0.37$; Student's two-tailed t-test on square roots). (b) The number of switches progressively decreased throughout the trial sessions (Pearson's $r^2 = 0.17$; $P = 0.01$).

6) Correlations between behavioural parameters

We observed only two correlations between the measured behavioural parameters in the two age/sex groups. Preference was negatively correlated with the number of switches in juvenile females (Pearson's $r^2 = 0.23$; $P = 0.05$) as well as with the exploration time in adult males (Pearson's $r^2 = 0.21$; $P = 0.04$) (Table 2).

Behavioural parameters	Adult males		Juvenile females	
	Pearson's r	P	Pearson's r	P
Preference x Switches	-0.090	0.707	-0.481	0.050
Preference x Exploration Time	-0.456	0.044	0.306	0.233
Switches x Exploration Time	-0.007	0.975	0.430	0.086

Table 2. Correlation between the three behavioural parameters measured in the dolphins. Pearson's correlation coefficients and P -values are presented for each statistical analysis. Significant correlations ($P < 0.05$) are highlighted in bold.

F. DISCUSSION

In previous studies on taste perception in bottlenose dolphins, only pure taste compounds such as citric acid, sodium chloride or sucrose (Friedl et al. 1990, Kuznetzov 1990) or artificial flavours (Kremers et al., 2016b) were tested. In contrast, here we report for the first time the perception of a complex, food-related taste in bottlenose dolphins, at least in one age/sex class. Indeed, our results strongly suggest that the juvenile females we tested discriminated the fish taste, as they had significantly more contacts and higher time of interaction with the Fish diffuser than with the Control diffuser. It is also noteworthy to mention that the trials were performed without conditioning and using single individuals, allowing a free spontaneous exploration of the stimuli without any social bias due to hierarchical structure in captive animals.

Regarding the compounds that are potentially perceived in the fish mixture, several hypotheses might be considered. First, although the salt concentration in the fish mixture (estimated to be 0.07 M based on Bhuiyan et al.'s (1986) measure of the salt concentration in raw Atlantic mackerel) was slightly below the behaviourally-determined sodium chloride detection threshold reported in bottlenose dolphins (0.1-0.3 M) (Friedl et al. 1990, Kuznetzov 1990) it was much higher than in the control solution (8.1×10^{-4} M). This difference in salt concentration may thus have played a role in the discrimination, as the salt receptor genes have all been shown to be functional in the bottlenose dolphin (Feng et al. 2014). Moreover, trimethylamine (TMA) is also present at high concentrations in raw fish including mackerel (Ahn et al. 2014) and has been found to be perceived by bottlenose dolphins when perfused in their mouth at a concentration of 3.4×10^{-2} M (Kuznetzov 1990). While the taste receptor type usually implicated in the detection of trace-amines in mammals has been lost in this species (Kishida, Thewissen, Hayakawa, et al. 2015), TMA may be perceived through another neural pathway such as the trigeminal nerve, as has been shown to be the case in humans and mice (van Thriel et al. 2006, Willis & Morris 2013). While sodium chloride and TMA are two potential candidates, many other chemical compounds contained in the fish mixture may have contributed, either individually or in combination, to the taste discrimination in juvenile females.

In contrast to the juvenile female dolphins, the two adult males did not discriminate between the two diffusers. This could be linked to a lower chemical sensitivity related to either sex or age. In primates, for example, it has been suggested that higher taste acuity in females could be linked to a higher density of fungiform papillae on the tongue (Muchlinski et al. 2011). However, there has been no report of sexual difference in the gustatory structures in odontocetes so far, although unfortunately the sex of the individuals investigated is rarely mentioned in the few previous studies on taste perception in bottlenose dolphins. In the recent study by Kremers et al. (2016b), both male and female bottlenose dolphins were tested and the authors found no apparent differences between sexes regarding taste discrimination.

A more likely explanation for the apparent lack of discrimination between the fish mixture and the control in the adult males is age, given that the adult males were, on average, approximately four times older than the juvenile females. A similar decline in taste sensitivity has also been documented in other mammal species including humans and rats (Kurt Thaw 1996, Mojet et al. 2001). Anatomical studies in bottlenose dolphins have suggested that taste buds progressively degenerate in adults as their presence was described in the pits located at the base of the tongue of a subadult and in 2-3 year-old calves, but not in mature adults (Kuznetsov 1990, Yoshimura & Kobayashi 1997). While more anatomical studies are needed to determine the chronology of this process, the apparently greater taste sensitivity observed in young individuals may be of great ecological importance as it could allow them to taste milk during the 2-year lactation period, as well as to discriminate food as they learn how to catch live prey (Komatsu & Yamasaki 1980). A similar process of progressive taste bud degeneration was also described in other species of toothed whale (Komatsu & Yamasaki 1980, Shindo et al. 2008). Therefore the discrimination abilities of the two juvenile females included in the present study, aged 4 and 7, may reflect a higher chemical sensitivity, possibly related to the presence of a larger number of functional taste buds. Taste thresholds have yet to be determined for juvenile bottlenose dolphins, but our results, as well as previous anatomical findings, suggest they are likely to be lower than those already reported in adults using go/no experiments (Friedl et al. 1990, Kuznetsov 1990).

In addition to our discoveries regarding the ability of bottlenose dolphins to perceive a complex-food mixture using taste, the main feature of our study was to assess whether this chemoreceptive ability

could influence their behaviour. For this reason, we chose to evaluate the spontaneous behavioural responses of the dolphins, instead of using operant conditioning techniques. Our results suggest that not only were juvenile females able to discriminate the fish taste from the control, but that they were also attracted by the fish mixture, as shown by the higher time of interaction recorded for these animals. We also observed a difference in behaviours between the adult males and the juvenile females that could explain partly the above-mentioned difference in perception between these two groups. Indeed, the juvenile females displayed a higher interest in the task in general compared to the adult males: they spent more time exploring the two diffusers and exhibited more biting behaviour. This result is not surprising as juvenile dolphins have previously been shown to engage in object play significantly more than adults (Greene et al. 2011). It may also explain why, on two occasions, one of the juvenile females (J1) was able to open the tightly screwed cap of the Fish diffuser and then swallow the remaining ice cube it contained. This happened only twice, so this unexpected event was not statistically exploitable and, as explained previously, the two trials in question were removed from the data analysis.

In general, both the adult males and the juvenile females showed a progressive decline in motivation to perform the experimental task, as suggested by the significant decline in the number of switches through the sessions. The number of switches may also be related to the performance in the discrimination task as it was negatively correlated to preference only in juvenile females; they tended to stick to their choice (i.e. switch less) when they found the Fish diffuser. This pattern appears similar to the “win-stay, lose-shift” strategy which involves a stimulus-reward association and is well documented in laboratory animals including mammals, birds and fishes (Emery, 2006; Evenden and Robbins, 1984; Heydarnejad and Purser, 2016). Wild bottlenose dolphins have been shown to use this behaviour during foraging: they tend to stay in patchy concentrations of nearshore preys until the local resource has been depleted and then travel in search of a new optimal site (Defran et al., 1999). In primates, a natural tendency to switch more between choices when the reward intensity decreases has also been described and linked to the stimulation of the parietal cortex (Kubanek and Snyder, 2017), a brain region that is also well developed in bottlenose dolphins (Jacobs et al. 1971). Increasing the animals’ motivation to play with the diffusers may therefore improve their performance throughout the entire duration of the experiment

via an increase in their exposure to the taste stimuli. One simple method of achieving this could be to reward them at the end of each trial by giving them the tasty ice cube to eat.

This study demonstrated that our methodological design is appropriate to investigate bottlenose dolphins' chemosensory abilities, since the dolphins extensively manipulated the floating diffusers with their mouths. As it was also easy to implement, this experimental approach could be used as a complementary approach to operant conditioning experiments that require long training periods working with particularly attentive animals. Using the methodology described here, a wide range of putatively relevant chemical cues could now be screened, including food-related individual chemicals, or urine extracts that are believed to contain sex pheromones (Muraco & Kuczaj 2015). The investigation of potential chemical deterrents would also be valuable for use in conjunction with pingers in the fishing industry (Hamer et al. 2012).

From an animal welfare point of view, the present spontaneous choice protocol could also be used as part of an enrichment program for captive dolphins raised in a relatively sterile, captive environment with a low chemical diversity (Wells 2009). Such sensory stimulations are now becoming increasingly encouraged in zoos and aquariums (Wells 2009, Mills et al. 2010), and may be especially important in marine mammals that usually cannot exhibit their natural feeding behaviours as they are fed dead fish, mostly as a reward after the successful completion of a conditioned task (Clark 2013). Rather than being dissipated throughout the entire captive environment, which could potentially be overwhelming and stressful to the animals, these chemical cues should be delivered as concentrated focal stimuli. This technique, using natural and artificial scents, has recently proved to be effective in decreasing pattern swimming and other stereotypical behaviours in California sea lions (Samuelson et al., 2016).

In conclusion, in this study we have designed and tested an innovative protocol to study the use of chemoreception in captive bottlenose dolphins. Our results corroborate with the very few previous behavioural studies on this subject (Friedl et al. 1990, Kuznetzov 1990), suggesting that bottlenose dolphins can indeed perceive chemical compounds. In addition, we have shown that a fish mixture can be attractive, at least for juvenile females, which provides strong evidence that chemical stimuli could be involved in foraging behaviour in complement with other sensory modalities. Further studies are now

required, focusing on wild dolphins that both live in contact with the complex mixture of chemicals present in the marine environment and exhibit natural foraging behaviours. Our team is currently implementing field experiments using protocols adapted from the research on chemoreception in marine birds (e.g. Nevitt et al. 2004). We anticipate that, as it has been the case in birds (e.g. Baldwin et al., 2014; Caro et al., 2015), a combination of these behavioural approaches with further investigations on their neuroanatomical and molecular bases may reveal that chemosensory systems play a more significant role in the behavioural ecology of odontocetes (and indeed other cetaceans) than has been previously thought.

G. ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Manuel Garcia Hartmann and all the trainers of the lagoon area at Marineland for their advice and collaboration. Funding was provided by Fondation Total (grant #144903/Parfums d'eau) and Ministère de l'Éducation nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

MANUSCRIT 2 : Réponses comportementales des cétacés odontocètes et des goélands au sulfure de diméthyle dans leur milieu naturel

Résumé français de l'étude :

La plupart des prédateurs marins utilisent des indices chimiques dans l'environnement pour trouver leurs proies. Les cétacés, et en particulier les odontocètes, sont considérés comme des exceptions car ils semblent peu équipés pour la chémoréception du point de vue anatomique et génétique. Des expériences comportementales sur les dauphins captifs contredisent cependant cette idée, suggérant qu'ils peuvent discriminer des composés tant dans l'eau que dans l'air. Etudier la réaction d'odontocètes sauvages envers des stimuli chimiques peut nous aider à mieux appréhender leurs capacités chimio-sensorielles. Nous avons mis au point un protocole novateur et un diffuseur chimique flottant afin de mesurer, en aveugle, la réponse des grands dauphins (*Tursiops truncatus*) et des globicéphales noirs (*Globicephala melas*) au sulfure de diméthyle (DMS). Le DMS, un indicateur chimique des zones de forte productivité primaire marine, est perçu par plusieurs autres prédateurs marins comme les oiseaux, les tortues et les poissons. Puisque les oiseaux attirés par le DMS pourraient constituer un stimulus visuel pour les cétacés, ils ont été également inclus dans les observations. Les résultats de deux campagnes d'étude en Méditerranée occidentale, analysés par des modèles linéaires généralisés, montrent que les deux espèces d'odontocètes réagissent à la présence de DMS. La proportion de groupes de dauphins venant nager à proximité du flotteur (dans un rayon de 50 m) était supérieure lorsqu'il diffusait du DMS par rapport à une solution contrôle. Pendant les essais avec du DMS les globicéphales se sont également rapprochés en plus grand nombre du diffuseur, mais pas aussi près que les dauphins (dans un rayon de 300 m), et ont exprimé plus fréquemment certains comportements comme la position de la chandelle (« spyhopping »). Nous avons également observé que les goélands leucophée (*Larus michahellis*) réagissent au DMS, ce qui n'avait jamais été rapporté dans cette famille d'oiseaux et évoque une stratégie de recherche alimentaire multimodale. Cependant, leur présence n'a pas affecté de façon significative l'approche des cétacés. Finalement, cette étude suggère que le grand dauphin et le globicéphale noir réagissent aux indices chimiques environnementaux de façons distinctes, reflétant probablement les différences dans leurs écologies alimentaires.

Présentation de l'article (en anglais) :

Titre : Behavioural responses of odontocete cetaceans and seagulls to dimethyl sulfide

Auteurs : **Bertrand Bouchard**, Philippe Verborgh, Pauline Gauffier, Sylvie Campagna,
Aurélie Célérier

Statut de publication : En soumission



Photo : Bertrand Bouchard

Behavioral responses of odontocete cetaceans and seagulls to dimethyl sulfide

Bertrand Bouchard^{1,2}, Philippe Verborgh⁴, Pauline Gauffier⁴, Sylvie Campagna^{1,3}, Aurélie Célérier^{1,2*}

¹ CEFE UMR 5175, CNRS - Université de Montpellier - Université Paul-Valéry Montpellier - EPHE – 34293 Montpellier cedex 5, France

² Université de Montpellier, 34095 Montpellier Cedex 5, France

³ Université de Nîmes, 30021 Nîmes Cedex 1, France

⁴ CIRCE, Conservation, Information and Research on Cetaceans, Algeciras-Pelayo, 11390 Cadiz, Spain

* Corresponding author: aurelie.celerier@cefe.cnrs.fr

KEYWORDS

Toothed whales, Chemoreception, *Tursiops truncatus*, *Globicephala melas*, foraging ecology, Sensory stimulation

A. ABSTRACT

Most marine predators use chemical cues to find their prey. Cetaceans, especially odontocetes, are considered exceptions as they appear little equipped for chemoreception both anatomically and genetically. Behavioural observations have however contradicted this idea, suggesting they may discriminate various compounds in the air and in water, but further evidences are needed. We thus designed an innovative blinded protocol to measure the response of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and long-finned pilot whales (*Globicephala melas*) to dimethyl sulfide (DMS). DMS is a chemical indicator of highly productive marine areas perceived by various marine vertebrates. Because attracted seabirds may represent a visual cue for cetaceans, they were also included in the observations. Results from two surveys in the Western Mediterranean Sea show that both odontocete species reacted to the presence of a DMS-scented vegetable oil slick. The proportion of dolphin groups swimming next to the stimulus area (within a 20-m-radius zone) was higher during DMS trials than during controls. Pilot whale groups also approached in higher numbers when DMS was diffused, but not as close as the bottlenose dolphins (100-m-radius), and exhibited more surface behaviors including spyhopping. Yellow-legged gulls (*Larus michahellis*) were found to react to DMS, a fact that was unknown for this bird taxon until now, and which suggest a multimodal foraging strategy in this species. However, the presence of seabirds did not significantly affect the cetaceans' approach. This study therefore suggests that bottlenose dolphins and pilot whales use chemical cues differently, which may be reflect their distinct foraging ecologies.

B. INTRODUCTION

Most vertebrate marine species living in the open ocean exhibit high sensitivity to chemical cues. Chemosenses (senses of smell, taste and trigeminal perception) allow them to detect biological or inorganic compounds from their environment, providing them with information that is crucial for their survival. While chemoreception can be involved in social interactions, breeding and orientation, it is of particular importance for foraging behavior in predators. Fish, for example, and particularly sharks, can find their food hundreds of meters away by detecting plumes of low-molecular-weight metabolites released by their prey using mainly their highly sensitive olfactory and lateral line systems (Hara 1994, Gardiner & Atema 2007). Experiments have also shown similar results for marine vertebrates such as turtles and sea snakes that engage in foraging behavior when they are exposed to food-related scents (Constantino & Salmon 2003, Shine et al. 2004) and for seabirds that are attracted to fish or krill homogenates (for a review, see: Dell'Araccia et al. 2014). At a larger scale, marine predators might find their foraging grounds in the open ocean by following chemical indicators of highly productive zones such as dimethyl sulfide (DMS), produced by phytoplankton when it is grazed by zooplankton (Dacey & Wakeham 1986, Cantin et al. 1996). There is growing evidence that DMS plays a key role in the foraging ecology of open ocean communities as it attracts seabirds, turtles and whale sharks (Nevitt & Bonadonna 2005, Endres & Lohmann 2012, Dove 2015). Pinnipeds can in fact detect very low concentrations of DMS (Kowalewsky et al. 2006). Several authors have also suggested that marine mammals including cetaceans could use this chemical signal while foraging in the pelagic environment (Thewissen et al. 2011, Hagelin et al. 2012). The use of chemical cues by cetaceans still remains surprisingly unclear, and data on this issue is particularly scarce. This knowledge gap may be due in part to the major modifications of their chemosensory anatomy during their evolution, making comparison with terrestrial mammals challenging.

The typical neuroanatomical structures involved in the sense of smell of terrestrial mammals such as the olfactory epithelium, bulbs and tract, reduce during odontocetes ontogeny and are absent in their adult brain (Jacobs et al. 1971, Oelschläger & Buhl 2008). The same is true for the cribriform plate and for ethmoturbinals (Breathnach 1960, Oelschläger & Buhl 1985, 2008, Pihlström 2008). Although reduced,

these main olfactory structures are still present in mysticetes (Breathnach 1960, Thewissen et al. 2011). This overall regression of the olfactory system is also reflected at a molecular level: cetaceans show in their genomes a lower number of olfactory receptor (OR) genes when compared to their closest terrestrial relatives as well as a high proportion of pseudogenization (29-54% in mysticetes and 74-100% in odontocetes) (Kishida et al. 2007, McGowen et al. 2008). A general reduction of the gustatory system has also been reported in odontocetes on anatomical and genetic levels (Komatsu & Yamasaki 1980, Kishida, Thewissen, Hayakawa, et al. 2015) while their potential trigeminal perception has not been studied. It therefore appears that throughout their evolutionary history, odontocetes lost most of the anatomical and genetic substrates known to be involved in chemoreception in terrestrial species. It could however be hypothesized that other non-canonical sensory pathways, still to be described, have evolved during the cetaceans' evolution towards the perception of chemical stimuli in air or in water. A surprising example was recently discovered with narwhals, which exhibit functional chemosensory structures innervated by the fifth cranial nerve (Nweeia et al. 2014). Behavioral experiments and empirical observations have suggested that odontocetes can in fact perceive various volatile compounds. Several species of dolphins have for example been known to react to their congeners' secretions such as blood, urine and feces (Dudzinski et al., 2009; Gubbins, 2002; Muraco and Ii, 2015; Norris et al., 1994). Kuznetsov (1990) also showed that bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) surprisingly displayed autonomous reactions such as increased heart and respiratory rates when their oral cavity was exposed to odorants (trimethylamine, indole, camphor and valeric acid). A new expression was subsequently proposed for this perception: "quasi-olfaction" instead of gustation. More recent spontaneous behavioral experiments also suggested that bottlenose dolphins could detect odors from decomposing fish (Kremers et al. 2016). Experimental evidence of their perception of air-borne molecules in a natural environment is however still lacking.

In this study, we tested whether DMS could represent a potential attractive chemical cue for wild odontocetes. We developed a protocol adapted to cetacean behavioural ecology, based on previous experiments set up by our team on bird chemoreception (Dell'Araccia et al. 2014, Cunningham et al. 2017). It was implemented in the western Mediterranean Sea, using a DMS slick acting as a chemical

stimulus in a behavioural response experiment targeting resident groups of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and long-finned pilot whales (*Globicephala melas*, thereafter pilot whales). These two species can be found in similar areas but show very distinctive feeding ecologies: while bottlenose dolphins mainly hunt teleost fish within 100 m from the surface (Blanco et al. 2001), pilot whales almost exclusively feed on cephalopods during dives at depth of several hundreds of meters (Astruc, 2005; Canadas & Sagarminaga, 2000; De Stephanis et al., 2008; Quick et al., 2017). Different behavioral reactions to a potential food-related chemical cue such as DMS were therefore expected. Because cetaceans and seabirds are often seen foraging together and could use each other as a visual cue to find schools of fish, the behaviour of birds present around the stimulus zone was also recorded.

C. MATERIALS AND METHODS

1) Study sites and targeted cetacean groups

The experiments were carried out during two fieldwork campaigns in the western Mediterranean Sea. The first took place in the Strait of Gibraltar in April and May 2015, a period of moderate whale watching activity and of favorable weather conditions. This area hosts a resident population of bottlenose dolphins and of long-finned pilot whales that share the same habitat in the narrowest part of the Strait, south of Tarifa, Spain (35°56'40"N-35°53'51"N and 5°31'30"W-5°40'26"W) (De Stephanis, Cornulier, et al. 2008, Verborgh et al. 2009). The second campaign was carried out in April 2016 in the Gulf of Vera south of Cartagena, Spain. This area allows frequent observations of bottlenose dolphins on the narrow continental shelf as well as of pilot whales, mostly found on the steep slopes to the shelf edge relatively close to the coast (12-15 km south from the port of Cartagena) (Gómez De Segura et al. 2006).

The experiments were set up during days of favorable sea conditions (wind force less than 4 on the Beaufort scale and swell less than 1 m), maximizing the chances to detect cetacean groups from the research vessel. The crew included a boat captain, two cetacean observers, one bird observer and one experimenter. The vessel navigated to the known distribution area of the resident pilot whale and bottlenose dolphin populations until a group was spotted. The animals were then approached at minimal speed (3-5 knots) up to a distance of approximately 300 m in order to assess the group size and to observe their general behavior, for a minimum of 10 minutes. These behaviors included traveling (moving towards one main direction), feeding (diving repeatedly and surfacing facing in varying directions), resting (floating at the surface or moving very slowly) and milling (moving in varying directions and remaining near the surface) (Shane et al. 1986, Shane 1995). A trial started when no other vessel was present (or likely to approach) within 1 km around the trial zone as it could influence the cetaceans' behavior and group cohesion during the experiment (Senigaglia et al. 2012).

2) Exposure stimuli and protocol

The chemical stimulus consisted of a scented slick deployed at sea in the vicinity of cetacean groups that mimicked a highly productive zone, as this was shown to effectively induce a behavioural response in several bird species (Nevitt et al. 1995, Dell'Araccia et al. 2014). The DMS solution was freshly prepared every day by dissolving the DMS (Purity $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Germany) in commercial vegetable (sunflower) oil at a final concentration of 0.2 M. The control (CTL) consisted in vegetable oil only. Two identical devices of 80 cm in diameter each were made for the control and DMS trials using stainless steel-reinforced orange Styrofoam™ tubes. A polyvinyl chloride membrane of 30 cm length was hung below the tubes in order to partly retain the oil solutions and a 1 kg weight was hung 40cm under the device with three polyester straps to serve as an anchor in order to prevent excessive drifting due to the wind (Fig. 1). The use of this bright-colored, round floating device allowed a progressive release of the olfactory stimulus during the trial and created a focal point of concentrated solution that was used as a reference by the observers.

Before starting a trial, the vessel was placed 300m upwind (*i.e.* into the wind) from the identified targeted group. Once the vessel was correctly positioned, 3 liters of the test solution were quickly poured in the device by an experimenter at the stern of the vessel. These solutions were deployed in a randomized order, out of sight of the observers and the rest of the crew (randomized blind experimental design). Once the chemical solution was poured in, the vessel was immediately placed 300 m upwind from the floater (therefore 600 m from the cetacean group) before the observation started (Fig. 2). The vessel engine was kept on neutral during the whole trial session, except for small adjustments in order to keep the position of 300 m upwind from the floater.

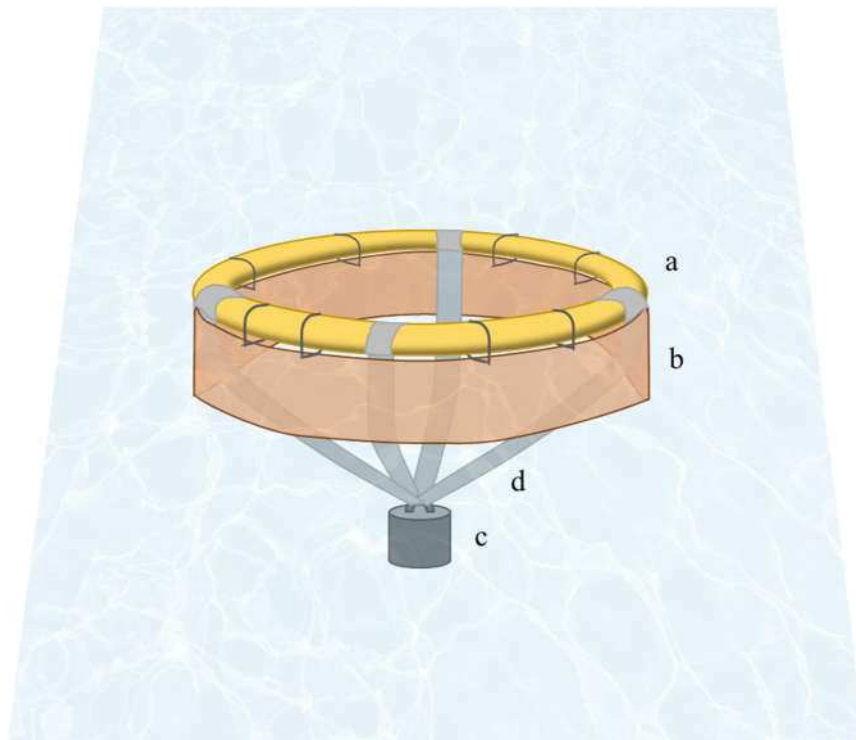


Figure 1. Representation of the sea-floating device used for the chemical diffusion tests. The floating part had a diameter of 80 cm and was made of one stainless steel-reinforced orange Styrofoam™ tube (a). A 30-cm-long polyvinyl chloride membrane (b) was hung below the tubes in order to partly retain the oily solutions during the trial. A 1-kg lead weight (c) was hung 40 cm under the device with four polyester straps (d) and worked as an anchor to prevent excessive drifting due to the wind.

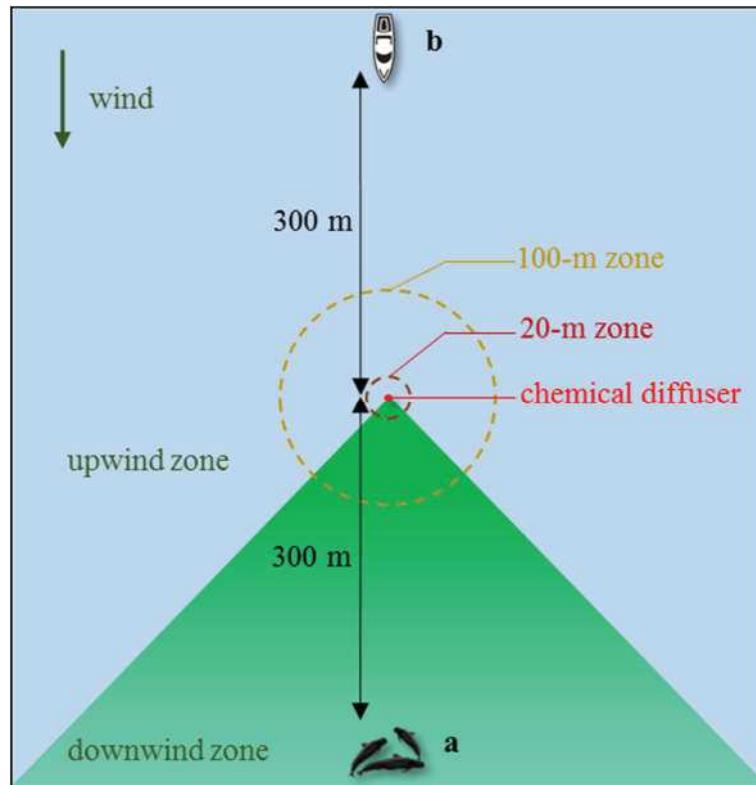


Figure 2. Schematic representation of the exposure trials' initial conditions. The floating chemical diffuser (red point) was placed 300 m upwind from the cetacean groups (a). Two exposure zones were considered in the behavioural analyses: a closer exposure zone with a 20-m radius (dark red) and a medium exposure zone with a 100-m radius (orange). The research vessel (b) was positioned 300 m upwind from the floater. Vessel and cetaceans are not at scale.

During 20 minutes, the position and behavior of each cetacean group was recorded by 2 experienced cetacean observers equipped with binoculars (7 x 50 magnification) placed on a 4-meters-high chair. A group was defined as one if all the animals were separated by less than 2 adult body lengths. The group was taken as a unit since preliminary observations indicated that it was not possible to follow each individual within the group with certainty, and because the movement of individuals as well as their surface behavior appeared to be highly dependent on the other members of the group. When several groups of the same species were present at the same time in the observation area, each group was given a unique code and recognized during the trial using its size (number of individuals) and physical characteristics of individuals (dorsal fin shape and marks as well as body size). Two approach zones were defined such as follow: a “close exposure zone” with a 20-m radius around the diffuser and a

“medium exposure zone” with a 100-m radius. The 300-m distance between the vessel and the diffuser, kept constant by the boat captain, was used by the observers as a reference to estimate the borders of the 100-m zone, while the 20-m zone was delimited using the length of mature animals as reference (5 m and 3 m for large adult pilot whales and bottlenose dolphins, respectively). The presence of a cetacean group was recorded only if at least half of the group members came inside its border. Other behavioral observations included all clearly identifiable surface behaviors, such as spyhopping (raising the head vertically out of the water), breaching (jumping completely or partially out of the water), stopping (interruption of swimming or marked decrease in navigation speed) and tailslapping (or lobtailing: slamming the fluke down on the water surface) (Perrin et al. 2009).

We were able to use aerial photography with an *unmanned aerial vehicle* (UAV) equipped with a 2.7K HD video camera (Phantom 3 advanced, DJI, Shenzhen, China) during 2 days of particularly good weather conditions (swell of 0.5 m and wind below force 2) in order to validate the data on cetaceans' approach and group size. Data from the observers and from the UAV were compared using the instant positions of 7 different groups. Based on data from 13 cetacean-to-diffuser distances taken by both observers and UAV, the average error in the observers' distance estimation was found to be 1.8 m in the 20-m zone and 9.1 m in the 100-m zone. The observers' estimations were thus considered accurate, since no difference was found in data on these groups' presence in the two exposure zones (20 m and 100 m radius) using both observation techniques. The estimations of the 7 group sizes by the observers were moreover identical or differed only by one individual when compared to the ones made with UAV images (mean difference between observations = 0.28 ± 0.76 individual, range = 0 - 1).

For each trial, the stimulus type (CTL or DMS), GPS position as well as environmental conditions (wind and sea forces, current speed, swell height and visibility) were recorded by the experimenter. The presence of any marine bird around the vessel was also recorded by a trained ornithologist equipped with binoculars. For each group of birds, the species and number of individuals were recorded as well as all flight patterns related to attraction: circling (the bird circles over the area), descending (the bird loses altitude, usually suddenly) and landing on water (Hutchison & Wenzel 1980). After the 20-minute trial was completed, the floating diffuser was retrieved. A second experiment would only be performed

after the boat moved at least 5 miles away and upwind from the stimulus zone and after an interval of at least one hour between the two trials so to avoid any disturbance related to the previous stimulation. Changing site after each test also allowed to avoid the inclusion of the same group in successive experiments and a potential bias due to previous exposure.

3) Data analysis

All analyses were generated using the statistical software package R (R Core Team 2017). Cetaceans' presence in the exposure zones and the occurrence of any surface behavior in each group were counted as absent or present (0 or 1) and thus followed a binomial distribution. Unlike for cetaceans, bird data were analyzed at the trial level in order to prevent any bias from a potential cumulative effect due to local enhancement in birds (i.e. the use of congeners as distant visual cues while foraging), a well-described behavior in seabirds (Poysa 1992, Silverman et al. 2004). Data therefore included the total number of birds observed in the stimulus zone (bird count) as well as behavioral data (occurrence of specific flight patterns during the trial) that followed a binomial distribution.

The differences in the animals' responses between CTL and DMS trials were analyzed with both basic and multi-parametric statistical methods. We first performed basic statistical tests using data on cetaceans and birds behaviors. These data were pooled and organized in contingency tables that incorporated the two stimulus conditions. The differences between proportions were tested using two-tailed Fisher test. The number of birds present in the stimulus area was also compared between CTL and DMS trials using two-tailed Student's t-test on log-transformed values.

In order to support these first statistical analyses and to identify other explanatory variables that could potentially influence the animals' responses, we then used a multi-parametric approach. We thus created generalized linear models (GLM) which were fitted to each response variable in cetaceans and birds. All GLM had a logit link, as response variables followed a binomial distribution, except for the bird count that was normally distributed once log-transformed. For cetaceans, these models incorporated ecologically-relevant explanatory variables such as stimulus condition, wind speed, the groups' initial general behavior and total bird counts. For birds, the explanatory variables included stimulus condition,

wind speed, the total number of cetaceans in the areas and the proportion of cetacean groups entering the 100 m (considered as a general indicator of the cetacean's overall reaction to the stimulus). Because the sample size was limited, experimental variables such as the trial occasion and the study area were not included in the analysis. This was decided after verifying visually on boxplots that they had no effect on the models' partial residuals and using Kruskal-Wallis' tests. The absence of correlation between explanatory variables was tested using Pearson's correlation test, contingency tables or Kruskal-Wallis tests depending on the distribution of the data. All models' combinations were constructed using the "dredge" function (MuMin package (Bartón 2016)). The bias-adjusted Akaike's Information Criterion (AICc) was used for model selection (Akaike 1973). A model averaging method was applied ("model.avg" function, MuMin package) using the top-ranked models (< 2 AICc). All explanatory variables had been previously standardized using the method developed by Gelman (2008) which allows an unbiased interpretation of the parameter estimates resulting from a model averaging (Grueber et al. 2011). Pseudo- R^2 values (McFadden's correlation coefficient) were calculated for each model. The estimates of the selected explanatory variables and their relative importance (I) in the averaged model were used in order to assess their influence on the response variable. Predicted values of the responses were calculated from the averaged models according to the different explanatory variables using the "predict" function for GLM in R.

D. RESULTS

1) Cetaceans' response

- *Number of groups included*

A total of 28 trials were run: 8 trials (4 CTL and 4 DMS) in the Gulf of Vera and 20 trials (11 CTL and 9 DMS) in the Gibraltar Strait. Overall, 100 cetacean groups were observed which included 37 groups of bottlenose dolphins and 63 groups of pilot whales. Both species were present in half of the trials (14/28), only bottlenose dolphins were observed in 6 trials and only pilot whales in 8 of the trials. The average group size was similar in both species, with 8.0 ± 1.8 individuals per group in bottlenose dolphins compared to 6.9 ± 0.7 in pilot whales. No difference was found in group size between stimulus and control experiments for both species ($p > 0.05$, two-sample Student's t-test on log-transformed data). Traveling and milling behaviors were both common in bottlenose dolphin groups (46% and 43% of the groups, respectively), feeding was observed in only 11% of the groups and no resting behavior was observed with this species. Most of the pilot whales (65%) exhibited a traveling behavior before the start of the trial while resting, milling and feeding were seen less frequently (16%, 13% and 6% of the groups, respectively).

- *Approach towards the chemical diffuser*

The proportions of cetacean groups that entered the 20-m and 100-m zones were first compared for each species using contingency tables incorporating the stimulus conditions (Table 1). In bottlenose dolphins, a larger proportion of groups approached the floater during the DMS trials than during the CTL trials. This difference was significant in the 20-m zone (53.3% vs. 18.2%, $p = 0.036$, two-tailed Fisher's exact test) but not in the 100-m zone (66.7% vs. 59.1%, $p = 0.737$). The same pattern was found in pilot whales, with differences of 36.4% vs. 21.9% ($p = 0.246$) and 72.7% vs. 51.2% ($p = 0.115$) in the 20-m and 100-m zones, respectively.

Species	Response	Stimulus		p-value
		CTL	DMS	
Bottlenose dolphins	<i>Number of groups</i>	22	15	
	Approach 20-m zone	4 (18.2%)	8 (53.3%)	0.036 *
	Approach 100-m zone	13 (59.1%)	10 (66.7%)	0.737
	Stopping	1 (4.5%)	1 (6.7%)	1.000
	Spyhopping	0 (0.0%)	1 (6.7%)	0.405
	Breaching	4 (18.2%)	3 (20.0%)	1.000
	Tailslapping	1 (4.5%)	1 (6.7%)	1.000
Pilot whales	<i>Number of groups</i>	41	22	
	Approach 20-m zone	9 (21.9%)	8 (36.4%)	0.246
	Approach 100-m zone	21 (51.2%)	16 (72.7%)	0.115
	Stopping	4 (9.8%)	6 (27.3%)	0.084
	Spyhopping	1 (2.4%)	4 (18.2%)	0.046 *
	Breaching	1 (2.4%)	3 (13.6%)	0.118
	Tailslapping	2 (4.9%)	2 (9.1%)	0.606

Table 1. Contingency table incorporating the proportion of cetacean groups approaching the floating chemical diffuser and exhibiting specific surface behaviors during DMS and CTL trials. P-values of two-tailed Fisher's exact tests are included. Asterisk indicates $p < 0.05$.

Results from GLM analyses followed the same trend and allowed us to estimate the influence of explanatory variables such as stimulus conditions, initial general behavior, wind force and number of birds present in the area. Between 3 and 7 models were selected for model averaging (Supplementary Table S1) depending on the species and the exposure zone. The stimulus conditions was the main explanatory variable in the selected models: it showed the highest importance scores and estimates, except in the 100-m zone for bottlenose dolphins (Supplementary Table S2). The predicted probability of bottlenose dolphins to enter the close exposure zones while DMS was diffused increased from 21% to 71% ($p = 0.056$) compare to the control (Fig.3a), while no significant change was observed for the medium exposure zone ($p = 0.344$). In pilot whales, these probabilities increased from 19% to 37% ($p = 0.193$) and

from 68% to 89% ($p = 0.110$) in close and medium exposure zones, respectively (Fig. 3b). The initial general behavior was only included in models selected for bottlenose dolphins, but not for pilot whales. In the former species, while its importance was higher in the 100-m zone than in the 20-m zone (importance = 0.73 vs. 0.18), it had similar effects on the approach in both zones when DMS was diffused: the predicted probability to enter the zone tended to be higher when the animals exhibited feeding behavior (probability of 85% for the 20-m zone and 100% for the 100-m zone), it was intermediate for milling behavior (72% and 79%, respectively) and it was low for traveling behavior (38% and 55%, respectively) (Fig. 3c). Wind force and bird counts, while included in several top-ranked models, generally showed low importance values ($I < 0.40$) with high p-values ($p > 0.15$) in averaged models for both species (Supplementary Table S2).

- *Surface behaviors*

The effect of stimulus (DMS vs. CTL) on the occurrence of surface behaviors was found to be different in both species (Table 1). Bottlenose dolphins exhibited few surface behaviors, and no significant differences were observed between stimulus types. In contrast, pilot whales displayed more surface activity and each of the measured behavior was found in higher proportion when the DMS scent was present. Differences between DMS and control trials were significant for spyhopping (18.2% vs. 2.4%, respectively, $p = 0.046$) and marginally significant for stopping (27.3% vs. 9.8%, respectively, $p = 0.084$).

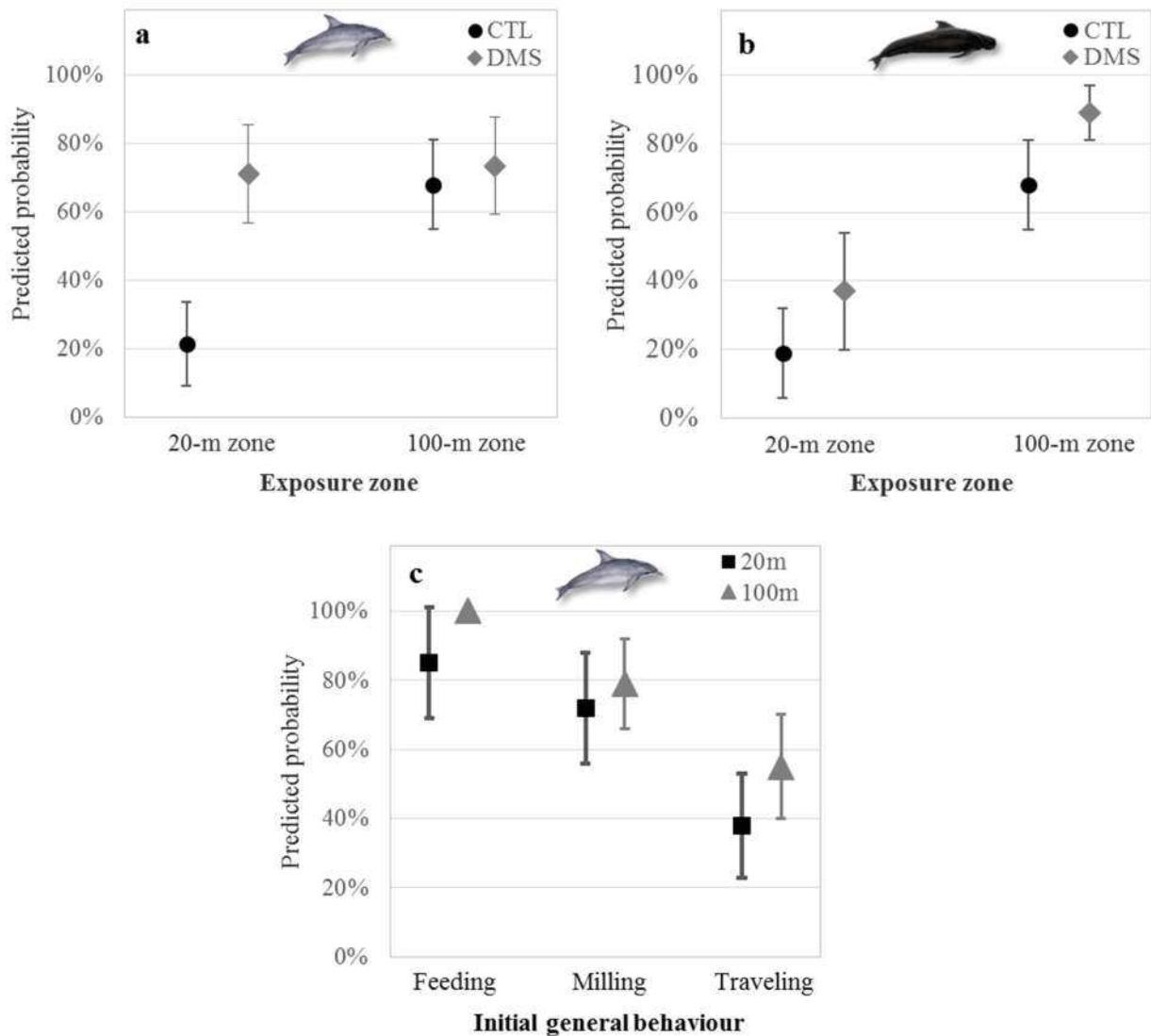


Figure 3. Predicted probability of entrance in the 20-m and in the 100-m zone for bottlenose dolphins (a) and pilot whales (b) according to the stimulus condition, using a GLM averaging approach. Means and standard errors were calculated from the averaged GLM for each species. Influence of the initial general behavior during DMS trials (c) is also shown, since this explanatory variable was selected in models for the bottlenose dolphins' approach (but not pilot whales'). P-values are found in the results section and/or Supplementary Table S2.

2) Bird response

- *Bird counts*

A total of 246 birds were counted, most of them (94%) in the Strait of Gibraltar with an average of 11.6 birds per trial (compared to 1.9 birds per trial in the Gulf of Vera). The predominant species observed was the yellow-legged gull (*Larus michahellis*, 83%). A few Audouin's gulls individuals (*Larus audouinii*, 3.2%) were also observed, although exclusively in the Gulf of Vera. Other bird species included black terns (*Chlidonias niger*), Cory's shearwaters (*Calonectris diomedea*), European storm petrels (*Hydrobates pelagicus*) and barn swallows (*Hirundo rustica*) (respectively 9.7%, 1.6%, 1.2% and 1.2% of the birds observed).

Because the majority of birds were observed in the Strait of Gibraltar, statistical analyses were limited to yellow-legged gulls (thereafter named gulls) in this study area only. While the number of gulls observed in the area during DMS trials was slightly higher than during CTL trials (12.0 vs. 8.5 individuals per trial, respectively) this difference was not statistically significant (Student's t-test on log-transformed values, $t = 1.60$, $p = 0.13$, Fig. 4). Our GLM analysis showed that among the 7 selected GLM, the stimulus condition was the most important explanatory variable (Supplementary Table S3): it also had the highest importance in the averaged model ($I = 0.42$) although its effect was not significant ($p = 0.118$) (Fig. 5a). Other explanatory variables such as wind force, cetacean approach (proportion of groups entering the 100-m zone) or cetacean counts had lower effects on the response variable in the averaged model, with an importance of 0.31, 0.24 and 0.09, respectively (Supplementary Table S4).

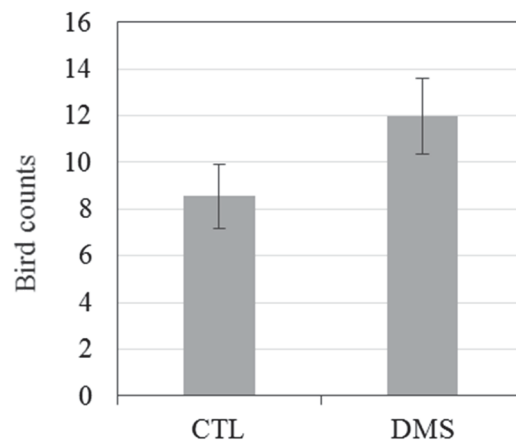


Figure 4. Total number of birds observed per trial in the study area for each stimulus condition. The difference between DMS and control trials (12.0 versus 8.5, respectively) was not significant (Student's t-test on log-transformed values, $t = 1.60$, $p = 0.13$).

- *Birds' flight behaviors*

Gulls tended to exhibit more specific flight behaviors during DMS trials than during CTL trials. However, this difference was only significant for circling behavior (88.9% vs. 36.4% of the trials, respectively, $p = 0.028$) (Table 2). Descending flight was observed in 66.7% vs. 27.3% ($p = 0.175$), respectively, and landing in the stimulus zone only occurred three times, including twice during DMS trials. The averaged GLM analysis revealed that the stimulus condition was the most important explanatory variable for circling ($I = 1.00$, estimate = 2.88 ± 1.54 , $p = 0.061$), but not for a descending flight ($I = 0.19$, estimate = 1.43 ± 1.47 , $p = 0.331$, Fig 5b). The wind was included in all averaged models but did not significantly affect the bird count ($I = 0.31$, estimate = -0.30 ± 0.26 , $p = 0.252$, Supplementary Table S4) or the birds' flight behaviours (Fig. 5c and 5d). Cetaceans' approach and cetacean counts were the variables with the lowest importance on circling and descending flight behaviors.

Response	Stimulus		<i>p</i>
	CTL (n=11)	DMS (n=9)	
Circling flight	4 (36.4%)	8 (88.9%)	0.028 *
Descending flight	3 (27.3%)	6 (66.7%)	0.175
Landing	1 (9.1%)	2 (22.2%)	0.566

Table 2. Contingency table incorporating the proportion of trials during which attraction behaviors of yellow-legged gulls occurred at least once during DMS and CTL trials. P-values of two-tailed Fisher's exact tests are included. Asterisk indicates $p < 0.05$.

E. DISCUSSION

In this study, a behavioral response experiment was implemented in order to test if odontocetes cetaceans could perceive DMS and be attracted to this presumed indicator of marine productive zones. We showed that bottlenose dolphins and pilot whales did react when exposed to high concentrations of DMS by approaching the stimulus zone and/or displaying specific surface behaviors. While gulls also responded to this chemical stimulation by changing their flight behavior, they did not seem to act as a visual cue for any of the cetacean species.

In bottlenose dolphins and to a lesser extent in pilot whales, the release of DMS at sea induced an approach towards the floating diffuser that was not observed during control trials. This response was tested using multivariate analyses that corroborated more basic statistical tests. Chemical stimulus was the explanatory variable with the higher importance in the model selection, and thus contributed the most to explain the cetaceans' approach to the diffuser. Other environmental variables such as the number of birds present in the area or the wind did not have a significant effect on this response. We also found that pilot whales exhibited significantly more spyhopping behavior and tended to slow down or even stop their navigation when DMS was diffused. Taken together, these results strongly suggest that these two species possess chemosensory abilities allowing them to perceive this chemical at sea.

Because DMS is a highly volatile molecule (vapor pressure at 20 °C: 53.7 kPa), its perception might have occurred mostly in the air during respiration and could therefore involve structures of the upper respiratory tract of cetaceans. Odontocetes however lack the canonical olfactory structures that allow the perception of airborne chemicals found in terrestrial mammals such as the olfactory mucosa, nerve and bulb (Breathnach 1960, Oelschläger & Buhl 2008). Some authors have suggested that other neural pathways could be involved in the perception of chemicals that reach the nasal cavity (Kuznetzov 1990, Muraco 2015, Kremers et al. 2016). The detection of airborne chemicals can for instance involve the trigeminal nerve (cranial nerve V),

the second largest nerve in odontocetes (for review, see Ridgway (1990)). This cranial nerve is known to be involved in chemesthesis in tetrapods, especially in the perception of pungent irritants such as ethanol, menthol, carbon dioxide or capsaicin (for a review, see Lundström et al. (2011)). This pathway has been shown to allow the rough coding of a broad range of odors and is referred to as the “general chemical sense” (Rothermel et al. 2011). Even if the olfactory and trigeminal systems are tightly connected in vertebrates, a trigeminal perception has been known to occur alone in humans born with aplasia of the olfactory bulb and tract (isolated congenital anosmia) (Frasnelli et al. 2007). While a complete description of the free trigeminal nerve endings and their potential stimulation by DMS remains to be done in cetaceans, it could be hypothesized that during this study, they perceived the chemical at least partly through chemesthesis. The terminal nerve (cranial nerve 0), a nerve that is hypertrophied in toothed whales (Oelschläger & Buhl 1985, Demski et al. 1990) and whose function is still debated today (Vilensky 2014) might also be a substitute when the main olfactory pathway is absent. During embryogenesis, this nerve originates from the olfactory placode together with the olfactory system (Oelschläger & Buhl 1985, Oeschlager et al. 1987). Interestingly, fiber bundles from the nervus terminalis are centrally attached to the telencephalon (olfactory tubercle, septal region) (Oelschläger & Buhl 1985) and are found running through the foramina of the ethmoid bone into the nasal sacs (frontal and vestibular sacs) (Demski et al. 1990). It turns out that chemoreceptor cells were precisely found in the frontal and vestibular sacs of harbor porpoises (Behrmann 1989).

Because the DMS slick progressively extended at the surface of the water during the 20-minute trials, the animals that approached the floater in the close exposure zone may also have perceived DMS through contact with their skin and oral cavity. Despite a low number of taste buds (Komatsu & Yamasaki 1980, Kuznetsov 1990) and despite a pseudogenization of most of their taste receptor genes (Feng et al. 2014, Zhu et al. 2014), captive bottlenose dolphins have

be shown to distinguish basic taste solutions (Friedl et al. 1990, Kuznetsov 1990) and to exhibit taste preferences (Kremers et al. 2016, Bouchard et al. 2017). In the present experiment, no open-mouth behavior was recorded by the observers, but this may have occurred under water and thus not be detected.

A third assumption is that odontocetes could have developed non-conventional sensory pathways, still to be described, during their adaptation to a fully-aquatic lifestyle. A surprising example regarding their chemosensory ability was recently found with the narwhals. Their helical tusk, an overgrown canine front tooth, allows the perception of salt concentration in water through circumpulpal sensory structures (Nweeia et al. 2014). Many odontocetes also exhibit bilateral vibrissal crypts on their upper jaws that are densely innervated by the infraorbital branches of the trigeminal nerve (Cozzi et al. 2016). These structures have been shown to allow passive electroreception in the Guiana dolphin (Czech-Damal et al. 2013). It has however been hypothesized that they could also be involved in chemoreception (Muraco 2015).

As expected from their distinct feeding ecology, the behavioral reactions of the two cetacean species towards the chemical stimulus were different. More than half (53.3%) of the bottlenose dolphin groups entered the close exposure zone during DMS trials, while they were less than a fifth (18.2%) during control trials. The animals were exposed at least 300 m away from the diffuser at the beginning of the trials. Therefore their presence in this 20-m zone (equivalent to about 5-10 times the body length of a mature dolphin) indicates an approach towards a very close contact with the chemical source. This attraction to DMS has never been demonstrated in cetaceans although it has been suggested in mysticetes, particularly because they exhibit functional, although reduced, olfactory structures (Thewissen et al. 2011, Hagelin et al. 2012, Godfrey et al. 2013, Torres 2017). While bottlenose dolphins in the western Mediterranean Sea mostly consume demersal and benthic prey, they also catch pelagic fish such as mackerel and

clupeid fish (Blanco et al. 2001). These patchily distributed planktivorous shoaling fish normally dwell in the highly productive top 50 meters of the water column (Misund & Beltestad 1996). DMS could therefore be a reliable cue for the dolphins to localize the high productivity zones where their prey aggregate. It would explain why DMS at high concentration can be attractive for bottlenose dolphins, especially when they are in search of prey. This hypothesis is supported by the fact that the groups exhibiting a foraging behavior at the beginning of a trial tended to come in a higher proportions close to the diffuser during DMS trials (compared to groups traveling or milling). Furthermore, foraging behavior was found to be the main factor for bottlenose dolphins' large scale movements and their use of the habitat (Hastie et al. 2004). Because chemicals diffuse much faster in air than in water due to its low viscosity, dolphins may perceive volatile foraging cues from long distances. It was in fact suggested from experiments using soluble prey extracts (Kremers et al. 2016, Bouchard et al. 2017) that they could perceive the stimulus in water when they get closer to the source. In terms of surface behaviors, no difference was observed between the two stimulus conditions. This might be due to the fact that these events were too rare (12 in total during the whole study) to show any statistical difference.

In contrast to bottlenose dolphins, pilot whales' attraction was much less pronounced. Even if they approached the diffuser in a higher proportion during DMS trials, the difference with the control trials was seen only in the medium exposure zone (100-m radius) and was marginally significant. Pilot whales mostly feed at depths of several hundreds of meters on cephalopods and are thus less likely to link DMS with feeding opportunities. Instead, they may use it as a general navigation cue as surface productivity has been shown to roughly reflect topographic features such as depth and slope through vertical (upwelling) and horizontal (currents) circulation (Cañadas et al. 2005). As spyhopping has been associated with the inspection of a visual cue above water (Perrin et al. 2009), the higher occurrence of this behaviour during DMS

trials could reflect the multisensory processing of a novel stimulus using visual and olfactory systems. This posture may also optimize the perception of air-borne chemical signals through active inhalation of volatile compounds (sniffing behavior): lifting the blowhole higher above the surface would increase the signal detection and thus improve the localization of its source.

The presence of birds did not seem to significantly influence the behavior of cetaceans. While the bird count was selected in a few top-ranked models, this variable showed a low importance in averaged models and its effect on the response appeared to be non-significant. Interestingly, DMS significantly triggered flight behaviors specific to attraction such as circling above the stimulus. Gulls have been shown to have a functional olfactory neural pathway (Shibuya et al. 1970) and it was recently observed that they rely on olfaction during migration (Wikelski et al. 2015). Surprisingly, there is no data on their use of this sense in their foraging ecology and previous behavioral studies using DMS-scented slick in the Mediterranean Sea did not report any attraction of gulls (Dell'Araccia et al. 2014). This contrast with our results but could potentially be explained by the presence of additional visual cues in our study: cetacean groups (30 individuals per trial on average) and the bright-colored floating diffuser were both absent during behavioral experiments previously reported in the literature. Seabirds seem to exhibit a multimodal foraging strategy, and both visual and olfactory cues have already been shown to have additional effects in the wandering albatross (Nevitt et al. 2008, Mardon, Nesterova, et al. 2010). Our results therefore suggest that DMS can trigger attraction in gull when it is combined with visual cues at the surface of the water. As well as chemical cue, wind speed was the most important explanatory variable for the gulls' response. Strong winds (force > 3) mostly tended to increase the occurrence of descending flight during DMS trials. Birds could fly down to inspect prey partly hidden by waves or spray during windy conditions. The presence and behavior of cetaceans also tended to positively influence the bird counts and the occurrence of circling flight, as they were both selected in averaged models. This corroborates other studies

suggesting that birds visually follow odontocetes to find their food since they can benefit from prey aggregation created by hunting dolphins (Clua & Grosvalet 2001, Hawke & Dobinson 2001, Sakamoto et al. 2009).

The recent years have seen the development of unmanned aerial vehicles (UAVs) that could provide additional quantitative behavioral data for behavioural response studies. The use of UAVs adapted to the challenging weather sea conditions would for example improve the precision of distance estimates and allow an automatic analysis of the cetaceans' trajectories. Group size, animal behaviors and body length could be measured more precisely from aerial images. In the present study, we used the same concentration of DMS (i.e. 0.2 M) than in experiments on birds' olfaction (Nevitt et al. 1995, Wright et al. 2011), although this concentration is much higher than in the real marine environment where values rarely exceed 10 nM (Berresheim 1987, Galí et al. 2013). The use of a concentration closer to the natural ones may induce reactions that better reflect the use of chemoreception by marine predators. Other compounds such as prey extracts (hydrolysates or oils) could also be tested to better understand the range of chemosensory abilities of cetaceans. Potential chemical deterrents, either biogenic (e.g. shark liver oil) or artificial (semiochemicals or irritating substances), may moreover be diffused with the same protocol in order to evaluate potential uses for conservation purposes. If deterrents prove to be efficient, they should be evaluated as potential solutions, in combination with existing methods such as acoustic deterrent (pingers), to keep cetaceans away from dangerous zones and in order to reduce bycatch. This is currently being developed for birds, turtles and elasmobranchs (Southwood et al. 2008, Friesen et al. 2017).

This study yielded innovative data on the use of chemoreception by odontocete cetaceans and by gulls in the wild. It also highlighted the interactions between the taxa during foraging. Our results revealed that odontocete cetaceans, considered before as anosmic due to the reduction of their chemosensory anatomical structures and receptors, could in fact use chemical cues such

as DMS. Now, more studies at histological and molecular levels remain to be conducted so potential non-canonical anatomical structures involved in odontocetes' chemoreception can be determined.

F. ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the field work assistants in Tarifa and Cartagena, especially Federica Salandra, Hamza El Kaa, Aixa Morata, José Luis Murcia, Gaia Dell'Ariceia, Nicolas Gaidet Drapier, Pablo Chevallard Navarro, Sara Torres Ortiz, and volunteers from ANSE. The contribution of Olivier Roux, Arnaud and Guillaume Lecorps is acknowledged for the design and construction of the floating diffusers. Special thanks to Pedro Garcia for piloting the Else, to Simon Benhamou and Jean-Yves Barnagaud for their advices on statistical analyses and to Laureen Magnet for entering cetaceans' behavioural data. Josée Castonguay-Vanier kindly contributed to the reviewing this manuscript. The experiments described in this paper were approved by the French national ethical committee (Comité Consultatif National d'Ethique, permit #1286.5392) and were in accordance with the European directive 86/609/CEE. Funding was provided by Fondation Total (grant #144903/Parfums d'eau) and by Ministère de l'Éducation nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

G. SUPPLEMENTARY MATERIALS

Response variable	GLM parameters					
	Explanatory variables	k	AICc	Δ AICc	AICc wt	Pseudo R ²
Bottlenose dolphins						
<i>Approach 20 m</i>						
1	stimulus	2	45.9	0.0	0.32	0.108
2	stimulus + wind	3	46.5	0.6	0.24	0.147
3	stimulus* + behavior	4	47.1	1.2	0.18	0.188
4	bird count + <i>wind</i>	3	47.6	1.7	0.14	0.123
5	<i>stimulus</i> + bird count	3	47.8	1.9	0.12	0.118
-	intercept only	1	48.7	2.9	-	0.000
<i>Approach 100 m</i>						
1	behavior	3	50.1	0.0	0.29	0.116
2	behavior + bird count	4	51.0	0.9	0.19	0.150
3	intercept only	1	51.2	1.1	0.17	0.000
4	stimulus + behavior	4	51.6	1.5	0.13	0.137
5	behavior + wind	4	51.9	1.8	0.12	0.130
6	bird count	2	52.1	1.9	0.11	0.028
Pilot whales						
<i>Approach 20 m</i>						
1	intercept only	1	75.5	0.0	0.32	0.000
2	stimulus	2	76.2	0.7	0.23	0.020
3	stimulus + bird count	3	77.0	1.5	0.16	0.040
4	wind	2	77.0	1.5	0.15	0.009
5	bird count	2	77.2	1.7	0.14	0.001
<i>Approach 100 m</i>						
1	stimulus	2	86.8	0.0	0.47	0.033
2	intercept only	1	87.5	0.7	0.33	0.000
3	stimulus + wind	3	88.5	1.7	0.20	0.039

Table S1. Comparison of the best fitted response models for cetaceans' approach in the two zones around the chemical diffuser (20-m and 100-m zones). These Generalized Linear Models (GLM) had a logit link and response variables following a binomial distribution. Explanatory variables include the stimulus condition (stimulus), wind force (wind), the initial general behavior (behavior) and total number of birds in the stimulus zone (bird count). The variables with a significant ($p < 0.05$) or marginally significant ($p < 0.10$) influence are respectively shown in bold and italic. GLM parameters include the number of parameters (k), the correlation coefficient (Pseudo-R², or proportion of explained deviance), corrected Akaike information criterion (AICc), the corresponding AICc increments (Δ AICc) and Akaike weight (AICc weight).

Explanatory variables	Bottlenose dolphins								Pilot whales							
	<i>Approach 20 m</i>				<i>Approach 100 m</i>				<i>Approach 20 m</i>				<i>Approach 100 m</i>			
	I	Est.	SE	P	I	Est.	SE	P	I	Est.	SE	P	I	Est.	SE	P
Stimulus	0.86	1.71	0.89	0.056	0.13	0.77	0.81	0.344	0.39	0.82	0.63	0.193	0.67	0.93	0.58	0.110
Initial Behavior	0.18				0.73				-				-			
Feeding		<i>Reference category</i>				<i>Reference category</i>										
Milling		-0.81	1.31	0.536		-16.8	2041	0.993								
Traveling		-2.24	1.46	0.126		-17.8	2041	0.993								
Wind	0.38	1.14	0.83	0.165	0.12	0.68	0.85	0.424	0.15	-0.47	0.60	0.440	0.20	0.40	0.55	0.469
Bird count	0.26	0.93	0.90	0.302	0.30	0.91	0.80	0.256	0.30	-0.04	0.04	0.375	-			

Table S2. Summary of the results from the averaged models of the cetaceans' approach including the top-ranked models ($\Delta AICc < 2$). Importance (I) of each explanatory variable, as well as its estimate (Est.), its standard error (SE) and p-value are also included.

Response variables	GLM parameters					
	Explanatory variables	k	AICc	Δ_{AICc}	AICc wt	Pseudo R ²
Yellow-legged seagulls						
Number of individuals						
1	intercept only	2	34.3	0.0	0.24	0.000
2	stimulus	3	34.5	0.2	0.22	0.124
3	cetaceans' approach	3	35.5	1.2	0.13	0.079
4	cetaceans' approach + wind	4	35.9	1.6	0.11	0.199
5	<i>stimulus</i> + wind	4	36.0	1.7	0.10	0.195
6	wind	3	36.1	1.8	0.10	0.048
7	<i>stimulus</i> + cetacean count	4	36.2	1.9	0.09	0.186
Circling flight						
1	stimulus	2	25.4	0.0	0.37	0.231
2	stimulus + wind	3	26.2	0.8	0.24	0.305
3	stimulus + <i>wind</i> + cetaceans' approach	4	26.6	1.2	0.21	0.409
4	<i>stimulus</i> + cetaceans' approach	3	26.9	1.5	0.17	0.278
-	intercept only	1	29.1	3.7	-	0.000
Descending flight						
1	<i>wind</i>	2	20.8	0.0	0.43	0.195
2	intercept only	1	22.2	1.4	0.21	0.000
3	stimulus + wind	3	22.4	1.6	0.19	0.254
4	cetacean count + <i>wind</i>	3	22.7	1.9	0.16	0.238

Table S3. Comparison of the best fitted response GLM for seagulls' number of individuals (identity link, log-transformed values) and flight behaviors (logit link, binomial distribution). Explanatory variables include the stimulus condition (stimulus), wind force (wind), total number of cetacean individuals present during the trial (cetacean count) and proportion of cetaceans entering in the 100-m zone (cetaceans' approach). The variables with a significant ($p < 0.05$) or marginally significant influence ($p < 0.10$) are respectively shown in bold and italic. GLM parameters include the number of parameters (k), the correlation coefficient (Pseudo-R², or proportion of explained deviance), the corrected Akaike information criterion (AICc), the corresponding AICc increments (Δ_{AICc}) and Akaike weight (AICc wt).

Explanatory Variables	Number of individuals				Circling flight				Descending flight			
	I	Est	SE	P	I	Est	SE	P	I	Est	SE	P
stimulus	0.42	0.38	0.24	0.118	1.00	2.88	1.54	0.061	0.19	1.43	1.47	0.331
wind	0.31	-0.30	0.26	0.252	0.46	-2.12	1.58	0.181	0.79	2.53	1.65	0.125
cetacean count	0.09	0.26	0.25	0.291	-	-	-	-	0.16	-1.28	1.61	0.428
cetaceans' approach	0.24	0.36	0.27	0.181	0.38	1.81	1.51	0.230	-	-	-	-

Table S4. Summary of the results from the averaged models of the seagulls' count and flight behaviors including the top-ranked models ($\Delta AICc < 2$). The importance (I) of each explanatory variable, as well as its estimate (Est.), its standard error (SE) and p-value are also included.

MANUSCRIT 3 : Réponse comportementale et acoustique de la baleine à bosse (*Megaptera novaeangliae*) à des stimuli chimiques en zone de reproduction et d'alimentation.

Résumé français de l'étude :

Pour détecter les agrégations éparées de plancton dans l'océan, les baleines à fanons doivent disposer d'indices fiables. La présence de structures olfactives relativement développées suggère qu'elles pourraient percevoir les odeurs associées à ces zones d'alimentations, comme cela est le cas chez d'autres prédateurs marins. Pourtant, l'implication de la chémoréception dans l'écologie alimentaire des baleines n'a, à ce jour, fait l'objet d'aucune étude comportementale. Nous avons donc réalisé, chez la baleine à bosse (*Megaptera novaeangliae*), des expériences permettant de mesurer les réponses à différentes stimulations chimiques, dans leurs zones de reproduction (Océan Indien) et de nourrissage (Atlantique Nord et Péninsule Antarctique). Deux stimuli chimiques, à caractère alimentaire, ont été utilisés: l'extrait de krill correspondant à leur source d'alimentation principale et le sulfure de diméthyle (DMS), un indicateur de zones de forte productivité primaire. Nos résultats montrent que lors des tests avec l'extrait de krill, les baleines s'approchent davantage de la zone de stimulation (dans un rayon de 300 m) et y restent plus longtemps (8.01 minutes, IC95% = 1.84 – 14.18, $p = 0.0048$), ce qui suggère une attraction vers la source d'émission du composé chimique. Cette réponse a été observée en Islande et dans une moindre mesure à Madagascar, mais pas en Antarctique. De plus, les baleines ont exprimé des comportements de surface évoquant une exploration sensorielle, comme des plongées sous la zone de stimulation ou l'arrêt de la navigation, plus fréquemment lors qu'elles étaient exposées à l'extrait de krill. Le DMS n'a quant à lui pas provoqué de telles réactions dans aucun des sites d'étude. L'analyse des enregistrements acoustiques suggère que les deux stimuli chimiques entraînent une modification des vocalisations des baleines sur leur site de reproduction à Madagascar. Nos résultats apportent la première preuve expérimentale que les mysticetes perçoivent et réagissent localement à des substances chimiques directement ou indirectement liées à leur alimentation. Ainsi, chez ces grands cétacés, l'olfaction pourrait être impliquée dans la perception multimodale de l'environnement et la recherche de nourriture en pleine mer, à l'instar des oiseaux marins.

Présentation de l'article (en anglais) :

Titre : Behavioural and acoustic responses of humpback whales to food-related chemical stimuli in their feeding and breeding grounds.

Auteurs : **Bertrand Bouchard**, Jean-Yves Barnagaud, Hervé Glotin, Pauline Gauffier, Sara Torres Ortiz, Marianne Rasmussen, Aurélie Célérier

Statut de publication : En préparation (en attente de l'achèvement des analyses acoustiques)



Photo : Miguel Isla Casares

Behavioural and acoustic responses of humpback whales to food-related chemical stimuli.

Bertrand Bouchard^{1,2*}, Jean-Yves Barnagaud¹, Hervé Glotin³, Marion Poupard³, Pauline Gauffier⁴, Sara Torres Ortiz⁵, Marianne Rasmussen⁶, Aurélie Célérier^{1,2}

¹ICEFE UMR 5175, CNRS, PSL Research University, EPHE, UM, SupAgro, IND, INRA, UMR 5175 CEFE, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France² Université de Montpellier, 34095 Montpellier Cedex 5, France

³ UMR CNRS LSIS, University of Toulon, 83957 La Garde, France

⁴ CIRCE, Conservation, Information and Research on Cetaceans, Algeciras-Pelayo, 11390 Cadiz, Spain

⁵ Marine Biological Research Centre, Department of Biology, University of Southern Denmark, Hindsholmvej 11, Kerteminde DK-5300, Denmark.

⁶ Húsavík Research Centre, University of Iceland, Hafnarstétt 3, 640 Húsavík, Iceland

* Corresponding author: bertrand.bouchard@gmail.com

KEYWORDS

Humpback whale; *Megaptera novaeangliae*; mysticete; foraging ecology; chemosensory abilities; behavioural response study; dimethylsulfide; krill

A. ABSTRACT

Baleen whales use reliable foraging cues to find their patchily distributed food in the open ocean. Their relatively well-developed olfactory structures suggests that they could identify the specific odours of planktonic prey aggregations such as krill schools. They may also, as other marine predators do, detect dimethyl sulfide (DMS), a chemical released in areas of high marine productivity. However, dedicated behavioural studies still have to be conducted in baleen whales in order to confirm this alleged involvement of chemoreception in their feeding ecology. We implemented 56 behavioural response experiments in humpback whales using two food-related chemical stimuli, krill extract and DMS as well as their respective controls (orange clay and vegetable oil) in their breeding (Madagascar) and feeding grounds (Iceland and Antarctic Peninsula). The animals approached the stimulus area and stayed longer in the trial zone during krill extract trials compared to control trials, suggesting that they were attracted to the chemical source and spent time exploring its surrounding, probably in search for prey. This response was observed in Iceland and to a lesser extent in Madagascar, but not in Antarctica. Surface behaviours evoking a sensory exploration, such as diving under the stimulus area and stopping navigation, were also observed more often during krill extract trials. Exposure to DMS did not elicit such exploration behaviours in any of the study areas. However, preliminary acoustic analyses suggest that DMS and krill extract both modified the whales' acoustic activity in Madagascar. Altogether, these results provide the first behavioural evidence that baleen whales actually perceive prey-derived chemical cues several hundred meters away. Chemoreception, especially olfaction, could thus be used for locating prey aggregations and for navigation at sea, as it has been shown in other marine predators including seabirds.

B. INTRODUCTION

For filter-feeders such as baleen whales (mysticetes), finding patchily-distributed krill aggregations is a challenging task which involves movements over hundreds to thousands of kilometres of open ocean. The cues on which they rely are still unclear but they are thought to use multimodal signals, probably using chemoreception in addition to acoustic and visual cues (Torres 2017). Chemical senses, and especially olfaction, plays a foreground role in the foraging ecology of several marine predators feeding on similar planktonic preys (DeBose & Nevitt 2008). For example, procellariiform birds including Cape Petrel (*Daption Capense*) and whale sharks (*Rhincodon typus*) detect prey-derived chemicals such as krill extracts in air and in water, respectively (Nevitt 1999, Dove 2015). These species are also attracted by dimethyl sulfide (DMS), a molecule emitted by phytoplankton when grazed by zooplankton (Nevitt et al. 1995, Dove 2015). DMS is now recognized as an efficient indicator of high marine productivity which play a crucial role in marine trophic interactions (Savoca & Nevitt 2014).

Anatomical studies have revealed that, in contrast to toothed whales (odontocetes), baleen whales are well equipped for olfaction. They exhibit developed ethmoturbinates in their nasal cavities, which transmit information on chemical stimuli to their large olfactory bulbs (Thewissen et al. 2011, Godfrey et al. 2013). Genetic studies have also revealed that they exhibit a high proportion of functional genes coding for olfactory receptors (OR), a transmembrane protein responsible for odorant binding expressed at the surface of olfactory neurons (McGowen et al. 2008, Thewissen et al. 2011, Kishida, Thewissen, Hayakawa, et al. 2015). Mysticetes are thus thought to have a functional sense of smell, but no experimental data has tested this hypothesis so far. A preliminary study was conducted by Hagelin et al. (2012) on humpback whales (*Megaptera novaeangliae*), a species feeding on krill as well as several schooling fish species depending on the prey availability. They showed that feeding humpback whales oriented significantly more into the wind than in other directions. This first result suggested that foraging mysticetes could follow wind-borne molecules emitted by their preys, even if other chemosensory systems could also be involved such as the perception of soluble compounds in water through gustation (Kienle et al. 2015, Torres 2017). However, rigorous behavioural experiments are still necessary to confirm that whales can perceive chemical compounds, and in particular food-related cues. Because

mysticetes are not held in captivity, these experiments have to be conducted under the constraints imposed by the natural environment, while allowing a detailed measurement of the whales' reactions towards potential chemical cues at sea (e.g. changes in their swimming trajectories, surface behaviours and acoustic activity).

In this study, we investigated the reaction of humpback whales to food-related chemicals. We tested whether these animals would be attracted by such stimuli, changing their trajectories or navigation speed, increasing their respiratory rate to improve airborne molecule sampling and/or exhibit specific feeding behaviour such as open mouth or foraging dives. We also recorded the whales' vocalizations as they are known to produce various sounds while foraging (Thompson et al. 1986, Cerchio & Dahlheim 2001, Stimpert et al. 2007), and could thus display a specific acoustic response to such stimulation. We used two different chemical stimuli with different physical properties as mysticetes' ability to perceive chemical stimuli may depend on the compound volatility/solubility. Krill extract directly reflects the prey's chemical signature and contains various volatile and soluble molecules. These stimulus could thus be perceived in air and/or in water through chemoreceptors located in the upper airways and the oral cavity. DMS is considered as an indirect indicator of potential prey aggregation, and a highly volatile molecule transported over great distances by wind, mainly detected in air during ventilation. Krill extract is likely to induce a higher attraction potential for humpback whales because it is a direct cue for the presence of prey. We conducted behavioural response experiments in three study areas with different prey availabilities and related to different whales' life cycles: one breeding ground (Madagascar, Indian Ocean) where the whales breed and calve and where no food is available, and two feeding grounds in the Northern Atlantic (Iceland) and Antarctic Peninsula. We expect the whales to exhibit behavioural reactions towards food-related chemicals exclusively in feeding grounds where they are actively searching for foraging cues and not in breeding grounds where their behaviours is focused on reproduction. The comparison of the whales' response to krill extract and DMS in these three areas should therefore explain, for the first time, how environmental and physiological factors influence the behavioural responses to food-related chemical stimuli in mysticetes.

A. MATERIALS AND METHODS

1) Study sites

We carried out four fieldwork campaigns in three humpback whales' breeding and feeding grounds. We selected the Sainte Marie Channel, located between Sainte Marie Island and the main island of Madagascar, as a breeding ground study area since these shallow waters allow an easy access to a high number of humpback whales at predictable times during the austral winter (Cerchio et al. 2016, Dulau et al. 2017). In this first area, we implemented experiments from late June to early July two successive years in 2015 and 2016. Additionally, we selected two sites characterized by different kinds of prey within the species' feeding grounds. We carried out the first fieldwork survey in August 2016 on the north-eastern coast of Iceland in Skjálfandi Bay, where humpback whales mostly feed on schools of small fishes (herring and capelin) as well as krill (Clapham 2009, Vikingsson et al. 2015). We then conducted the second set of experiments in December 2016 in the Antarctic Peninsula where krill is the main food available for mysticetes (Friedlaender et al. 2006, Friedlaender, Lawson, et al. 2009).

2) Targeted whale groups

In order to maximize the chances to detect whales and get high quality observations at sea, we carried out the experiments only under favourable weather conditions, i.e. no precipitation, visibility of more than 5 km, moderate winds (Beaufort's wind scale force < 4) and swell less than 1.5 m. In all study areas, the research crew included two experienced cetacean observers, one bird observer and one experimenter. We adapted the protocol from research on odontocete chemoreception (Bouchard et al. 2016). Briefly, at the beginning of the day, the research boat navigated within the study area until a whale or a group of whales was opportunistically spotted. We then slowly approached the animals from the side and observed them during a 10-minutes period 300 meters away, a distance known to limit disturbance of their behaviour (Stamation et al. 2010). This pre-trial observation phase allowed to assess the number of groups in the area, a group being defined as several individuals separated by less than 4 body lengths (about 50 m), generally moving in the same direction, and coordinating their behaviour (Whitehead 1983, Dunlop et al. 2012). We took the whale group as a unit as previous reports and preliminary observations revealed that the movement and behaviour of a whale was highly dependent

on the other group members (Whitehead 1983). We identified each group with a unique code and recognized it during the trial using its size and specific features of its members (body size, dorsal and caudal fins shape, coloration and marks). We also recorded the group size (number of individuals), their age category (calf, juvenile or adult) and initial behaviour. We defined three categories of initial behaviour: traveling (moving towards one main direction), resting (floating at the surface or moving very slowly) or foraging (repeated dives with no significant progression towards a particular direction, sometimes surfacing with the mouth open) (Friedlaender, Hazen, et al. 2009). We took the decision to start a trial only if the whale's behaviour was not obviously disturbed by the boat presence (no strong avoidance, agonistic surface behaviours such as caudal peduncle throws, or long dives) and if no other vessel (for example whale-watching or ferry boat) was likely to approach within 2 km around the whales during the next 30 minutes.

3) Chemical stimuli

Two chemical stimuli were tested: krill extract (experiment K) and DMS (experiment D).

- *Experiment K: Krill extract*

For the krill extract experiments, we used 4 kg of a powdered hydrolysate of Antarctic krill (Phosphotech, France) diluted in 8 litres of water as a chemical stimulus. As krill contains about 80 % moisture (Kim et al. 2014), this dose approximately corresponds to the dry matter of 20 kg of fresh krill which represents 2 - 5% of an adult humpback whale's daily intake (Reilly et al. 2004). We made a control solution of similar colour using 60 g of an orange clay powder dissolved in the same amount of water.

At the beginning of the trial, we deployed the test solution from the boat at low speed in order to create a stimulus line of about 30 m in length and maximize the diffusion of soluble molecules in seawater. We released a recording platform in the middle of this line in order to mark the centre of the stimulus zone, as the red colour progressively disappeared within 10-15 minutes while the powder was sinking in the water. This floating Styrofoam™ device (120 x 60 x 5 cm) was equipped with an omnidirectional hydrophone (model C57, Cetacean Research Technology, Seattle, USA) connected to a digital audio

recorder (acquisition at 96 KHz 24 bits, on a Zoom H1 recorder, Zoom Corp., Tokyo, Japan) and two underwater cameras (GoPro Hero 4, GoPro Inc., San Mateo, USA) oriented 30° downward and facing in opposite directions (Fig. 1). This recording platform allowed the analysis of the whales' vocalizations as well as their underwater behaviours in the vicinity of the stimulus area.

- *Experiment D: DMS solution*

We prepared a 0.2 M DMS solution each day by diluting pure DMS (Purity \geq 99%, Sigma-Aldrich, Germany) in vegetable oil. While this concentration is much higher than what is found in surface waters where DMS rarely peaks over 20 nM during summer months (Leck & Persson 1996, Turner et al. 1996), it was previously shown to induce behavioural reactions in seabirds (Nevitt et al. 1995, Wright et al. 2011). Control solution only consisted of vegetable oil.

We poured test solutions inside a floating round diffuser made of stainless steel-reinforced orange Styrofoam™ tubes. A 30-cm-wide polyvinyl chloride membrane was hung below the tubes in order to retain part of the oily solutions during the trial and a 1-kg weight tied 40 cm under the device by three polyester straps worked as an anchor, preventing wind-drift (Fig. 1). This floating device allowed a progressive release of the scent during the trial and created a focal point of highly-concentrated chemical stimulus used by the observers as a visual reference. The recording platform described previously was attached to the diffuser by a 1 m strap.

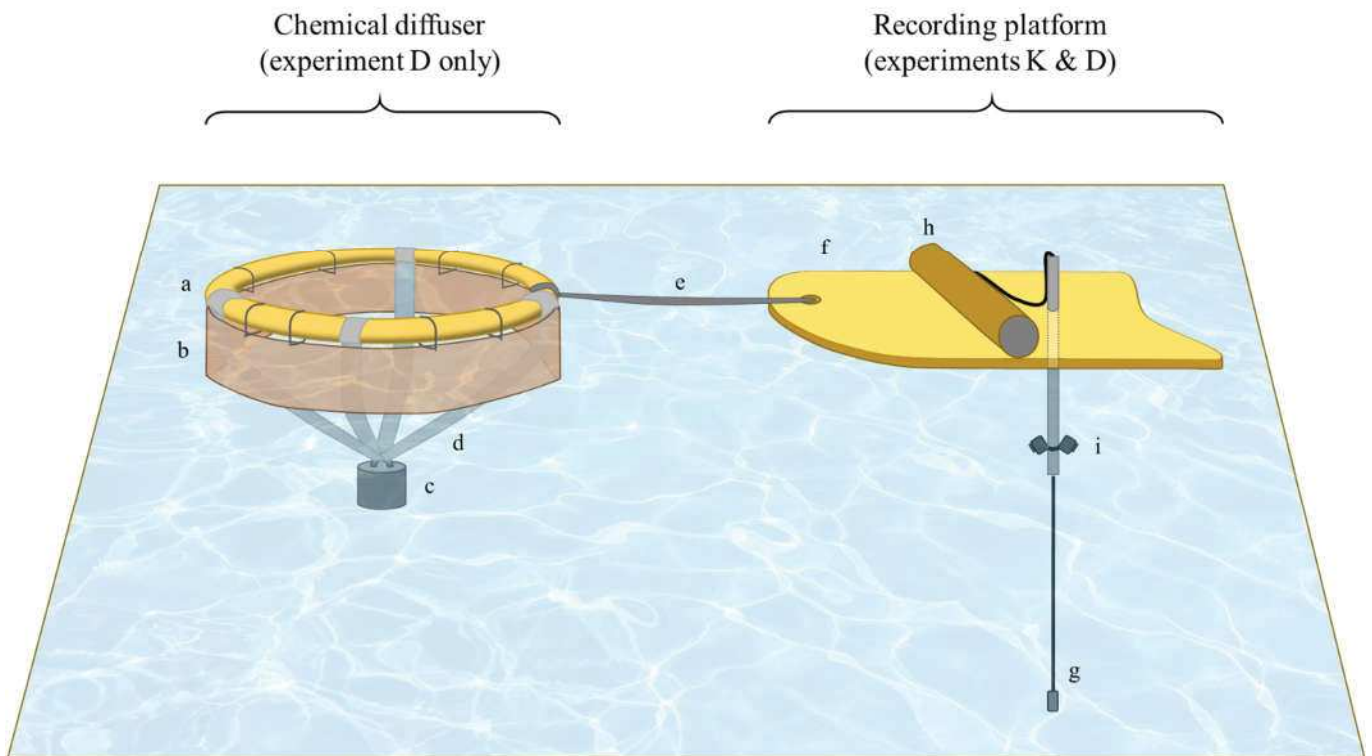


Figure 1. Schematic presentation of the floating diffuser and recording platform used in the behavioural response experiments. The diffuser was used only during DMS experiments and their controls (experiment D). It had a diameter of 80 cm and was made of one stainless steel-reinforced orange Styrofoam™ tube (a). A 30-cm-long polyvinyl chloride membrane (b) was hung below the tubes in order to partly retain the oily solutions during the trial. A 1-kg lead weight (c) was hung 40 cm under the device by four polyester straps (d), and worked as an anchor in order to prevent excessive drifting due to wind. The diffuser was attached to the recording device, a 120 x 60 cm floating Styrofoam™ platform (f), by a 100-cm-long strap (e). This platform was equipped with a hydrophone (model C57, Cetacean Research Technology, Seattle, USA) (g) connected to a digital audio recorder (Zoom H1 recorder, Zoom Corp., Tokyo, Japan) (h) and two underwater cameras (GoPro Hero 4, GoPro Inc., San Mateo, USA) (i) oriented 30° downward and facing in opposite directions.

4) Behavioural observations

The boat was placed approximately 300 m upwind (i.e. into the wind) from the closest targeted groups to maximize the exposure of the animals to the chemicals (Fig. 2). The chemical stimuli or their respective control were then released in the water in randomized order. Once the experimenter deployed the stimulus at the back of the boat, out of sight of the observers (blinded experiments), the boat navigated about 200 – 300 m away from the stimulus zone and the captain stopped its engine. The two cetacean observers then started to record the position and behaviour of each whale or group of whales every minute for 22 minutes using 7x50 binoculars. We defined the position of a whale group as the centroid of the positions of all its members. As the chemical diffuser was placed 300 m upwind from the closest group, we also recorded the initial distance to the stimulus for all the other targeted groups. We also recorded the apparition of new, non-target groups which were not observed at the beginning of the trial.

We defined two zones around the stimulus area: a close exposure zone with a 50-m radius, and a medium exposure zone with a 300-m radius. When a group crossed these limits, we recorded the time spent since the beginning of the trial in order to measure the duration of its presence within each zone. We also counted all respirations and surface behaviours evoking an exploration of the area such as stopping (a marked decrease in navigation speed) or diving under the stimulus (a short dive in the close exposure zone with whale surfacing on the other side of the device), as well as non-vocal communication behaviours including breaching (jumping completely or partially out of the water), head-, pectoral- or tailslapping (slamming the head or fin down on the water), (Frankel et al. 1995, Félix 2004). During the whole experiment, the experimenter piloted an unmanned aerial vehicle equipped with a 2.7K HD video camera (Phantom 3 advanced, DJI, Shenzhen, China) above the animals in order to assist the cetacean observers: it provided them with accurate data on the whales' distance to the stimulus as well as their detailed behaviours. The minimum flight altitude was set to 50 m in order to ensure it was not seen or heard by the whales (Christiansen et al. 2016).

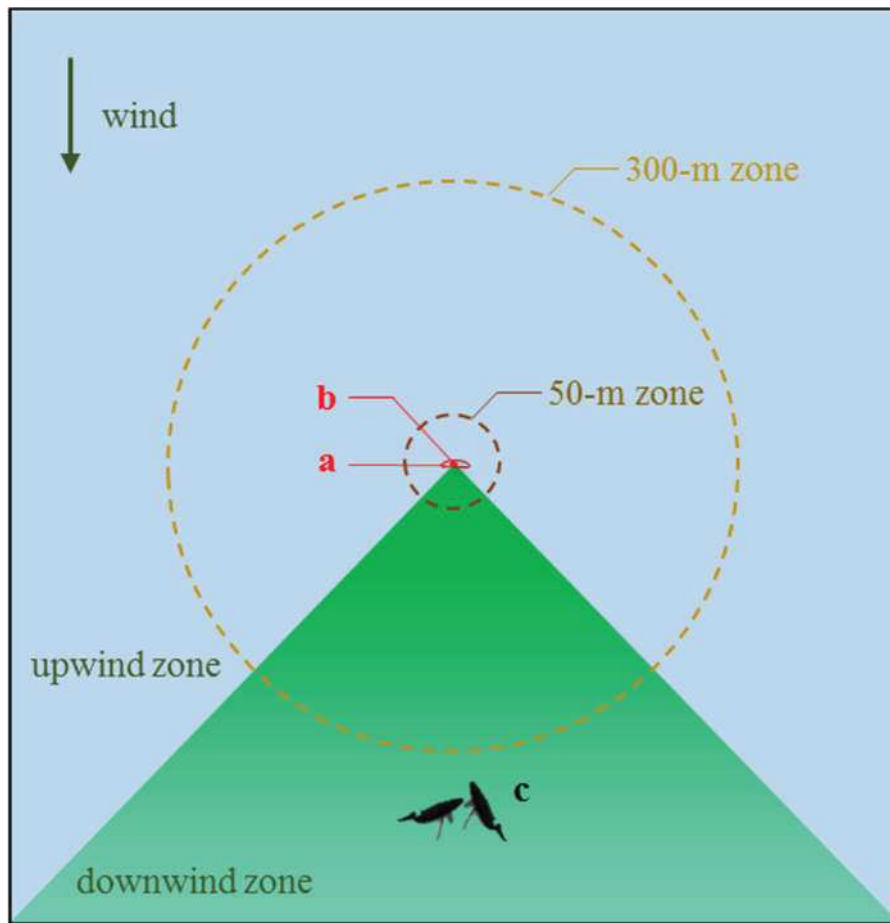


Figure 2. Schematic presentation of the exposure trials' initial conditions. For experiment K, the stimulus (a) was released along a 30-m line, with the recoding platform (b) (equipped with a hydrophone and two underwater cameras) in its centre, approximately 300 m from the closest group of whales (c). The same protocol was used for experiment D, except that the stimulus was poured in a chemical diffuser (see Fig. 1) attached to the recording platform by a 100-cm long strap. Two exposure zones were considered in the behavioural analyses: a close exposure zone with a 50-m radius (dark red) and a medium exposure zone with a 300-m radius (orange). The whales' dimensions are not at scale.

Birds can affect the whales' foraging behaviour (Anderwald et al. 2011), therefore a trained ornithologist equipped with binoculars recorded their presence and behaviour around the stimulus area. In each bird flock, species and number of individuals were recorded as well as any specific flight pattern including

circling (the bird circles over the area), flying down (the bird loses altitude, usually suddenly) and landing on water (Hutchison & Wenzel 1980).

At the end of each 22-minute trial, the experimenter recorded the trial conditions including the stimulus type (krill, DMS or their respective control), GPS position as well as environmental conditions (wind force, swell height, precipitation and visibility). The floating devices were then retrieved, and the boat was moved to another zone upwind in order to run a new trial on a different group of whales. The next trial was started after a period of at least 1 hour and in an area distant of at least 2 km upwind, in order to avoid any potential disturbance from the stimulus used in the previous experiment. In total, we run a total of 56 trials in humpback whales' breeding (26) and feeding grounds (22 in Iceland, 8 in Antarctica) during the four field surveys. We implemented 20 experiment K trials associated with 11 controls and 13 experiment D trials with 12 controls (Table 1). We could not set D experiments in Antarctica due to logistical and permit issues

5) Vocalizations tracking and features extraction

In order to analyse the potential effect of the exposure to prey-related chemical on the whales' acoustic activity, we quantified and categorized the vocalizations they produced during each trial. Acoustic analysis were performed using an automatic detector as described in Abeille et al. (2013). This detector was parameterized to exclude vocalizations with a low amplitude which were likely to have been emitted by whales located far away from the stimulus area and thus not exposed to the chemical. Briefly, the detection included two steps: a binarization of the recording followed by a detection of the vocalizations by the algorithm. First, the t-SNE (Distributed Stochastic Neighbor) embedding allowed a nonlinear dimensionality reduction for the visualization of high-dimensional datasets in lower dimensions, while keeping data variety (Van der Maaten & Hinton 2012, Lohani & Glotin 2017). This method is particularly well-suited to generate several acoustic parameters such as initial and final frequencies, duration of vocalisations, etc. Then, a Bayesian non-parametric clustering (BNP) (Bartcus & Glotin 2015) allowed an unsupervised classification of the dataset. Finally, the NMI (Normalized Mutual Information) score was calculated in order to evaluate the mutual dependence between true clusters (generated using BNP) and estimated clusters (corresponding to chemical stimulations) (Fowlkes &

Mallows 1983, Strehl & Ghosh 2002). Due to the high amount of data collected and limitations due to calculation capacities, the first ten minutes of each recordings were processed.

6) Data analysis

All analyses were performed in R (R Core Team 2017). A workflow on data collection and analysis can be found in Table 1.

First, we tested whether the chemical stimulation could have attracted whales that were not in sight during the pre-trial observation. The number of non-targeted whale groups that appeared per trial was analysed using a generalized linear model (GLM) with a Poisson distribution including the stimulus condition and several control variables such as the study area, wind speed, swell as well as the birds' numbers and flight behaviours.

Type of experiment	Trial duration	Stimulus trials	Control trials	Stimulus diffusion
Experiment K	22 minutes	Krill extract 4 Kg powder Iceland: 6 Antarctica: 5 Madagascar: 9	Red clay powder Iceland: 3 Antarctica: 3 Madagascar: 5	Deployed directly in water creating a 30 m stimulus line
Experiment D	22 minutes	DMS 0.2 M in vegetable oil Iceland: 6 Madagascar: 7	Vegetable oil Iceland: 7 Madagascar: 5	Poured in a floating round diffuser (Fig. 1)

Data collection	Measured data	Data analysis
a) Visual observations from the boat using binoculars, assisted by UAV	1) Number of non-targeted whales that appeared 2) Time spent in close exposure zone (50-m radius) 3) Time spent in medium exposure zone (300-m radius) 4) Number of blows	GLM (Poisson distribution) Tobit models for zero-inflated data Linear model
b) Recoding platform	5) Occurrence of surface behaviours 7) Occurrence of underwater behaviours 6) Vocalizations	Two-tailed Fishers' exact test Descriptive analysis Automatic spectral tracker and clustering
c) Underwater video	8) Bird counts & flight behaviours	GLM (negative binomial) & Fisher's exact test

Table 1. Workflow of the experimental design, data collection and analysis for the two chemical stimulation experiments (K and D) implemented in humpback whales in their breeding and feeding grounds

We also examined the influence of krill extract and DMS on several response variables. First, the times spent by the whales in the two zones (50 and 300-m zones) expressed their exploration of the stimulus area. This variable had a zero-inflated Gaussian shape because several whales groups did not enter any of the zones. This issue was overcome by testing stimuli effects in a Tobit regression (`censReg` R package) (Henningsen 2013). One global model was first created for all trials. We added study area, distance at start, time of arrival, wind speed, swell, group size as well as bird counts and their flight behaviour as control variables. In order to compare the whales' exploration of the stimulus zone in the three different study areas, we also used a Tobit regression for each of the sites. We then tested the influence of the food-related stimuli on the whales' respiratory rates (defined as blow counts within a group divided by the product of the group size and the time the group was observed) using a linear model on square root-transformed values. For each of these models, we created a maximum model with all independent variables and used the `dredge` function (`MuMIn` R package) to test which variable combinations allow to get the most parsimonious model based on AIC, considering a model to be substantially better than another if its AIC was lower by at least 2 AIC units (Burnham & Anderson 2004). For both experiments (K and D), the effect of the stimulus condition was compared to its control by post-hoc multiple comparison using the `glht` function (`multcomp` R package).

Finally, we tested the influence of the chemical stimulation on the whales' surface behaviour. We built 2 x 2 contingency tables, separately for each experiment. These tables incorporated, for each chemical (stimulus or control solution), the number of groups that presented or not a specific behaviour. The differences between proportions were tested using a two-tailed Fisher exact test.

As a side-analysis, we investigated whether the birds observed in the stimulation zone responded to the chemical stimulation and/or the whales' behaviour. The effect on bird counts was evaluated using negative binomial regression using the `glm.nb` function (`MASS` package) because of over-dispersion of the data and using the same model selection method as for whales' behaviour, including control variables such as wind force, study area, whale counts and surface behaviours as well as time of the day. The influence of the chemicals on the birds' behaviour pattern was calculated using the occurrence of each flight pattern during a trial. This allowed to avoid any bias from a potential cumulative effect due to

local enhancement in birds (i.e. the use of congeners as distant visual cues while foraging), a well-described behaviour in seabirds (Poysa 1992, Silverman et al. 2004). This variable followed a binomial distribution as it was counted as absent or present (0 or 1) during each trial. These data were pooled and organized in 2 X 2 contingency tables incorporating the stimulus conditions and the differences between proportions were tested using a two-tailed Fisher exact test.

B. RESULTS

1) Number of whale groups

A total of 113 humpback whale groups were included in our analyses (1-5 per trial), totaling 164 individuals (range: 1 to 4 individuals per group, mean \pm S.D.: 1.45 ± 0.45). Only one other whale species (a minke whale, *Balaenoptera acutorostrata*) was observed in the stimulus zone during one krill trial in Antarctica, and was excluded from the analysis. From 0 to 3 new whale groups (average: 0.77 ± 0.87) that were not targeted at the beginning of the experiment (because they were not detected during the pre-trial observation phase) appeared in the area, potentially attracted from a long distance. However, our GLM showed that this number was neither significantly affected by the stimulus condition (estimate = 0.188, 95% CI = -1.630 – 2.008, $p = 0.993$ for krill extract and estimate = 0.242, 95% CI = -1.112 – 1.598, $p = 0.967$ for DMS) nor by control variables (study area, time of day, wind force, swell, bird counts and flight behaviours) (Fig. 3).

2) Time spent in the stimulus zone

- *Global model*

We considered the time spent by the whales within the two exposure zones around the diffuser (50-m and 300-m zones) as an indicator their exploration of the chemical source. The most parsimonious Tobit model for the 300-m zone included the chemical stimulus and 3 control variables: study area, initial distance and time of day (McFadden pseudo R-squared = 0.14). The stimulus effect was highly significant in K experiment: during krill extract trials, whales spent about 8 min. more near the stimulus than during control trials (estimate = 8.01, 95% CI = 1.84 – 14.18, $p = 0.0048$). However, the same was

not true for DMS (estimate = 0.76, 95% CI = -5.97 – 7.49, $p = 0.99$). The study area had no significant effect on the time whales spent in the vicinity of the diffuser. As expected, the model found a highly significant negative effect of the initial distance on this response variable (estimate = -0.029, 95% CI = -0.0041 – -0.017, $p < 0.001$). The time of the day also had a significant negative effect (estimate = -15.14, 95% CI -25.70 – -4.57, $p = 0.003$). The influence of the chemical stimulus on the time spent in the 50-m zone followed the same trend, except that the positive effect of krill extract was not significant (estimate = 4.18, 95% CI = -1.08 – 9.46, $p = 0.17$).

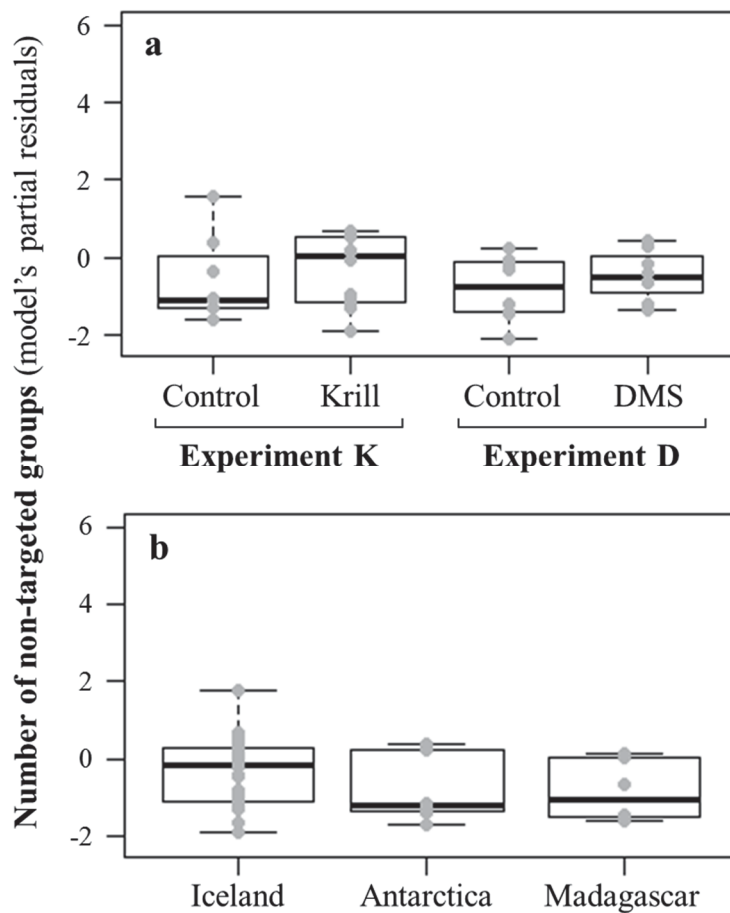


Figure 3. Partial regression plots showing the relationship between the number of whales that appeared during the exposure experiment and the stimulus condition (a). There was no significant effect of this factor on the response variable. The effects of control variables such as the study area (b), the time of day, wind force, well or bird counts or behaviours, were also found to be not significant.

- *Intersite differences*

As explained in the introduction, the three study areas differed in terms of the whales' reproductive state (breeding vs. feeding grounds) and in terms of prey availability (no prey in Madagascar, krill and fish in Iceland and exclusively krill in Antarctica). We tested whether these differences could affect the whales' response to the two food-related chemicals. We observed a response of higher intensity in Iceland than in Madagascar (estimate = 13.92, 95% CI = 3.28 – 24.56, $p = 0.0042$ and estimate = 8.03, 95% CI = 0.25– 15.81, $p = 0.039$, respectively) and no effect was found in Antarctica (estimate = -5.56, 95% CI = -14.08 – 2.95, $p = 0.20$) (Fig. 4). In the 50-m zone, a marginally significant effect was only found in Iceland (estimate = 7.57, 95% CI = -0.49 – 15.65, $p = 0.073$). Exposure to DMS did not induce any response in both exposure zones, in any of the study areas.

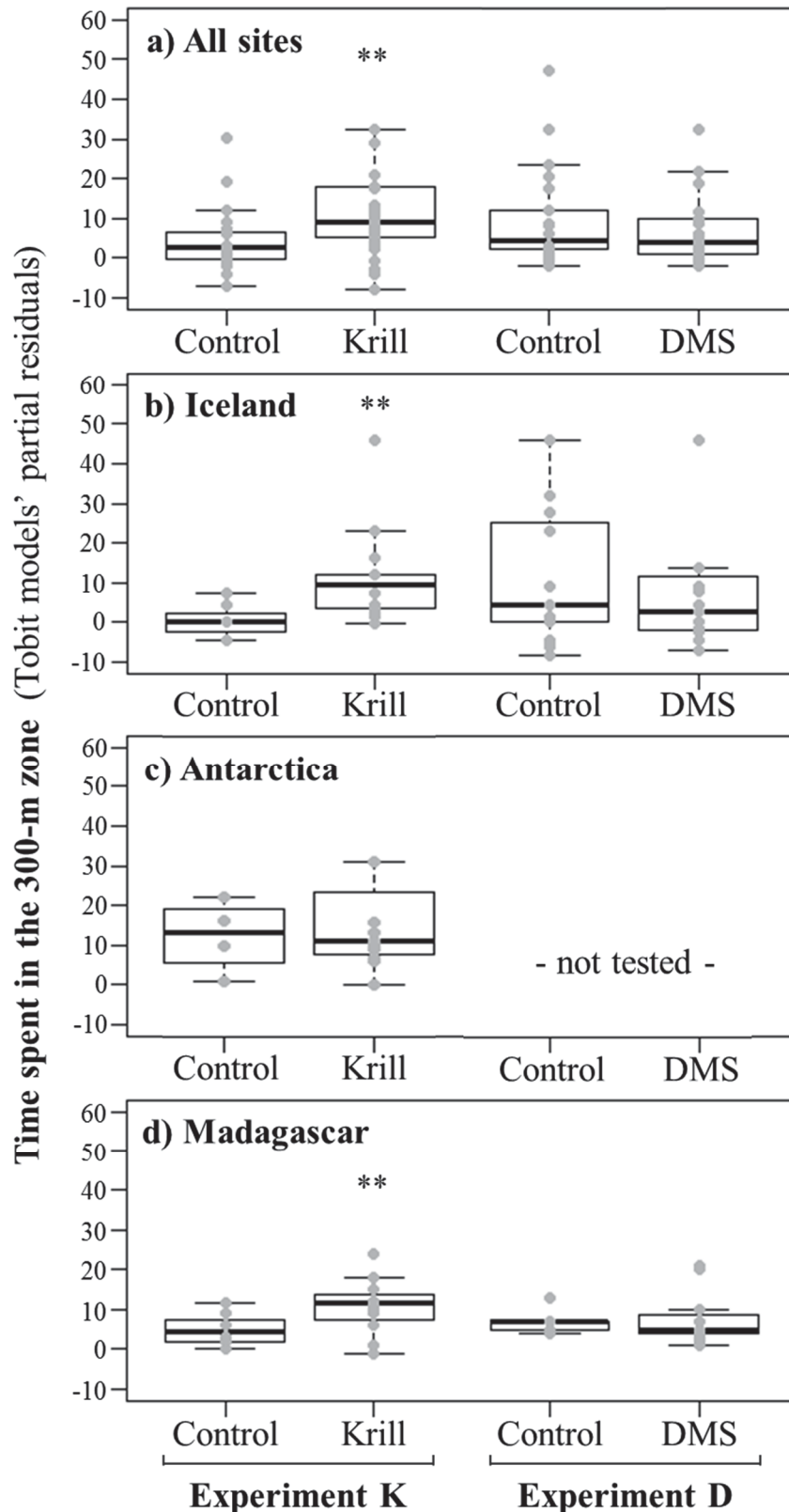


Figure 4. Partial regression plots showing the relationship between the time spent by humpback whales in the 300-m zone around the chemical diffuser and the type of chemical stimulation during K and D experiments, considering all study sites (a) or for each site individually (b, c and d).

** p < 0.01

3) Respiratory rate

We calculated the average whales' respiratory rate for each group in order to test whether it could be increased by an exposure to airborne food-related chemical. The most parsimonious linear model for respiratory rate included 2 explanatory variables: chemical stimulus and study area (R-squared = 0.50). Chemical stimuli did not affect the response variable compared to their respective controls (estimate = 0.078, 95% CI = -0.114 – 0.269, $p = 0.71$ for krill extract and estimate = 0.056, 95% CI = -0.131 – 0.245, $p = 0.85$ for DMS, square-root transformed values) (Fig. 5). The study area had a strong influence on the respiratory rates, being higher in Iceland than in Antarctica and Madagascar (estimate = 0.384, 95% CI = 0.185 – 0.582, $p < 0.001$ and estimate = 0.51824, 95% CI = 0.649 – 0.387, $p < 0.001$, respectively, square-root transformed values).

4) Surface and underwater behaviours

We counted all surface behaviours as they could potentially be affected by the whales' detection of a food-related chemical cue. We observed that the whales exposed to krill extract stopped and dived under the floating diffuser more often than the ones exposed to the control solution (27.1% vs. 5.0%, $p = 0.08$, $n = 37$ and 0.0% vs. 18.9%, $n = 20$, $p = 0.04$, respectively, two-sided Fisher's exact tests) (Fig. 6a). Non-vocal communication behaviours were not affected by the exposure to krill extract. There was no significant difference in the occurrence of any behaviour between DMS and control trials (Fig. 6b).

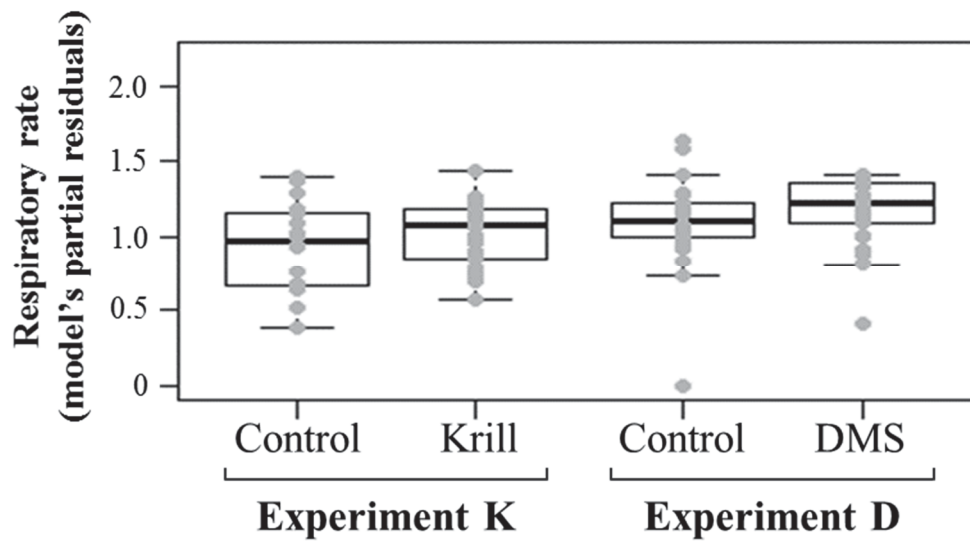


Figure 5. Partial regression plot showing the relationship between the humpback whales' respiratory rate and the type of chemical stimulation during K and D experiments.

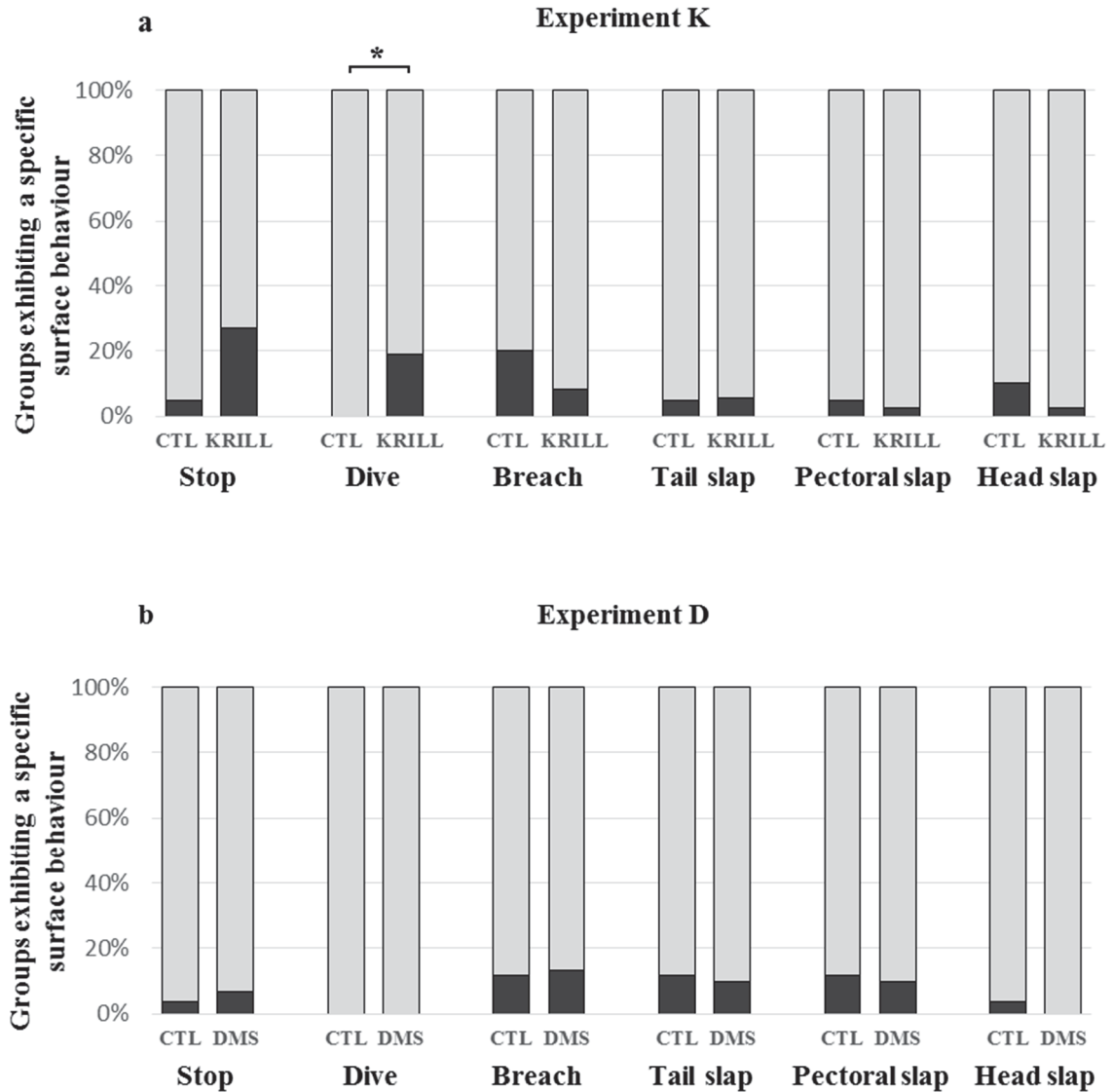


Figure 6. Occurrence of specific surface behaviours in humpback whales exposed to a chemical stimulation or a control during 22-minutes-long behavioural response experiments. **(a)** Krill extract versus control (CTL) including 20 and 37 groups, respectively. **(b)** DMS versus control (CTL) including 26 and 30 groups, respectively. Asterisk indicates a significant difference between stimulus and control trials (p -value < 0.05) as calculated using GLM with logit link for each response variable.

In all three study areas, visibility in the water was reduced (less than 5 – 10 m) due to turbidity. Therefore, although 26 whales groups entered in the close exposure zone (within 50 m around the diffuser), only two of them (3 individuals in total) were captured by the recording platform’s cameras

during two krill extract trials in Skjálfandi Bay, Iceland. One individual approached underwater and surfaced 7 m from the diffuser. It then swam under the surface back and forth within 20 m around the floater for 55 sec, breathing twice, before swimming away. The two other individuals formed a unique group. After they approached and breathed 5 m from the floater, they swam down slowly to about 10 m under the surface during 12 seconds before coming back to the surface to breathe again. No open mouth or specific behavioural display was observed underwater for any of these individuals.

5) Vocalizations

Our algorithm detected a total 2314 vocalizations, all of them in Madagascar. The maximum dependence between acoustic parameters and chemical stimuli ($SNI = 0.25$) was obtained using 3 clusters (Figure 7). While cluster 0 included sounds produced during all stimulus conditions, cluster 1 mainly consisted in vocalizations emitted during exposure to food-related chemicals (krill extract and DMS). Most of the calls in cluster 2 were produced during exposure to clay (control chemical of the experiment K).

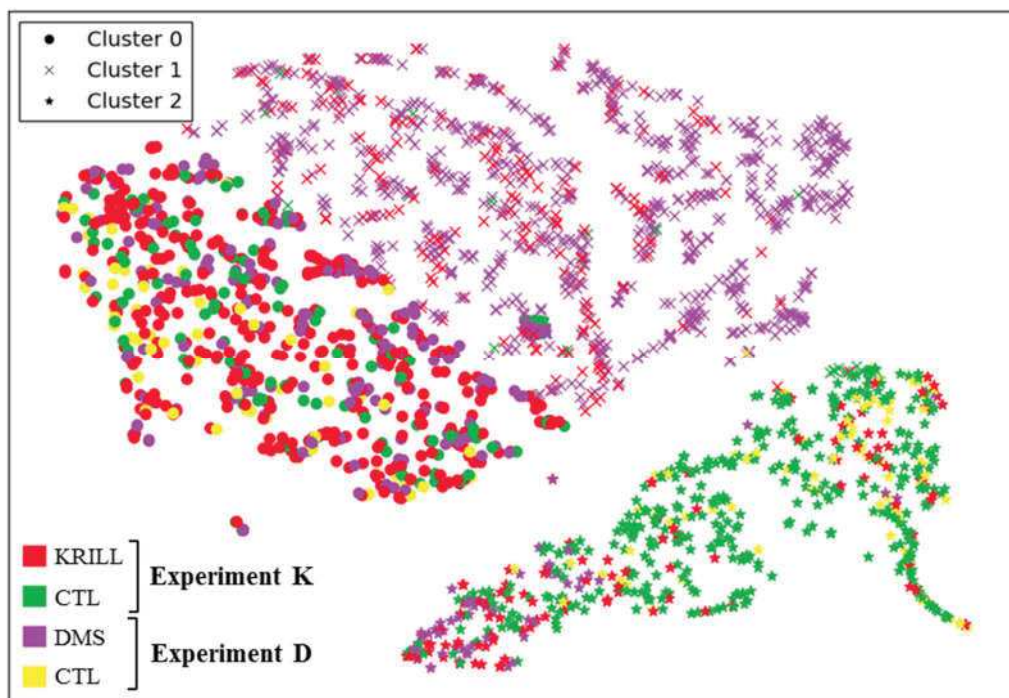


Figure 7. Analysis of the whales' vocalizations emitted in Madagascar during exposure experiments. After dimensionality reduction (t-SNE) of all acoustic parameters, a Bayesian non-parametric clustering (BNP) was applied to the data. A maximum NMI score (0.27) was obtained using 3 clusters.

6) Influence of the birds as visual cues

Of 471 bird groups counted during the 56 trials, 399 (83.7%) were northern fulmar *Flumarus glacialis* sighted in Iceland. The remaining 28 groups encompassed 14 species, differing in each area (Supplementary material, Table S1). The general linear model showed that the bird count per trial was not significantly affected by the chemical stimulation, but only by the study area (Iceland > Antarctica > Madagascar) and by the occurrence of whales' breaching (estimate = 1.897, 95% CI = 0.661 – 3.133, $p = 0.002$) (Supplementary material, Fig. S2a-d). Chemical stimulation had no significant effect on the birds' flight pattern except a marginally significant positive effect of krill extract on the occurrence of zig-zag flight ($p = 0.06$, two-sided Fisher's exact test on contingency table) (Supplementary material, Fig. S2e and S2f).

C. DISCUSSION

Humpback whales reacted to food-related chemical stimuli released in water, providing the first experimental evidence for functional chemical senses in this species. In particular, reactions towards krill extract were stronger than towards DMS, suggesting differences in their attractive potential for foraging whales.

Exposure to krill hydrolysate induced a longer stay in the stimulus area, with groups spending 8 minutes more in the 300-m zone than during control experiments. Two specific surface behaviours evoking sensory exploration, including diving under the chemical diffuser and slowing down their navigation, were expressed more frequently during krill extract trials than controls. These results provide strong evidence that the animals detected the stimulus and approached its source, probably in search for the related prey. Attraction towards krill-derived chemicals increases their probability of finding krill aggregations which are patchily and unpredictably distributed (Brierley et al. 1997, Sims et al. 2008). After a chemical stimulus has been detected, exploring the area at low speed may enable them to better perceive other prey-related cues at short distance using vision, mechanoreception and audition (Torres 2017). This corroborates other behavioural studies that have shown that humpback whales, like other rorquals, swim at a relatively low forward speed during foraging while they only accelerate during underwater lunges (Goldbogen et al. 2008, Simon et al. 2012). Attractive chemical cues could enable

them to maintain proximity to the highest densities of their prey (Friedlaender et al. 2006, Hazen et al. 2009), a behaviour which appears crucial to maximize their energy intake during summer months for this migratory species.

Response to krill extract compared to control trials varied between study areas. While the difference in the time spend in the stimulus area was the highest in Iceland, no difference was found in Antarctica. One possible explanation for this contrast may be that the krill density in the western Antarctic Peninsula is usually hundreds to thousands times higher than in Northern Iceland (62000 vs. 8.8 g per 1000 m⁻³) (Nowacek et al. 2011, Silva et al. 2017). High levels of krill-derived chemicals in Antarctica may therefore have hidden the signal created by the experimental stimulus, which represents a relatively small quantity (representing 20 kg of fresh krill) compared to what is found naturally in the surrounding waters. In Madagascar, the observed increase in the whales' exploration time, even if it was less marked than in Iceland, was not expected because their behavioural and physiological state is primarily oriented towards breeding at this time of the year. However, this species has been reported to feed at low latitudes during migration (Stamation 2007) so the detection of prey-related cue may trigger an opportunistic predation even in area where feeding usually does not occur.

While it has been speculated that baleen whales use DMS as an indicator of prey aggregation (Thewissen et al. 2011, Hagelin et al. 2012), we did not observe any difference with its control regarding their exploration of the stimulus area or their surface behaviour. This is probably due to the fact that this chemical cue is used at a large scale (dozen to hundreds of kilometres) and it may thus be useless for the whales to reach the exact source of this odour, which may be spread over kilometres (Torres 2017).

Our acoustic analyses were based on an automatic method which detected calls in Madagascar only and not in the feeding areas. These results confirm the strong difference in the whales' acoustic activity between breeding grounds, where they produce a high quantity of songs, and feeding grounds when much less calls are emitted (Clapham 2009). They also suggest that the whales' vocalizations were modified in Madagascar when they were exposed to krill extract or DMS. Modification of humpback whales' acoustic activity in their breeding area is known to occur in response to anthropogenic noises (Miller et al. 2000, Fristrup et al. 2003, Risch et al. 2012). Similarly, detecting a food-related chemical

in an environment where there is no prey may represent an unusual stimulus for the whales and could trigger a change in their acoustic activity. Unfortunately, our detector was not able to detect vocalizations of lower intensity (non-song calls), which are used by the whales for short-range communication. Adjustments of the acoustic detector are being conducted in order to detect these types of vocalization and include them in our analyses.

Our experimental design did not allow to determinate whether DMS and krill extract were perceived in air, in water or both. From far away (hundreds of meters from the diffuser), whales were exposed mostly to volatile compounds because molecules spread faster in air than in water currents. Whales could have perceived these molecules through their nasal cavity as mysticetes are well equipped for olfaction (see Berta et al. (2014) for a review). For example, Thewissen et al (2011) showed that the size of bowhead whales' *Balaena mysticetus* olfactory bulbs compared to their brain was much higher than in most primates (0.13% vs 0.06 % in apes and even less in humans) and that their OR repertoire had a relatively low proportion of pseudogenes (49%). Most mammals change their respiratory pattern following an olfactory stimulus, optimizing odorant sampling by sniffing (Rinberg & Gelperin 2006). The absence of a significant difference in respiratory rates between stimulus and control trials may reveal that whales, like birds, lack sniffing-associated behaviours, or that they use subtle air sampling movements that differ from blows and were not detected from a distance. Whales approaching within dozen of meters from the diffuser were also exposed in water to soluble compounds. While the three whales captured by the underwater cameras did not exhibit obvious open-mouth behaviour, groups that swam in the vicinity of the diffuser must have perceived chemical stimuli in water through taste receptors in their oral cavity. Data on the mysticetes' tongue anatomy are still scarce, but fungiform papillae have recently been found in a neonate grey whale (*Eschrichtius robustus*) with similar characteristic to the ones involved in taste perception in terrestrial mammals (Kienle et al. 2015). Also, even if most of the taste receptor genes are pseudogenized in all cetaceans (Feng et al. 2014), odontocetes are able to react to various taste stimuli which could also be the case in baleen whales (Friedl et al. 1990, Kuznetsov 1990, Kremers et al. 2016, Bouchard et al. 2017).

Taken together, our results strongly suggest that humpback whales, and probably other mysticete species, rely on chemoreception to localize their food as it has been shown in other marine predators. They also corroborate the hypothesis that chemical cues, especially airborne molecules that can travel long distances in the windy marine environment, may be used for navigation in conjunction with other senses including magnetoreception, audition, vision and somatosensory perception of oceanographic stimuli (e.g. temperature) (Torres 2017). Moreover, in some mysticetes including the bowhead and grey whales, the presence of vibrissae around the blowhole probably improves the localization of the odour source, combining information from wind direction with chemoreception in the nasal cavity (Berta, Ekdale, Zellmer, et al. 2015, Drake et al. 2015). The perception of environmental volatile signals would therefore be especially crucial for migratory mysticete species such as humpback whales that travel thousands of kilometres in the open ocean each year to reach localized feeding or breeding grounds. The importance of olfactory plumes originating from the migratory corridor for successful navigation has recently been shown in migratory gulls (Ramírez et al. 2015, Wikelski et al. 2015). Our results also showed that while birds are often associated with cetaceans at prey aggregations (Evans 1982, Anderwald et al. 2011), their presence or behaviour did not affect the whales' response. On the contrary, seabirds came in higher numbers when whales were breaching, providing further evidence of their use of cetaceans as visual cues to find feeding areas (Clua & Grosvalet 2001, Sakamoto et al. 2009). Finally, the present study gives new insights in baleen whales' foraging ecology and provides behavioural evidences in favour of their use of chemoreception in both air and water. New experiments are needed to assess the reaction of other mysticete species, especially krill specialists (e.g. blue whales), to DMS or krill extract. Our findings also opens new opportunities for further research on their use of this sense in navigation at larger scales, for example by combining GPS tracking data with particle dispersal models as it was recently achieved in migratory birds (Wikelski et al. 2015, Safi et al. 2016). This new knowledge on the mysticete chemosensory abilities could also find practical applications such as the use of chemical repellents in dangerous zones including areas of high-density maritime traffic or fishing zones.

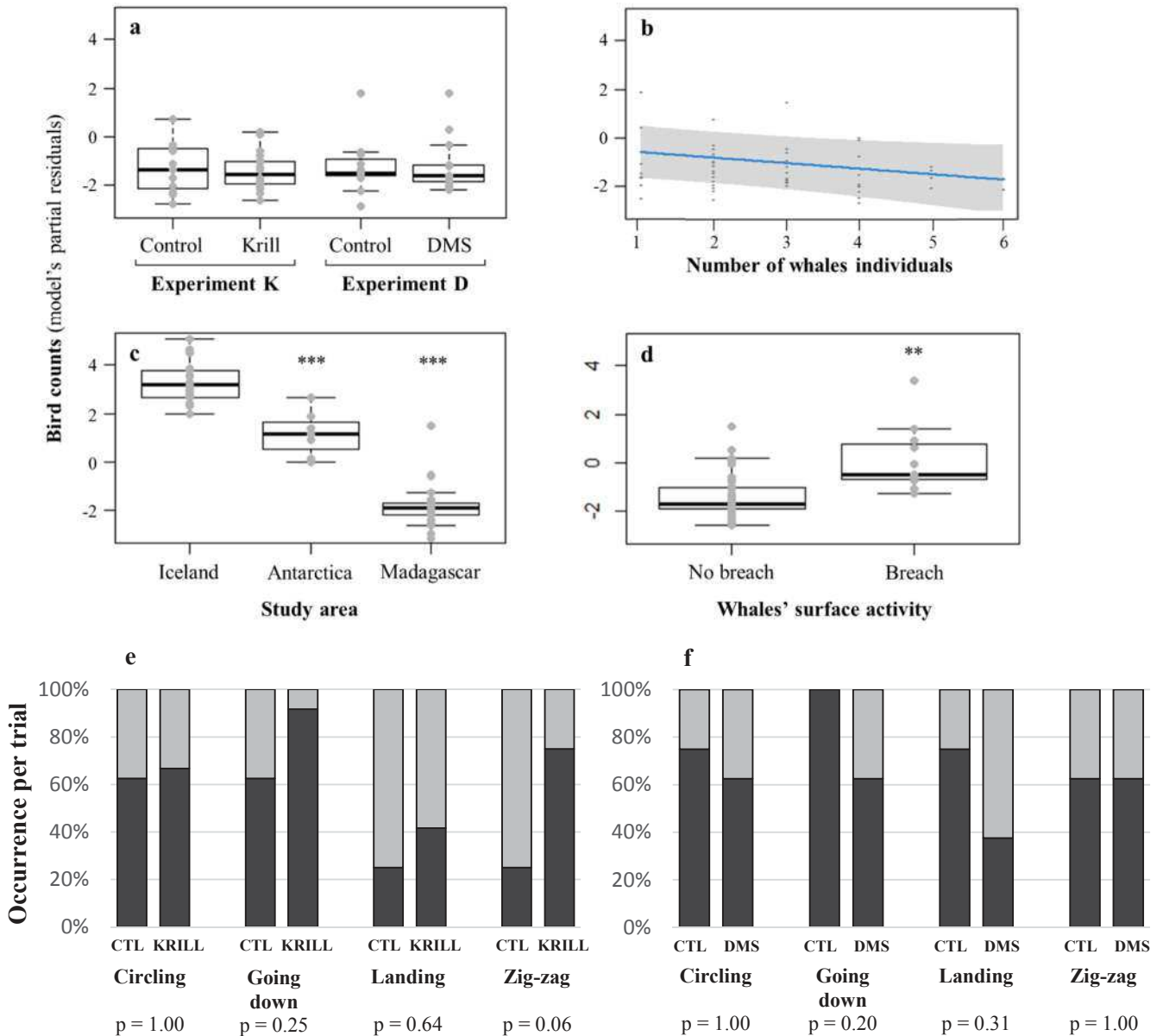
D. ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to all field work assistants including Pauline Gauffier, Sara Torres Ortiz, Malicia Besnard, Anjara Saloma and all Cetamada's volunteers and managers, the summer students of the Húsavík Research Centre as well as the Quixote Expeditions' team, especially Laura Smith, Federico Guerrero, Miguel Isla Casares and Annie Ford. The experiments described in this paper were approved by the French national ethical committee (Comité Consultatif National d'Ethique, permit #1286.5392) and were in accordance with the European directive 86/609/CEE. Funding was provided by Fondation Total (grant #144903/Parfums d'eau) and by Ministère de l'Éducation nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

E. SUPPLEMENTARY MATERIALS

Study area	Common name	Scientific name	Number of groups observed
Iceland	northern fulmar	<i>Fulmarus glacialis</i>	399
Iceland	arctic tern	<i>Sterna paradisaea</i>	15
Iceland	great black-backed gull	<i>Larus marinus</i>	7
Iceland	arctic skua	<i>Stercorarius parasiticus</i>	3
Iceland	black-legged kittiwake	<i>Rissa tridactyla</i>	2
Iceland	European shag	<i>Phalacrocorax aristotelis</i>	1
Antartica	southern giant petrel	<i>Macronectes giganteus</i>	2
Antartica	Wilson's storm petrel	<i>Oceanites oceanicus</i>	6
Antartica	skua	<i>Stercorarius maccormicki</i>	8
Antartica	antartic tern	<i>Sterna vittata</i>	4
Antartica	kelp gull	<i>Larus dominicanus</i>	3
Antartica	Antartic shag	<i>Leucocarbo bransfieldensis</i>	1
Madagascar	lesser noddy	<i>Anous tenuirostris</i>	15
Madagascar	common tern	<i>Sterna hirundo</i>	5

Supplementary material S1. Bird groups observed during behavioural response experiments implemented in humpback whales' breeding (Madagascar) and feeding grounds (Iceland and Antarctica)



Supplementary material S2. Birds' presence and activity during exposure to food-related chemical cues. Using a generalized linear model with a negative binomial link, we found no difference in the bird count according to the type of chemical stimulation (**a**) or the number of whale individuals in the stimulus area. However, the study area (**c**) and the whales' surface activity (**d**) did have a significant effect on this response variable. Using two-sided Fisher's exact test, no difference was found in the occurrence of specific flight behaviour in birds during experiment K (**e**) and D (**f**).

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

CHAPITRE 2 : DESCRIPTION DES BASES ANATOMIQUES ET CHIMIQUES POTENTIELLES DE LA CHEMORECEPTION CHEZ LES CETACES

Après avoir objectivé l'existence de réponses comportementales aux stimuli chimiques aussi bien chez les odontocètes que les mysticètes (Chapitre 1), j'ai souhaité initier l'étude des bases anatomiques et chimiques de la chémoréception. Tout d'abord, il paraissait pertinent d'investiguer la présence de récepteurs chimiques dans les voies ariennes supérieures et la cavité orale des cétacés, car les études anatomiques menées jusqu'à présent avaient conclu à une forte régression voire une disparition des structures chémoréceptrices. Etant donné les modifications que ces régions ont subies au cours de l'évolution des cétacés, nous avons opté pour une analyse microscopique des muqueuses orales et nasales par immunohistochimie, une technique permettant de marquer spécifiquement les récepteurs chimiques impliqués dans l'olfaction et la gustation. Les échantillons ont été collectés par mes collègues et moi-même sur des cétacés échoués en Méditerranée, ou obtenus dans le cadre du Réseau National Echouage (RNE) qui gère les nécropsies des animaux échoués à l'échelle nationale. En collaboration avec Thomas Lisney, post-doctorant dans notre équipe, j'ai analysé les tissus issus de quatre espèces différentes d'odontocètes et ainsi révélé la présence de structures susceptibles d'être impliquées dans la chémoréception dans les cavités orales et nasales (**Manuscrit 4**). Au cours de cette thèse, nous n'avons pas eu l'occasion de collecter d'échantillons suffisamment frais sur des mysticètes pour réaliser une étude anatomique comparée des deux sous-groupes de cétacés. En revanche, nous avons récemment établi une collaboration dans ce but avec Joy Reidenberg, spécialiste de l'anatomie des voies respiratoires des gros cétacés à la Faculté de Médecine du Mount Sinai (New York, USA), qui nous permettra de bénéficier de ses compétences et de ses échantillons. Enfin, j'ai également contribué à l'étude des composés chimiques sécrétés par les cétacés et qui pourraient jouer un rôle dans une potentielle communication chimique interindividuelle. J'ai donc participé à mise en place d'une étude visant à analyser les composés volatiles présents dans les excréta (urine et fèces) d'une espèce d'odontocètes, le marsouin commun. L'établissement d'une collaboration étroite avec le département

de pathologie vétérinaire de l'Université d'Utrecht (Pays-Bas), m'a permis d'obtenir une trentaine d'échantillons d'animaux fraîchement échoués sur les côtes hollandaises en 2016. Grâce au travail d'analyse par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse (GC-MS) de Marianne Gabirot, post-doctorante dans notre équipe, nous avons pu décrire la diversité des composés excrétés et initié des comparaisons de profils chimiques en fonction du sexe, de l'âge et de l'état de santé des individus (**Manuscrit 5**). L'identification de tous les composés est en cours d'achèvement, et ces premiers résultats seront prochainement complétés par l'inclusion de nouveaux échantillons collectés en 2017, permettant notamment une analyse plus fine des différences liées à la maturité sexuelle. Enfin, une analyse de la fraction soluble de ces échantillons par chromatographie liquide est prévue à terme, de façon à dresser un aperçu exhaustif de la diversité chimique des sécrétions urinaires et fécales, et de révéler éventuellement la présence de phéromones.

MANUSCRIT 4 : Identification de structures chimio-sensorielles dans la cavité orale et les voies aériennes supérieures de cétacés odontocètes.

Résumé français de l'étude :

La chémoréception (olfaction, gustation et sensibilité trigéminale) joue un rôle crucial dans l'écologie de la plupart des prédateurs marins comme les poissons, les tortues et les oiseaux marins. L'utilisation de cette modalité sensorielle chez les cétacés a cependant été peu étudiée et reste aujourd'hui controversée. Quelques expériences comportementales suggèrent que les odontocètes pourraient percevoir des stimuli chimiques dans l'air et dans l'eau, ce qui contraste avec les études anatomiques qui révèlent au contraire qu'ils sont peu équipés pour la chémoréception. Par exemple, le nombre de bourgeons du goût dans la cavité orale semble réduit et leur système olfactif a considérablement régressé au cours de l'évolution. Dans cette étude, nous avons utilisé des techniques d'histologie et d'immunohistochimie pour une exploration approfondie des potentielles structures chémoréceptrices. Nous avons ainsi recherché la présence de récepteurs chimiques (récepteur olfactifs et bourgeons du goût) dans la cavité orale et les voies aériennes supérieures de quatre espèces d'odontocètes présentant des habitats et des écologies alimentaires différents : le dauphin bleu et blanc (*Stenella coeruleoabla*), le grand dauphin (*Tursiops truncatus*), le marsouin commun (*Phocoena phocoena*) et le globicéphale noir (*Globicephala melas*). Les colorations histologiques montrent que leur muqueuse orale présente globalement les mêmes caractéristiques que celle des mammifères terrestres. De plus, des bourgeons du goût ont été identifiés à la base de la langue chez un dauphin bleu et blanc adulte. Les voies aériennes supérieures présentent un épithélium pseudostratifié conventionnel, sauf les sacs aériens dont la structure pluristratifiée rappelle sa probable origine épidermique. L'analyse immunohistochimique révèle une co-localisation de différents anticorps ciblant des chémorécepteurs avec le marqueur neuronal (MAP2), suggérant la présence de structures chimio-sensorielles. Plus précisément, le passage nasal et les sacs aériens présentent un co-marquage du récepteur olfactif de type 2 (OR2) et MAP2 chez le dauphin bleu et blanc (les analyses sont en cours chez les autres espèces). Chez la même espèce, on observe la co-localisation d'un marqueur des voies gustatives (5-HT) avec MAP2 dans la langue, mais aussi dans le palais, comme chez le marsouin commun. De façon surprenante, un co-marquage entre OR2 et MAP2 a été observé à la base de la langue, ce qui pourrait être en relation avec la capacité des cétacés à percevoir des composés odorants via la cavité orale (hypothèse de quasi-olfaction). Bien que plusieurs tissus restent encore à analyser, notre étude apporte un éclairage nouveau sur l'organisation des muqueuses orale et nasale chez les odontocètes. En effet, en rupture avec l'idée communément admise de l'inexistence des sens chimiques chez ces animaux, nos résultats suggèrent la présence de structures atypiques impliquées dans l'olfaction et la gustation.

Présentation de l'article (en anglais) :

Titre : Identification of chemosensory structures in the oral cavity and the upper airways of odontocete cetaceans.

Auteurs : Thomas J. Lisney, **Bertrand Bouchard**, Roxanne Haas, Julie Galia, Thierry Jauniaux, Sylvie Campagna, Laurent Givalois, Aurélie Célérier

Statut de publication : En préparation (les analyses de certains tissus doivent être complétées)



Photo : Bertrand Bouchard

Identification of chemosensory structures in the oral cavity and the upper airways of odontocete cetaceans.

Thomas J. Lisney^{1,2 #}, Bertrand Bouchard^{1,2 #}, Roxanne Haas², Julie Galia², Thierry Jauniaux⁴, Sylvie Campagna^{1,5}, Laurent Givalois^{2,6}, Aurélie Célérier^{1,2*}

¹ CEFE UMR 5175, CNRS - Université de Montpellier - Université Paul-Valéry Montpellier - EPHE – 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France

² Université de Montpellier, Place Eugène Bataillon, 34090 Montpellier, France

⁴ Department of Pathology, Fundamental and Applied Research for Animals and Health (FARAH), Faculty of Veterinary Medicine, B43, Liège University, 4000 Liège, Belgium

⁵ Université de Nîmes, Département Sciences et Arts, Rue du Docteur Georges Salan, 30021 Nîmes Cedex 1, France

⁶ Molecular Mechanisms in Neurodegenerative Dementia Laboratory, Inserm U1198, Team EiAlz, Montpellier, France

These authors contributed equally to this work

* Corresponding author: bertrand.bouchard@cefe.cnrs.fr

KEYWORDS

Toothed whales; Taste; Olfaction; Chemoreception; Histology; Immunohistochemistry

A. ABSTRACT

Chemosenses (olfaction, gustation and trigeminal perception) play a crucial role in the ecology of most marine predators including fishes, turtles and seabirds. The use of this sensory system by cetaceans however still remains unclear. While behavioural experiments have suggested that toothed whales (odontocetes) could perceive chemical cues in both air and water, previous anatomical studies have shown that they are little equipped for chemoreception: not only do they exhibit a low number of taste buds in their oral cavity, but the olfactory tract appears to be absent. In this study, we used a histological and immunohistochemical approach to shed new light on their potential chemosensory structure. These techniques allowed us to investigate the presence of chemoreceptors in the upper airways and oral cavity of four odontocete cetacean species with distinct ecologies including the striped (*Stenella coeruleoabla*) and bottlenose (*Tursiops truncatus*) dolphins, the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) and the pilot whale (*Globicephala melas*). Histological stainings showed that their oral mucosae is similar to terrestrial mammals and taste buds were found in the tongue root of a striped dolphin. The upper airways exhibit a typical pseudostratified epithelium, except in the airsacs were a pluristratified epithelium appears to confirm its epidermal embryological origin. Immunohistochemical labelling revealed colocalisations between antibodies targeting different chemoreceptive structures and a neuronal marker (MAP2), suggesting sensory pathways in various anatomical regions. The nasal passage and the airsacs both showed a colabelling of the olfactory receptor 2 (OR2) and MAP2 in the striped dolphin (analyses of samples from the other species are still being processed). In this animal, a specific marker of gustatory structures (5-HT) colocalized with MAP2 in the tongue root as well as in the palate, which was also the case in a juvenile harbour porpoise. Surprisingly in both species, a positive labelling of OR2 and MAP2 was also found in the tongue root, suggesting that odorant perception could occur in this part of the oral cavity. These results have to be completed by the analysis of all tissues collected in the four odontocete species. Also, other proteins involved in chemical signals transmission (e.g. Olfactory Marker Protein, OMP) should be labeled in order to confirm that these putative chemosensory pathways are functional. If this is confirmed, this would reveal that odontocetes have retained a functional chemoreception partly through the development of unconventional sensory structures during their unique evolution towards an aquatic life.

B. INTRODUCTION

Chemoreception is the most ancient sense and is found in living organisms from bacteria to mammals (Wicher 2012). It plays a crucial role for survival and reproduction, allowing organisms to perceive biotic and abiotic chemical information in their environments, as well as to communicate with congeners. In mammals, olfaction (smell) and gustation (taste) are the two main chemosensory systems, even though other neural pathways, such as the trigeminal or terminal nerves, provide complementary information (Lundström et al., 2011; Oeschlager et al., 1987). In terrestrial mammals, the main olfactory system binds airborne molecules in the upper respiratory tract during respiration through free nerve endings embedded in a mucus, and projecting to the olfactory bulb in the brain. In some mammalian groups such as rodents and ungulates, an accessory olfactory system also detects chemicals through the vomeronasal organ located between the oral and nasal cavities (Mombaerts 2004). The perception of gustatory stimuli involves three different neural pathways: taste receptor cells, organized in taste buds, make synapses with primary sensory axons that run through the (1) facial nerve (cranial nerve VII), (2) glossopharyngeal nerve (cranial nerve IX), or (3) vagus nerve (cranial nerve X), depending on whether they are located in the tongue, palate or epiglottis and esophagus, respectively (Simon et al. 2006).

In the two extant orders of cetaceans (Odontoceti, the toothed whales, and Mysticeti, the baleen whales), dramatic anatomical changes of the nasal and oral cavities have occurred during their evolutionary adaptation from a terrestrial and herbivorous lifestyle to a complete aquatic lifestyle and a carnivorous diet. For example, their nostrils have migrated to the top of their skull, forming the blowhole, and their dentition has evolved to homodonty and polydonta (odontocetes) or even to a complete loss of teeth with the development of filtering baleen plates (mysticetes) (Armfield et al., 2013; Berta et al., 2014). The evolution of sound production mechanisms has also resulted in significant modifications of the nasal region in odontocetes as well as the laryngeal region in mysticetes (Cazau et al. 2016; Houser et al., 2004; Marriott et al., 2013). All these changes had major implications with regard to cetacean sensory neuroanatomy including an apparent reduction of chemoreceptive structures, especially in odontocetes. First, the olfactory mucosa, nerves and bulbs are reported to be absent in odontocetes (Jacobs et al., 1971; Oeschläger & Buhl, 2008). Regarding gustation, some species exhibit a small

number of taste buds located in pits at the root of the tongue, which seem to degenerate in adults (Komatsu & Yamasaki, 1980; Kuznetzov, 1990; Shindo et al., 2008; Yoshimura et al., 2008). Genetic studies seem to corroborate these findings, as most of their olfactory and taste receptor genes appear pseudogenized and thus non-functional (Feng et al., 2014; Kishida et al., 2015).

Interestingly, despite this overall reduction in their chemosensory organs, a few studies and observations have shown that odontocetes do react behaviourally and physiologically to chemical stimuli in air and water. Indeed, it has been reported that bottlenose dolphins can perceive a fish odour (Kremers et al. 2016) as well as dimethyl sulfide (DMS) (Bouchard et al., in prep), a chemical produced in highly productive zone and used by other marine predators to find their foraging grounds (Dacey & Wakeham 1986). It has also been shown that they can detect the four basic tastes (sweet, salty, sour and bitter) and that they can be attracted by the taste of their prey (Bouchard et al., 2017; Friedl et al., 1990; Kremers et al., 2016). A multidisciplinary study has also demonstrated that the narwhal's tusk is sensitive to chemical stimuli and could be involved in the perception of environmental and social/reproductive information (Nweeia et al. 2014). Moreover, Kusnetsov (1990) measured autonomous reactions (increased heart and respiratory rates) in captive odontocetes when he irrigated their mouth with organic compounds such as trimethylamine, valeric acid and camphor. Because these chemicals are usually perceived by terrestrial mammals using olfaction, the author called this atypical chemical sense "quasi-olfaction". It is thus likely that odontocetes are not completely lacking chemosensory abilities, but that they might rely on neuroanatomical structures that differ from those classically described in their most studied terrestrial relatives. However, these pathways, as well as the associated chemoreceptors, have yet to be located.

In order to better understand the anatomical substrates involved in this aspect of the odontocetes' sensory ecology, we investigated the presence of potential chemoreceptive structures in tissue collected from their nasal and oral cavities using histological and immunohistochemical (IHC) techniques. Because an animal's chemosensory abilities strongly depend on its environment and foraging behaviour, we collected samples from four species with different habitats or ecologies: the long-finned pilot whale (thereafter pilot whale) which almost exclusively preys on cephalopods at great depths, the striped

dolphin which feed mostly on pelagic or benthopelagic fishes, the harbour porpoise that inhabit coastal waters, and the bottlenose dolphin, which exhibit a very plastic feeding behaviour (Cañadas et al., 2005; Marubini et al., 2009). We thus expected that this comparative study would highlight common patterns in the odontocetes' chemosensory structures as well as inter-specific variations in their neuroanatomy.

C. MATERIAL AND METHODS

1) Samples collection

Samples were opportunistically collected between 2012 and 2016 from freshly stranded cetaceans belonging to four different odontocete species: pilot whale (*Globicephala melas*), striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*), harbor porpoise (*Phocoena phocoena*) and bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) (Fig. 1). In total, samples from two adult pilot whales, one adult striped dolphin, one juvenile harbour porpoise and one juvenile bottlenose dolphin were used. (Table 1). Only carcasses with a decomposition state of 1/5 (considered very fresh, less than 48 h post-mortem (Van Canneyt et al. 2015)) were included and brought directly to a veterinary necropsy room for sample collection. For strandings occurring in France, specimen collection was made in partnership with the National Stranding Network (“Réseau National Echouage”, RNE) coordinated by the PELAGIS observatory at the University of La Rochelle. It also involved the GECEM (Study Group of Mediterranean Cetaceans) on the Mediterranean coast (for bottlenose and striped dolphin) as well as the Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium, on the Atlantic coast (for pilot whales). Tissues were collected from a variety of different candidate structures from the oral and nasal/respiratory pathways (Fig. 2).

2) Sample preparation

After dissection, samples were preserved and stored in buffered 4% paraformaldehyde (PFA) at room temperature for at least 2 months. Then samples were embedded in paraffin and sectioned using the facilities at the “Réseau d’Histologie Expérimentale de Montpellier” (RHEM), located at the “Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier” (IRCM). The samples were sectioned on a semi-automatic rotary microtome (model HM 340-E with “Niagara” STS system, Microm Microtech, Brignais, France) at a thickness of 3 µm. Sections were mounted on either Superfrost (histological staining) or Superfrost plus (IHC) slides (Fisher Scientific, Illkirch, France).

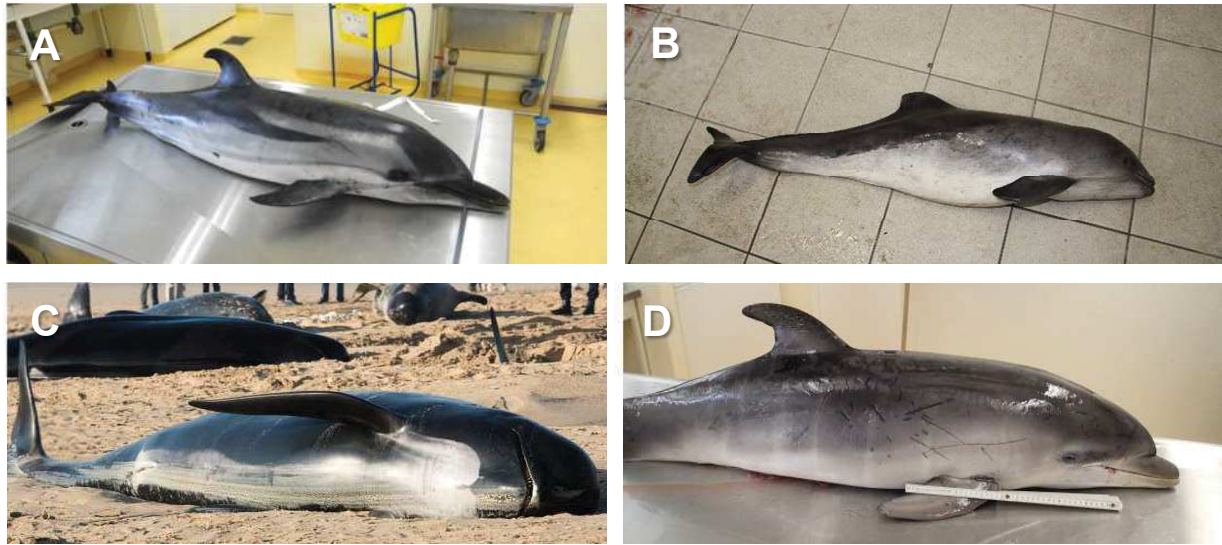


Figure 1. Pictures of the stranded individuals, belonging to four different odontocete species, that were sampled in order to investigate potential chemoreceptive structures in the oral and nasal/respiratory pathways. **(A)** Striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*), **(B)** Harbour porpoise (*Phocoena phocoena*), **(C)** Pilot whale (*Globicephala melas*), and **(D)** Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Image credits: **(A,B,D)** Behavioural Ecology Group / CEFE-CNRS; **(C)** taken from Metro News (<http://metro.co.uk/2015/11/02/family-of-ten-whales-found-stranded-on-beach-in-calais-5476042/>)

Species	Animal ID	Sex	Age class	Stranding place and date
Pilot whale	G3, G6	Males	adults	Calais, France, Nov 2015
Striped dolphin	SC1	Male	adult	Beauduc, France, May 2013
Harbour porpoise	PP1	Female	Juvenile	Atlantic coast of France, Dec 2012
Bottlenose dolphin	TT1	Male	Juvenile	Arles, France, July 2016

Table 1. Details age and sex classes of the individuals included in the present investigation, as well as the place and date of their stranding.

3) Histological analyses

Representative slides for each block were stained with *hematoxylin eosin saffron* (HES) and cresyl violet (CV). The HES staining was performed using automated slide stainer (model HMS 740, Microm Microtech, Brignais, France) at the RHEM. The CV staining was performed manually. Sections were deparaffinized in toluene, rehydrated through a descending series of ethanols to distilled water, stained with CV (Diapath, Martinengo, Italy), and dehydrated through an ascending series of ethanol to xylene. Slides were coverslipped with Mountex mounting-medium.

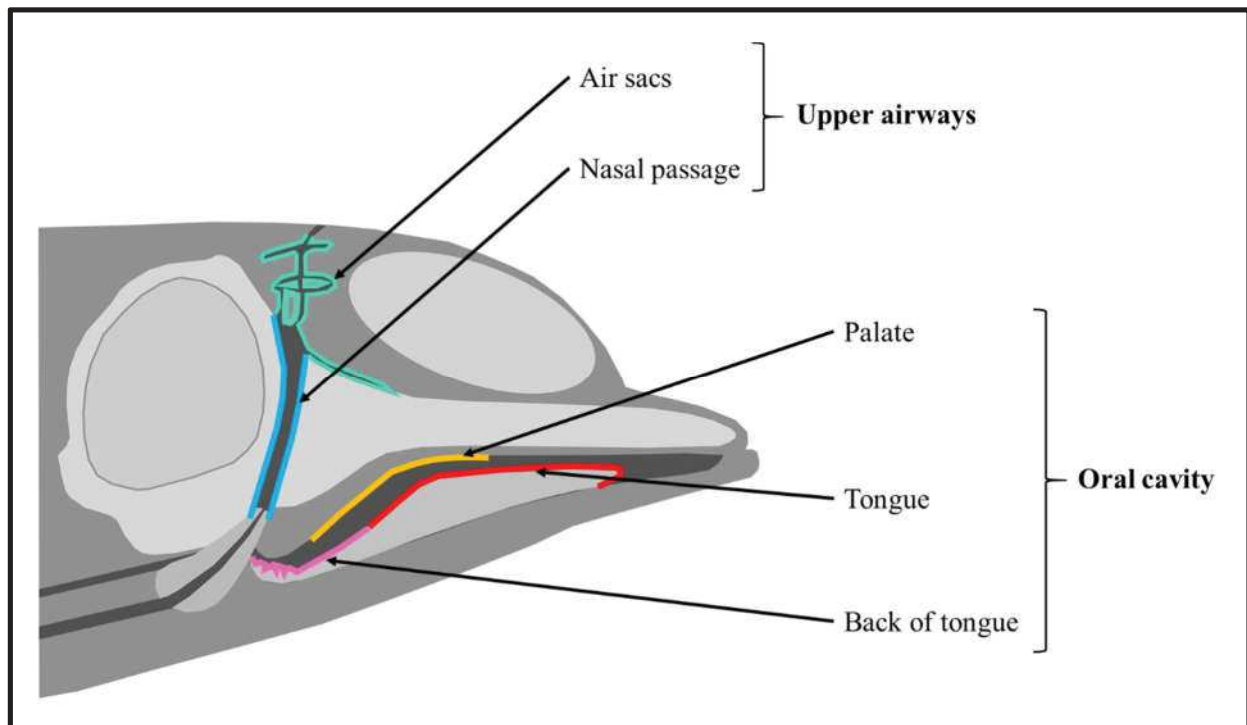


Figure 2. Schematic view of the nasal/respiratory (upper airways) and oral structures collected for histological and IHC analyses in the four studied odontocete species.

4) Immunohistochemical (IHC) analyses

We used IHC techniques in order to specifically label potential olfactory and gustatory structures and receptors in the collected samples. First, a detailed and extensive literature review of the available research into mammalian olfactory and taste receptor gene expression and functionality has been conducted, and a number of specific antibodies against olfactory and taste receptors (which we considered highly likely to be present and functional in cetaceans) have been identified (Table 2). We first run preliminary studies using several antibodies from different mammal species in order to identify which provided the best results on the collected tissues. This process allowed us to select cow antibodies, a result which was expected as artiodactyls like cattle are relatively closely related to cetaceans. Based on an established protocol (Givalois et al. 2004, Brureau et al. 2013), all these antibodies were used in triple-labelling experiments in conjunction with an antibody against microtubule associated protein 2 (MAP-2, 1/100, Millipore, France), which is expressed in neurons and is widely used as a neuronal marker, and with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 mg/ml, Molecular Probes, The Netherlands), which labels cell nuclei. In order to unmask antigenic sites, slides were first washed in phosphate buffer saline (PBS, 3 x 10 min) and subsequently immersed in a demasking solution (1%, Vector antigen unmasking solution, Vector Lab., USA) at 75°C for 25 min before being washed under cool water. They were then rinsed in PBS (3 x 5 min) before nonspecific antibody binding was blocked by treatment with normal goat serum (3%, Vector Lab.) diluted in phosphate buffered saline (PBS) and 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, France) at room temperature for one hour. Diluted primary antibodies (250 µl) were applied directly onto sections and slides were incubated in a humid chamber at room temperature overnight. Sections were then rinsed in PBS (3 x 10 min) before to be incubated 2 hours in humid chamber and at room temperature with 300 µl of appropriate fluorescent secondary antibodies (Cy3 anti-IgG, 1/1000, Jackson ImmunoResearch Lab. and Alexa Fluor 488 anti-IgG, 1/1000, Molecular Probes). Sections were then rinsed (3 x 10 min in PBS) and the nuclei of sections were counterstained with DAPI (1/1000) at room temperature for 5 min. They were finally washed using PBS (3 x 10 min.), sealed with a coverslip using Fluorosave reagent (Calbiochem, France) and stored in the dark at 4°C. Immunostaining specificity was determined by incubating control sections with the secondary antiserum alone.

Cell type	Primary antibody / marker name	Rationale for use
Olfactory receptors	Anti-olfactory marker protein (OMP)	Antibody to olfactory marker protein (OMP), which is expressed in mature olfactory receptor neurons in vertebrates (Margolis 1972).
	Anti-OR2 Anti-OR10 Anti-OR13	Antibodies to three olfactory receptor (OR) proteins that are expressed and presumed to be functional in odontocetes (McGowen et al. 2008, Hayden et al. 2010).
Taste receptors	Anti-keratin 19	Antibody to keratin 19 proteins that are expressed in all mature mammalian taste cells (Wong et al. 1994, Zhang et al. 1995, Hendricks et al. 2004)
	Anti-ENTPD2	Antibody to NTPDase2. Ecto-ATPase (NTPDase2 in mammals), label tastes bud cells in many different vertebrates, including lampreys, sharks, bony fishes, amphibians, and mammals (Bartel et al. 2006, Kirino et al. 2013).
	Anti-TRPM5	Antibody to TRPM5, a common TRP ion channel protein found in mammalian sweet, bitter and umami taste cells (Zhang et al. 2003, Ishimaru et al. 2006).
	Serotonin (5-HT)	A neurotransmitter used by some mammalian taste receptor cells (Kim & Roper 1995, Ren et al. 1999).
Neurons	Anti- β -Tubulin III	Antibody to β -Tubulin III, a structural protein that is a major part of microtubules within the cytoskeleton and is expressed primarily in neurons. This antibody is widely used as a marker to distinguish neurons from other cell types (https://www.stemcell.com/anti-beta-tubulin-iii-antibody-clone-aa10.html).
	Anti-MAP2	Antibody to microtubule associated protein 2 (MAP2), which is expressed in neurons. This antibody is widely used as a marker to distinguish neurons from other cell types. (http://www.labome.com/method/Neuronal-Cell-Markers.html).
	Anti-synaptophysin	Antibody to synaptophysin, which is a protein expressed in the presynaptic vesicles of the synapses of neurons (Wiedenmann & Franke 1985).
	'Neurotrace'	A fluorescent Nissl stain that is selective for the Nissl substance characteristic of neurons and provides more sensitivity than traditional histological dyes like toluidine blue or cresyl violet. (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/N21482)

Table 2. List of antibodies against olfactory and taste receptors, as well as neuronal markers, currently being used to investigate the potential presence of olfactory and taste receptor cells in odontocetes.

5) Microscopy and image analysis

Sections stained with HES and CV were viewed with a Leica DM 2500 compound light microscope. Images were acquired using a Leica DFC 495 digital camera and Leica Application Suite 4.0.0 image acquisition software (Leica Microsystems, Nanterre, France). The sections processed for fluorescence IHC were viewed with a Leica DMR compound light microscope equipped with the appropriate fluorescence filter cubes (L5 FITC (green), N3 Rhodamine (red) and A4 UV (blue)), attached to a solid state light source (Sola Light Engine, Lumencor, Beaverton, OR, USA). Images were acquired and treated using a Leica DFC 365 FX digital camera and Leica Application Suite.

6) Ethical statement

This study was approved by the French national ethical committee (“Comité Consultatif National d’Ethique”, permit # APAFIS#2016051717525952, obtained on 10/05/2016).

D. RESULTS

1) Histological analyses

- *Oral cavity*

The CV and HES staining revealed that the structures of the tongue and palate in the 4 odontocete species are similar. Their mucosa is covered by a stratified epithelium about 200 - 400 μm thick (Fig. 3), consisting of many layers of epidermal cells lying on top of a laminal propria (underlying connective tissue) containing blood vessels, collagen and muscle fibers. The lamina propria showed prominent dermal papillae, which inter-digitated with the overlying epithelium.

In the juvenile harbour porpoise, the caudal part of the tongue also exhibited fungiform papillae (Fig. 4A) and taste bud-like structures were located at the base of these papillae (Fig. 4B). In all species, the epithelium was thinner caudally near the tongue root. In this region, a range of pores and glands were found in which the epithelium was even thinner, with a thickness of about 30-50 μm (Fig. 5A and 5B).

In the oral cavity, we did not observe macroscopically any naso-palatine duct suggesting the presence of a vomeronasal (Jacobson's) organ.

- *Nasal cavity*

The epithelium in the air sacs was also stratified, with a thickness of about 100 - 250 μm , and its histological appearance was found to be similar in the four odontocete species (Fig. 3). In the nasal passage, the mucosa had a different structure, with a pseudostratified columnar epithelium exhibiting various pores and mucous glands (Fig. 5C and 5D).

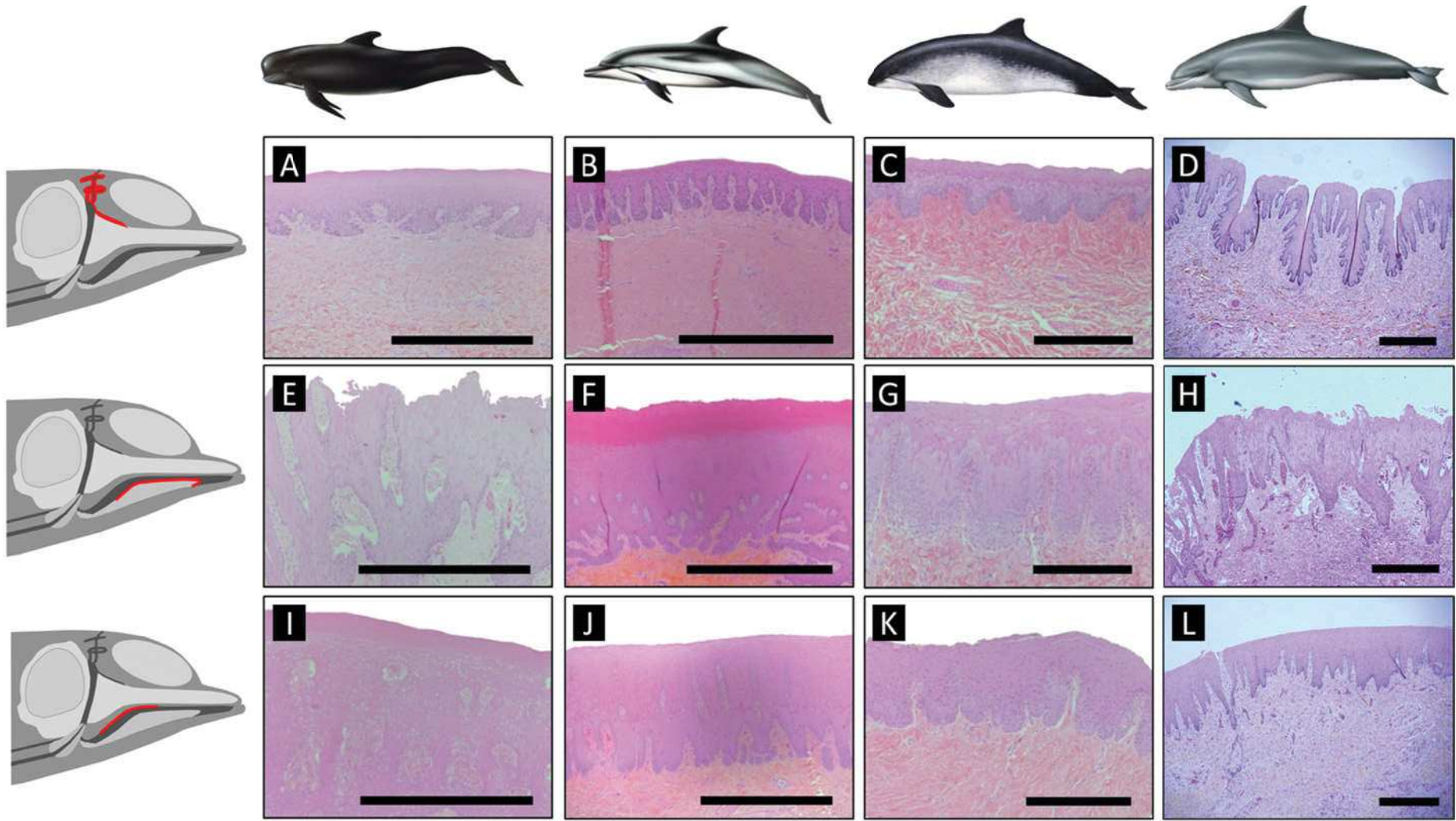


Figure 3. Examples of the anatomical structure the nasal air sacs' epithelium (A, B, C), palate (D, E, F) and tongue (G, H, I) in three odontocete species: the pilot whale (A, D, G), the striped dolphin (B, E, H), and the harbour porpoise (C, F, I). The histological staining used is hematoxylin-eosin-saffron. Scale bars = 500 μ m.

2) Immunohistochemical analyses

Preliminary data from immunohistochemical analyses of fully processed samples (Fig. 6) indicate positive immunoreactivity for specific olfactory and gustatory markers, in various structures located in both the nasal/respiratory pathways and the oral cavity of several odontocete species.

- *Nasal cavity*

Positive immunostaining for OR2 was observed in fiber-like structures at the outer edge of the air sacs' epithelium in pilot whale (Fig. 7H), striped dolphin and harbour porpoise, where it always appeared to be scarcely and weakly co-localized with the neuronal marker (MAP2). In the striped dolphin, positive immunoreactivity for OR2 (Fig. 7D) and OR13 (Fig. 7E), both clearly associated with MAP2 labeling, was observed in the external layer of the nasal passage epithelium. In this species, the specific antibody addressed against OR13 also labelled the air sac tissue.

- *Oral cavity*

Immunostaining obtained using the antibody against 5-HT, a neurotransmitter used by some mammalian taste receptor cells, is associated with neuronal elements (MAP2 positive) in all anatomical regions of the oral cavity (tongue, back of tongue and palate) in the striped dolphin (Fig. 7G). Positive immunoreactivity of this gustatory marker was also found to be strongly associated with MAP2 labelling in the tongue tissue of the harbour porpoise (Fig. 7C).

Interestingly, a co-localisation between different olfactory markers and the neuronal marker MAP2 was identified in several structures of the oral cavity. More precisely, in the pilot whale we observed a positive labelling for OR10 in the epithelium of the palate (Fig. 7I). The same anatomical region was also weakly labelled with OR2 antibodies in the harbor porpoise (Fig. 7B). Finally, OR2 immunoreactivity revealed the presence of this olfactory receptor on MAP2 labelled element in the back of the tongue of two species: the harbour porpoise (Fig. 7A) and the striped dolphin (Fig. 7F).

Negative controls did not exhibit any specific immunostaining in regions that had positive signals with specific antibodies used in the study.

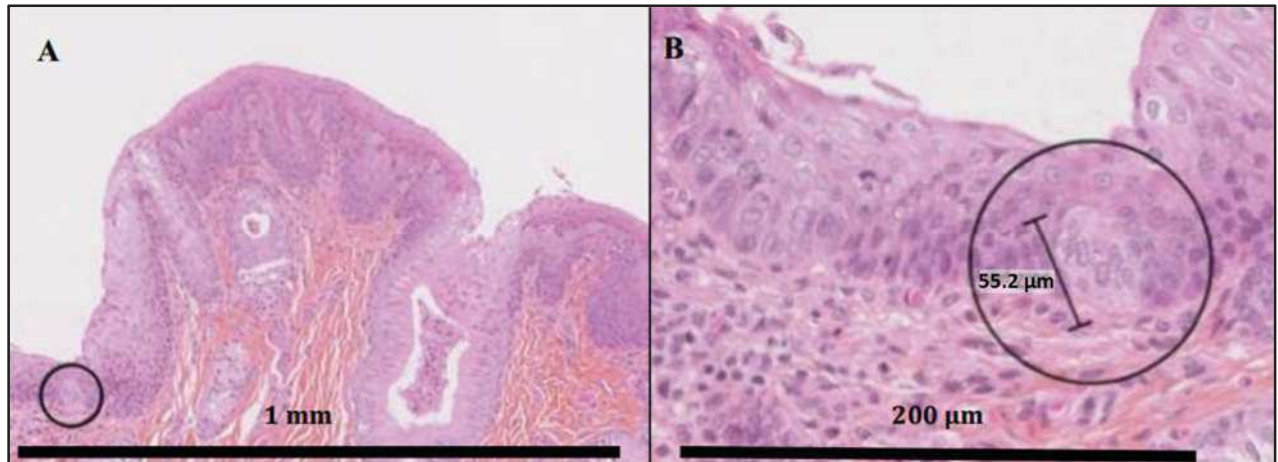


Figure 4. Sections of the tongue of a juvenile harbor porpoise. Fungiform papillae was found in the caudal part (A), with taste bud-like structures at their base (B). Sections were stained with hematoxylin-eosin-saffron.

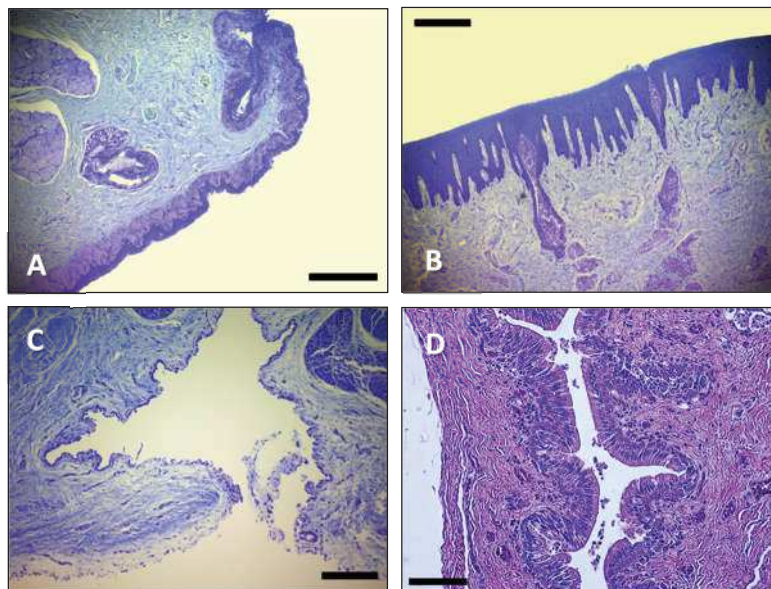






Figure 5. Sections of cetaceans' tissues collected from their upper respiratory tract and oral cavities. Pores were found at the root of the tongue of the harbour porpoise (A) and bottlenose dolphin (B) as well as in the nasal passage of the bottlenose (C) and striped dolphins (D). Sections were stained with cresyl violet. Scale bar = 200 µm (C, B) 100 µm (D) and 500 µm (A).

			Olfactory markers				Gustatory markers	
			OR2 + MAP2	OR13 + MAP2	OR10 + MAP2	OMP + MAP2	5HT + MAP2	CK19 + MAP2
 Harbor porpoise	Upper Airways	Air Sac Complex	+					
		Nasal Passage	[Yellow]					
	Oral Cavity	Tongue	-				+ (Fig. 7C)	
		Back of Tongue	+ (Fig. 7A)				-	
		Palate	+ (Fig. 7B)				-	
 Bottlenose Dolphin	Upper Airways	Air Sac Complex						
		Nasal Passage	[Yellow]					
	Oral Cavity	Tongue	[Yellow]					
		Back of Tongue	[Yellow]					
		Palate	[Yellow]					
 Stripped Dolphin	Upper Airways	Air Sac Complex	+	+	-			
		Nasal Passage	+ (Fig. 7D)	+ (Fig. 7E)	-			
	Oral Cavity	Tongue					+	
		Back of Tongue	+ (Fig. 7F)				+	
		Palate	-				+ (Fig. 7G)	
 Pilot whale	Upper Airways	Air Sac Complex	+ (Fig. 7H)	-	-			
		Nasal Passage	[Yellow]					
	Oral Cavity	Tongue	-		-			
		Back of Tongue	-		-			
		Palate	-		+ (Fig. 7I)			

Samples Collected Processed and Analyzed
Samples Collected Processed and To be analyzed
Samples Collected and To be processed and analyzed
Samples To be collected on other stranded animals
Not relevant

Figure 6. Results from immunohistochemical staining in the upper airways and oral cavity of four odontocete species.

The stages of analysis completion for each tissue and species are shown in different colours (see legend at the bottom left).

For the samples that have already been analyzed, positive immunostaining (colocalization of the neuronal and olfactory markers) is indicated by a “+” with for some of them a reference to a representative slide on Figure 7, while negative immunostaining (absence of staining or absence of colocalization) is indicated by a “-”.

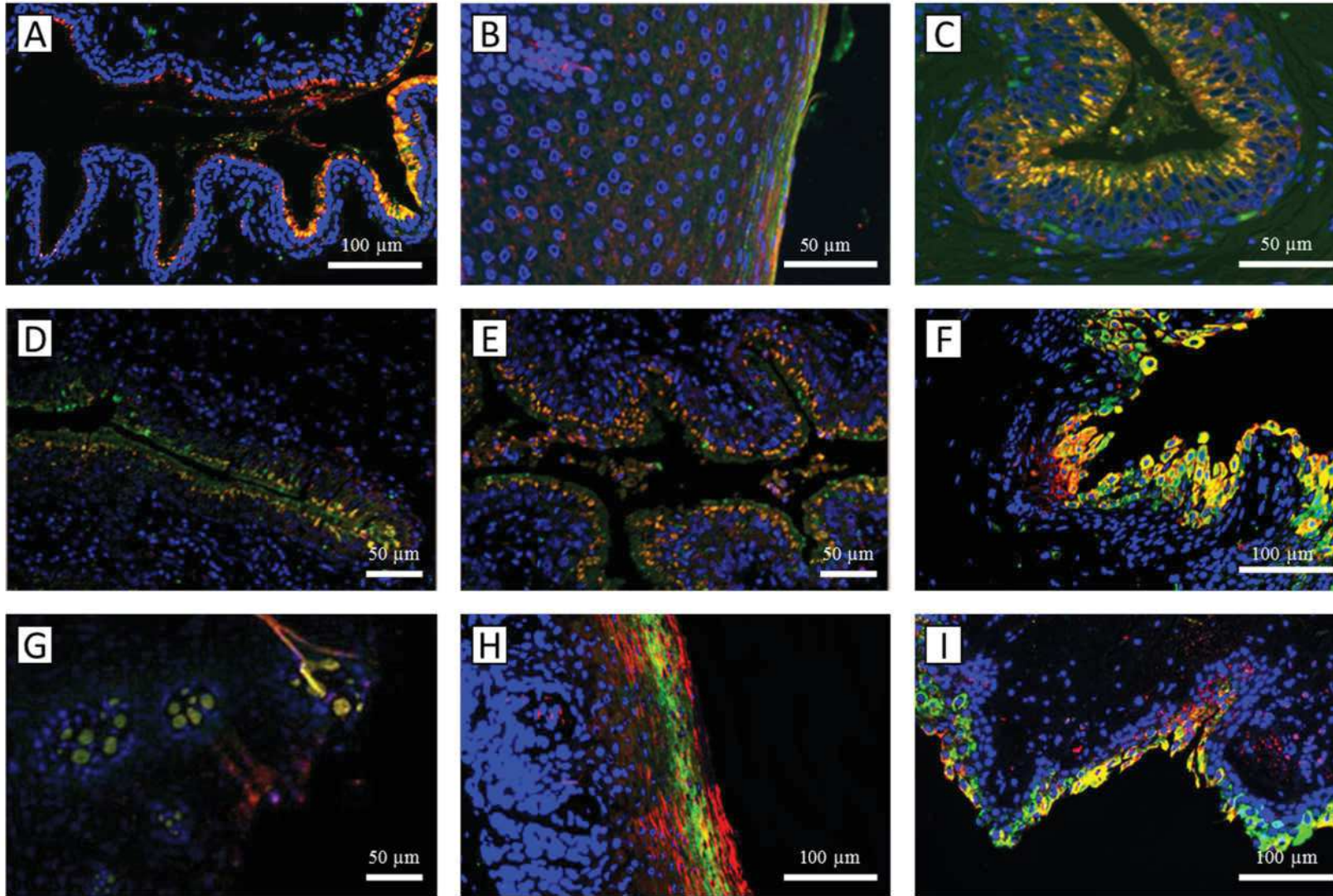


Figure 7. Representative images of positive immunostaining as indicated in Figure 6. **A.** Harbour porpoise's back of tongue tissue, labeled with an antibody against OR2 (green). **B.** Harbour porpoise's palate tissue, labeled with an antibody against OR2 (green). **C.** Harbour porpoise's tongue tissue, labeled with an antibody against 5-HT (green). **D.** Striped dolphin's nasal passage tissue, labeled with an antibody against OR2 (green). **E.** Striped dolphin's nasal passage tissue, labeled with an antibody against OR13 (green). **F.** Striped dolphin's back of tongue tissue, labeled with an antibody against OR2 (green). **G.** Striped dolphin's palate tissue, labeled with an antibody against 5-HT (green). **H.** Pilot whale's air sac tissue labeled with an antibody against OR2 (green). **I.** Pilot whale's palate tissue, labeled with an antibody against OR10 (green). In all images MAP2 (a neuronal marker) labeling appears in red and DAPI (a cell nuclei marker) appears in blue. Areas in yellow show co-localization between the olfactory markers and MAP2.

E. CONCLUSIONS

In the four odontocete species included in the study, histological and immunohistological investigations revealed several structures potentially involved in chemical perception in both the oral cavity and the upper airways.

In oral cavity, the histological structure of the tongue was similar to what was found in other studies in odontocetes. For example, the thick stratified epithelium observed in the cranial part progressively becomes thinner in the caudal region (Ferrando et al. 2010). At the tongue root, various pits were found surrounded by a thin epithelium only 30 - 50 μm thick. Such histological features were already reported in the striped dolphin (Komatsu & Yamasaki 1980). The presence of taste bud-like structures in the juvenile harbour porpoise corroborates other studies in juvenile odontocetes including the bottlenose dolphin, striped dolphin, Stejneger's beaked whale and possibly sperm whale (Komatsu & Yamasaki 1980, Kuznetsov 1990, Werth 2004, Shindo et al. 2008). It has thus been hypothesized that taste buds are present in neonates but progressively degenerate in adults (Komatsu & Yamasaki 1980, Kuznetsov 1990). This is corroborated by taste preference experiments in captive bottlenose showing that juveniles exhibit a higher taste reactivity (Bouchard et al. 2017). However, it is possible that taste buds may have been missed during anatomical exploration of cetaceans, due to the low number of these structures and the fact that they could degrade shortly after death (Pfeiffer et al. 2001). Indeed, taste buds have also been reported in adult harbour porpoise, bottlenose dolphin and Pacific white-sided dolphin (Behrmann 1988, Yoshimura & Kobayashi 1997), and gustation was found to be functional in adult bottlenose dolphins (Friedl et al. 1990, Kuznetsov 1990, Kremers et al. 2016). It is likely that these structures also exist in mysticetes as the tongue root of a neonate grey whale showed features very similar to odontocetes, including fungiform papillae (Kienle et al. 2015).

In the nasal cavity, the epithelium of the air sacs found in the four species included in this study was pluristratified. This finding is compatible with the hypothesis that these structures have an epidermal origin. This was already suggested by several authors based on the fact that air sacs are partly pigmented in black, which appear useless as they are not exposed to sunlight, and could have evolved from an invagination of the skin above the nares (Cranford et al. 1996, Reidenberg & Laitman 2008). The

structure of the nasal passage was however very different, exhibiting a pseudostratified columnar non-ciliated epithelium with various pores and glands. To our knowledge, this is the first histological description of this part of the upper respiratory tract, which may be due to the time and logistics needed to explore this deep bony area, especially in large species. In the two species in which the nasal passage was sampled (bottlenose and striped dolphins), it exhibited a similar epithelium as other parts of the airways such as the trachea and larynx which were already described in the bottlenose dolphin (Smith et al. 1999, Cozzi et al. 2016). However, the presence of small pits with pores in some sections seems unique to this part of the respiratory tract. While typical mammalian olfactory cells with hair-like cilia were not found histologically, the overall structure was similar to nasal mucosa found in terrestrial mammals (Morrison & Costanzo 1992).

Immunohistochemical results presented here are only partial and will be complemented by ongoing analyzes (see Fig. 6 for analysis progression). However, these preliminary data suggest the presence of specific olfactory and gustatory markers in several tissues of odontocetes. These tissues were collected from anatomical structures localized in the airways and in the oral cavity that are classically associated with chemoreception in others mammals.

OR antibodies used in the immunohistochemical studies were selected because they label olfactory receptors (OR2, OR10, OR13) that were shown to be conserved (non-pseudogenized) in cetaceans (Kishida, Thewissen, Hayakawa, et al. 2015) and thus potentially functional. Here, it appear that these ORs are actually expressed in several tissues associated with neurons, which could be involved in the transmission of the sensory signal to the central nervous system. Such observations were made on several individuals from different species, sex and age class, and therefore suggest general traits rather than anecdotal evidences.

Data processing must be completed for all the selected antibodies in the tissues collected from the four odontocete species included in order to allow meaningful and exhaustive comparative analyzes. Nevertheless, the labelling with OR2, fully processed for the harbor porpoise, the striped dolphin and the pilot whale, shows subtle interspecific differences in the density and anatomical localization of immunostaining. The harbor porpoise and the striped dolphin display OR2-positive immunoreactivity

in both the oral and nasal cavities, whereas pilot whale only exhibit OR2 labelling in the air sac complex. In pilot whales, these OR2 olfactory receptors might be involved in the perception of volatile chemicals such as DMS, as suggested from behavioural experiments in the Western Mediterranean Sea (Bouchard et al. 2017b, submitted). The presence of olfactory receptor labelling (OR2 and OR13) in the oral cavity in all species is consistent with the “quasi-olfaction hypothesis” proposed by Kusnetzov (1990) explaining the perception of substances considered as odorants when perfused in the oral cavity of dolphins. These results should however be confirmed by further immunostaining, in particular using anti-OMP (Olfactory Marker Protein), a protein expressed specifically in mature olfactory receptor neurons in vertebrates (Kaupp 2010).

Using 5-HT labelling, we identified potential areas with taste receptors cells, at least in the harbor porpoise and the striped dolphin. The presence of taste receptor cells both in a juvenile (harbour porpoise) and an adult (striped dolphin) specimen do not corroborate previous studies suggesting taste buds degeneration in adults (Komatsu & Yamasaki, 1980; Kuznetzov, 1990; Shindo et al., 2008; Yoshimura et al., 2008). These results must be confirmed by further analyses using other gustatory marker, for example anti-K19 antibodies which bind the keratine 19 protein expressed in all mature mammalian taste cells (Wong et al., 1994; Zhang et al., 1995; Hendricks et al., 2004).

These preliminary results not only corroborate previous histological studies in odontocete cetaceans but provide new comparative data on the organization of the upper airways including the nasal passage and the air sac complex. Furthermore, the immunohistochemical analysis using anti-bovine antibodies appears a promising technique to explore the molecular bases of chemoreception in the oral cavity and upper airways of these animals.

F. ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Willy Dabin and the members of the french stranding network (RNE) for the signalement of stranded cetaceans. We also acknowledge the help of Dr Nicolas Keck from the Laboratoire Départemental Vétérinaire de l'Hérault for his advice during dissections. We would warmly thank the teams at the Molecular Mechanisms in Neurodegenerative Dementia Laboratory at University of Montpellier and the histology platform of the IRCM for providing the equipment for tissue section and analysis. Funding was provided by Fondation Total (grant #144903/Parfums d'eau) and Ministère de l'Éducation nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

MANUSCRIT 5 : Exploration par GC-MS des composés présents dans les excréta de marsouins communs morts échoués. Une solution pour déterminer la présence de phéromones chez les cétacés ?

PREAMBULE

Disposer de capacités chimio-sensorielles fonctionnelles permet la détection de molécules informatives, que ce soient des signaux chimiques (produits par des congénères) ou des indices chimiques (issus des autres espèces ou de l'environnement abiotique). Dans les parties précédentes, nous avons décrit de potentielles structures chémoréceptrices dans la cavité orale et les voies aériennes supérieures des odontocètes, et montré que ces animaux réagissent à des indices chimiques liés à l'alimentation dans leur environnement (extraits de proies, DMS). Mais existe-t-il une communication chimique intra-spécifique chez les cétacés? En d'autres termes, émettent-ils des signaux chimiques susceptibles d'être perçus et d'influencer le comportement ou la physiologie de leurs congénères? L'existence d'une telle communication chimique est connue chez d'autres mammifères marins comme les pinnipèdes tant au niveau comportemental (Insley et al. 2003, Pitcher et al. 2011) que par la présence de signatures chimiques (Stoffel et al. 2015) et fortement suggérée chez les siréniens (Bills 2011, Bills et al. 2013), mais sur ce point, les cétacés demeurent encore mystérieux.

La communication chimique intra-spécifique peut impliquer deux types de signaux, ou molécules chémochimiques. D'une part, un signal de type phéromone, basé sur un composé unique ou un mélange de quelques molécules seulement. D'autre part, un signal de type « signature chimique » qui repose sur un assortiment complexe de molécules chimiques impliqué dans la reconnaissance individuelle (telle que la reconnaissance d'individus apparentés) (Fig. 1).

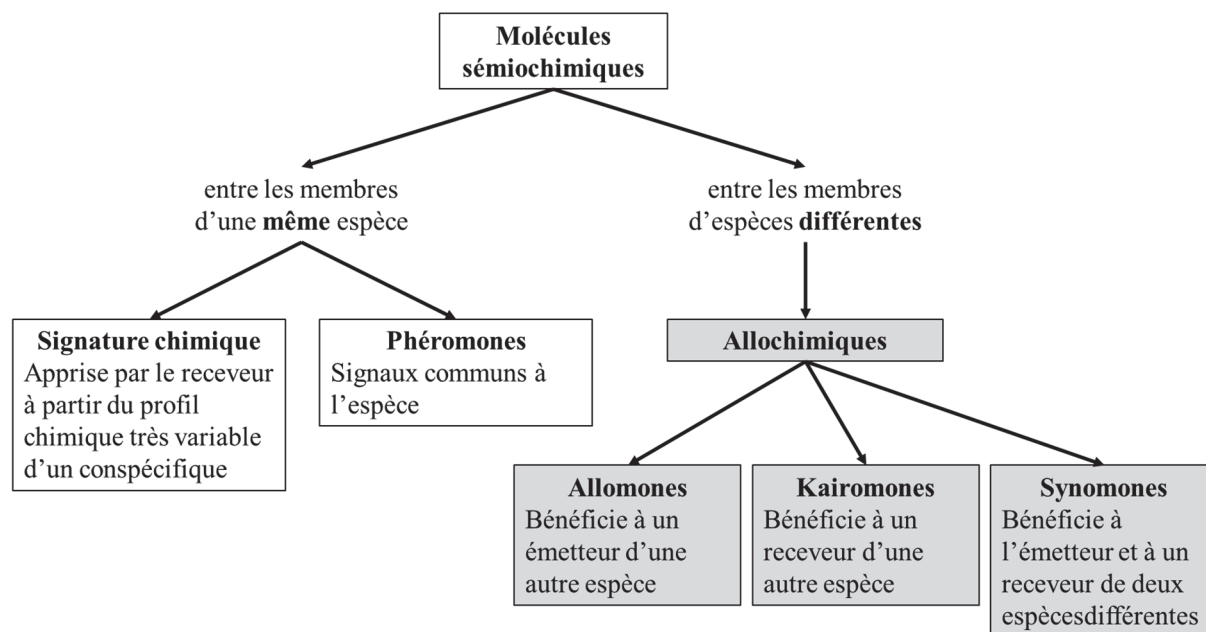


Figure 1. Définitions des différentes molécules impliquées dans les interactions entre les individus, basée sur le schéma de (Wyatt 2014).

Chez les mammifères, peu de molécules chémiochimiques ont été identifiées, par rapport aux insectes ou aux plantes (Apps 2013). La plupart des phéromones connues sont celles émises par les animaux de laboratoires, domestiques ou captifs, pour lesquels les échantillons peuvent être facilement collectés (Wyatt 2014; Greenwood et al. 2005; Barja and de Miguel 2010; Soso 2016; Poddar-Sakar and Brahmachary 1997; Burger 2005).

Théoriquement, l'étude des molécules chémiochimiques présentes dans les sécrétions repose sur la mise en évidence, au préalable, d'une réponse comportementale des animaux exposés à ces sécrétions. Ce principe a été énoncé par Wyatt (2015), selon qui l'isolement des phéromones implique une démarche expérimentale comprenant les quatre étapes suivantes : 1) la démonstration d'une réponse physiologique ou comportementale induite par une odeur, 2) le développement d'un test biologique (bio-essai) robuste, 3) l'identification et la synthèse de la molécule bioactive suivi par 4) la confirmation de l'activité de ce composé par bio-essai. Il n'a pas été possible, dans le cadre de ma thèse de réaliser des expériences comportementales directes en raison notamment du peu d'animaux captifs disponibles pour cette recherche. Par conséquent, nous avons choisi une approche alternative indirecte : une analyse chimique

descriptive basée sur l'identification des molécules présentes dans les excréments des cétacés. Le principe de cette étude est de comparer les profils chimiques des individus afin d'identifier de potentielles différences selon le sexe ou l'âge. La mise en évidence de telles différences (par exemple, un profil chimique spécifique aux femelles mûres sexuellement) constituerait un argument en faveur d'une possible communication chimique chez les cétacés. De plus, cette analyse pourrait nous permettre d'identifier des composés ou des mélanges de composés excrétés uniquement par certains groupes et qui seraient susceptibles de jouer un rôle de phéromone.

La première étape d'échantillonnage constitue, en soi, un défi majeur car la manipulation des animaux est impossible chez les mysticètes, et très difficile chez les odontocètes en dehors des dauphins maintenus en captivité. Par ailleurs, ces derniers n'étant pas toujours entraînés pour se prêter volontairement aux prélèvements biologiques, le nombre d'échantillons disponibles s'en trouve considérablement limité. L'analyse de l'air exhalé (souffle), qui peut être prélevé à proximité de l'évent, sans nécessairement imposer de manipulation à l'animal et adaptable au milieu naturel, nous a paru une idée ingénieuse pour initier cette étude. Nous avons donc réalisé des prélèvements de souffles sur lingette de coton chez deux individus mâles (un dominant et l'autre subordonné) de grands dauphins en captivité (Planète Sauvage, France), afin de mettre au point les protocoles de collecte, de stockage, d'extraction et d'analyses des composés. Ces lingettes sont produites en Hongrie (Prada et al. 2010) et utilisées pour les prélèvements chimiques par le service central d'identité judiciaire de Lyon (INTERPOL). Après une phase de test de plusieurs méthodes d'extraction (avec solvant, flux de gaz chauffant, etc.), nous avons choisi d'utiliser la micro-extraction en phase solide (SPME) qui permet d'extraire un maximum de composés. Les premiers résultats obtenus étaient prometteurs puisqu'ils nous ont permis de valider la méthode expérimentale et d'identifier des composés émis spécifiquement par les individus et non présents dans les contrôles (air ambiant). Nous avons également observé des différences de profil chimique entre les individus qui pourraient être reliées à des caractéristiques individuelles telles que l'âge, l'état sanitaire, ou la position dans la hiérarchie du groupe (Fig. 2A). Afin d'avoir accès à un plus grand nombre d'animaux, et dans des conditions naturelles, nous avons alors débuté la collecte d'échantillons chez des cétacés sauvages, en commençant par la baleine à bosse (au

cours de la campagne effectuée à Madagascar pour les expériences comportementales) pour des raisons pratiques : cette espèce peut être approchée relativement facilement et son souffle est d'un volume supérieur à celui des odontocètes. Nous avons ainsi prélevé à partir d'une embarcation légère, des échantillons d'air exhalé sur des lingettes placées sur des perches de 5 m puis placées dans un pot de verre opaque et conservées à -20°C jusqu'à analyse. Cependant, les analyses chimiques réalisées sur ces échantillons ont révélé une forte contamination des prélèvements contrôles notamment, (Fig. 2B) rendant les échantillons inexploitable. Cette contamination a pu avoir lieu aussi bien lors de la collecte des échantillons sur le site, que lors du transport des lingettes voire de leur stockage avant analyse. Par conséquent, l'exploitation scientifique des échantillons d'air exhalé de cétacés sauvages nécessite encore une importante phase de mise au point pour déterminer les causes exactes de contamination afin de les réduire au maximum dans les conditions non aseptisées du travail de terrain.

Face à ces complications méthodologiques, nous avons alors décidés de tenter d'exploiter d'autres types d'excrétions : les urines et les fèces. Ces excréta sont connus pour contenir des molécules sémiologiques chez de nombreuses espèces de mammifères dont les artiodactyles (Müller-Schwarze 1991, Dehnhard 2011, Karthikeyan et al. 2013). Kuznetsov (1990) a été le seul à réaliser des expériences de stimulation par des excréta chez les cétacés et a obtenu des résultats encourageants. Il a montré que l'irrigation de leur cavité orale avec des excréta de congénères (urine ou fèces diluées jusqu'à 1 :100) provoquaient une augmentation des fréquences respiratoire et cardiaque et une réponse galvanique. Les excréta de cétacés sont donc susceptibles contenir des molécules informatives, comme c'est le cas chez certains de leurs cousins terrestres. La collecte d'urine, de fèces, ou autres sécrétions chez les individus sauvages (baleine à bosse), en prélevant l'eau de l'empreinte caudale (tâche à l'aspect huileux laissée dans le sillage des animaux lorsqu'ils sondent) a également été envisagée et initiée. Ces prélèvements représentent également un défi important en raison de la forte concentration de NaCl dans les échantillons, ce qui nécessite des méthodes de traitements et d'extraction que nous n'avons pas encore pu mettre en œuvre. De ce fait, j'ai proposé d'initier la collecte d'excréta chez les animaux fraîchement échoués, qui nous permettrait potentiellement d'avoir accès à de nombreux prélèvements chez une même espèce. Le département de pathologie de la Faculté Vétérinaire d'Utrecht, qui réalise la majeure partie

des nécropsies de cétacés échoués sur les côtes hollandaises (principalement des marsouins communs), a accepté de participer à cette recherche en collectant l'urine et les fèces sur tous les marsouins échoués, lorsque cela était possible. Après 10 mois de collecte systématique en 2016, nous avons ainsi disposé d'une trentaine d'échantillons ce qui nous a permis de réaliser une première étude chez cette espèce, qui sera complétée par d'autres prélèvements en 2017 pour atteindre une centaine d'individus inclus dans l'étude.

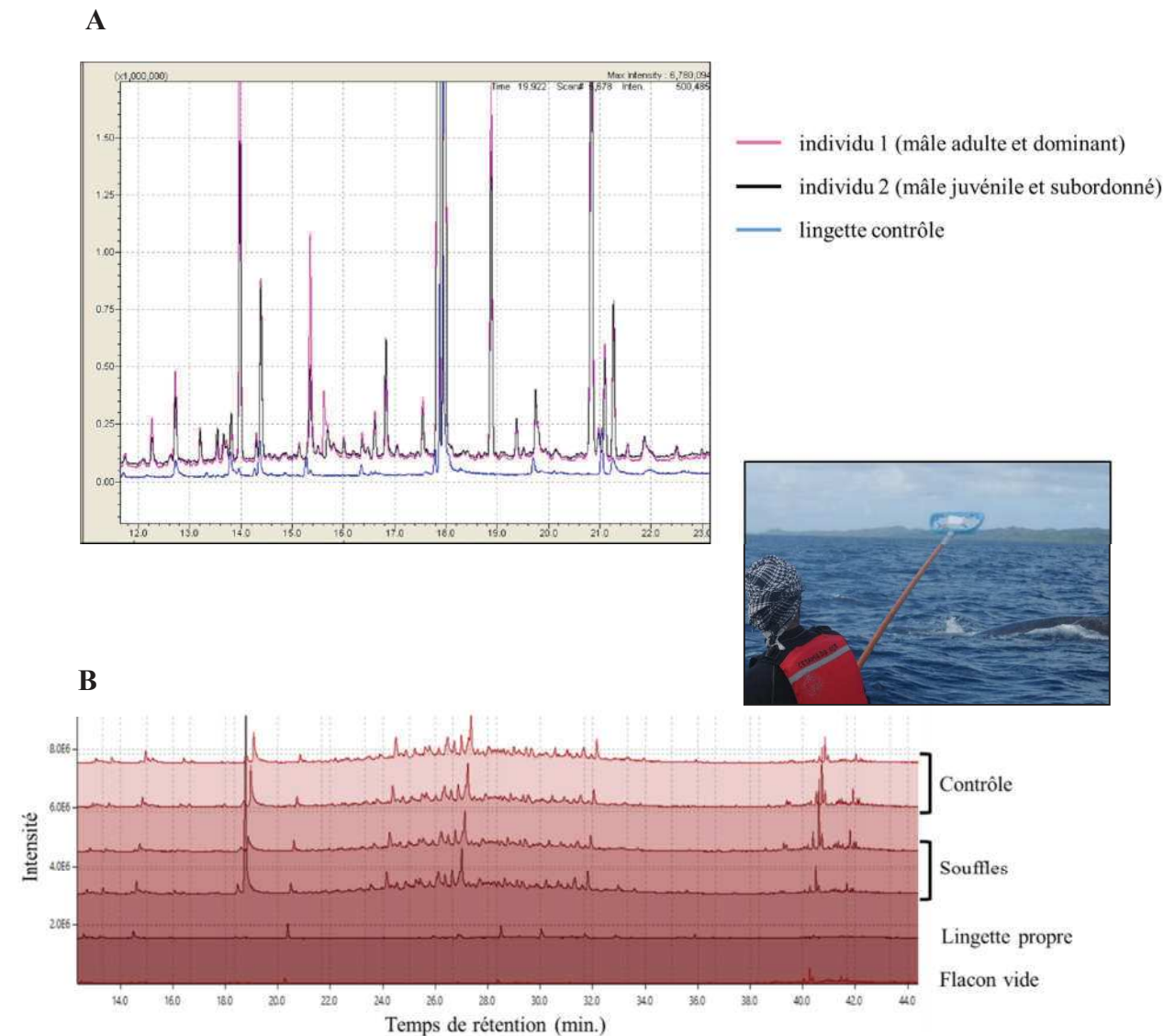


Figure 2. Profils chimiques en GC-MS de l'air exhalé (souffle) d'odontocètes et les mysticètes extraits sur fibres SPME. (A) Comparaison des profils chimiques de souffles de grands dauphins mâles et comparaison avec une lingette contrôle (lingette exposée aux mêmes conditions environnementales et pendant la même durée que lors du prélèvement de souffle). (B) Comparaison des profils chimiques de souffles de baleine à bosse (prélèvement illustré sur l'image encadrée), de lingettes contrôle, de lingettes propres (non utilisées) et de flacon vide (non utilisé). Contrairement aux analyses chez les grands dauphins, les profils des lingettes contrôles sont ici identiques aux souffles, indiquant une contamination pendant la collecte, le transport ou le stockage. Cette contamination rend les échantillons de souffle inexploitable pour l'étude des profils chimiques.

Résumé français de l'étude :

Les cétacés sont les descendants de mammifères terrestres qui se sont adaptés à un mode de vie totalement aquatique. Cette évolution singulière s'est accompagnée d'une profonde réorganisation de leurs systèmes de chémoréception (principalement olfaction et gustation). Alors que plusieurs observations empiriques suggèrent une possible communication chimique intra-spécifique, la présence de phéromones dans leurs sécrétions n'a jamais été étudiée. La disponibilité des échantillons biologiques étant un des principaux facteurs limitant chez ces espèces, nous avons testé la possibilité d'utiliser les excréta d'animaux échoués. Nous avons ainsi initié la collecte d'échantillons d'urines et de fèces de marsouins communs (*Phocoena phocoena*) fraîchement échoués sur les côtes hollandaises et analysé les composés présents après micro-extraction en phase solide (SPME) suivie d'une séparation en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Alors que les résultats montrent que les profils chimiques des urines sont très différents des fèces car ils contiennent chacun des composés spécifiques, certaines molécules (42 sur les 189 identifiées au total) sont communes aux deux excréta. De plus, il existe une différence significative dans la composition des fèces en fonction du degré de masse adipeuse et de la cause de la mort. Ceci suggère que des processus métaboliques présents uniquement chez les individus émaciés, probablement liés à des maladies chroniques, influent sur le profil chimique des fèces par rapport aux individus ayant un bon degré de masse adipeuse (le plus souvent mort de cause accidentelle ou de prédation). Chez ces derniers, nous n'avons pas trouvé de différence significative dans la composition des fèces en fonction du sexe ni de l'âge. Cependant la puissance statistique de nos tests s'est trouvée limitée par le faible nombre d'échantillons inclus dans cette étude. Ces premiers résultats suggèrent que l'analyse chimique des fèces pourrait être une aide dans la détermination de la cause de la mort chez les cétacés. De plus, les excréta d'animaux échoués en bonne santé et prélevés rapidement après le décès semblent constituer des échantillons exploitables dans la recherche de molécules impliquées dans la communication chimique chez ces mammifères marins.

Présentation de l'article (en anglais) :

Titre : Exploration of the chemical compounds in stranded harbour porpoises' excreta using GC-MS. One possible means of finding pheromone-like compounds in cetaceans?

Auteurs : Marianne Gabirot, **Bertrand Bouchard**, Lonneke L. IJsseldjik, Aurélie Célérier et Sylvie Campagna

Statut de publication : En préparation (d'autres échantillons collectés en 2017 doivent compléter l'étude)



Photo: Fjord and Baelt
<http://www.fjord-baelt.dk/>

Exploration of the chemical compounds in stranded harbour porpoises' excreta using GC-MS: one possible means of finding pheromones in cetaceans?

Marianne Gabirot¹, Bertrand Bouchard^{1, 2}, Lonneke L. IJsseldijk³, Aurélie Célérier^{1, 2*} and Sylvie Campagna^{1, 4*}

¹CEFE UMR 5175, CNRS - Université de Montpellier - Université Paul-Valéry Montpellier - EPHE – 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France.

²Université de Montpellier, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France.

³Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, Yalelaan 1, NL-3584 CL Utrecht, The Netherlands.

⁴Université de Nîmes, 30021 Nîmes Cedex 1, France.

* Co-corresponding authors: sylvia.campagna@cefe.cnrs.fr and aurelie.celerier@cefe.cnrs.fr

KEYWORDS: urine; faeces; harbour porpoise; *Phocoena*; chemical analysis; SPME; semiochemical; stranding; pheromone

A. ABSTRACT

Cetaceans are descendants of land-living mammals which returned to water for a fully aquatic life. This singular evolutionary history was accompanied by a profound reorganization of their chemosensory system (olfaction and gustation). While behavioural evidences of chemoreception in toothed whales have been reported, nothing is known about pheromone-like compounds secreted by these animals and their potential implication in chemical communication. In order to overcome the challenges of sampling living animals, we initiated a chemical analysis of 20 faecal and 9 urine samples collected from harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded along the Dutch coastline. Volatile and semi-volatile compounds were extracted using solid phase microextraction (SPME) followed by an analysis by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS). Our results show that a higher chemical diversity is found in the headspace of faecal than urine samples (150 vs. 81 analytes, respectively) while 42 molecules are shared by both excreta. We were able to associate several chemical compounds with the animals' diet or environment. Our results show that faecal chemical profiles are mainly influenced by the cause of death and the body condition of the animal. However, the true impact of specific pathogens or diseases on the chemical composition of faeces is still unknown. For both urine and faecal samples, no significant difference in chemical profiles was observed between sex or age classes. However, these results may be due to the small sample size of the present study. More material from animal that died in healthy conditions (especially neonates) is thus needed to increase the statistical power of our analyses and identify potential pheromone-like compounds in cetaceans' excreta. Other extraction methods such as liquid chromatography may also reveal the presence of water-soluble semiochemicals in these samples.

B. INTRODUCTION

Within mammals, marine species and especially cetaceans represent the « orphan child » of the research in chemical communication, despite the fact that most species display highly social interactions and behaviours (Wyatt 2014). The few behavioural and anatomical studies focusing on chemoreception have mainly been undertaken in semi-aquatic mammals such as pinnipeds (Hardy et al. 1991, Dobson & Jouventin 2003, Kowalewsky et al. 2006, Laska et al. 2008, Pitcher et al. 2011). However, despite these experimental evidences, the potential presence of semiochemicals in pinniped secretions has only been investigated in one recent study (Stoffel et al. 2015). Chemical fingerprinting of skin secretions collected onto cotton swabs was analysed in conjunction with genetic analyses in order to explore the chemicals potentially involved in mother–offspring recognition in Antarctic fur seals (*Arctocephalus gazella*). By sampling mother–offspring pairs from two different colonies, it appears that colony membership, mother–offspring similarity and genetic relatedness were all chemically encoded. Interestingly, several compounds displayed similarities to known pheromones, consistent with the suggestion that pheromone-like chemical signals could be involved in kin recognition in this marine mammal (Vaglio 2009). While chemoreception seems effective in pinnipeds, the use of this sense by fully aquatic species remains unclear.

Cetaceans, in particular, present a significant regression of most of their olfactory and gustatory receptor gene repertoire (McGowen et al. 2008, Jiang et al. 2012, Feng et al. 2014, Kishida, Thewissen, Hayakawa, et al. 2015). Most of the odorant receptor (OR) genes are pseudogenized in toothed whales (odontocetes; about 80%) and in a lesser extent in baleen whales (about 60%) (Kishida et al. 2007). The corresponding anatomical structures have strongly regressed during their adaptation to the aquatic environment to become rudimentary or even totally absent in toothed whales, which lack the main and accessory olfactory tracts as well as the cribriform plate and ethmoturbinals (Oelschläger & Buhl 1985, Pihlström 2008). This unique case within mammalian taxa probably explains why there has not been any experimental investigation of chemical communication in cetaceans. Therefore, the question that logically arises is: have cetaceans lost this important sensory channel? This issue remains still open as several anatomical studies have brought contradictory statements about the absence of chemosensory

abilities in cetaceans. For example, toothed whales possess a well-developed olfactory tubercle (Oeschlager & Oeschlager 2009) and at least one species, the bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), exhibits a well-developed gustatory thalamus (Kruger 1959) and prominent olfactory lobes possibly activated by the trigeminal nerve (Jacobs et al. 1971). These sparse examples suggest that if a chemical communication does exist in cetaceans, the neural circuits that process the putative chemical signals may clearly have no analogy with terrestrial mammals.

A debate on the existence of chemical communication in cetaceans has been brought by several authors. For example, the presence of an alarm pheromone has been suggested in beluga (*Delphinapterus leucas*) after they have been observed to react to their congeners' blood in water by either quickly escaping or becoming unusually excited (Lowell & Flanigan 1980). Similarly, spinner dolphins (*Stenella longirostris*) appear to swim deliberately through their schoolmates' excrements (Norris et al. 1994). Odontocetes also urinate almost constantly, leading to the assumption their urine may contain chemical information (sexual pheromones) (Norris & Dohl 1979). Only one behavioural experiment has so far shown that solutions of urine and faeces, when irrigated in the oral cavity of captive bottlenose dolphins, can induce an autonomous physiological response (increase in heart rate, respiratory rate and skin conductivity) (Kuznetsov 1990). Additional studies are crucial to shed light on a potential chemical communication in cetaceans, but they appear almost impracticable *in natura*. Even if audio-visual tools have improved recently, providing high-quality underwater and aerial observations, the collection of biological samples that might contain semiochemicals remains a serious obstacle to such studies. A low number of captive individuals available for research, logistical challenges *in situ* for collecting and storing samples and salt water as environment of chemical diffusion are few examples of the challenges that make research on chemoreception in marine mammals a difficult task. Moreover, behavioural response experiments require substantial volumes of biological material which are not difficult to collect. Nevertheless it is technically possible to collect excreta (urine and faeces) during necropsies on stranded animals. We thus tested whether this type of "unusual" samples could be suitable as a first step in the search of cetacean's semiochemicals. We thus initiated this work by analysing urine and faecal samples from harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) that stranded along the Dutch coastline (often due to bycatch incidents). This species of toothed whales was selected due to its presence in great

numbers (345 to 873 individuals per year) in stranding events (Keijl et al. 2016). Another argument for selecting this species was the presence of chemoreceptive cells air sacs (frontal and vestibular sac) close to the blowhole (Behrmann 1988). Although they generally live in small groups of two or three animals, they also display social behaviours in summer during reproduction, when they gather in larger groups of up to several hundred individuals (Sørensen & Kinze 1994).

As previous work has shown that odontocetes react to odorants as well as to their congeners' excreta (Kuznetzov 1990), we focused on volatile and semi-volatile compounds found in faeces and urine. Molecules present in the samples headspace were collected using solid phase micro-extraction (SPME) and then analysed using gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS). For this initial work, we evaluated the impact of the cause of death on the chemical composition of urine and faecal samples from stranded porpoises. This would allow us to determine whether some animals killed by specific conditions are better suitable for the search of pheromone-like compounds, which are related to individual condition such as sex or age (juvenile, neonate, adult). As it was not possible to sample the same individual more than once, we only looked for the presence or absence of chemicals compounds in the different individuals and not to any quantitative relationships among multiple components that could encode chemical signals. In other words, our analysis focused on putative single pheromone-like compounds and not on signature mixtures nor multicomponent pheromones. While this could appear as an important limitation, most of the semiochemicals identified so far in mammals appear to be single compounds rather than mixtures (Apps 2013).

C. MATERIALS AND METHODS

1) Sample collection

All samples included in this study were collected at the Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, during necropsies on harbour porpoises that stranded along the Dutch coastline in 2016 (Table 1). Faecal samples were collected in the distal part of the digestive tract from 9 females (2 adults, 5 juveniles and 2 neonates) and 11 males (3 adults and 8 juveniles); urine samples were collected using a sterile syringe in the bladder from 2 females (juveniles) and 7 males (1 adult, 4 juveniles and 1 neonate) (Table 1). All samples were immediately stored at -20 °C in plastic vials (faeces) or in cryotubes (urine) until further analysis. In parallel, controls were made using osmosed water which was stored in the same conditions as the samples.

<i>Individual (identification code)</i>	<i>Sex: Male (M) and Female (F)</i>	<i>Age: Adult (A), Juvenile (J) and Neonate (N)</i>	<i>Cause of Death</i>	<i>Nutritional condition code</i>	<i>Samples: Faeces (F) and Urine (U)</i>
MA1 (1494)	M	A	Infectious	3	U
MA2 (1512)	M	A	Infectious	4	F
MA3 (1522)	M	A	Bycatch (?)	2	F
MA4 (1531)	M	A	Infectious	3	F
MJ1 (1495)	M	J	Emaciation	6	F
MJ2 (1497)	M	J	Infectious	1	F and U
MJ3 (1504)	M	J	Live stranding	1	F
MJ4 (1510)	M	J	Unknown	2	F and U
MJ5 (1511)	M	J	Emaciation	6	F and U
MJ6 (1515)	M	J	Live stranding	2	F
MJ7 (1516)	M	J	Bycatch (?)	2	F and U
MJ8 (1517)	M	J	Grey seal attack	2	F
MN1 (1536)	M	N	Emaciation (starvation)	2	U
MN2 (1549)	M	N	Grey seal attack (?)	1	U
FA1 (1508)	F	A	Infectious	1	F
FA2 (1527)	F	A	Infectious	6	F
FJ1 (1505)	F	J	Grey seal attack	2	F and U
FJ2 (1513)	F	J	Grey seal attack	4	F
FJ3 (1514)	F	J	Infectious	3	F and U
FJ4 (1518)	F	J	Infectious	3	F
FJ5 (1521)	F	J	Unknown	2	F
FN1 (1524)	F	N	Perinatal death	3	F
FN2 (1525)	F	N	Grey seal attack	4	F

Table 1. Characteristics of the samples (urine and faeces) collected from stranded harbour porpoises. For each animal, the nutritional condition code was scored on a scale from 1 (very fat and muscular) to 6 (emaciated). A question mark (?) indicates an uncertain cause of death.

2) Extraction and chemical analyses

For this study, the choice of using solid phase micro extraction (SPME) from the headspace of urine and faecal samples was made because this solvent-free method requires minimum steps and minimize the interferences and impurities introduced to samples with solvents. Divinylbenzene / PDMS coating was selected as this it allows the adsorption of a broad range of analytes, specifically volatile and/or semi-volatile compounds.

We directly collected about 0.6 - 1 g of frozen faeces or urine (approximately 0.5 ml) using a clean stainless steel spatula. The sample was defrosted at room temperature during 15 minutes. Samples were then placed in an incubator at 36°C for extraction. Chemical compounds were captured directly from the headspace of each sample glass jar onto a 65- μ m coated Polydimethylsiloxane / Divinylbenzene (PDMS / DVB) composite Stableflex fibre (Supelco, Bellefonte, PA, USA) (Fig. 1). Each fibre was exposed for 2 h at 36 °C (porpoise's physiological temperature). Controls were prepared using osmosed water instead of urine or faeces and stored under the same conditions as the samples.

The analyses were performed using a GC-MS system (GC 6890N, MSD 5973N, Agilent Technologies, Wilmington, USA) equipped with a split / splitless injector, in the splitless mode, at 250 °C during the chromatographic run. After extraction, the compounds were immediately desorbed from the fibre at 250 °C in the injection port of the GC-MS for 2 min. and separated in a Optima 5MS-MS capillary column (30 m length, 0.25 mm inner diameter, 0.25 μ m film thickness, Macherey-Nagel, Düren, Germany). The GC-MS temperature program of the run was as follows: initial oven temperature was held at 40 °C for 5 minutes, then the temperature was ramped up at a rate of 5 °C/min to 220 °C, then a second ramp was applied at a rate of 10 °C/min to 250 °C with a 5 minute hold at this temperature. The mass spectrometer was run in electron impact (EI) ionization mode, scanning the mass ion range of 40–350 amu. The mass detector conditions were: transfer line temperature of 250 °C, ion source temperature of 200 °C and ionization mode with electron impact at 70 eV. The n-alkane standard solution C8-C20 (0.1 μ L of the alkane mixture at a concentration of 40 mg/L each, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) was used for calibration and determination of the retention index (RI).

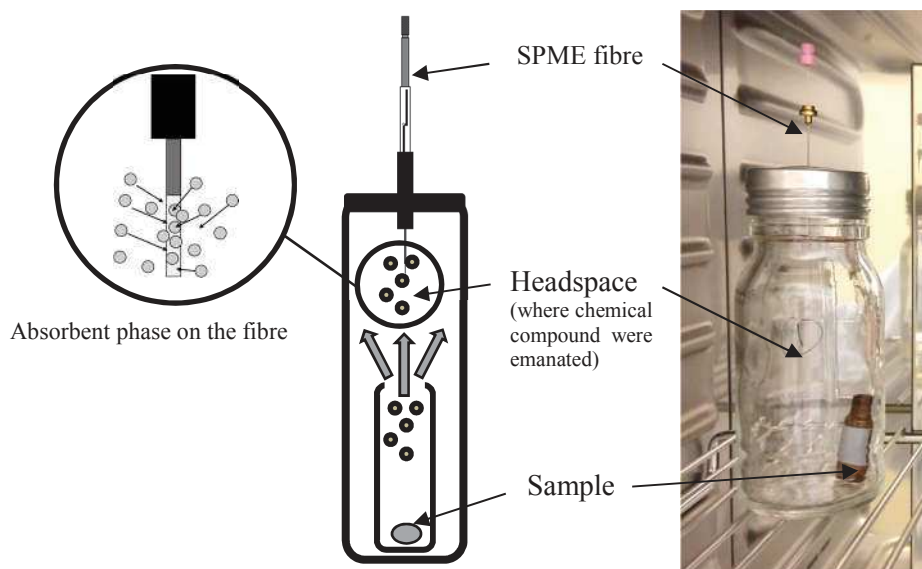


Figure 1. Static headspace sampling with a solid phase micro-extraction (SPME) device of chemical compounds from urine or faeces of harbour porpoise. The device was incubated 2h at 36°C in an incubator.

3) GC-MS analyses

Chromatograms were de-convoluted and integrated using the Automated Mass Detection and Identification System (AMDIS, NIST). The quality of all software-defined peak detections and identifications was visually reviewed and manually corrected when necessary. Analytes were putatively identified by comparison of mass spectral data using the NIST Mass Spectral Search Program v2.0© (Faircom Corp., Columbia MO, USA). Spectral matches were cross-checked with the calculated retention index (RI) of the molecule. The data was used to construct a custom RI mass spectral library, which contain a) components which showed high spectral match (> 80 %) and good RI fit and which were added as putatively identified, b) compounds with high spectral match and low RI fit which were added as substance class e.g. 'alkane' and c) compounds that were recurrent at the same RI but no identifiable to substance class level, which were added as 'unidentified'. A final report file was created with data from every signal found in samples, blanks (i.e. empty headspace) and controls (i.e. with osmosed water). Data processing was essentially 'blind' as uninformative codes were given to all samples and used in all analytical steps until the final data set was obtained. Chromatograms were

aligned using the Pivot table function in Excel and alignment checked against RI values. The ‘integrated area’ value was used for further processing, which involved removal of compounds consistently present in controls (replacing excreta by osmosed water, stored by same protocol to control storage and sample preparation contamination) and blanks (i.e. empty headspace without excreta or water to control fibre method and instrument contamination) and compounds from non-biological origin.

4) Statistical analyses

We first described chemical profiles and analyte families found in urine and faecal samples. We then compared the chemical components found in urine, in faeces but also in both excreta. Afterwards we measured the effect of different factors: cause of death (infectious or emaciation vs. accidental), sex (female vs. male) and age (juvenile vs. neonate vs. adult). During necropsy protocol different causes were characterized: infectious, emaciation and accidental such as grey seal attack, bycatch or live stranding. Because of the small quantity of urine sample available (2 females, 7 males or 6 juveniles, 2 neonates, 1 adult), we were only able to analyze the factor “cause of death” in these samples. Integrated areas of each chemical compounds were normalized by the total per individual. All data were square-root transformed. We then created a matrix by Euclidean resemblance to observe differences between relative proportions of VOCs in chemical profiles. All chemical data were initially analyzed with an unconstrained PCO ordination based on resemblance matrix to visualize the patterns of differences in the multivariate chemical structure among samples as described in Mardon et al. (2010). Chemical profiles were next compared with n-factor PERMANOVA (Anderson 2001, McArdle & Anderson 2001) using 9999 permutations (Mardon, Saunders, et al. 2010). PERMANOVA allows distance-based tests of significance for comparing a priori groupings. P values were obtained using 9999 permutations of residuals under a reduced models (Freedman & Lane 1983) and Type I (sequential) sums of squares (SS). Pairwise comparisons were made using constrained permutation tests. CAP models that had a good discriminating capability between groups were examined to identify the VOCs associated with the different chemical signals. We calculated the Pearson correlation (r) between the individual molecules and the model CAP axes. All statistical analyses were carried out using the computer program PRIMER V.7.0.5 PERMANOVA+1 (Primer-E Ltd[©]).

D. RESULTS AND DISCUSSION

1) Description of chemical compounds found in the headspace of urine and faeces

81 different chemical compounds were detected in the headspace of urine samples and 150 compounds in the headspace of faecal samples, but only part of them were identified (Supplementary data S1). The chemical classes of the compounds found in these two excreta were clearly distinct (Fig. 2).

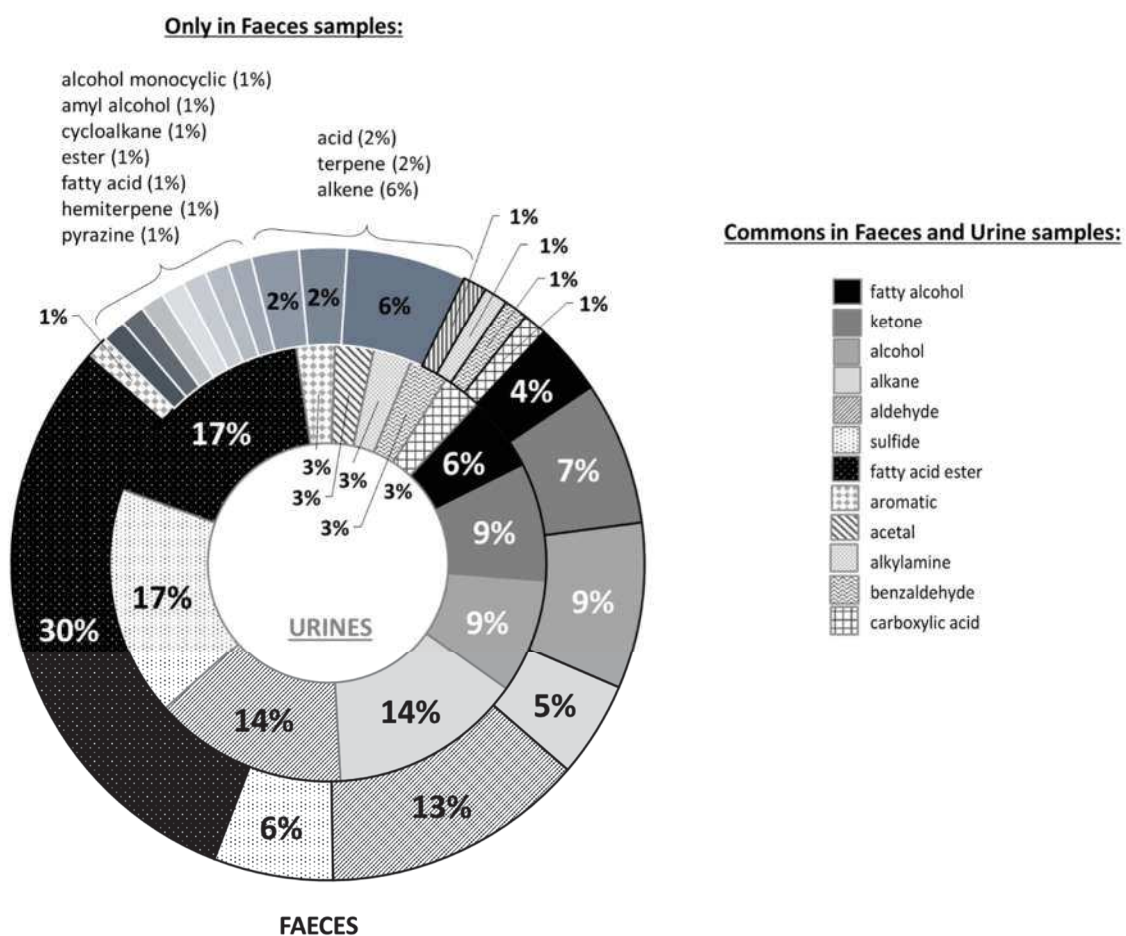


Figure 2. Relative numbers of compounds in each chemical class that were detected in faecal and urine samples from stranded harbour porpoises. Proportions are based on number of different compounds identified and not upon their relative concentrations.

A significant difference was found between their chemical profiles (PERMANOVA test: Pseudo-F1, 28 = 5.10 $p = 0.0001$; Supplementary S2). Only a portion of these chemicals was present in each sample and about 44 and 28 molecules were found in average in one individual's urine and faecal samples, respectively (Fig. 3). Among the 189 molecules detected in total, 42 (22.2%) were present in both substrates while 39 (20.6%) chemical compounds were exclusively found in urine samples and 108 (57.2%) exclusively in faecal samples. It can be hypothesized that molecules shared by both excreta are the products of chemical conversions undertaken by the liver with no further modification. The other molecules are likely to be the products of modifications from other organs, of microbial conversions or even of unusual metabolic activity due to diseases. Even the bladder, which was only previously considered as a storage organ for urine, is capable of biotransformation at least in humans (Vaziri et al. 2001). The marked differences in chemical profiles between urine and faeces are therefore not surprising and reported in a recent review on volatile compounds from human body (De Lacy Costello et al. 2014). As for human, fatty acid esters constitute one of the predominant chemical class in faeces and its proportion is higher in faeces than in urine (30% and 17%, respectively). Among the nine molecules that are ubiquitous in human urine volatile components (Smith et al. 2008), none was found in our samples. Most of them are supposed to arise from the gut as they are also ubiquitous in human faeces, therefore these differences may be due to cetacean's highly-specialized diet and/or their microbiota. Interestingly, none of the acids (ethanoic, propionic, butanoic, pentanoic, and hexanoic acids), generally produced by the carbohydrates fermentation in the gut by *Bacteroides* sp. were found. However, 2-methylbutanoic acid and branched-chain fatty acids were identified, and are principally produced by gut microbial action on proteins via the respective branched amino acid (De Lacy Costello et al. 2014). This is entirely consistent with the piscivorous diet of harbour porpoises. Similarly, methionine that is found in high quantities in fish is used in the metabolism of Clostridia in the gut (Smith & Macfarlane 1997) to produce at least some of the sulphide compounds detected here in the faeces. On the contrary, the presence in one sample of faeces of two terpenes that are found in plants is more surprising. However, one of them (i.e. phytol) is found in high quantities in edible marine algae (Huang et al. 2016) and could have been ingested accidentally by one animal and not digested hence its presence here.

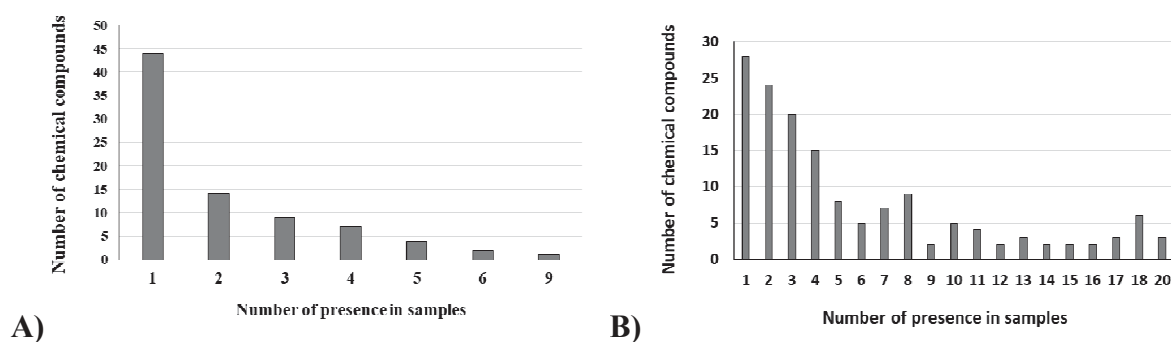


Figure 3. Presence of chemical compounds in A) urine samples (n = 9 individuals; total of compounds = 81) and B) faeces samples (n = 20 individuals; total of compounds = 150). For example 44 chemical compounds in urine were found in only one individual; at the contrary one analyte was encountered in all 9 urine samples.

2) Impact of the cause of death on chemical profiles

We then analyzed the impact of the factor « cause of death » on the chemical profiles by creating 2 categories: deaths that are due to infectious diseases or poor overall conditions (nutritional condition code of 5 or 6) and deaths caused by by-catch, grey seal attack and unknown reasons but with a healthy nutritional condition code (i.e. low number code). In the first category, we made the assumptions that the presence of an infection (micro-organisms) or a poor body condition could have led to important changes in the physiology and therefore in the metabolites excreted by the animal. The consequences of these processes would then be noticeable in the chemical profiles of the urine and faeces. However we did not observe any significant variation between urines chemical profiles according to the cause of death of the animals, considering all compounds and specific urine chemical components (PERMANOVA test: $p > 0.5$ for both; Table 2). In faeces, however, we observed an effect of the cause of death between infected and non-infected animals using all chemical compounds encountered in faeces and also faeces-specific analytes ($p < 0.04$ for both; Table 2; Supplementary data S3 & 4). Chemical profiles distinguished the cause of death in CAP on a single axis obtained in PCO axes ($m = 4$ for all compounds (n = 150); $m = 6$ for faeces specific compounds (n = 108); details in supplementary data S3 & 4). The leave-one-out misclassification error was 5 % for the samples used to build the CAP model

for both. Chemical compounds from faecal samples differed between individuals that died from an infection or emaciation and individuals that were killed suddenly (from bycatch or grey seal attack). Chemical analytes such as butanal,3-methyl-, 1-butanamine,2-methyl-N-(2-methylbutylidene), tetradecanal, tetradecane,2,6,10-trimethyl-, 2,3-dimethyl-1-hexene, 4-methyl-1-heptyn-3-ol were found more often in infectious or emaciated individuals than in other animals (Pearson correlation $r > 0.43$ from CAP model). Some of these molecules might probably be used as biomarkers of diseases although complementary analysis are required to determine the exact cause of death. On the contrary, infectious/emaciated individuals had lower quantities of several compounds such as 9,12,15-octadecatrienal, 2-hexene 3,5,5-trimethyl, butanoic acid 2-ethyl-1,2,3-propanetriyl ester, 2,4-decadienal, cyclohexanone 2-butyl-, 5,9-undecadien-2-one,6,10-dimethyl, decanoic acid,ethyl ester, n-octen-1-ol, 2-octenal, 2-nonanone 3-(hydroxymethyl), 10-undecyn-1-ol and ethyl 9-decenoate (Pearson correlation $r > 0.43$).

<i>Factor</i>	<i>PERMANOVA test</i>	<i>CAP Model</i>
Urine (considering all 81 compounds)		
Cause of Death	F1,8 = 0.81 p = 0.64	-
Urine (considering 39 specific compounds)		
Cause of death	F1,8 = 0.77 p = 0.83	-
Faeces (considering all 150 compounds)		
Cause of Death	F1,19 = 1.78 p = 0.04	95% of good classification group (19/20) using m = 4 PCO axes
Faeces (considering 108 specific compounds)		
Cause of Death	F1,19 = 1.86 p = 0.02	95% of good classification group (19/20) using m = 6 PCO axes
Faeces (considering 108 specific compounds) of individuals died suddenly in a good overall body condition		
Sex	F1,9 = 1.29 p = 0.22	-
Age	F2,9 = 0.90 p = 0.59	-

Table 2. Statistical test by n-factor PERMANOVA (using 9999 permutations; Pseudo-F and p) and CAP models (percentage of correct classification within group according with factor selected). Two factors were tested in urine and faeces samples: sex and cause of death, considering different pool of chemical compounds (all analytes found in samples and specific molecules to one sample type).

Several reasons could explain these differences in the chemical profiles between animals that suffered from a chronic stress and the ones that died in healthy condition. For example, the poor overall body condition of the animals could presumably lead to a decrease in quantity and/or in quality of their diet. Important changes in their gut microbiota might also have occurred as a consequence of the presence of pathogens as well as modifications in the physiology of organs involved in the chemical conversions. As a consequence, the search of putative pheromone-like compounds was restricted to the chemicals from individuals that died from by-catch, grey seal attack or unknown reasons but that still a good overall body condition.

3) Search of putative semiochemicals in urine and faeces from stranded harbour porpoises.

As explained above, an analysis of the presence/absence of each compound was only undertaken in the samples from animals that stranded with no supposed infection and/or chronic diseases. In urine samples, it was not possible to compare the chemical profiles between females and males due to the low number of females matching our criteria (1 sample, FJ1 in Table 1). For similar reasons, we were not able to make any comparison according to the age (sexual maturity). Surprisingly, only one unidentified compound (with RI = 1117) was found to be ubiquitous in the urine samples. Nevertheless more urine samples need to be included in order to assess the presence of potential specific sexual chemical profiles in the harbour porpoise. However, it was obvious that one of our sample collected from a male neonate (MN2 in Table 1) stands out as it displayed a high number of specific compounds that were not found in the other animals (Table 3). Among the twenty compounds (13 identified and 7 unidentified) specific to this neonate's urine, several aldehydes could arise from lipid peroxidation and therefore from a high oxidative stress. As oxydative stress is considered to be an important component of various diseases and it is therefore difficult to make any assumption about the presence of these compounds. More likely, the milk-based diet of this neonate would explain this result at least partly, because several aldehydes (as hexanal and heptanal) are found in the milk of mammals including humans (Elisia & Kitts 2011). Other compounds specifically found in the urine of neonate MN2, such as butanoic acid, 2-methyl-ethyl ester, 1-Octen-3-ol or 2-ethyl-1-hexanol, are usually found in faeces as this is the case for several samples in

this work (Table 3). These compounds were also reported in significantly higher concentrations in the faeces of human neonates (De Lacy Costello et al. 2008).

In faeces, 10 individuals died a sudden death (a by-catch, a grey seal attack or an unknown reasons) in a good overall body condition (with 4 females and 6 males, or one adult, one neonate and 8 juveniles; see details in Table 1). Eleven compounds (8 identified and 3 unidentified) were present in all individuals (Table 3). When including these 10 individuals only, we did not observed any effect of sex (pseudo-F_{1,9} = 1.29, p = 0.22) or age (pseudo-F_{2,9} = 0.90, p = 0.59). At least seven other compounds were found exclusively in the faecal sample of one juvenile male (MJ4). One of them (acetic acid) is usually produced during protein fermentation or putrefaction (anaerobic digestion) by microbes present in the colon. In the samples from the two female neonates, five specific compounds (1 identified and 4 unidentified) were present. However, it was not possible to link the identified molecule (nonanoic acid, ethyl ester) to any particular metabolism. Finally, the comparison of 108 chemical compounds present in all faeces samples (i.e. including individuals with potential infectious death) showed a significant effect of age (pseudo-F_{2,19} = 1.79, p = 0.0098). In a CAP model (m = 7 PCO axis), only 5% of chemical profiles were not correctly classified; there were only errors between juveniles and adults. This results, based on animals that died of several different causes, may suggest the presence of age-specific chemical profiles but more samples from animals that died in good body condition are required to confirm this hypothesis.

<i>Chemical compound</i>	<i>Urines</i>	<i>Faeces</i>
Acetic acid		1 Male Juvenile (MJ4)
1-Heptanol		1 Male Juvenile (MJ4)
1-Hexanol		1 Male Juvenile (MJ4)
Hexanal	1 Male Neonate (MN2)	All Individuals (10)
Octanal	1 Male Neonate (MN2)	
Decanal		All Individuals (10)
Heptanal	1 Male Neonate (MN2)	All Individuals (10)
Lilac aldehyde D	1 Male Neonate (MN2)	
2-Hexene, 3,5,5-trimethyl-		All Individuals (10)
5-Octadecene, (E)-		1 Female Juvenile (FJ1)
Butanoic acid, 2-ethyl-, 1,2,3-propanetriyl ester		All Individuals (10)
Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	1 Male Neonate (MN2)	
Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester	1 Male Neonate (MN2)	
Butanoic acid, ethyl ester	1 Male Neonate (MN2)	
Ethyl 9-hexadecenoate	1 Male Neonate (MN2)	
Heptadecanoic acid, ethyl ester	1 Male Neonate (MN2)	
Nonanoic acid, ethyl ester		2 Female, Neonates (FN1 and FN2)
10-Undecyn-1-ol		All Individuals (10)
1-Octen-3-ol	1 Male Neonate (MN2)	All individuals (10)
n-octen-1-ol		All Individuals (10)
2-Ethyl-1-hexanol	1 Male Neonate (MN2)	
5-Hepten-2-one, 6-methyl-		1 Male Juvenile (MJ4)
1-Propanone, 1-(4-methoxyphenyl)-		1 Male Juvenile (MJ4)
2-Undecanone	2 Males Neonates (MN1 and MN2)	
6,7-Dodecanedione		1 Male Juvenile (MJ4)
Acetoin		1 Male Juvenile (MJ4)
2,4-Dithiapentane		1 Male Juvenile (MJ3)
3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol (phytol)		1 Male Juvenile (MJ6)

Table 3. Chemical compounds released from the headspace of urine and faecal samples and found in one category of stranded harbour porpoises. The code of the individual indicated in brackets refers to Table 1.

E. CONCLUSIONS

Our study reveals that solid phase micro extraction followed by GC-MS allows to identify a great variety of chemical compounds present in the urine and faeces of stranded harbour porpoises. The results also show that the cause of death affects chemical diversity of their excreta: faeces from animals that died from a chronic pathologic condition (and found in a poor body condition) exhibit a distinct chemical profile. This change must reflect modifications in their metabolism due to an infection or other diseases including starvation or chronic disorders. This result suggests a relationship between the chemical composition of excreta and specific pathologic conditions in odontocetes, and that potential biomarkers of health status could be identified in such samples.

Concerning the primary purpose of this work, i.e. the search of putative pheromones, it appears that some of urine and faecal samples from stranded animals could be used. However, no “pheromone-like” compound was identified in the samples collected so far, and no sex difference was found in their chemical profiles. This result could be due to the small sample size of this study, but also to the analytical method used: in the present study, analyses focused on the volatile and semi-volatile fraction of the samples, while some semiochemicals could be water-soluble. Another method for extraction such as liquid chromatography has to be developed, taking into consideration the salt and other parameters of environment in marine mammals.

The present study allowed to establish a first database of chemical compounds secreted by an odontocete cetacean, which represents a significant development for further investigations. Several specific compounds that have been specifically detected in the urine of male neonates are likely to be associated with their dairy diet, but it cannot be totally excluded that some of them may be used by the mother for kin recognition. Further samples, including some from neonates, need to be collected in order to complete the chemical compound database that was initiated through this work and may reveal some pheromone candidates.

F. ACKNOWLEDGEMENTS

The contribution of the staff of department of Pathobiology at the University of Utrecht is acknowledge for specimen collection. We warmly thank Bruno Buatois for his support and advice during chemical analyses at the Plateforme d'Analyses en Ecologie Chimique of the Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive. The present study was approved by the French national ethical committee (Comité Consultatif National d'Ethique, permit #1286.5392) and were in accordance with the European directive 86/609/CEE. Funding was provided by Fondation Total (grant #144903/Parfums d'eau) and by Ministère de l'Éducation nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

G. SUPPLEMENTARY MATERIALS

<i>Chemical compound</i>	<i>Urines (presence number in all samples, n=9)</i>	<i>Faeces (presence number in all samples, n=20)</i>	<i>Cited relevance to behaviour</i>	<i>Published odour description</i>
<u><i>Acetal</i></u>				
Ethane, 1,1-diethoxy-	✓ (2/9)	✓ (8/20)		Fruity
<u><i>Carboxylic acid</i></u>				
Acetic acid		✓ (1/20)		Pungent, vinegar
cis-5-Dodecenoic acid		✓ (3/20)		
Butanoic acid, 2-methyl-	✓ (2/9)	✓ (4/20)		
<u><i>Alcohol</i></u>				
1-Butanol	✓ (2/9)	✓ (2/20)		Fermented, oily
1-Heptanol		✓ (1/20)		Green, musty, leafy
1-Hexadecanol	✓ (4/9)		Female-sex-pheromone (attractant) in Lepidoptera	Waxy, floral
1-Hexanol		✓ (1/20)		Herbal
1-Propanol		✓ (2/20)		Fermented
1-tetradecanol	✓ (6/9)			Waxy, fruity
2-Propyl-1-pentanol		✓ (4/20)		Floral
Phenylethyl Alcohol		✓ (4/20)		Floral, rose
<u><i>Alcohol monocyclic</i></u>				
1-Methylcycloheptanol		✓ (4/20)		
<u><i>Aldehyde</i></u>				
2-Octenal, (E)-		✓ (11/20)		Fatty
Hexanal	✓ (1/9)	✓ (16/20)	Alarm pheromone in insect	Freshly cut grass, green

<i>Chemical compound</i>	<i>Urines (presence number in all samples, n=9)</i>	<i>Faeces (presence number in all samples, n=20)</i>	<i>Cited relevance to behaviour</i>	<i>Published odour description</i>
Octanal	✓ (1/9)	✓ (12/20)	Immobility in mammals (<i>Mus musculus</i> and <i>Panthera leo</i>)	Citrus, orange peel
2,4-Decadienal, (E,E)-		✓ (8/20)	Male pheromone (attractant) in insects	Fatty, nutty
4-Heptenal		✓ (5/20)		Green, dairy
cis-Dodec-5-enal		✓ (3/20)		
Decanal	✓ (3/9)	✓ (17/20)	Alarm, aggregation in insects	Waxy, fatty, citrus, green
Heptanal	✓ (1/9)	✓ (13/20)	Aggregation, Inhibited behaviour, excitation in insects	Herbal, fatty, fresh
2-(5-ethenyl-5-methyloxolan-2-yl)propanal (Lilac aldehyde D)	✓ (1/9)	✓ (11/20)		Floral, lilac
Butanal, 3-methyl-		✓ (18/20)	Attraction in insects	Fruity, peach
Tetradecanal		✓ (18/20)	Female-sex-pheromone in Lepidoptera	Waxy, amber
<i>Alkane</i>				
Dodecane	✓ (1/9)		Alarm in insects	
Heptadecane	✓ (1/9)	✓ (10/20)		
Octadecane	✓ (1/9)			
Pentadecane	✓ (3/9)	✓ (13/20)	Aggregation in insects	
Pentadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-		✓ (10/20)		
Tetradecane	✓ (1/9)		Aggregation in insects	
Tetradecane, 2,6,10-trimethyl-		✓ (6/20)		
<i>Alkene</i>				

<i>Chemical compound</i>	<i>Urines (presence number in all samples, n=9)</i>	<i>Faeces (presence number in all samples, n=20)</i>	<i>Cited relevance to behaviour</i>	<i>Published odour description</i>
1,3-Heptadiene, 5,5-dimethyl-		✓ (3/20)		
1-Octene, 6-methyl-		✓ (3/20)		
2,3-Dimethyl-1-hexene		✓ (1/20)		
2-Hexene, 3,5,5-trimethyl-		✓ (18/20)		
5-Octadecene, (E)-		✓ (1/20)		
<u>Alkylamine</u>				
1-Butanamine, 2-methyl-N-(2-methylbutylidene)-		✓ (3/20)		
1-Butanamine, N-butyl-	✓ (1/9)			Ammonia-like
<u>Amyl alcohol</u>				
1-Butanol, 3-methyl-		✓ (3/20)		Fermented fruit
<u>Aromatic</u>				
Benzene acetaldehyde		✓ (11/20)		Green, floral
Phenol	✓ (1/9)		Oestrus, sexuality in insects	Plastic
<u>Benzaldehyde</u>				
Benzaldehyde	✓ (1/9)	✓ (11/20)	Oviposition, defensive, aggression, alarm recruitment in insects	Bitter, almond, cherry
<u>Cycloalkane</u>				
1-Methylpentyl cyclopropane		✓ (4/20)		
<u>Ester</u>				
Ethyl Acetate		✓ (7/20)		Ethereal, fruity
n-Propyl acetate		✓ (2/20)		Fruity
<u>Fatty acid ester</u>				

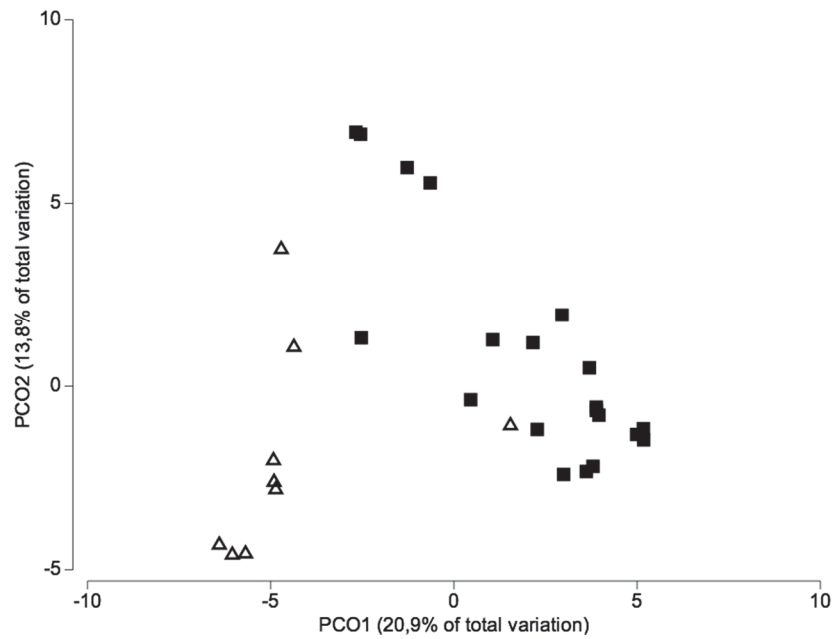
<i>Chemical compound</i>	<i>Urines (presence number in all samples, n=9)</i>	<i>Faeces (presence number in all samples, n=20)</i>	<i>Cited relevance to behaviour</i>	<i>Published odour description</i>
(E)-9-Octadecenoic acid ethyl ester ((E)-ethyl oleate)		✓ (9/20)		
2-Pentenoic acid, 4-methyl-, ethyl ester, (E)-		✓ (3/20)		
3,7-Dimethyl-oct-6-enoic acid, ethyl ester		✓ (4/20)		Green
Butanoic acid, 2-ethyl-, 1,2,3-propanetriyl ester		✓ (14/20)		
Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	✓ (1/9)	✓ (8/20)		Fruity, green apple
Butanoic acid, 2-methyl-, propyl ester		✓ (2/20)		Fruity
Butanoic acid, 3-methyl- (isovaleric acid)	✓ (1/9)	✓ (5/20)		Cheesy
Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester (ethyl isovalerate)	✓ (1/9)	✓ (10/20)		Fruity
Butanoic acid, ethyl ester	✓ (1/9)	✓ (5/20)		Fruity
Decanoic acid, ethyl ester		✓ (3/20)		Waxy, sweet
Dodecanoic acid, ethyl ester (ethyl laurate)		✓ (8/20)		Waxy, sweet
Ethyl 3-methyldecanoate		✓ (8/20)		
Ethyl 5-methylhexanoate		✓ (5/20)		
Ethyl 9-decenoate		✓ (3/20)		Fruity
Ethyl 9-hexadecenoate	✓ (1/9)		Female-sex-pheromone in insects	
Ethyl 9-tetradecenoate		✓ (4/20)		
Heptadecanoic acid, ethyl ester	✓ (1/9)	✓ (7/20)		

<i>Chemical compound</i>	<i>Urines (presence number in all samples, n=9)</i>	<i>Faeces (presence number in all samples, n=20)</i>	<i>Cited relevance to behaviour</i>	<i>Published odour description</i>
Heptanoic acid, ethyl ester		✓ (2/20)		
Hexadecanoic acid, ethyl ester		✓ (4/20)	Female-sex-pheromone in insects	Fruity, pineapple
Hexanoic acid, ethyl ester		✓ (4/20)		Fruity
Methyl 2-ethyldecanoate		✓ (4/20)		
Nonanoic acid, ethyl ester		✓ (3/20)		Waxy, fruity
Octanoic acid, ethyl ester		✓ (7/20)		Waxy, fruity
Pentanoic acid, 4-methyl-, ethyl ester		✓ (4/20)		Fruity
Undecanoic acid, ethyl ester		✓ (5/20)		Soapy, waxy
Propanoic acid, ethyl ester		✓ (5/20)		Fruity
<u>Fatty alcohol</u>				
10-Undecyn-1-ol		✓ (15/20)		
1-Octen-3-ol	✓ (1/9)	✓ (17/20)	Aggregation in insects	Mushroom-like
n-octen-1-ol	✓ (1/9)	✓ (14/20)		Green
2-Ethyl-1-hexanol	✓ (1/9)	✓ (16/20)		Citrus
<u>Hemi-terpene</u>				
5-Hepten-2-one, 6-methyl-		✓ (1/20)	Alarm pheromone in ants	Citrus, green
<u>Ketone</u>				
2-Butanone, 3-methyl-		✓ (1/20)		
3-Pentanone	✓ (5/9)	✓ (5/20)		Ethereal
1-Propanone, 1-(4-methoxyphenyl)-	✓ (4/9)	✓ (3/20)		
2-Nonanone, 3-(hydroxymethyl)-		✓ (13/20)		

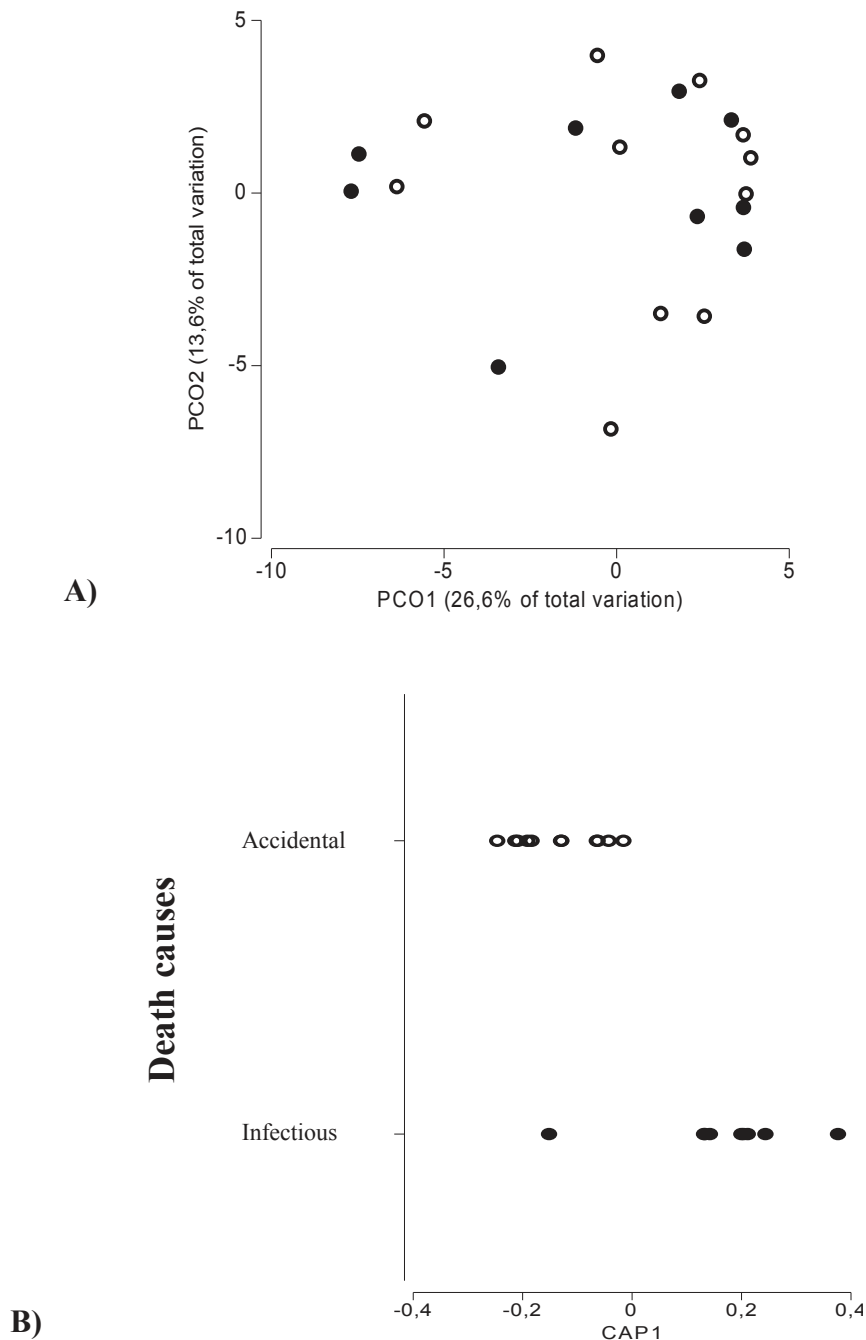
<i>Chemical compound</i>	<i>Urines (presence number in all samples, n=9)</i>	<i>Faeces (presence number in all samples, n=20)</i>	<i>Cited relevance to behaviour</i>	<i>Published odour description</i>
2-Undecanone	✓ (2/9)	✓ (10/20)	Attractive in insects	Floral, rose-like
5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl- (geranyl acetone)		✓ (9/20)	Attractive (to female) in insects	Floral, magnolia
<u>Other</u>				
3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, (R)-		✓ (2/20)		Floral
4-Methyl-1-heptyn-3-ol		✓ (1/20)		
6,7-Dodecanedione		✓ (1/20)		
9,12,15-Octadecatrienal		✓ (4/20)		
3-hydroxybutan-2-one (Acetoin)		✓ (1/20)	Female-sex-pheromone in insects	Buttery
Cyclohexanone, 2-butyl-		✓ (7/20)		
<u>Pyrazine</u>				
Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-		✓ (2/20)		
<u>Sulphide</u>				
Dimethyl sulphide	✓ (3/9)	✓ (7/20)	Attractive in hamster vaginal secretion	Sulphurous onion
Dimethyl trisulphide	✓ (2/9)	✓ (2/20)	Attractive in hamster vaginal secretion	Alliaceous
2,4-Dithiapentane	✓ (1/9)	✓ (3/20)		Garlic, mushroom
Disulphide, dimethyl	✓ (2/9)	✓ (6/20)	Attractive in insects	Cabbage, onion
Pentasulphide, dimethyl	✓ (1/9)			Sulphurous onion
Tetrasulphide, dimethyl	✓ (2/9)	✓ (1/20)		
<u>Terpene</u>				

<i>Chemical compound</i>	<i>Urines (presence number in all samples, n=9)</i>	<i>Faeces (presence number in all samples, n=20)</i>	<i>Cited relevance to behaviour</i>	<i>Published odour description</i>
1-Dodecanol, 3,7,11-trimethyl- (hexahydrofarnesol)		✓ (1/20)		
3,7,11,15-Tetramethyl-2- hexadecen-1-ol (phytol)		✓ (1/20)	Attractive in insects	Floral

Supplementary Data S1. Chemical compounds found in the headspace of urine and faecal samples of harbour porpoises. Only compounds that have been tentatively identified are included in this table. Faecal and urine specific compounds are indicated in green and yellow, respectively. Cited relevancies to behaviour were taken from <http://www.pherobase.com> and published odour descriptions were taken from <http://www.thegoodscentcompany.com>.

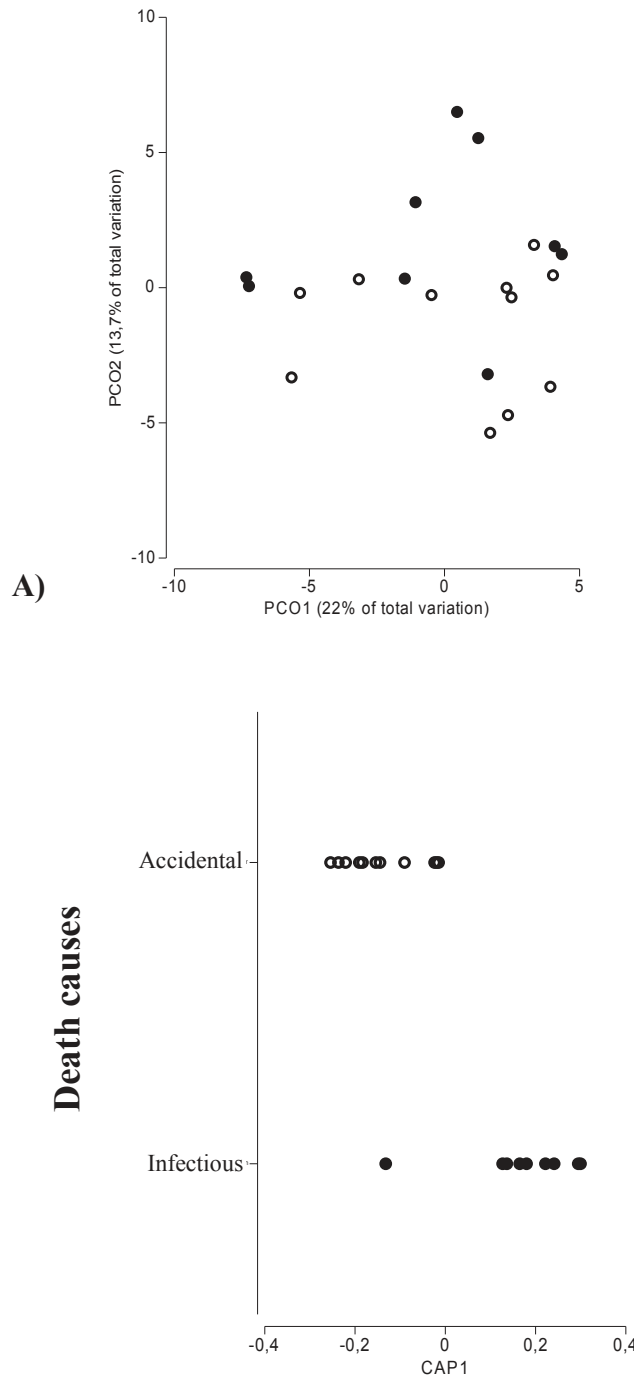


Supplementary Data S2. Comparison of chemical profiles from urine and faeces of harbour porpoise in two-dimensional PCO ordinations (PCO1 x PCO2). Triangles correspond to urine samples and rectangle to faeces. (PERMANOVA test for excreta type factor: Pseudo-F1, 28 = 5.10 p = 0.0001).



Supplementary Data S3. A) Comparison of chemical profiles using 150 compounds from faeces (sampling during 2h at 36 °C) in two-dimensional PCO ordinations for all samples: PCO1 vs PCO2. **B)** Comparison of chemical profiles in faeces (2h) in CAP analysis considering death reason as factor using a single axis obtained from $m = 4$ PCO axes, showing 95% correct discrimination of chemical profiles between death causes (due to infectious diseases or poor overall conditions (named infectious) and caused by by-catch, grey seal attack and unknown reasons but with a healthy nutritional condition code (named accidental)).

Black filled circles represent infected animal and black circles represent non-infected animals.



Supplementary Data S3. A) Comparison of chemical profiles using 108 compounds specific to faeces samples (extracted during 2h at 36 °C) in two-dimensional PCO ordinations for all samples: PCO1 vs PCO2. **B)** Comparison of chemical profiles in faeces (2h) in CAP analysis considering death reason as factor using a single axis obtained from $m = 6$ PCO axes, showing 95% correct discrimination of chemical profiles between death causes ((due to infectious diseases or poor overall conditions (named infectious) and caused by by-catch, grey seal attack and unknown reasons but with a healthy nutritional condition code (named accidental)).

Black filled circles represent infected animal and black circles represent non-infected animals.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse m'ont permis d'objectiver la réponse comportementale de plusieurs espèces de cétacés à des stimuli chimiques alimentaires, mettant en évidence l'implication de la chémoréception dans la perception multimodale de leur environnement. J'ai également contribué à l'exploration des structures neuro-anatomiques supportant cette perception, et à l'analyse des sécrétions susceptibles d'être impliquées dans une communication chimique. Nous verrons dans cette partie comment ces données originales ouvrent de nouvelles perspectives pour appréhender les comportements de ces mammifères marins, particulièrement dans un contexte de recherche de nourriture mais aussi de déplacements à grande échelle. Les potentielles applications de ces connaissances fondamentales dans les domaines de la gestion et de la conservation seront également discutées.

A. Contribution de l'étude à une meilleure compréhension de l'écologie et des comportements des cétacés

1. La chémoréception intervient dans une perception multisensorielle

a) Chez les odontocètes, mise en évidence de sens chimiques fonctionnels

Dans un premier temps, les expériences sur le grand dauphin en milieu contrôlé ont révélé que les odontocètes pourraient être spontanément attirés par des composés solubles issus de leurs proies (**Manuscrit 1**). Ceci n'avait jamais été démontré auparavant, même si cela avait été suggéré (Torres 2017) sur la base de tests de sensibilité ou de discrimination gustative (Friedl et al. 1990, Kuznetsov 1990, Kremers et al. 2016). Très récemment, des images issues d'appâts sous-marins filmés (BRUV pour « Baited Remote Underwater Video ») sont venues confirmer l'attraction des odontocètes sauvages pour des extraits de proies : des groupes de dauphins tachetés de l'Atlantique (*Stenella frontalis*) au large des Iles Sauvages (Portugal) se sont approchés du tube PVC percé contenant des morceaux de sardine et ont tenté de le mordre à plusieurs reprises (Centre for Marine Futures 2015).

La différence de réaction entre les animaux juvéniles et adultes observée dans notre étude s'explique vraisemblablement par une plus forte exposition des jeunes au stimulus gustatif liée à leur motivation à manipuler les objets et à réaliser la tâche de discrimination. On ne peut cependant pas exclure une plus forte sensibilité gustative chez les juvéniles, car plusieurs études anatomiques ont montré une réduction des bourgeons du goût avec l'âge (Komatsu & Yamasaki 1980, Kuznetzov 1990). Bien que cette hypothèse reste à tester expérimentalement, ceci pourrait être lié à une importance particulière de la gustation lors des premiers stades de la vie, notamment pour la détection du lait maternel ainsi que dans l'apprentissage de la discrimination des proies, tel que suggéré par Shindo et al. (1990) à la suite de la description de bourgeons du goût sur l'arrière-langue d'un nouveau-né de baleine à bec de Stejneger.

L'étude de la chémoréception chez le grand dauphin et le globicéphale noir dans leur milieu naturel a permis de révéler qu'ils peuvent percevoir le DMS, une molécule qui joue un rôle crucial dans les interactions trophiques en milieu marin (Savoca & Nevitt 2014). Ces deux espèces ont réagi à ce stimulus en s'approchant de la zone de diffusion et dans le cas du globicéphale uniquement, en exprimant des comportements de surface spécifiques comme le spyhopping (**Manuscrit 2**). Récemment, de nouvelles expériences utilisant le même protocole d'expositions ont été menées en collaboration avec nos collègues de la University of Southern Denmark sur des groupes de marsouins communs dans la mer du Nord. Elles ont montré que cette espèce côtière réagit de façon similaire au DMS (Torres Ortiz et al., en préparation⁷), suggérant que cette molécule joue un rôle dans l'écologie alimentaire des odontocètes en général. Comme cela a été montré chez les oiseaux marins (Nevitt et al. 2004), les cétacés à dent pourraient utiliser cet indice chimique comme indicateur de zones riches en proies. Les pics de productivité marine ont lieu lorsque des eaux riches en nutriments atteignent la surface (upwelling), ce qui a généralement lieu sur des zones de plusieurs kilomètres autour des reliefs sous-marins (montagnes sous-marines, talus, canyons, etc.) et au niveau des fronts océaniques (zones de séparation entre deux masses d'eau ayant des caractéristiques physico-chimiques différentes) (Savoca & Nevitt 2014). Le

⁷ Torres-Ortiz, S., Bouchard, B., Sørensen, K., Wahlberg, M., Campagna S., Célérier, A. Behavioural response of free-ranging harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) to DMS and to fish extract: a pilot study.

DMS constitue donc un signal à large échelle d'une zone où les proies des odontocètes (poissons et céphalopodes) sont potentiellement abondantes.

Cette molécule étant émise dans des zones précises et de façon régulière au cours des saisons (Turner et al. 1996), elle pourrait également être utilisée par les animaux comme un repère spatial lors de leurs déplacements sur de longues distances. Même si d'une façon générale, les odontocètes n'effectuent pas de grandes migrations comme cela est le cas chez les mysticètes, certains effectuent néanmoins de longs voyages. Les plus longs déplacements saisonniers sont effectués par les cachalots, dont les mâles migrent des eaux tropicales aux régions froides chaque année (Perrin et al. 2009). D'autres odontocètes tels que les dauphins pélagiques (*Stenella sp.*), les grands dauphins, les bélugas (*Delphinapterus leucas*), les globicéphales, les dauphins de Risso (*Grampus griseus*) et les orques (Lockyer & Brown 1981, Forcada 2009) se déplacent parfois sur des centaines de kilomètres en fonction de la disponibilité de leurs proies.

J'ai fait le choix d'utiliser le DMS comme stimulus chimique lors des expériences en milieu naturel, non seulement pour le rôle central qu'il joue dans l'écosystème marin, mais aussi parce qu'il est extrêmement volatile et que son odeur forte active intensément les circuits olfactifs même à très faible concentration chez les oiseaux et les mammifères, dont l'homme et le phoque commun (Taylor et al. 1969, Nevitt & Bonadonna 2005, Kowalewsky et al. 2006). J'ai pourtant souhaité dans un premier temps utiliser des concentrations importantes de DMS (0.2 M), similaires à celles utilisées dans les expériences sur les oiseaux procellariiformes, les manchots et les tortues marines (Pombo & Moreira 2010, Wright et al. 2011, Dell'Araccia et al. 2014). Ces concentrations sont bien supérieures à celles qui sont mesurées dans l'environnement, où elles dépassent rarement les 10 nM, mais elles permettaient de s'assurer que les animaux seraient exposés à des doses importantes même à distance du diffuseur (Berresheim 1987, Galí et al. 2013). Dans de futures études comportementales, il conviendrait donc d'utiliser le même protocole pour étudier la réaction des animaux à des doses plus faibles de DMS. Cela permettrait d'éviter de provoquer d'éventuelles réactions non naturelles dues à un comportement d'exploration ou de néophilie, voire d'aversion (Lopes et al. 2016) face à un stimulus chimique intense, plutôt qu'à la poursuite d'un signal chimique lié à l'alimentation. Enfin, l'exposition d'odontocètes à d'autres stimuli

chimiques pourrait confirmer l'utilisation de la chémoréception dans un contexte alimentaire. Par exemple, au cours d'expériences préliminaires effectuées dans le détroit de Gibraltar lors de la phase de mise au point du protocole d'exposition, nous avons observé une attraction des globicéphales et des grands dauphins par l'huile de foie de morue. Il est probable que, comme chez la plupart des prédateurs marins, ces signaux soient constitués d'un mélange de composés plutôt que d'une molécule unique (Brönmark & Hansson 2000).

Enfin, après la démonstration de l'utilisation des sens chimiques dans l'écologie alimentaire des odontocètes, il serait intéressant de déterminer leur contribution, en interaction avec les autres canaux sensoriels, à la perception multimodale de l'environnement et leur implication dans les processus de décisions. Il est possible de répondre à cette question grâce par exemple à des tests de choix réalisés dans des conditions contrôlées. Ce pourrait être effectué dans un bassin reproduisant les conditions d'un labyrinthe en Y. Une seule des branches contiendrait un stimulus attractif (poisson, jouet, etc.) et un stimulus répulsif (auditif, visuel, chimique, thermique) serait diffusé aléatoirement dans une des branches. Ceci permettrait de comprendre comment les odontocètes « hiérarchisent » les stimuli sensoriels dans différents contextes, comme cela a été expérimenté chez les crustacés (Jurcak & Moore 2014).

b) Démonstration d'une chémoréception fonctionnelle chez les mysticètes, jouant un rôle probablement crucial dans leur écologie

Contrairement aux odontocètes, l'utilisation des sens chimiques par les mysticètes est suspectée depuis de nombreuses années et notamment depuis la description détaillée de leur système olfactif relativement développé (Cave 1988, Thewissen et al. 2011, Godfrey et al. 2013). Les résultats obtenus lors des expériences de diffusion de molécules liées à l'alimentation viennent confirmer que leur sens de l'olfaction est effectivement fonctionnel, et qu'ils l'utilisent très probablement dans un contexte de recherche de nourriture. En effet, nos expériences sur les baleines à bosse suggèrent qu'elles pourraient être sensibles au DMS (modification de leur activité acoustique), mais indiquent une réaction

comportementale plus intense aux extraits chimiques de krill, leur proie principale (**Manuscrit 3**). La perception du stimulus chimique à longue distance (plusieurs centaines de mètres) a probablement fait intervenir des récepteurs localisés dans les voies aériennes supérieures (cavité nasale). La détection d'indices volatiles est susceptible de jouer un rôle important dans l'écologie alimentaire des baleines en permettant la localisation des agrégations de krill à distance, même si une chémoréception via la cavité orale pourrait contribuer à proximité immédiate de la source. Nos expériences montrent que cette perception est effective sur plusieurs centaines de mètres, mais les distances parcourues entre les différents sites de nourrissage et l'exemple des oiseaux marins suggèrent qu'elle pourrait être efficace sur plusieurs dizaines voire centaines de kilomètres (Cave 1988, Nevitt et al. 2004, Stern 2009). Il est également envisageable que ces composés volatils soient utilisés comme indices environnementaux lors de la migration chez les mysticètes, dont la plupart des espèces parcourent des milliers de kilomètres entre les sites d'alimentation et de reproduction. Ils pourraient donc contribuer à une perception multimodale de l'environnement, conjointement à d'autres indices comme le géomagnétisme terrestre, la direction et la vitesse des courants, les sources sonores (vagues autour des reliefs, zones d'activité sismique), ainsi que la position du soleil et des étoiles (Wartzok & Ketten 1999, Kenney et al. 2001, Stern 2009, Torres 2017). Certains auteurs ont également suggéré l'utilisation de la chémoréception dans l'eau, et notamment la perception des variations de salinité, pour l'orientation sur de longues distances (Kenney et al. 2001, Stern 2009, Torres 2017). Nos résultats corroborent cette hypothèse d'une perception par des structures de la cavité orale : les baleines ont réagi plus intensément face à l'extrait soluble de krill (contenant des composés volatiles et solubles) que face au DMS (volatile), en passant notamment plus de temps à explorer la zone à proximité du stimulus chimique. Alors que le DMS est très volatile et peut a priori être détecté à grande distance de la source uniquement dans l'air, l'hydrolysat de krill contient également des composés hydrosolubles comme des acides aminés, qui diffusent dans le courant d'eau. Il est donc probable que ces composés, perçus dans l'eau via la cavité orale, aient créé un stimulus chimique supplémentaire expliquant une plus forte réponse comportementale et l'observation d'une chimiotaxie. Les molécules diffusant plus lentement dans l'eau que dans l'air à cause de sa plus grande viscosité, le signal chimique y est probablement perçu à une échelle beaucoup plus limitée, de l'ordre de quelques centaines de mètres (Torres 2017).

Le DMS impliqué dans l'ingestion de plastique par les cétacés ?

Des études récentes chez les poissons et les oiseaux ont dévoilé un effet pervers de l'attraction par le DMS : cette molécule est émise par les déchets plastiques rejetés en mer. Ceci est dû au fait que les débris de plastiques qui flottent dans l'océan sont rapidement colonisés par différentes espèces de micro-organismes marins, un processus nommé « biofouling ». Les algues qui s'accumulent à leurs surfaces produisent naturellement du DMS dans des concentrations importantes, supérieures à celles qui sont mesurées dans les zones de forte productivité primaire (Savoca et al. 2016). Par conséquent, ce signal d'origine anthropique peut être un leurre pour les animaux qui l'utilisent comme indice chimique, tel que cela a été démontré expérimentalement chez l'anchois (*Engraulis mordax*) et récemment suggéré par des analyses multiparamétriques chez oiseaux marins procellariiformes (Savoca et al. 2016, 2017). Il se pourrait donc que les espèces de cétacés qui sont attirés par le DMS s'approchent de zones d'agglomération de débris plastiques (gyres) à la recherche de nourriture. Ce comportement augmenterait fortement le risque d'ingestion accidentelle de macro et micro déchets plastiques dont les conséquences néfastes sur leur santé sont clairement avérées (obstruction intestinale, toxicité chronique, etc.) (Gregory 2009, Jauniaux et al. 2014, Besseling et al. 2015, Fossi et al. 2016).

2. Description de potentielles structures chémoréceptrices dans la cavité orale et les voies aériennes supérieures

Les résultats issus de l'étude histologique et immunohistochimique ont suggéré la présence de structures chémoréceptrices dans les cavités orale et nasale chez les odontocètes (**Manuscrit 4**). Nous avons notamment mis en évidence des bourgeons du goût chez un jeune marsouin commun, ce qui n'avait jamais été montré chez cette espèce. Ceci vient ajouter des arguments en faveur d'une gustation fonctionnelle chez les odontocètes, au moins aux stades néo-natal et juvénile. De plus, l'utilisation d'un marqueur fluorescent spécifique du système gustatif (anticorps anti 5-HT) a induit un marquage positif dans les tissus de langue chez le marsouin commun et le dauphin bleu et blanc (les analyses sont en cours pour les autres espèces). Le résultat le plus surprenant est probablement la présence de récepteurs

olfactifs dans certains tissus de la cavité orale chez ces individus. Ces résultats doivent maintenant être confirmés par d'autres études, notamment le marquage des autres protéines impliquées dans la transmission du signal olfactif comme l'OMP. Si cette voie nerveuse est réellement fonctionnelle dans la cavité orale, cela pourrait expliquer certains résultats comportementaux en milieu captif, comme la détection de composés odorants par la cavité buccale appelée quasi-olfaction, ou les comportements de « genital tracking »⁸ (Kuznetzov 1990, Muraco & Kuczaj 2015). Un autre résultat remarquable est l'observation d'un immunomarquage par des anticorps anti-OR dans les sacs aériens des 3 espèces chez lesquelles ils ont été testés (marsouin commun, globicéphale noir et dauphin bleu et blanc). L'OR2 semble aussi avoir été détecté dans le passage nasal chez le dauphin bleu et blanc. Là encore, de nouvelles études sont nécessaires pour confirmer la présence de ces récepteurs dans les voies aériennes supérieures des odontocètes, et notamment la mise en évidence de la protéine OMP, typique des neurones olfactifs matures des vertébrés (Kaupp 2010). De plus, il est nécessaire de déterminer quels sont les trajets nerveux qui relient ces récepteurs au système nerveux central. La nécropsie étant de toute évidence trop grossière, la réalisation d'une IRM avec imagerie de diffusion (tractographie) serait utile pour déceler des fibres nerveuses permettant la transmission du message olfactif. Un contrat de collaboration de recherche a été établi avec l'équipe du service de Neuroradiologie de l'Hôpital Gui de Chauliac qui dispose des équipements, des personnels et des compétences pour réaliser la collecte et l'analyse des images IRM lors d'un futur échouage de cétacé en très bon état de conservation (stade 1 tel que défini par le RNE (Van Canneyt et al. 2015)).

Au cours de la thèse, nous n'avons pas eu d'opportunité pour collecter des échantillons de qualité chez les mysticètes. Les événements d'échouages de gros cétacés sont en effet assez rares sur les côtes françaises et lorsqu'ils se produisent, les interventions de nécropsie et de collectes d'échantillons sont beaucoup plus difficiles à mettre en place d'un point de vue logistique. De plus, les structures anatomiques d'intérêt pour notre étude n'étant pas directement accessibles, leur prélèvement nécessitent un lourd travail de dissection sur des animaux de plusieurs tonnes. Il est donc pour l'instant impossible

⁸ Apposition du rostre sur la fente génitale d'un autre individu. Généralement observé chez les mâles envers les femelles en période de reproduction.

de savoir si les mysticètes possèdent également ces potentielles structures chémoréceptrices. Les résultats des études comportementales ont montré des réactions d'attraction vers les stimuli chimiques comparables que celles des odontocètes (voire même plus intenses : observation de comportements de plongée, d'arrêt de la navigation et d'aller-retours dans la zone de stimulation chez la baleine à bosse), ce qui suggère des similarités au niveau des mécanismes de perception. En revanche, il existe de grandes différences entre odontocètes et mysticètes concernant les régimes alimentaires et les capacités acoustiques (capacité d'écholocation présente uniquement chez les premiers), ce qui pourrait être lié à des développements différents de leurs structures chémoréceptrices. Des études génétiques récentes suggèrent que c'est effectivement le cas pour l'olfaction au sens strict, qui paraît s'être adaptée différemment à des écologies alimentaires distinctes. Kishida and Thewissen (2012) ont ainsi décrit deux scénarios pour expliquer la réduction progressive des structures olfactives chez les odontocètes, par rapport aux mysticètes : l'hypothèse « filtration prioritaire » et l'hypothèse « écholocation prioritaire » (Fig. 6). L'hypothèse « filtration prioritaire » stipule que, conjointement au développement d'adaptations spécifiques au milieu aquatique, les ancêtres communs des cétacés ont vu les gènes impliqués dans l'olfaction subir un relâchement de la sélection stabilisatrice. Ce relâchement a été maintenu chez les odontocètes, alors que chez les mysticètes une sélection purifiante a permis de récupérer des gènes fonctionnels et d'utiliser leur odorat pour trouver leur nourriture. A l'inverse, l'hypothèse « écholocation prioritaire » propose qu'une sélection purifiante a été maintenue chez l'ancêtre commun des cétacés, et a été relâchée seulement lorsque l'écholocation est apparue chez les premiers odontocètes. Alors que les premières données étaient en faveur de l'hypothèse filtration (Kishida, Thewissen, Hayakawa, et al. 2015), les analyses récentes du gène de l'OMP incluant de nombreuses espèces de cétacés prédisent au contraire que la réduction des gènes impliqués dans l'olfaction a eu lieu chez les odontocètes après l'apparition de l'écholocation, et indépendamment chez différentes espèces (modèle D ci-dessous) (Springer & Gatesy 2017).

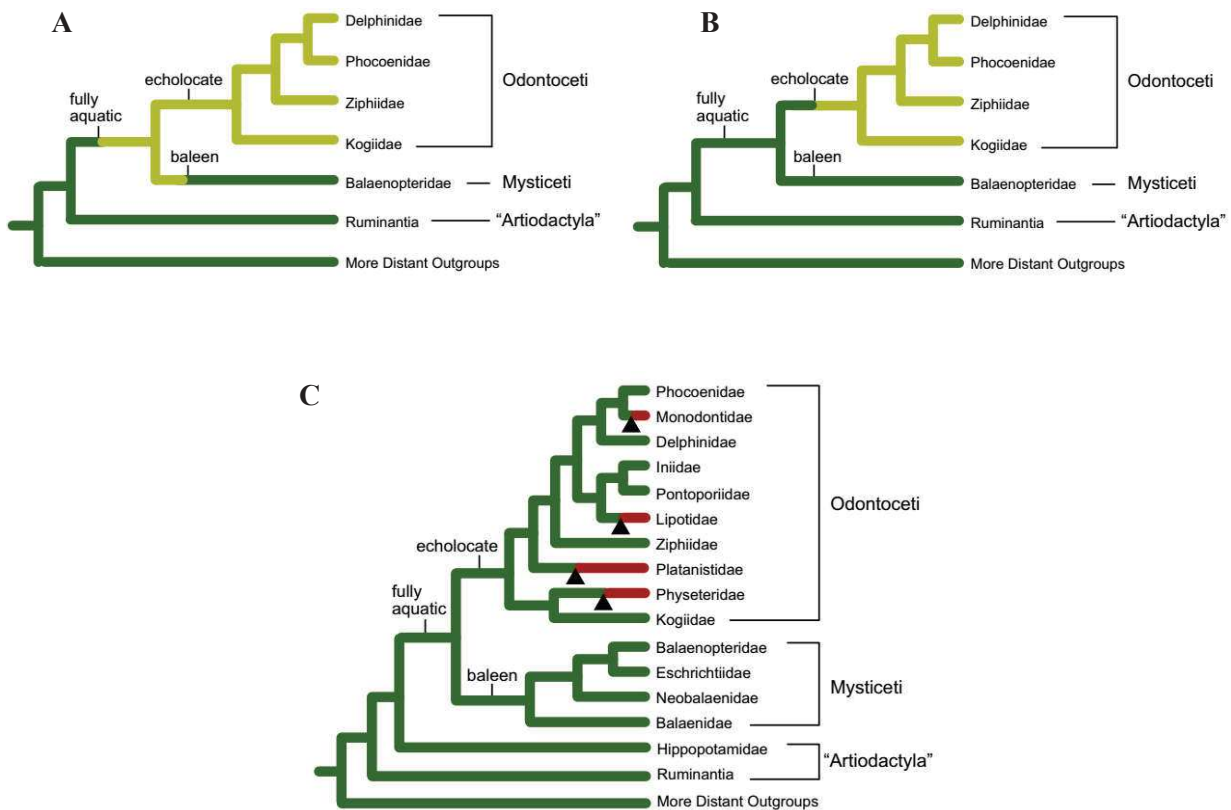


Figure 6. Différentes hypothèses expliquant l'évolution du gène OMP chez les cétacés. Les deux principales sont l'hypothèse « filtration prioritaire » (A) qui stipule un relâchement (vert clair) de la sélection stabilisatrice chez les ancêtres communs aux odontocètes et aux mysticètes, et l'hypothèse « écholocation prioritaire » (B) qui prévoit que ce relâchement a eu lieu plus tard et uniquement chez les odontocètes. Les taxons ayant conservé un gène OMP fonctionnel sont représentés en vert foncé. Les dernières analyses suggèrent que le second scénario est le plus plausible, et en particulier plusieurs inactivations du gène OMP par des mutations indépendantes (triangles noirs) dans les différentes branches d'odontocètes (rouge) (C). D'après Sringer & Gatesy (2017).

3. Des sécrétions caractérisées par une importante diversité chimique

Les résultats de l'analyse chimique des composés volatiles présents dans les urines et les fèces de marsouin commun n'ont pour l'instant pas permis de mettre en évidence une différence significative entre mâles et femelles, ni entre les animaux juvéniles et matures (**Manuscrit 5**). A ce stade des analyses, la présence de molécules informatives n'a pas pu être révélée dans ces excréments de marsouin commun.

Les tests statistiques n'ont pour l'instant pas révélé de différences significatives entre les classes chimiques de molécules, mais il convient d'analyser les échantillons récemment collectés en 2017 pour augmenter la puissance statistique de ces analyses et équilibrer les effectifs des différentes classes (sexe, âge...). Par ailleurs, comme mentionné dans le chapitre 2.B, de nouvelles analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse permettront de compléter l'analyse chimique de nos échantillons.

Une difficulté dans l'interprétation de cette étude est qu'elle repose sur l'analyse d'échantillons prélevés sur des animaux échoués. Les échouages constituent en effet la principale source possible de prélèvement chez les cétacés sauvages et représentent donc l'unique moyen de réaliser des analyses biologiques systématiques sur des effectifs significatifs d'individus. Mais cet avantage de la quantité d'échantillons est associé à une importante variabilité de leur qualité. Celle-ci dépend des conditions de prélèvement sur le terrain et notamment du temps écoulé entre la mort de l'individu et le prélèvement/stockage à -20°C, qui entraîne la dégradation des échantillons biologiques (notamment des fèces, de par la présence importante de bactéries). Il semble également que la cause de la mort affecte significativement la composition chimique des échantillons, en raison des impacts d'une éventuelle pathologie sur le métabolisme des individus. L'ajout de données supplémentaires dans notre étude (inclusion des échantillons collectés en 2017) devrait nous permettre de mieux analyser l'influence des facteurs qui peuvent modifier le profil chimique des excréta comme le sexe ou l'âge des individus.

Idéalement, cette étude devrait inclure des échantillons de sécrétions d'individus vivants et sains. Ceci permettrait d'établir des « profils chimiques » contrôles et d'identifier éventuellement des marqueurs chimiques associés à différentes causes de mortalité (famine, pathologies, stress associé à une capture accidentelle...), autant de marqueurs biologiques utilisables en complément des examens réalisés en routine lors des nécropsies et visant à établir clairement les causes de décès des individus échoués. Cependant, les prélèvements sur animaux sains et vivants sont difficiles à obtenir car les cétacés élevés en captivité sont peu nombreux et ils ne sont pas tous entraînés à se prêter volontairement aux prélèvements d'échantillons, notamment urinaires et fécaux. Des prélèvements moins invasifs (souffles, frottis...) sur animaux sauvages sont envisageables lors d'une étude de terrain impliquant la capture de

dauphins, comme cela a été fait chez les grands dauphins du golfe du Mexique suite à l'accident de la plateforme pétrolière Deepwater Horizon (Schwacke et al. 2014). Mais ce type d'expérience nécessite une logistique importante et occasionne un stress important chez les animaux, ce qui est difficilement envisageable chez de nombreuses espèces et susceptible également de modifier la composition des sécrétions. Chez les mysticètes, l'analyse des sécrétions (urine, fèces, sécrétions cutanées) chez des animaux sains pourrait éventuellement passer par l'analyse de l'eau dans la traine des animaux (fluke print). Cependant, nous avons pu constater que ces échantillons représentent un vrai défi logistique puisqu'il faut collecter de gros volumes d'eau pour pouvoir ensuite concentrer progressivement les échantillons avant de procéder aux analyses chimiques. Par ailleurs, de par la forte salinité des échantillons, des étapes d'élimination des ions sont nécessaires avant toute analyse chimique et sont généralement difficiles de mise en œuvre. Comme nous l'avons mentionné pour les prélèvements de souffle (air exhalé), il est aussi primordial de mettre au point des protocoles de collecte, de transport et de stockage des échantillons qui n'altèrent pas leur qualité et évitent les contaminations.

En parallèle de ces analyses chimiques, il serait intéressant de déterminer spécifiquement la présence, dans l'urine des cétacés, de protéines urinaires majeures (MUP). Celles-ci sont impliquées dans la communication chimique chez les rongeurs, chez qui elles jouent le rôle de transporteur et de stabilisateur pour les phéromones (Hurst et al. 1998). Elles peuvent également avoir elles-mêmes une fonction de phéromone (Chamero et al. 2007). Sauf quelques rares exceptions (dont l'Homme), tous les mammifères étudiés jusqu'à présent possèdent au moins un gène de MUP (21 chez la souris) mais il n'existe aucune donnée chez les cétacés (Logan et al. 2008). Notre équipe a donc récemment mis en place une collaboration avec l'équipe de Bio-informatique de l'Institut des Sciences de l'Environnement de Montpellier (Séverine Bérard) afin de déterminer si les cétacés possèdent une copie fonctionnelle de ce gène, ce qui serait un argument en faveur d'une possible communication chimique chez ces espèces.

Enfin, une communication chimique pourrait exister entre la mère et le jeune, aussi bien durant l'allaitement que lors des fréquents comportements de « goosing » lors desquels la mère appose son rostre sur la fente génitale du nouveau-né. Il serait donc intéressant d'étudier les composés chimiques présents dans le lait et le colostrum, ainsi que la composition des sécrétions des glandes situées dans la

région mammaire. Chez les ongulés, ces signaux permettent une discrimination interspécifique et interindividuelle, et seraient reconnus à la fois par des structures nasales et orales (Schaal 2010). De par leur proximité phylogénétique, on peut émettre l'hypothèse que les nouveau-nés cétacés reconnaissent et localisent également la mamelle de leur mère grâce à la signature chimique des sécrétions mammaires. Il a été montré chez le grand dauphin que la mère sécrète spontanément du lait au cours du premier mois post-partum, même en l'absence de stimulation mécanique de la région mammaire (Muraco 2015). Cette sécrétion pourrait donc constituer une piste chimique qui guiderait les nouveau-nés en quête de nourriture vers la mamelle de leur mère. Ceci est appuyé par le fait que les cétacés juvéniles présentent des structures chémoréceptrices plus développées dans la cavité orale et montrent une meilleure discrimination des composés liés à l'alimentation que les adultes (Komatsu & Yamasaki 1980, Kienle et al. 2015, Bouchard et al. 2017). Des expériences comportementales sur des nouveau-nés en captivité, couplées à une analyse de la composition chimique du lait de leur mère, seraient utiles pour confirmer cette hypothèse.

B. Potentielles applications pour la conservation des cétacés

1. Utilisation de répulsifs chimiques pour réduire la mortalité due aux activités humaines

Bien que la plupart des cétacés soient protégés au niveau national et international, de nombreux individus sont involontairement mais régulièrement tués ou blessés par des activités humaines. Une des causes importante de mortalité chez les grands cétacés à l'échelle mondiale est la collision avec les navires (Van Waerebeek et al. 2007). C'est le cas en méditerranée occidentale et sur la côte ouest des Etats-Unis où la circulation des ferrys et des cargos est la première cause de mortalité des rorquals communs et bleus, respectivement (Panigada et al. 2006, Berman-Kowalewski et al. 2010). C'est également le cas pour les baleines franches de l'atlantique nord, dont la population est au bord de l'extinction, chez laquelle les nouveau-nés et les juvéniles sont encore plus vulnérables aux collisions que les adultes (Knowlton & Kraus 2001, Kraus et al. 2005). Les causes exactes d'un si fort impact des collisions et de l'absence d'évitement chez les baleines sont encore inconnues, mais il semble qu'elles ne réagissent pas au bruit des bateaux de commerce (Nowacek et al. 2004).

La pêche est l'autre cause majeure de mortalité d'origine anthropique chez les cétacés. Chez les petits cétacés, la pêche aux filets maillants et au chalut provoque la plupart des captures accidentelles, alors que la palangre cause des dommages plus occasionnels (Gilman et al. 2006, Reeves et al. 2013, Peltier et al. 2016). Les mysticètes sont également victimes des filets maillants, qui même s'ils ne les étouffent pas directement, peuvent provoquer des lésions importantes voire fatales (Reeves et al. 2013). D'autres engins de pêche, notamment ceux utilisés pour la capture des crustacés (homards, crabes), provoquent des dommages considérables (Knowlton & Kraus 2001). Un exemple cruel est le pic de mortalité observé au cours de cet été 2017, avec l'échouage d'une dizaine de baleines franches dont la plupart montrent des traces d'enchevêtrement (Pêches et Océans Canada 2017).

Des solutions ont été étudiées et, pour certaines, appliquées à plus ou moins grande échelle. Par exemple, pour diminuer les collisions des baleines franches avec les navires, certaines voies de trafic maritime ont été déroutées et la vitesse des bateaux régulée en Atlantique du Nord (Vanderlaan & Taggart 2009).

Des systèmes de signalement par et pour les navires de commerce et les ferrys sont en cours de mise en place dans le sanctuaire Pelagos en Méditerranée (Souffleurs d'Ecume 2016). Pour diminuer les prises accidentelles, des répulsifs acoustiques sont également utilisés avec une efficacité qui peut grandement varier en fonction notamment de l'espèce de cétacé et du type de pêche (Dawson et al. 2012).

Les résultats obtenus dans cette étude permettent d'envisager, en complément de ces solutions, le développement de répulsifs chimiques. De nouvelles études comportementales en conditions réelles sont maintenant nécessaires pour tester les composés pouvant avoir un effet répulsif. Des résultats concluants ont déjà été obtenus chez les oiseaux marins en diffusant de l'huile de foie de requin dans le sillage des bateaux de pêche dans le but de réduire les prises accessoires dans les palangres (Pierre & Norden 2006). Cette substance pourrait également posséder des propriétés aversives chez les cétacés car les grands requins sont des prédateurs avérés de nombreuses espèces d'odontocètes et mysticètes (Bornatowski et al. 2012, Smith et al. 2017). Les composés agissant sur le système trigéminal comme la capsaïcine, la pipérine ou le camphre ont également un fort effet répulsif chez les oiseaux marins (Gasco & Pierre 2007). Notre équipe a d'ailleurs testé de façon empirique le pouvoir répulsif du camphre chez le phoque gris, qui a montré d'intenses réactions d'aversion à courte distance (non publié). Il serait donc très intéressant d'étudier l'effet de ces molécules sur les cétacés en s'inspirant de notre méthodologie et de tester une éventuelle habituation. S'ils s'avèrent avoir un effet répulsif suffisant en termes d'intensité et de durée, et que leur utilisation est réaliste d'un point de vue économique, leur utilisation sur les engins de pêche pourrait être testée en conditions réelles.

Utilisation de substances attractives : nécessité d'une régulation ?

La mise en évidence de capacités chimio-sensorielles pourrait susciter un intérêt commercial, notamment chez les opérateurs de croisières d'observation des cétacés. Ces derniers seraient susceptibles de vouloir utiliser des substances attractives pour maximiser les chances de rencontres ou augmenter le temps d'interaction à proximité du bateau. Cette technique d'appâtage (ou « chuming ») est déjà utilisée par l'industrie du tourisme ornithologique, notamment pour attirer les oiseaux marins grâce à des huiles de poisson. C'est également une pratique courante pour les activités d'observation de requins en plongée, au cours desquelles des morceaux de proies permettent d'attirer chimiquement les animaux. Ces pratiques sont très controversées car elles peuvent avoir des conséquences néfastes sur la conservation de ces espèces. Les animaux ainsi leurrés par des signaux chimiques, alloueraient moins de temps à la recherche de proies réelles ou aux autres comportements naturels nécessaires à leur survie et leur reproduction (Hammerschlag et al. 2012, Newsome & Rodger 2013, Gallagher et al. 2015). Par conséquent, il serait souhaitable de réguler l'utilisation de ces substances et d'étudier les conséquences de leur utilisation éventuelle.

2. Prédiction des déplacements et de l'utilisation de l'habitat

La prédiction des déplacements des cétacés est particulièrement utile pour la mise en place d'aires marines protégées et la régulation des activités humaines potentiellement néfastes comme la pêche, la navigation ou l'utilisation de sonars. Elle permet également, grâce notamment à l'apport des données issues de l'écologie sensorielle, de mieux appréhender les futurs effets des changements climatiques sur ces mouvements et la distribution des espèces. L'élaboration des modèles de prédiction de déplacements nécessite, entre autres, de comprendre comment les animaux perçoivent les stimuli sensoriels environnementaux et les intègrent dans la prise de décision. Cette dernière doit permettre une réponse adaptative aux variations de l'environnement, et résulte de l'intégration conjointe des stimuli externes et de différents facteurs tels que l'expérience passée (apprentissage et mémoire) ou l'état physiologique (état de satiété, repos, reproduction, etc.) (Avgar et al. 2013).

Avec ces nouvelles connaissances sur la perception des signaux chimiques chez les cétacés, notre étude apporte des éléments qui permettront d'affiner la modélisation de leurs mouvements et de leur habitat.

Les protocoles comportementaux utilisés ici pourront inspirer de nouvelles recherches sur les réactions de ces animaux à divers composés chimiques, attractifs ou répulsifs, naturellement présents dans leur environnement. Comme dans le cas des poissons, des tortues et des oiseaux (Kasumyan 2004, Hays et al. 2014, Reynolds et al. 2015), l'intégration des données sur la chémoréception aux connaissances générales déjà acquises sur d'autres modalités sensorielles permettra donc de mieux comprendre comment ces grands prédateurs trouvent leur nourriture et s'orientent dans l'océan. Cette démarche est de plus en plus utilisée en écologie et les prédictions de distribution des espèces, notamment en réponse aux changements climatiques, commencent maintenant à intégrer les signaux chimiques dans leurs modèles (voir par exemple l'étude sur les oiseaux marins en arctique effectuée par Huetmann et al., 2011).

En parallèle de ces connaissances, il convient donc de continuer à décrire plus précisément les paysages sensoriels de l'environnement marin dans lesquels ces animaux évoluent. En ce qui concerne la chémoréception, ceci inclut l'analyse des diverses molécules chimiques auxquelles sont exposés les cétacés et la mesure de leurs variations dans l'espace et dans le temps.

3. Applications pour les programmes de réhabilitation et de ré-introduction

Les résultats de cette étude, en révélant les capacités chimio-sensorielles des cétacés, permettent d'envisager plusieurs applications dans les structures hébergeant des odontocètes en captivité. Les principales espèces de cétacés captifs sont le grand dauphin et l'orque, mais on trouve également des marsouins communs, des belugas, ainsi que des dauphins de l'Amazone (*Inia geoffrensis*). La grande majorité appartient à des parcs d'attraction qui les utilisent essentiellement à des fins commerciales. Cependant, il existe aussi quelques rares centres de recherche et/ou réhabilitation où les animaux ne participent pas à des spectacles mais sont intégrés dans des programmes scientifiques et de sensibilisation du public à la protection de l'environnement (ex. Fjord and Baelte, Danemark ou The Marine Mammal Center aux USA).

Les sources de stress sont nombreuses pour les cétacés captifs et sont principalement liées à l'environnement du bassin qui peut restreindre leurs mouvements, à l'alimentation (absence de proies

naturelles vivantes et nourrissage manuel) et à la constitution de groupes sociaux artificiels (Morgan & Tromborg 2007). L'exposition à des stimuli sensoriels stressants, comme des sons ou des lumières intenses (notamment durant les spectacles, dans les delphinariums), peut également affecter le bien-être des animaux (Morgan & Tromborg 2007). Notre étude pousse donc à s'interroger sur la présence de composés chimiques susceptibles de provoquer un stress, et notamment les odeurs de prédateurs qui sont connues affecter plusieurs espèces de mammifères en conditions de captivité, tels que les ongulés ou le castor (Engelhart & Müller-Schwarze 1995). Dans les delphinariums où les deux espèces sont présentes, les dauphins pourraient percevoir la signature chimique des orques, qui représentent un de leurs principaux prédateurs naturels (Weller 2009). Une étude de leur réaction comportementale à la diffusion de sécrétions d'orques (volatiles et solubles) permettrait d'investiguer cette question en vue d'établir d'éventuelles recommandations. De plus, si une communication chimique intra-spécifique était avérée chez les odontocètes, celle-ci devrait être prise en considération dans la gestion de leur bien-être et de leur reproduction. En effet, des signaux chimiques émis par d'autres individus, présents dans l'eau du bassin ou l'air ambiant, pourraient expliquer certains comportements de stress (agressivité, stéréotypies, etc.) comme cela a été montré chez les rongeurs et les ongulés captifs (Schultz & Tapp 1973, Vieuille-Thomas & Signoret 1992).

Au contraire, la diffusion de composés chimiques appropriés dans l'environnement d'odontocètes captifs pourrait contribuer à leur bien-être et au succès de programmes de réintroduction. La stimulation sensorielle des animaux en captivité est efficace pour augmenter leur répertoire comportemental, améliorer l'utilisation positive de l'environnement et réduire les comportements aberrants comme la stéréotypie (Wells 2009). En dehors des spectacles où les cétacés sont exposés à des stimulations sensorielles excessives (sons et lumières essentiellement), les animaux maintenus en delphinarium vivent dans des milieux extrêmement pauvres en termes de stimulation sensorielle, en regard de leurs conditions de vie naturelles. Cela est particulièrement notable pour l'environnement chimique puisque les nettoyages et les désinfections fréquentes y éliminent la plupart de la diversité des composés ambiants, aboutissant à une éventuelle privation sensorielle. L'usage de stimulations chimiques adaptées pourrait donc constituer un enrichissement non négligeable et avoir un impact très favorable sur le bien-

être des animaux. Des expériences chez des lions (*Panthera leo*) captifs ont en effet montré les bienfaits sur le comportement de composés qui ont un sens biologique comme les excréta de proies. D'autres molécules auxquelles les animaux sont naïfs, comme certaines huiles essentielles (ex. lavande, camomille, menthe poivrée, etc.), permettent également de diminuer le stress dans les refuges canins et les animaleries de laboratoire (Wells 2009). Une expérience récente chez l'otarie de Californie confirme l'efficacité d'odeurs naturelles et artificielles chez les pinnipèdes pour augmenter leur exploration de l'environnement et réduire leurs comportements de stéréotypie (Samuelson et al. 2016). De tels résultats encouragent vivement à la réalisation d'expériences similaires chez les odontocètes captifs. De plus, si des phéromones maternelles ou sexuelles étaient identifiées (Muraco 2015), leur usage pourrait également avoir un effet positif sur les comportement sociaux et alimentaires des jeunes, comme cela a été montré chez les porcs d'élevage (*Sus scrofa domesticus*) (McGlone & Anderson 2002). Le stress des animaux étant un des facteurs limitants du succès de la réhabilitation de cétacés blessés (Barnett 2002, Zagzebski et al. 2006), ces techniques d'enrichissement pourraient accroître les chances de pouvoir relâcher les animaux soignés. D'autre part, des programmes de reproduction en captivité commencent à être envisagés pour les espèces fortement menacées comme le vaquita (*Phocoena sinus*) ou le dauphin de l'Irrawaddy (*Orcaella brevirostris*) dans le but ultime de les réintroduire dans leur milieu naturel (Curry et al. 2013). L'utilisation de potentielles phéromones identifiées chez les cétacés ou la présentation des odeurs du partenaire sexuel avant l'accouplement sont susceptibles d'améliorer le succès reproducteur dans ces structures, comme cela est le cas pour d'autres espèces comme le panda géant (*Ailuropoda melanoleuca*) et le guépard (*Acinonyx jubats*) (Campbell-Palmer & Rosell 2011).

C. Conclusion générale

Comme nous l'avons vu précédemment, les résultats de cette thèse permettent d'approfondir nos connaissances sur l'écologie sensorielle des cétacés. Même si l'audition représente le canal sensoriel principal chez ces mammifères marins, nos travaux mettent l'accent sur une probable implication des sens chimiques dans une perception multimodale d'un environnement complexe et changeant. Ces données pourront, je l'espère, contribuer à la préservation des cétacés que ce soit par une meilleure compréhension de leurs comportements et de leurs déplacements ou par des applications pratiques telles que celles mentionnées dans le paragraphe précédent.

Finalement, cette étude encourage également à de nouvelles recherches sur les capacités chimio-sensorielles des autres groupes de mammifères vivant dans l'eau comme les pinnipèdes, les siréniens, les loutres et les hippopotames. Ceux-ci varient par leurs origines phylogénétiques, leurs écologies alimentaires et leurs degrés d'adaptation au milieu aquatique. La façon dont les sens chimiques ont évolués en fonction de ces différents facteurs pourrait donc être mieux comprise grâce à une étude comparative multi-espèces.

L'étude comportementale des cétacés pose des défis considérables car ils évoluent dans un milieu souvent difficilement accessible et passent une grande partie de leur vie sous la surface, invisibles à nos yeux. Heureusement, ces dernières années ont vu l'apparition de nouveaux outils de télémétrie, de suivi acoustique et d'imagerie aérienne (drones) qui permettent l'acquisition de données très utiles et en grande quantité. Ces avancées technologiques promettent de belles découvertes pour les chercheurs qui tenteront de comprendre l'écologie sensorielle de ces animaux fascinants. Comme un vaste océan encore à explorer.

ANNEXES

A. Etude des excréta de cétacés par une technique alternative à la chimie : utilisation d'un chien de détection

Comme nous l'avons vu précédemment (Manuscrit 5), la détection d'un signal par des méthodes d'analyses chimiques, dans les sécrétions des cétacés se heurte à différentes contraintes et difficultés techniques, logistiques et théoriques. De même, l'observation directe des réactions comportementales ou physiologiques à des signaux sociaux chez ces animaux, même en captivité, demeure encore trop ambitieuse dans l'état actuel de nos connaissances. Face aux limites de la démarche analytique classique, j'ai donc cherché une alternative pour tenter de mettre en évidence une éventuelle signature chimique susceptible d'être perçue et reconnue par les cétacés dans les excréta de leurs congénères.

Mon choix s'est orienté vers des expériences comportementales, basées sur l'utilisation d'un "nez biologique" dans un protocole de discrimination olfactive. Le principe à la base de cette idée est le suivant : si un animal peut percevoir la différence entre les excréta de deux groupes d'individus (ex. mâles et femelles), c'est qu'il existe des signaux chimiques spécifiques à ces deux groupes. Ce type d'expérience n'étant à l'heure actuelle pas réalisable sur les cétacés eux-mêmes, car cela nécessite un apprentissage et un conditionnement très long avec des cétacés captifs dont très peu d'individus sont par ailleurs disponibles pour la recherche (pour réaliser les expériences comportementales mais aussi pour disposer de suffisamment d'échantillons chimiques à tester). Par conséquent, j'ai décidé d'utiliser un animal présentant déjà des dispositions pour ce type de test, facilement conditionnable et dont l'efficacité a été prouvée dans d'autres contextes expérimentaux : un chien renifleur (ou chien de détection) (Johnen et al. 2013).

En effet, les chiens possèdent une acuité olfactive remarquable, exploitée depuis très longtemps par l'homme pour trouver des indices olfactifs de la présence d'animaux dont l'homme (ex. victimes d'avalanches ou de tremblements de terre, identification de criminels, etc.), de végétaux (ex. truffes) ou

de produits illégaux (stupéfiants ou explosifs). Aujourd'hui de nouvelles applications voient le jour dans le domaine du diagnostic médical et de la conservation d'espèces menacées (Hurt & Smith 2009, Bijland et al. 2013). En collaboration avec une collègue du CEFÉ, Nathalie Espuno, qui possède un chien de détection, nous avons mis en place un protocole permettant de tester la présence d'un signal chimique codant pour le sexe chez le marsouin commun. Ce protocole est adapté des techniques développées par la police du Royaume-Uni pour tester les performances des chiens entraînés à l'identification d'odeurs (Porritt et al. 2015). Le principe consiste à conditionner un chien à reconnaître l'empreinte olfactive commune aux fèces d'individus femelles (étape de généralisation). Une phase d'apprentissage, basée sur les principes du conditionnement opérant (Skinner 1938), est poursuivie jusqu'à ce que le taux de succès atteigne 80%. Une phase de test utilisant de nouveaux échantillons permet d'objectiver cette reconnaissance. Il s'agit de présenter au chien 6 échantillons de fèces dont l'un, choisi de façon aléatoire, provient d'une femelle alors que les cinq autres proviennent de mâles. Ce test est répété 5 fois afin d'obtenir une probabilité de choix correct par chance inférieure à 1% (Porritt et al. 2015). Un choix correct est comptabilisé lorsque le chien indique l'échantillon femelle et n'indique aucun échantillon mâle. L'indication d'un échantillon mâle ou la non-indication d'un échantillon femelle sont considérés comme des erreurs.

Afin d'établir les courbes d'apprentissage basales pour ce type d'expérience et ne disposant que d'une quantité limitée de fèces de marsouins, nous avons entraîné le chien à réaliser la tâche discriminative sur une autre espèce de mammifère dans un premier temps. Ainsi, nous avons débuté l'entraînement du chien Leïa en utilisant des crottes de microcèbes (*Microcebus murinus*) captifs, élevés pour la recherche en neurosciences à l'Université de Montpellier. Cette espèce a été choisie car elle nous permettait un accès à un grand nombre d'échantillons d'animaux identifiés, sexuellement matures et élevés dans des conditions contrôlés, tout en nous offrant une diversité génétique plus large (et donc plus proche de celles d'animaux sauvages) que celle de rats ou souris de laboratoire. Le contrôle étroit des facteurs de variation de la composition chimique des fèces (autres que le sexe), notamment grâce à un régime alimentaire identique pour tous les animaux, permet de limiter la présence de composés susceptibles d'interférer avec la recherche du signal "sexe" lors de la tâche de discrimination. A l'issue de cette phase

d'apprentissage et de la validation de la phase de test avec les échantillons de microcèbes, nous répèterons la procédure avec les crottes de marsouins mâles et femelles dont nous disposons. Cette deuxième étape devrait débiter à l'automne 2017 puisque Leïa montre déjà des taux de réussite de l'ordre de 60 - 70% avec les odeurs de microcèbe. En comparaison, les odeurs de marsouins présentent une variabilité chimique beaucoup plus importante (cf. analyses chimiques) probablement liée à des différences individuelles telles que l'âge, le régime alimentaire, ou la cause de la mort (maladie infectieuse, trauma, etc.) et le degré de décomposition. Nous faisons l'hypothèse que l'entraînement à l'identification du sexe femelle sur des crottes de microcèbe facilitera l'apprentissage de l'identification du sexe femelle sur les crottes de marsouins.

Ainsi, si le chien renifleur est capable de discriminer les sécrétions d'individus femelles des individus mâles, l'hypothèse selon laquelle les marsouins présentent des signaux chimiques codant pour leur genre sera appuyée. Bien que de tels résultats ne permettent pas de déterminer directement si les marsouins perçoivent et utilisent ces signaux, (perçus par le chien), ils constitueraient néanmoins une avancée indirecte dans le sens d'une communication probable chez les odontocètes.

B. Test de choix appliqué aux odontocètes sauvages

Après avoir mis en évidence une attraction envers un extrait de proie chez les grands dauphins juvéniles en captivité (Manuscrit 1), j'ai voulu tester si ces résultats étaient extrapolables chez leurs congénères sauvages. J'ai donc tenté de transposer le protocole expérimental dans le milieu naturel, en exposant des groupes de cétacés à un stimulus chimique alimentaire.

PRINCIPE ET METHODOLOGIE

L'objectif était de mesurer la réaction comportementale des grands dauphins et des globicéphales lorsqu'ils sont exposés à un extrait de proies. Nous avons construit un dispositif de diffusion de solutions test (2 kg de mélange d'hydrolysats de poissons et de calmar en proportions égales dilués dans 30 L d'eau de mer) et témoin (100 g d'argile marron dilués dans 30 L d'eau de mer) sur le pont d'un navire de 9 m (Fig. 1). Deux boules inox percées (boules de diffusion) étaient maintenues dans le sillage, distantes de 11 m, alors que le navire naviguait à vitesse modérée (inférieure à 5 nœuds). Dans chaque boule, une solution chimique était déversée en flux continu par un tube PVC flexible depuis le réservoir de 50 L fixé sur le pont à 2 m de hauteur. L'ouverture des réservoirs était contrôlée par un expérimentateur, permettant de déverser les solutions dans les boules de diffusion simultanément, avec un débit de 0.1 L/sec, créant deux « cônes » d'exposition sur les côtés du navire. Cette expérience a été menée dans le détroit de Gibraltar, une zone où les populations résidentes de grands dauphins et de globicéphales sont facilement observables dans un périmètre restreint.

Après avoir repéré un groupe de cétacés (grands dauphins ou globicéphales) naviguant en mer, le capitaine positionnait le bateau devant leur trajectoire à une distance d'environ 40 m. Si le groupe maintenait sa trajectoire et suivait le bateau, les solutions étaient déversées pendant 4 minutes ou jusqu'à ce que le groupe change de direction et s'éloigne du navire d'une distance supérieur à 100 m.

Nous avons mené deux types d'expositions :

- Des essais d' « **Exposition chimique de type choix** » : diffusion simultanée d'une solution test d'un côté et d'une solution témoin de l'autre côté (test de discrimination) ;
- Des essais « **Contrôle neutre** » : diffusion de la solution témoin de chaque côté.

Le côté où était déversée la solution test (extraits de proie) était défini par tirage aléatoire. La zone d'exposition était filmée par deux caméras fixées sur des perches positionnées en hauteur (4 m au-dessus du pont). Un biologiste, qui ignorait le type de substance déversé, a ensuite compté sur les enregistrements vidéos le nombre de total de respirations de cétacés dans chaque zone d'exposition (Gauche, Centrale et Droite, sur différentes distances à l'arrière du navire : 10, 20, 30 et 40 m). Le nombre de respirations divisé par le produit du nombre d'individu et par le temps d'exposition nous a permis d'obtenir une fréquence respiratoire (FR, exprimée en nombre de respiration x individu⁻¹ x min⁻¹).

$$FR = \frac{\text{nombre de respirations}}{\text{nombre d'individus} \cdot \text{temps d'exposition}}$$

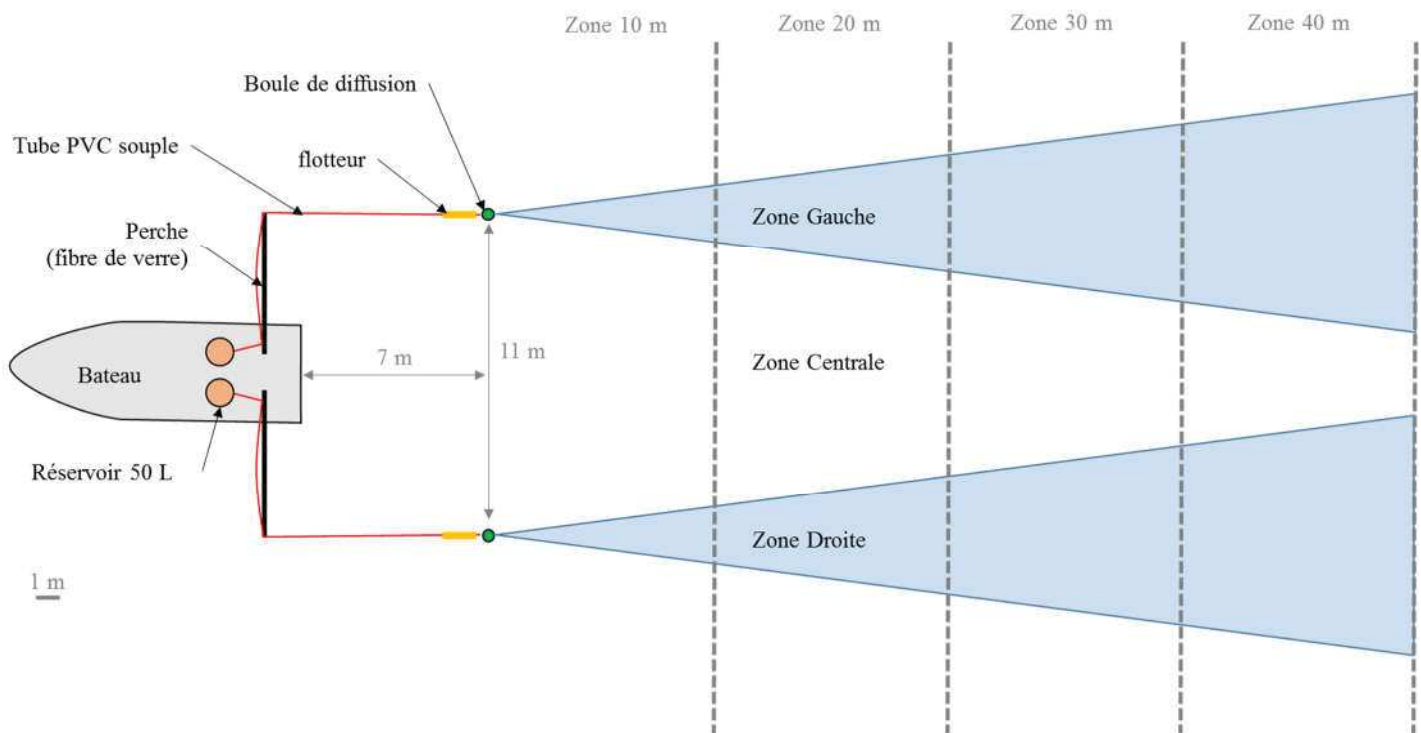


Figure 1. Dispositif de diffusion d'exposer les cétacés nageant dans le sillage du bateau à deux stimuli chimiques simultanément.

Nous avons effectué deux types d'analyses :

- Pour les tests d'exposition chimique de type choix uniquement, nous avons testé s'il existait une différence de FR entre la zone « test », et la zone « témoin » (test de discrimination). En effet, nous avons émis l'hypothèse qu'une attraction par les extraits de proies pourrait induire une présence des animaux plus importante dans la zone « test ». Nous avons donc comparé les FR entre la zone « test » et la zone « témoin » en testant la différence ($FR_{\text{Test}} - FR_{\text{Témoin}}$) grâce à un test T de Student.
- Pour tous les essais (« Exposition chimique » + « Contrôle neutre »), nous avons testé si la diffusion d'un extrait de proie (lors des essais « Exposition chimique ») pouvait augmenter la fréquence respiratoire sur l'ensemble des zones, par rapport à une solution témoin (essais « Contrôle neutre ») d'une façon similaire à un test de type « go - no go ». Nous avons évalué si la différence entre les FR était significative grâce à un test T de Student.

La séquence des essais « Exposition chimique de type choix » et « Contrôles neutres » suivait un ordre aléatoire. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel R. Pour chaque expérience, nous avons en plus mesuré l'influence de plusieurs facteurs sur la variable de réponse (FR) grâce à des modèles linéaires, en incluant non seulement le type de stimulus chimique (extrait de proies vs. argile), mais également l'espèce de cétacé (grand dauphin ou globicéphale), la vitesse du bateau, la présence de juvéniles dans le groupes, l'heure de la journée, le jour de l'expérience et la position de l'essai dans la séquence d'exposition. Un modèle global a tout d'abord été construit, puis le modèle le plus parcimonieux a été sélectionné en se basant sur l'AIC grâce à la fonction *dredge* (package MuMIn).

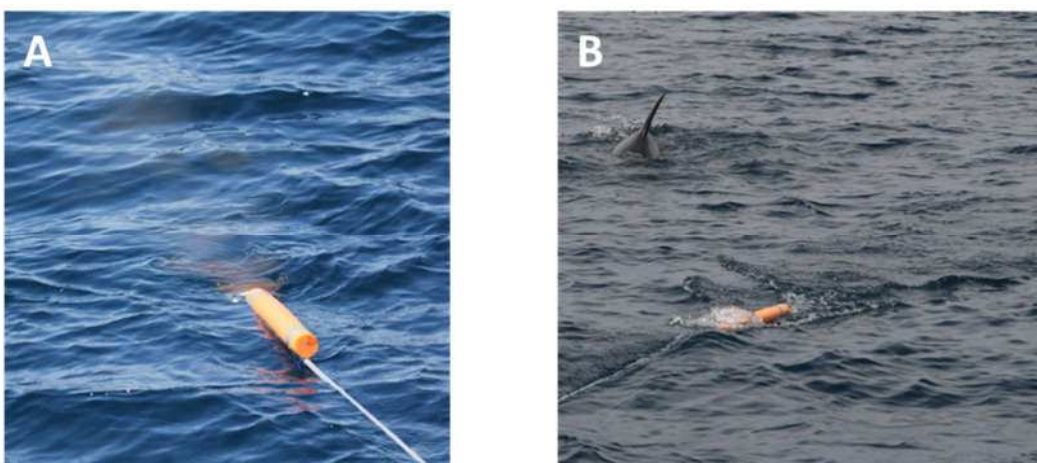


Figure 2. Détail du système de diffusion de composé chimique (A) et approche d'une boule de diffusion par un globicéphale (B).

RESULTATS

Nous avons effectué un total de 58 essais : 36 essais « exposition chimique de type choix » (18 avec l'extrait de proies à gauche, et 18 à droite) et 22 essais « contrôle neutre ». La durée moyenne des séquences d'exposition était de 116 ± 76 sec. (de 15 à 240 sec.). Les essais ont été effectués sur plus de groupes de grands dauphins (48 groupes, soit 233 individus) que de globicéphales (16 groupes, soit 116 individus).

Test de préférence (coté « test » vs. coté « Témoin »)

En prenant en compte les 36 essais « Exposition chimique de type choix » uniquement, nos résultats montrent que la FR ne varie pas significativement en fonction du côté où se trouve l'extrait de proie ($t = -0.269$, IC 95% = $-0.56 - 0.43$, $p = 0.78$, test T de Student bilatéral). Le modèle linéaire ne nous a permis d'expliquer qu'une faible proportion de la variance des données (R^2 ajusté = 0.05) et ne montre pas non plus d'effet significatif du stimulus chimique, ni de l'espèce ou de la présence de juvéniles, ni des différentes variables de contrôle incluses dans le modèle (vitesse du bateau, heure de la journée, numéro de la séquence d'exposition).

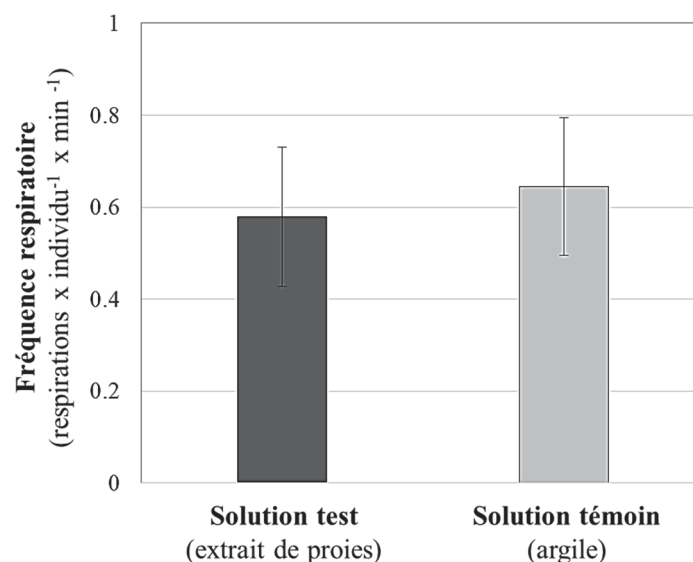


Figure 3. Fréquence respiratoire des cétacés (grands dauphins et globicéphales) dans les deux cônes d'exposition, créés par les deux boules de diffusions situées à l'arrière du navire. Les barres verticales représentent les erreurs-types. La différence n'est pas significative ($p = 0.78$).

Analyse séquentielle (essai « Exposition chimique de type choix » vs. essai « Contrôle neutre »)

Sur l'ensemble des 58 essais, nous avons trouvé une augmentation marginalement significative de la fréquence respiratoire lors de l'exposition à l'extrait de proie par rapport à une solution contrôle ($t = 1.816$, IC 95% = $-0.023 - 0.463$, $p = 0.075$, test T de Student bilatéral)

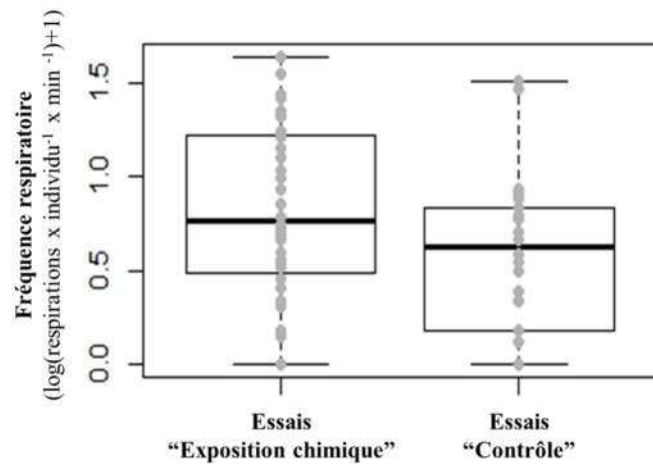


Figure 4. Comparaison de la fréquence respiratoire des cétacés (grands dauphins et globicéphales) exposés à l'arrière du navire à un stimulus chimique (extrait de proies, essais « exposition chimique de type choix ») ou à un stimulus contrôle (argile de couleur identique, essais « contrôle neutre »). La différence est marginalement significative ($p = 0.075$)

Le modèle linéaire explique mieux la variance (R^2 ajusté = 0.18) que pour l'analyse précédente. La stimulation par l'extrait de proies a eu un effet positif (estimate = 0.24, IC 95% = 0.11 – 2.13, $p = 0.038$) alors que l'heure de la journée a eu un effet négatif (estimate = -0.09, IC 95% = -0.19 – 0.005 $p = 0.038$). La vitesse de traction du dispositif a également eu un effet marginalement positif (estimate = 0.13, IC 95% = 0.07 – 1.93, $p = 0.058$).

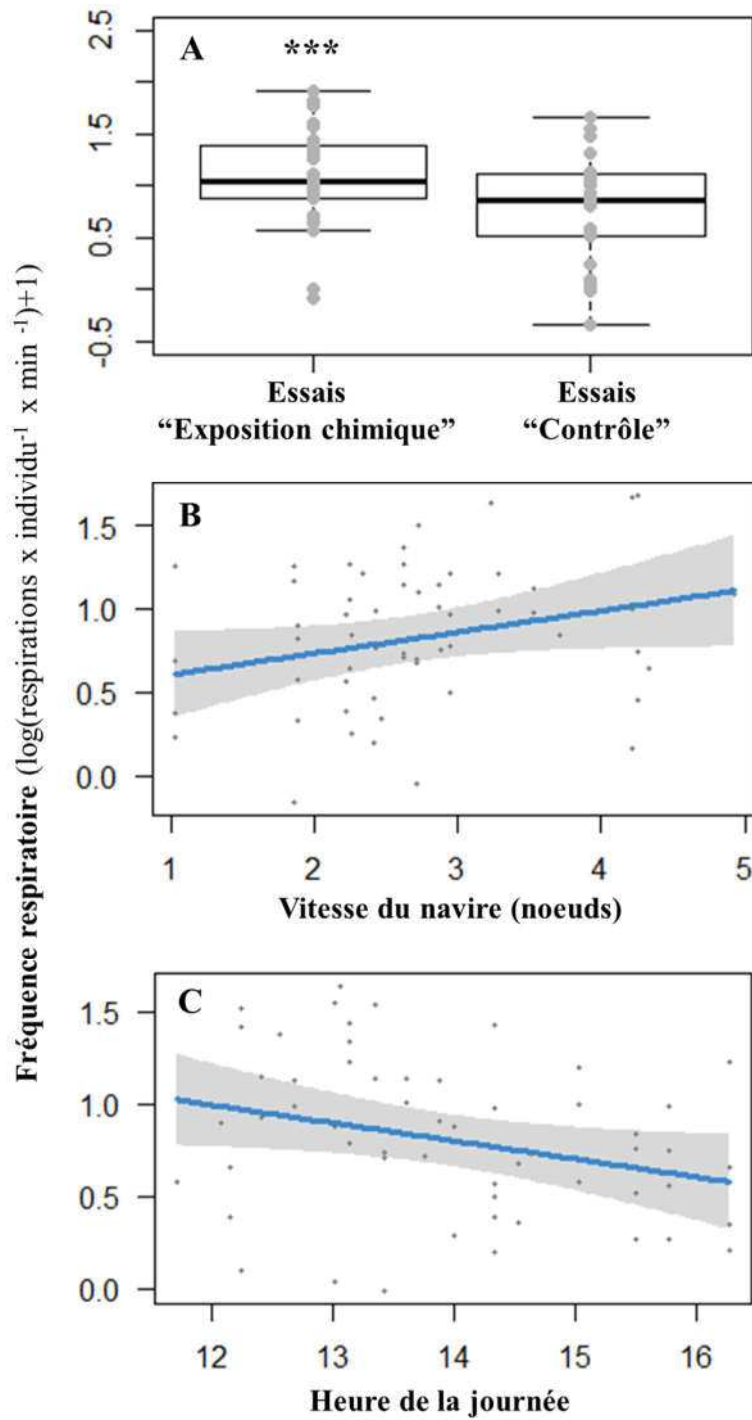


Figure 5. Fréquence respiratoire des cétacés (grands dauphins et globicéphales) en fonction de l'exposition à un stimulus chimique ou une solution témoin (A), de la vitesse de traction du dispositif (B) et de l'heure de la journée (C).

CONCLUSION

Nos résultats n'ont pas montré, lors du test de choix, de préférence pour la boule de diffusion du goût de proie (mélange d'hydrolysats de poissons et de calmars) par rapport à la diffusion d'une solution témoin chez le grand dauphin ou le globicéphale. Ceci contraste avec les observations chez les grands dauphins en captivité, qui ont révélé une attraction plus importante des juvéniles envers un diffuseur d'extrait de poisson par rapport au diffuseur contrôle. Cependant, dans le milieu naturel, nous n'avons pu mesurer que les respirations des animaux lorsque leur évent apparaît en surface, ce qui ne reflète pas nécessairement les mouvements des animaux sous la surface. En effet, la visibilité dans l'eau était inférieure à 10 m, nous empêchant de mesurer le temps exact passé par les animaux dans chaque « cône de diffusion » malgré la présence d'une caméra sous-marine fixée à la coque arrière. Une autre explication pour l'absence de différence de fréquence respiratoire entre les deux zones pourrait être un mélange des deux solutions dans le sillage du navire, dû aux turbulences créées par les deux hélices de propulsion : c'est par anticipation de ce problème que nous avons mis en place des tests de types « go – no go » en comparant les essais « exposition chimique de type choix » aux essais « contrôle neutre ».

En revanche, nos résultats mettent en évidence une augmentation de la fréquence respiratoire des cétacés (grands dauphins et globicéphales) lors de la diffusion de l'extrait de proie par rapport à une solution contrôle. Ceci pourrait être lié à une augmentation de la ventilation permettant d'échantillonner les molécules volatiles diffusées dans l'air, comme le « sniffing » chez les mammifères terrestres.

Le protocole mis en place dans cette expérience présente l'avantage d'exposer activement des cétacés sauvages à des stimuli chimiques, soit dans le cadre d'un test de choix binaire (deux boules de diffusions distantes de 11 m), soit lors d'essais successifs. Cependant, cette expérience nous montre qu'il doit être amélioré pour permettre une mesure fine des réactions des animaux. Réaliser une étude dans des eaux moins turbides (visibilité supérieure à 20 m) pourrait permettre d'utiliser les images sous-marines enregistrées par la caméra fixée à la coque arrière, et ainsi de mesurer le temps exact passé dans chaque cône de diffusion. De plus, l'utilisation d'un drone avec une caméra orientée à 90° au-dessus des boules de diffusion donnerait des informations précises sur les déplacements des animaux dans les premiers

mètres sous la surface. Cependant, les permis de pilotage de drone dans le détroit de Gibraltar, une zone stratégique militaire et commerciale, sont très difficiles à obtenir. Enfin, il serait intéressant d'exposer de petits groupes : cela permettrait de suivre le comportement de chaque animal afin de mettre en évidence un effet individuel potentiel, notamment lié à l'âge comme cela a été montré en captivité.

C. Imagerie par drone : un outil performant pour l'étude de réponses comportementales chez les cétacés

PILOTER UN DRONE EN MER : UN DEFI TECHNIQUE

Lors des expériences que j'ai menées sur les cétacés sauvages (Manuscrits 1 et 2), j'ai pu appréhender pleinement les nombreuses difficultés de l'utilisation du drone en mer par rapport au milieu terrestre. Tout d'abord, le milieu marin n'offre pas de repères stables, rendant l'orientation difficile. Ensuite, piloter un drone sur un bateau nécessite de composer avec des vents omniprésents qui peuvent retourner l'appareil lors de rafales puissantes. Le vent entraîne par ailleurs une utilisation plus intense des moteurs d'hélice pour stabiliser la position de l'appareil et diminue donc considérablement le temps de vol. Ensuite, travailler en mer nécessite de prendre en considération la houle et les vagues. Celles-ci peuvent déstabiliser le pilote, mais surtout elles font bouger le bateau verticalement ce qui rend le décollage et l'atterrissage difficiles et parfois dangereux. Les antennes et les drapeaux, ainsi que les haubans et les drisses des voiliers représentent également des dangers de collisions lors des phases de décollage et d'atterrissage. En mer, l'absence d'ombre et les reflets des rayons solaires peuvent aussi compliquer la lecture du retour vidéo sur la télécommande. Enfin, il convient de prendre garde aux oiseaux marins car certaines espèces (Laridés notamment) peuvent avoir des comportements agressifs envers les drones, notamment en période de reproduction.

Au cours de cette thèse, j'ai ainsi eu l'occasion de piloter des drones dans des milieux très différents (tropicaux, polaires et tempérés), dans des conditions climatiques variées et sur de nombreux types d'embarcations (zodiacs, navires de recherche, monocoques et catamarans). Cette technologie étant relativement récente, les informations disponibles sur l'utilisation des drones en mer étaient quasi-inexistantes. J'ai donc pratiqué de nombreuses fois en milieu terrestre, et j'ai dû apprendre principalement par essais-erreurs. Voici donc quelques recommandations pour le pilotage de drone en milieu marin, basées sur mon expérience :

1. ne pas voler par vent de plus de 20 nœuds
2. avant chaque utilisation, réaliser un vol « test » court et à proximité
3. avoir une bonne maîtrise des techniques d'atterrissage d'urgence

4. présence d'un observateur qui garde un contact visuel avec le drone en permanence
5. évaluer le risque lié aux oiseaux à proximité (espèces, nombre et comportement)
6. coller au drone une étiquette avec le nom, l'organisation, et le contact du pilote
7. si vol au-dessus de l'eau : utilisation de flotteurs (Fig. 1)
8. si pilotage à bord d'un navire : ne pas voler par houle supérieure à 2m et avoir un assistant permettant le décollage et l'atterrissage équipé de gants et lunettes, utilisation de protecteurs d'hélices (Fig. 1)



Figure 1. Drone « Phantom 3 Advanced » équipé de protecteurs d'hélices et de flotteurs

ANALYSE DES MOUVEMENTS ET COMPORTEMENTS DES CETACES PAR IMAGES AERIENNES

Lors des expériences en milieu naturel, j'ai principalement utilisé le drone pour améliorer la précision des observations comportementales. En effet, grâce au retour vidéo sur la télécommande, j'ai pu suivre en détails les mouvements des groupes de cétacés. Cela m'a permis de compléter les données des observateurs embarqués, par exemple en interagissant directement avec eux pour améliorer leurs estimations des distances et de la taille des groupes.

J'ai également enregistré des séquences d'images de la réaction des animaux (une image prise toutes les 2 secondes) en plaçant le drone à 150 m au-dessus du diffuseur chimique, avec la caméra orientée à 90° vers le bas. La qualité de ces photographies (12 mégapixels, soit 4000 x 3000 pixels) m'a permis d'obtenir une définition de 8 cm/pixel environ et donc de suivre avec précision, jusqu'à plusieurs mètres

sous la surface, les mouvements et comportements des animaux, aussi bien des mysticètes que des odontocètes (Fig. 2).

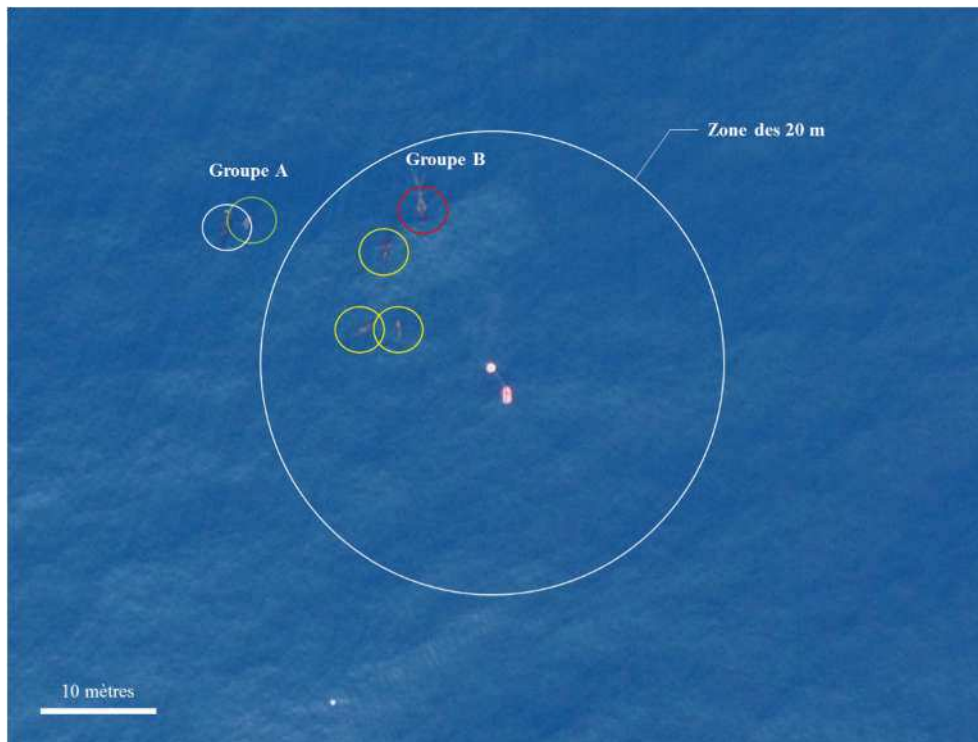


Figure 2. Approche du diffuseur (attaché à la plate-forme d'enregistrement, au centre) par deux groupes de globicéphales dans le golfe de Vera, Espagne. Certains individus sont en surface (cercles rouges et vert) alors que les autres nagent sous l'eau (cercles jaunes et blanc).

A partir de ces images, en prenant comme repère le diffuseur flottant, il est possible de mesurer plusieurs paramètres de déplacement des groupes d'animaux tels que leur trajectoire, leur vitesse horizontale et leur angle d'approche du stimulus chimique (Fig. 3). Ceci est effectué automatiquement après avoir déterminé manuellement la position de chaque individu à l'aide d'un point, avec des couleurs différentes en fonction des groupes et de la position sur ou sous la surface, et l'utilisation d'un programme (développé par Simon Benhamou) de reconnaissance des points colorés. La position du centre du groupe a été définie comme la moyenne des positions de chacun de ses membres. Les images aériennes permettent également de calculer la proportion de temps passé en surface (et donc potentiellement en respiration) de chaque individu.

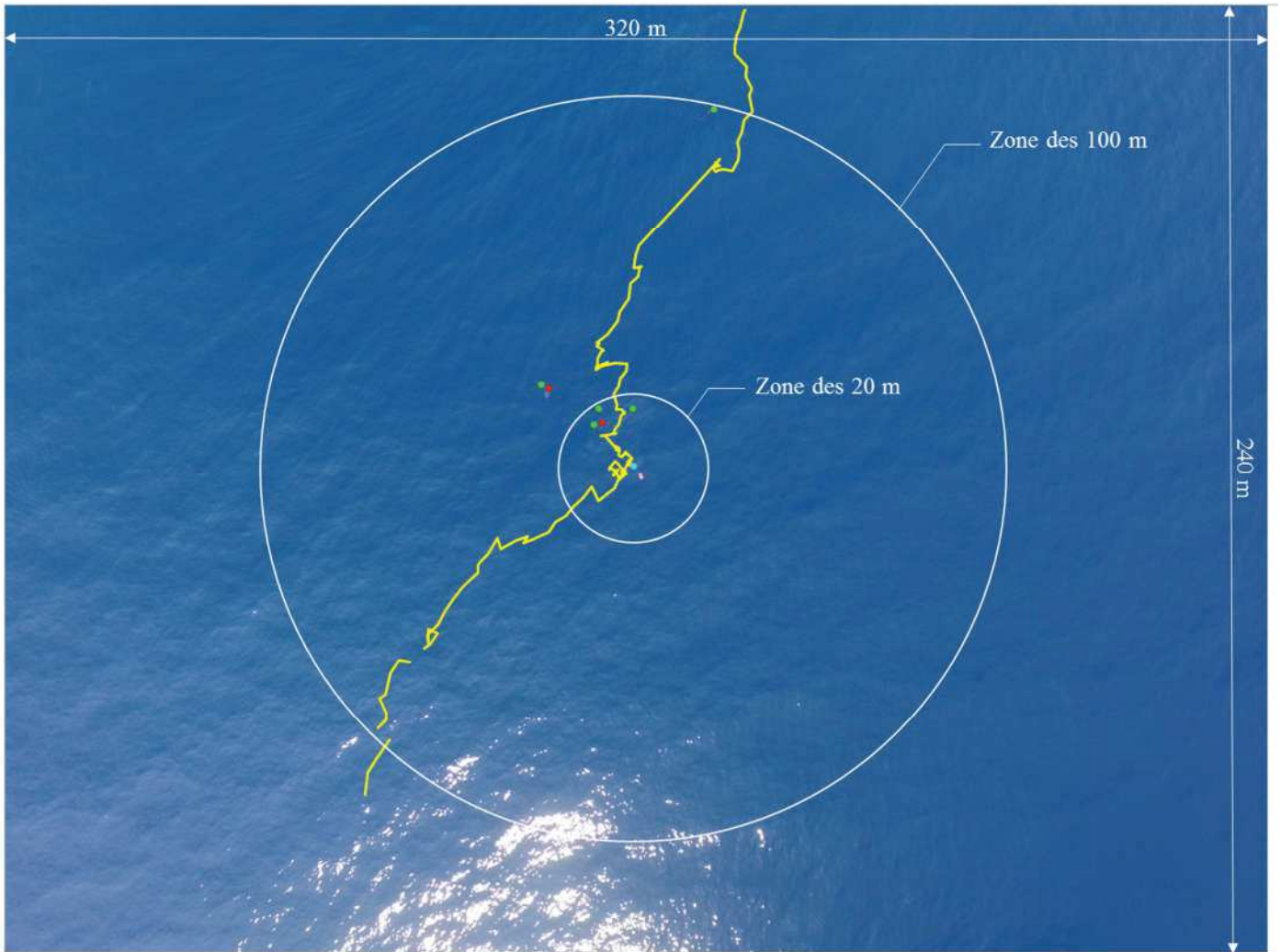


Figure 3. Trajectoire d'un groupe de globicéphale (jaune) lors d'une expérience d'exposition au DMS dans le golfe de Vera, Espagne. La position de chaque individu du groupe sur une image donnée est représentée par les points verts (sous la surface) ou rouges (sur la surface). Les zones de forte et moyenne exposition (20 m et 100 m de rayon, respectivement) sont indiquées en cercles blancs.

D'après les quelques essais effectués sur les globicéphales, il semble que ces paramètres permettent d'objectiver et quantifier la réponse des groupes à un stimulus chimique. En effet, un groupe attiré par le DMS change de profil de déplacement à l'approche du diffuseur : il ralentit sa vitesse horizontale et se déplace de façon moins linéaire (augmentation de l'erreur d'angle) (Fig. 4A et 4B). De plus, il augmente le temps passé en surface, suggérant des respirations plus fréquentes en faveur d'une perception de la molécule volatile par les voies aériennes supérieures (Fig. 4C).

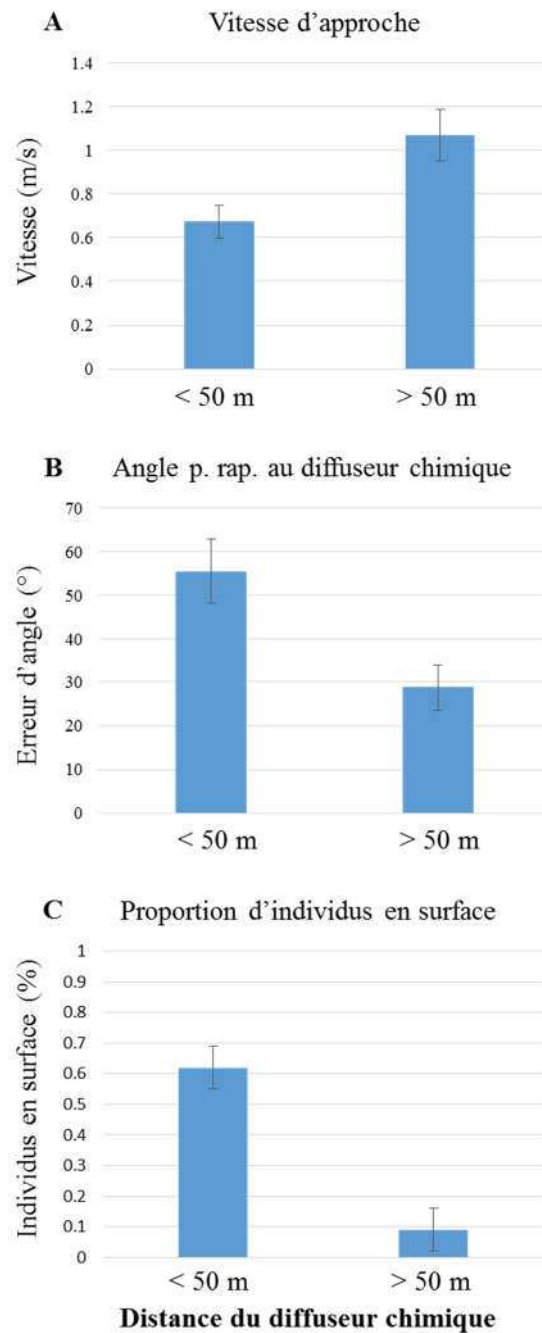


Figure 4. Paramètres de déplacement et de comportements d'un groupe de globicéphales lors de l'exposition au DMS, en fonction de leur distance par rapport au flotteur. La limite de 50 m a été choisie car elle constitue un intermédiaire entre les zones de forte et moyenne exposition. Lorsqu'un groupe réagit au stimulus chimique, la vitesse d'approche diminue (A) alors que l'erreur d'angle (B) et la présence en surface augmentent (C).

Ces premiers résultats montrent que l'analyse des images aériennes prises par drone constitue un outil particulièrement efficace pour l'étude fine des comportements et des déplacements des cétacés. Dans le cas de nos travaux, elle permet le suivi de la réaction des animaux à un stimulus chimique, mais son utilisation pourrait être étendue à de nombreux domaines comme celui des études de l'impact des activités anthropiques (bruits sous-marins, navires d'observations des cétacés, pêche, etc.). L'amélioration rapide des capacités des drones, en terme de temps de vol et de qualité des images, va donc très certainement en faire un outil très largement utilisé dans un futur proche en écologie des mammifères marins en particulier et de la mégafaune marine en général.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abeille R, Doh Y, Dufour O, Giraudet P, Halkias P, Glotin H, Prévot JM, Rabouy C, Razik J (2013) Détection et classification sur transect audiovisuel de populations de cétacés du nord Pelagos - Iles d'Or. Parc National de Port-Cros. Toulon, France. 136 p.
- Ahn J-H, Szulejko JE, Kim K-H, Kim Y-H, Kim B-W (2014) Odor and VOC emissions from pan frying of mackerel at three stages: raw, well-done, and charred. *Int J Environ Res Public Health* 11:11753–71
- Akaike H (1973) Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov BN, Csaki F (eds) *Proceedings of the 2nd international symposium on information theory*. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, p 267–281
- Anderson MJ (2001) Permutation tests for univariate or multivariate analysis of variance and regression. *Can J Fish Aquat Sci* 58:626–639
- Anderwald P, Evans PGH, Gygas L, Hoelzel AR (2011) Role of feeding strategies in seabird-minke whale associations. *Mar Ecol Prog Ser* 424:219–227
- Apps PJ (2013) Are mammal olfactory signals hiding right under our noses? *Naturwissenschaften* 100:487–506
- Archunan G, Rajanarayanan S, Karthikeyan K (2014) Cattle Pheromones. In: Mucignat-Caretta C (ed) *Neurobiology of Chemical Communication*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p 612–630
- Astruc G (2005) Exploitation des chaînes trophiques marines de Méditerranée par les populations de cétacés. MSc dissertation. Ecole Pratique des Hautes Etudes, Paris, France.
- Avgar T, Deardon R, Fryxell JM (2013) An empirically parameterized individual based model of animal movement, perception, and memory. *Ecol Modell* 251:158–172
- Baldwin MW, Toda Y, Nakagita T, O'Connell MJ, Klasing KC, Misaka T, Edwards S V., Liberles SD (2014) Sensory biology. Evolution of sweet taste perception in hummingbirds by transformation of the ancestral umami receptor. *Science* 345:929–33
- Barnett J (2002) Evaluation of Rehabilitation As an Option for Stranded Dolphins, Porpoises and Whales. *Rehabilitation*: 1–91
- Bartcus C, Glotin H (2015) Hierarchical Dirichlet process Hidden Markov Model for unsupervised bioacoustic analysis—application to whale song decomposition. In: *Proceedings of the IEEE International Joint Conference on Neural Networks*. p 1–7
- Bartel DL, Sullivan SL, Lavoie ÉG, Sévigny J, Finger TE (2006) Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds. *J Comp Neurol* 497:1–12
- Bartón K (2016) MuMIn: Multi-Model Inference. Model selection and model averaging based on information criteria (AICc and alike) (available at www.cran.r-project.org/web/packages/MuMIn/index.html).
- Beauchamp GK, Moulton DG, Mugford RA (1976) Mammalian Olfaction, Reproductive Processes, and Behavior. *Mamm Olfaction, Reprod Process Behav*: 143–160
- Behrmann G (1988) The peripheral nerve ends in the tongue of the harbour porpoise *Phocoena phocoena* (Linne, 1758). *Aquat Mamm* 14:107–112
- Behrmann G (1989) The olfactory regions in the nose of the harbour porpoise *Phocoena phocoena*. *Aquat Mamm* 15:130–133

- Bell WJ, Tobin TR (1982) Chemo-Orientation. *Biol Rev* 57:219–260
- Berman-Kowalewski M, Gulland FMD, Wilkin S, Calambokidis J, Mate B, Cordaro J, Rotstein D, Leger JS, Collins P, Fahy K, Dover S (2010) Association between blue whale (*Balaenoptera musculus*) mortality and ship strikes along the California coast. *Aquat Mamm* 36:59–66
- Berresheim H (1987) Biogenic sulfur emissions from the Subantarctic and Antarctic Oceans. *J Geophys Res* 92:13245–13262
- Berta A, Ekdale EG, Cranford TW (2014) Review of the Cetacean Nose: Form, Function, and Evolution. *Anat Rec* 297:2205–2215
- Berta A, Ekdale EG, Deméré T a., Reidenberg JS (2015) Introduction to the Anatomy of the Head of a Neonate Gray Whale (*Mysticeti*, *Eschrichtius robustus*). *Anat Rec* 298:643–647
- Berta A, Ekdale EG, Zellmer NT, Deméré T a., Kienle SS, Smallcomb M (2015) Eye, Nose, Hair, and Throat: External Anatomy of the Head of a Neonate Gray Whale (*Cetacea*, *Mysticeti*, *Eschrichtiidae*). *Anat Rec* 298:648–659
- Besseling E, Foekema EM, Franeker JA Van, Leopold MF, K??hn S, Bravo Rebolledo EL, He??e E, Mielke L, IJzer J, Kamminga P, Koelmans AA (2015) Microplastic in a macro filter feeder: Humpback whale *Megaptera novaeangliae*. *Mar Pollut Bull* 95:248–252
- Bhuiyan AKMA, Ratnayake WMN, Ackman RG (1986) Effect of Smoking on the Proximate Composition of Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*). *J Food Sci* 51:327–329
- Bijland LR, Bomers MK, Smulders YM (2013) Smelling the diagnosis: a review on the use of scent in diagnosing disease. *Neth J Med* 71:300–7
- Bills ML (2011) Description of the chemical senses of the Florida manatee, *Trichechus* (*Manatus latirostris*), in relation to reproduction. PhD dissertation. University of Florida, USA. 156 p.
- Bills ML, Samuelson DA, Larkin IL V. (2013) Anal glands of the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*: A potential source of chemosensory signal expression. *Mar Mammal Sci* 29:280–292
- Blanco C, Raga JA, Salomón O (2001) Diet of the Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) in the Western Mediterranean Sea. *J Mar Biol Assoc UK* 81:1053–1058
- Blomqvist C, Amundin M (2004) High-Frequency Burst-Pulse Sounds in Agonistic/Aggressive Interactions in Bottlenose Dolphins, *Tursiops truncatus*. In: Thomas JA, Moss CF, Vater M (eds) *Echolocation in Bats and Dolphins*. University of Chicago Press, Chicago, USA., p 425–431
- Bonadonna F, Hesters F, Jouventin P (2003) Scent of a nest : discrimination of own-nest odours in Antarctic prions, *Pachyptila desolata*. *Behav Ecol Sociobiol* 54:174–178
- Bonadonna F, Nevitt GA (2004) Partner-specific odor recognition in an Antarctic seabird. *Science* 306:835
- Bordoni B, Zanier E (2013) Cranial nerves XIII and XIV: Nerves in the shadows. *J Multidiscip Healthc* 6:87–91
- Bornatowski H, Wedekin LL, Heithaus MR, Marcondes MCC, Rossi-Santos MR (2012) Shark scavenging and predation on cetaceans at Abrolhos Bank, eastern Brazil. *J Mar Biol Assoc United Kingdom* 92:1–6
- Bouchard B, Campagna S, Célérier A (2016) Finding food in the ocean: could cetaceans use chemical cues? In: Annual Conference of the European Cetacean Society. Funchal, Portugal, p 92
- Bouchard B, Lisney TJ, Campagna S, Célérier A, Celerier A, Célérier A (2017) Do bottlenose dolphins display behavioural response to fish taste? *Appl Anim Behav Sci* 194:120–126

- Brakes P, Simmonds MP (2011) Whales and Dolphins: Cognition, Culture, Conservation and Human Perceptions . Earthscan, London, UK
- Breathnach AS (1960) The cetacean central nervous system. *Biol Rev* 35:187–230
- Brierley AS, Watkins JL, Murray AWA (1997) Interannual variability in krill abundance at South Georgia. *Mar Ecol Prog Ser* 150:87–98
- Brönmark C, Hansson L (2000) Chemical communication in aquatic systems: an introduction. *Oikos* 88:103–109
- Bureau A, Zussy C, Delair B, Ogier C, Ixart G, Maurice T, Givalois L (2013) Deregulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis functions in an Alzheimer’s disease rat model. *Neurobiol Aging* 34:1426–1439
- Buhl EH, Oelschläger HA (1986) Ontogenetic development of the nervus terminalis in toothed whales. Evidence for its non-olfactory nature. *Anat Embryol* 173:285–94
- Burnham KP, Anderson DR (2004) Model Selection and Multimodel Inference (KP Burnham and DR Anderson, Eds.). Springer New York, New York, NY, USA
- Campbell-Palmer R, Rosell F (2011) The importance of chemical communication studies to mammalian conservation biology: A review. *Biol Conserv* 144:1919–1930
- Canadas A, Sagarminaga R (2000) The northeastern Alboran Sea, an important breeding and feeding ground for the long-finned pilot whale (*Globicephala melas*) in the Mediterranean Sea. *Mar Mammal Sci* 16:513–529
- Cañadas A, Sagarminaga R, Stephanis R De, Urquiola E, Hammond PS (2005) Habitat preference modelling as a conservation tool: Proposals for marine protected areas for cetaceans in southern Spanish waters. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 15:495–521
- Canneyt O Van, Dabin W, Dars C, Dorémus G, Gonzalez L, Ridoux V, Spitz J, Report T, Universit OVC, Rochelle L, Dor G, Rochelle L, Universit VR, Rochelle L (2015) Guide des échouages de mammifères marins. Cahier technique de l’Observatoire PELAGIS sur le suivi de la mégafaune marine. Université de La Rochelle et CNRS, La Rochelle, 64 p.
- Cantin G, Levasseur M, Gosselin M, Michaud S (1996) Role of zooplankton in the mesoscale distribution of surface dimethylsulfide concentrations in the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Mar Ecol Prog Ser* 141:103–117
- Caro SP, Balthazart J (2010) Pheromones in birds: myth or reality? *J Comp Physiol A* 196:751–766
- Caro SP, Balthazart J, Bonadonna F (2015) The perfume of reproduction in birds: Chemosignaling in avian social life. *Horm Behav* 68:25–42
- Cave AJE (1988) Note on olfactory activity in mysticetes. *J Zool* 214:307–311
- Cazau D, Adam O, Aubin T, Laitman JT, Reidenberg JS (2016) A study of vocal nonlinearities in humpback whale songs: from production mechanisms to acoustic analysis. *Sci Rep* 6:31660
- Centre for Marine Futures (2015) Ilhas Selvagens. University of Western Australia, Crawley (Australia). [Site internet visité le 20/01/2018]. <http://www.meeuwig.org/video-gallery/ilhas-selvagens-2015>.
- Cerchio S, Dahlheim M (2001) Variation in feeding vocalizations of humpback whales *megaptera novaeangliae* from southeast alaska. *Bioacoustics* 11:277–295
- Cerchio S, Trudelle L, Zerbini AN, Charrassin JB, Geyer Y, Mayer FX, Andrianarivelo N, Jung JL, Adam O, Rosenbaum HC (2016) Satellite telemetry of humpback whales off Madagascar reveals insights on breeding behavior and long-range movements within the southwest Indian Ocean.

- Mar Ecol Prog Ser 562:193–209
- Ceruti MG, Fennessey P V., S. TS (1985) Chermoreceptively active compounds in secretions, excretions and tissue extracts of marine mammals. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* 82:505–514
- Chamero P, Marton TF, Logan DW, Flanagan K, Cruz JR, Saghatelian A, Cravatt BF, Stowers L (2007) Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature* 450:899–902
- Chivers DP, Mirza RS, Bryer PJ, Kiesecker JM (2001) Threat-sensitive predator avoidance by slimy sculpins: understanding the importance of visual versus chemical information. *Can J Zool* 79:867–873
- Christiansen F, Rojano-Doñate L, Madsen PT, Bejder L (2016) Noise Levels of Multi-Rotor Unmanned Aerial Vehicles with Implications for Potential Underwater Impacts on Marine Mammals. *Front Mar Sci* 3:1–9
- Chung-Davidson Y-W, Huertas M, Li W (2010) A Review of Research in Fish Pheromones. In: Breithaupt T, Thiel M (eds) *Chemical Communication in Crustaceans*. Springer New York, New York, NY, USA p 467–482
- Clapham PJ (2009) Humpback whale: *Megaptera novaeangliae*. In: Perrin W, Wursig B, Thewissen J (eds) *Encyclopedia of Marine Mammals*, 2nd ed. Academic Press, London, UK, p 582–585
- Clark FE (2013) Marine mammal cognition and captive care : A proposal for cognitive enrichment in zoos and aquariums. *J Zoo Aquarium Res* 1:1–6
- Clark FE, Davies SL, Madigan AW, Warner AJ, Kuczaj SA (2013) Cognitive enrichment for bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*): Evaluation of a novel underwater maze device. *Zoo Biol* 32:608–619
- Clua É, Grosvalet F (2001) Mixed-species feeding aggregation of dolphins, large tunas and seabirds in the Azores. *Aquat Living Resour* 14:11–18
- Colbert MW, Racicot R, Rowe T (2005) Anatomy of the cranial endocast of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, based on HRXCT. *J Mamm Evol* 12:195–207
- Constantino MA, Salmon M (2003) Role of chemical and visual cues in food recognition by leatherback posthatchlings (*Dermochelys coriacea* L). *Zoology* 106:173–181
- Cozzi B, Huggenberger S, Oelschläger HA (2016) *Anatomy of Dolphins: Insights into Body Structure and Function* (B Cozzi, S Huggenberger, and HA Oelschläger, Eds.), 1st ed. Academic Press, London, UK
- Cranford TW, Amundin M, Norris KS (1996) Functional morphology and homology in the Odontoceti nasal complex implications for sound generation. *J Morphol* 228:223–285
- Cunningham GB, Leclaire S, Toscani C, Bonadonna F (2017) Responses of king penguin *Aptenodytes patagonicus* adults and chicks to two food-related odours. *J Avian Biol* 48:235–242
- Curry BE, Ralls K, Brownell RL (2013) Prospects for captive breeding of poorly known small cetacean species. *Endanger Species Res* 19:223–243
- Czech-Damal NU, Dehnhardt G, Manger P, Hanke W (2013) Passive electroreception in aquatic mammals. *J Comp Physiol A Neuroethol Sensory, Neural, Behav Physiol* 199:555–563
- Dacey JWH, Wakeham SG (1986) Oceanic Dimethylsulfide : Production During Zooplankton Grazing on Phytoplankton. *Science* 233:1314–1317
- Dawson S, Northridge S, Waples D, Read A (2012) To ping or not to ping; the use of active acoustic

- devices in mitigating interactions between small cetaceans and gillnet fisheries. *Endanger Species Res* 19:201–221
- DeBose JL, Nevitt GA (2008) The use of odors at different spatial scales: Comparing birds with fish. *J Chem Ecol* 34:867–881
- Dehnhard M (2011) Mammal semiochemicals: Understanding pheromones and signature mixtures for better zoo-animal husbandry and conservation. *Int Zoo Yearb* 45:55–79
- Dell’Ariccia G, Celerier A, Gabirot M, Palmas P, Massa B, Bonadonna F (2014) Olfactory foraging in temperate waters: Sensitivity to dimethylsulfide by shearwaters in the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *J Exp Biol* 217:1701–1709
- Demski LS, Ridgway SH, Schwanzel-Fukuda M (1990) The terminal nerve of dolphins: gross structure, histology and luteinizing-hormone-releasing hormone immunocytochemistry. *Brain Behav Evol* 36:249–261
- Diebel CE, Proksch R, Green CR, Neilson P, Walker MM (2000) Magnetite defines a vertebrate magnetoreceptor. *Nature* 406:299–302
- Dobson FS, Jouventin P (2003) How mothers and their pups in a colony of Antarctic fur seals. *Behav Processes* 61:77–85
- Dove ADM (2015) Foraging and ingestive behaviors of whale sharks, *Rhincodon typus*, in response to chemical stimulus cues. *Biol Bull* 228:65–74
- Drake SE, Crish SD, George JC, Stimmelmayer R, Thewissen JGM (2015) Sensory Hairs in the Bowhead Whale, *Balaena mysticetus* (Cetacea, Mammalia). *Anat Rec* 298:1327–1335
- Dudzinski KM (1998) Contact behavior and signal exchange in Atlantic spotted dolphins (*Stenella frontalis*). *Aquat Mamm* 24:129–142
- Dudzinski KM, Thomas JA, Gregg JD (2009) Communication in Marine Mammals. In: Perrin WF, Wursig B, Thewissen JGM (eds) *Encyclopedia of Marine Mammals*, 2nd ed. Academic Press, New York, USA, p 260–269
- Dulau V, Pinet P, Geyer Y, Fayan J, Mongin P, Cottarel G, Zerbini A, Cerchio S (2017) Continuous movement behavior of humpback whales during the breeding season in the southwest Indian Ocean: on the road again! *Mov Ecol* 5:11–28
- Dunlop RA, Noad MJ, Cato DH, Kniest E, Miller PJO, Smith JN, Stokes MD (2012) Multivariate analysis of behavioural response experiments in humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *J Exp Biol* 216:759–770
- Elisia I, Kitts DD (2011) Quantification of hexanal as an index of lipid oxidation in human milk and association with antioxidant components. *J Clin Biochem Nutr* 49:147–152
- Elvidge CK, Brown GE (2012) Visual and Chemical Prey Cues as Complementary Predator Attractants in a Tropical Stream Fish Assemblage. *Int J Zool* 2012:1–7
- Endres CS, Lohmann KJ (2012) Perception of dimethyl sulfide (DMS) by loggerhead sea turtles: a possible mechanism for locating high-productivity oceanic regions for foraging. *J Exp Biol* 215:3535–3538
- Engelhart A, Müller-Schwarze D (1995) Response of beaver (*Castor canadensis*) to predator chemicals. *J Chem Ecol* 21:1349–1364
- Epstein LH, Leddy JJ, Temple JL, Faith MS (2007) Food reinforcement and eating: a multilevel analysis. *Psychol Bull* 133:884–906
- Evans PGH (1982) Associations between seabirds and cetaceans: a review. *Mamm Rev* 12:187–206

- Fadool D a, Wachowiak M, Brann JH (2001) Patch-clamp analysis of voltage-activated and chemically activated currents in the vomeronasal organ of *Sternotherus odoratus* (stinkpot/musk turtle). *J Exp Biol* 204:4199–212
- Fasick JI, Cronin TW, Hunt DM, Robinson PR (1998) The visual pigments of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Vis Neurosci* 15:643–51
- Félix F (2004) Assessment of the level of surface activity in humpback whales during the breeding season. *Lat Am J Aquat Mamm* 3:25–36
- Feng P, Zheng J, Rossiter SJ, Wang D, Zhao H (2014) Massive losses of taste receptor genes in toothed and baleen whales. *Genome Biol Evol* 6:1254–1265
- Ferrando T, Caresano F, Ferrando S, Gallus L, Wurtz M, Tagliaferro G (2010) The tongue morphology and lingual gland histochemistry of Ligurian Sea odontocetes. *Mar Mammal Sci* 26:588–601
- Ferrari TE (2017) Cetacean beachings correlate with geomagnetic disturbances in Earth's magnetosphere: an example of how astronomical changes impact the future of life. *Int J Astrobiol* 16:163–175
- Ferrari MCO, Wisenden BD, Chivers DP (2010) Chemical ecology of predator–prey interactions in aquatic ecosystems: a review and prospectus. *Can J Zool* 88:698–724
- Finger TE, Kinnamon SC (2011) Taste isn't just for taste buds anymore. *F1000 Biol Rep* 3:20
- Firestein S (2001) How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413:211–218
- Flegel C, Vogel F, Hofreuter A, Schreiner BSP, Osthold S, Veitinger S, Becker C, Brockmeyer NH, Muschol M, Wennemuth G, Altmüller J, Hatt H, Gisselmann G (2016) Characterization of the Olfactory Receptors Expressed in Human Spermatozoa. *Front Mol Biosci* 2:1–14
- Flewelling LJ, Naar JP, Abbott JP, Baden DG, Barros NB, Bossart GD, Bottein M-YD, Hammond DG, Haubold EM, Heil C a, Henry MS, Jacocks HM, Leighfield T a, Pierce RH, Pitchford TD, Rommel S a, Scott PS, Steidinger K a, Truby EW, Dolah FM Van, Landsberg JH (2005) Brevetoxicosis: red tides and marine mammal mortalities. *Nature* 435:755–756
- Forcada J (2009) Distribution. In: Perrin W, Wursig B, Thewissen JGM (eds) *Encyclopedia of Marine Mammals*, 2nd ed. Academic Press, London, UK, p 316–321
- Fossi MC, Marsili L, Baini M, Giannetti M, Coppola D, Guerranti C, Caliani I, Minutoli R, Lauriano G, Finoia MG, Rubegni F, Panigada S, Bérubé M, Urbán Ramírez J, Panti C (2016) Fin whales and microplastics: The Mediterranean Sea and the Sea of Cortez scenarios. *Environ Pollut* 209:68–78
- Fowlkes EB, Mallows CL (1983) A method for comparing two hierarchical clusterings. *J Am Stat Assoc* 78:553–569
- Frankel AS, Clark CW, Herman LM, Gabriele CM (1995) Spatial distribution, habitat utilization, and social interactions of humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, off Hawai'i, determined using acoustic and visual techniques. *Can J Zool* 73:1134–1146
- Frasnelli J, Schuster B, Hummel T (2007) Subjects with congenital anosmia have larger peripheral but similar central trigeminal responses. *Cereb Cortex* 17:370–377
- Freedman DA, Lane D (1983) Significance testing in a nonstochastic setting. In: *A Festschrift for Erich L. Lehmann*. Bickel P, Doksum K, Hodges JL (eds). Wadsworth, Inc., Belmont, CA, USA pp.185–208
- Friedlaender AS, Halpin PN, Qian SS, Lawson GL, Wiebe PH, Thiele D, Read AJ (2006) Whale distribution in relation to prey abundance and oceanographic processes in shelf waters of the

- Western Antarctic Peninsula. *Mar Ecol Ser* 317:297–310
- Friedlaender AS, Hazen EL, Nowacek DP, Halpin PN, Ware C, Weinrich MT, Hurst T, Wiley D (2009) Diel changes in humpback whale *Megaptera novaeangliae* feeding behavior in response to sand lance *Ammodytes* spp. behavior and distribution. *Mar Ecol Prog Ser* 395:91–100
- Friedlaender AS, Lawson GL, Halpin PN (2009) Evidence of resource partitioning between humpback and minke whales around the western Antarctic Peninsula. *Mar Mammal Sci* 25:402–415
- Friedl W a, Nachtigal PE, Moore PWB, Chun NKW, Haun JE, Hall RW, Richards JL (1990) Taste reception in the Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus gilli*) and the California sea lion (*Zalophus californianus*). In: Thomas JA, Kastelein RA (eds) *Sensory Abilities of Cetaceans: Laboratory and Field Evidence*. NATO ASI Series. Series A. Life Sciences. Springer Science+Business Media, New York, USA p 447–454
- Friesen MR, Beggs JR, Gaskett AC (2017) Sensory-based conservation of seabirds: A review of management strategies and animal behaviours that facilitate success. *Biol Rev* 92:1769–1784
- Fristrup KM, Hatch LT, Clark CW (2003) Variation in humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) song length in relation to low-frequency sound broadcasts. *J Acoust Soc Am* 113:3411
- Gagliardo A, Bried J, Lambardi P, Luschi P, Wikelski M, Bonadonna F (2013) Oceanic navigation in Cory's shearwaters: evidence for a crucial role of olfactory cues for homing after displacement. *J Exp Biol* 216:2798–2805
- Galí M, Simó R, Pérez GL, Ruiz-González C, Sarmiento H, Royer SJ, Fuentes-Lema A, Gasol JM (2013) Differential response of planktonic primary, bacterial, and dimethylsulfide production rates to static vs. dynamic light exposure in upper mixed-layer summer sea waters. *Biogeosciences* 10:7983–7998
- Gallagher AJ, Vianna GMS, Papastamatiou YP, Macdonald C, Guttridge TL, Hammerschlag N (2015) Biological effects, conservation potential, and research priorities of shark diving tourism. *Biol Conserv* 184:365–379
- Gardiner JM, Atema J (2007) Sharks need the lateral line to locate odor sources: rheotaxis and eddy chemotaxis. *J Exp Biol* 210:1925–1934
- Gasco N, Pierre JP (2007) Effect of Two Natural Repellents on the Depredation of Mackerel Baits by White-Chinned Petrels (*Procellaria aequinoctialis*). *CCAMLR XXV1/FSA-07-18*.
- Gelman A (2008) Scaling regression inputs by dividing by two standard deviations. *Stat Med* 27:2865–2873
- Gilman E, Brothers N, McPherson G (2006) A review of cetacean interactions with longline gear. *J Cetacean* 8:215–223
- Givalois L, Arancibia S, Alonso G, Tapia-Arancibia L (2004) Expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptors in the median eminence cells with sensitivity to stress. *Endocrinology* 145:4737–4747
- Glendinning JI (2007) How do predators cope with chemically defended foods? *Biol Bull* 213:252–266
- Godfrey SJ, Geisler J, Fitzgerald EMG (2013) On the olfactory anatomy in an archaic whale (protocetidae, cetacea) and the minke whale *Balaenoptera acutorostrata* (Balaenopteridae, Cetacea). *Anat Rec* 296:257–272
- Goldbogen JA, Calambokidis J, Croll DA, Harvey JT, Newton KM, Oleson EM, Schorr G, Shadwick RE (2008) Foraging behavior of humpback whales: kinematic and respiratory patterns suggest a high cost for a lunge. *J Exp Biol* 211:3712–3719

- Gómez De Segura A, Crespo EA, Pedraza SN, Hammond PS, Raga JA (2006) Abundance of small cetaceans in waters of the central Spanish Mediterranean. *Mar Biol* 150:149–160
- Graphodatsky AS, Trifonov VA, Stanyon R (2011) The genome diversity and karyotype evolution of mammals. *Mol Cytogenet* 4:22
- Grassman M, Owens D (1987) Chemosensory imprinting in juvenile green sea turtles, *Chelonia mydas*. *Anim Behav* 35:929–931
- Greene WE, Melillo-Sweeting K, Dudzinski KM (2011) Comparing Object Play in Captive and Wild Dolphins Journal. *J Comp Psychol* 24:292–306
- Gregory MR (2009) Environmental implications of plastic debris in marine settings--entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:2013–2025
- Gruerber CE, Nakagawa S, Laws RJ, Jamieson IG (2011) Multimodel inference in ecology and evolution: Challenges and solutions. *J Evol Biol* 24:699–711
- Gubbins CM (2002) The dolphins of Hilton Head: Their natural history. University of South Carolina Press, Columbia, USA
- Hagelin JC, Straley JM, Nielson LB, Szabo A (2012) Baleen Whales and Tubenose Seabirds — A Colossal Chemosensory Convergence? In: The Association For Chemoreception Sciences Annual Meeting.p 13
- Hamer DJ, Childerhouse SJ, Gales NJ (2012) Odontocete bycatch and depredation in longline fisheries: A review of available literature and of potential solutions. *Mar Mammal Sci* 28:345–374
- Hammerschlag N, Gallagher AJ, Wester J, Luo J, Ault JS (2012) Don't bite the hand that feeds: Assessing ecological impacts of provisioning ecotourism on an apex marine predator. *Funct Ecol* 26:567–576
- Hammerschlag N, Martin RA, Fallows C (2006) Effects of environmental conditions on predator-prey interactions between white sharks (*Carcharodon carcharias*) and Cape fur seals (*Arctocephalus pusillus pusillus*) at Seal Island, South Africa. *Environ Biol Fishes* 76:341–350
- Hara TJ (1994) The diversity of chemical stimulation in fish olfaction and gustation. *Rev Fish Biol Fish* 4:1–35
- Hardy MH, Roff E, Smith TG, Ryg M (1991) Facial skin glands of ringed and grey seals, and their possible function as odoriferous organs. *Can J Zool* 69:189–200
- Hastie GD, Wilson B, Wilson LJ, Parsons KM, Thompson PM (2004) Functional mechanisms underlying cetacean distribution patterns: Hotspots for bottlenose dolphins are linked to foraging. *Mar Biol* 144:397–403
- Hawke DJ, Dobinson J (2001) Some seabird associations with dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*) at Kaikoura and with orca (*Orcinus orca*) at Nelson, New Zealand. *Notornis* 48:56–58
- Hay ME, Kubanek J (2002) Community and ecosystem level consequences of chemical cues in the plankton. *J Chem Ecol* 28:2001–2016
- Hayden S, Bekaert M, Crider TA, Mariani S, Murphy WJ, Teeling EC (2010) Ecological adaptation determines functional mammalian olfactory subgenomes. *Genome Res* 20:1–9
- Hays GC, Christensen A, Fossette S, Schofield G, Talbot J, Mariani P (2014) Route optimisation and solving Zermelo's navigation problem during long distance migration in cross flows. *Ecol Lett* 17:137–143

- Hazen EL, Friedlaender AS, Thompson MA, Ware CR, Weinrich MT, Halpin PN, Wiley DN (2009) Fine-scale prey aggregations and foraging ecology of humpback whales *Megaptera novaeangliae*. *Mar Ecol Prog Ser* 395:75–89
- Hendricks SJ, Brunjes PC, Hill DL (2004) Taste Bud Cell Dynamics during Normal and Sodium-Restricted Development. *J Comp Neurol* 472:173–182
- Henningsen A (2013) censReg: Censored Regression (Tobit) Models. R package version 0.5-20. :1–12
- Holland RA, Thorup K, Gagliardo A, Bisson IA, Knecht E, Mizrahi D, Wikelski M (2009) Testing the role of sensory systems in the migratory heading of a songbird. *J Exp Biol* 212:4065–4071
- Houser DS, Finneran J, Carder D, Bonn W Van, Smith C, Hoh C, Mattrey R, Ridgway S (2004) Structural and functional imaging of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) cranial anatomy. *J Exp Biol* 207:3657–3665
- Huang Y, Zhang D, Xue S, Wang M, Cong W (2016) The potential of microalgae lipids for edible oil production. *Appl Biochem Biotechnol* 180:438–451
- Huettmann F, Artukhin Y, Gilg O, Humphries G (2011) Predictions of 27 Arctic pelagic seabird distributions using public environmental variables, assessed with colony data: A first digital IPY and GBIF open access synthesis platform. *Mar Biodivers* 41:141–179
- Hurst JL, Robertson DHL, Tolladay U, Beynon RJ (1998) Proteins in urine scent marks of male house mice extend the longevity of olfactory signals. *Anim Behav* 55:1289–1297
- Hurt A, Smith DA (2009) Conservation dogs. In: Helton WS (ed) *Canine ergonomics. The Science of Working Dogs*. CRC Press, London, p 175–194
- Hutchison L V., Wenzel BM (1980) Olfactory guidance in foraging by procellariiforms. *Condor* 82:314–319
- Insley SJ, Phillips A V, Charrier I (2003) A review of social recognition in pinnipeds. *Aquat Mamm* 29:181–201
- Ishimaru Y, Inada H, Kubota M, Zhuang H, Tominaga M, Matsunami H (2006) Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12569–12574
- Jacob S, Zelano B, Gungor a, Abbott D, Naclerio R, McClintock MK (2000) Location and gross morphology of the nasopalatine duct in human adults. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126:741–8
- Jacobs M, Porgane P, McFarland W (1971) The anatomy of the brain of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Comp Neurol* 141:205–272
- Janik VM, Sayigh LS, Wells RS (2006) Signature whistle shape conveys identity information to bottlenose dolphins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8293–7
- Jauniaux T, Haelters J, Degraer S (2014) Fatal plastic impaction in a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). In: *Abstract book 28th Annual Conference of the European Cetacean Society: Marine mammals as sentinels of a changing environment, Liège, Belgium, 5-9th April 2014*.p 168
- Jiang P, Josue J, Li X, Glaser D, Li W, Brand JG, Margolskee RF, Reed DR, Beauchamp GK (2012) Major taste loss in carnivorous mammals. *Proc Natl Acad Sci* 109:4956–4961
- Johnen D, Heuwieser W, Fischer-Tenhagen C (2013) Canine scent detection—Fact or fiction? *Appl Anim Behav Sci* 148:201–208
- Jurcak AM, Moore P a. (2014) Behavioral decisions in sensory landscapes: crayfish use chemical

- signals to make habitat use choices. *J Crustac Biol* 34:559–564
- Karthikeyan K, Muniasamy S, SankarGanesh D, Achiraman S, Ramesh Saravanakumar V, Archunan G (2013) Faecal chemical cues in water buffalo that facilitate estrus detection. *Anim Reprod Sci* 138:163–167
- Kasumyan AO (2004) The Olfactory System in Fish: Structure, Function and Role in Behavior. *J Ichthyol* 44:180–223
- Kaupp UB (2010) Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nat Rev Neurosci* 11:188–201
- Keijl GO, Begeman L, Hiemstra S, Ijsseldijk LL, Kamminga P, Seal Centre Pieterburen (2016) Cetaceans stranded in the Netherlands in 2008-2014. *Lutra* 59:75–107
- Kenney RD, Mayo CA, Winn HE (2001) Migration and foraging strategies at varying spatial scales in western North Atlantic right whales : a review of hypotheses. *J Cetacean Res Manag* 1:251–260
- Kienle SS, Ekdale EG, Reidenberg JS, Deméré T a. (2015) Tongue and Hyoid Musculature and Functional Morphology of a Neonate Gray Whale (Cetacea, Mysticeti, *Eschrichtius robustus*). *Anat Rec* 298:660–674
- Kim M, Jung H, Lee Y, Chun B, Kim S (2014) Monthly Variations in the Nutritional Composition of Antarctic Krill *Euphausia superba*. *Fish Aquat Sci* 17:409–419
- Kim D-J, Roper SD (1995) Localization of serotonin in taste buds: A comparative study in four vertebrates. *J Comp Neurol* 353:364–370
- Kirino M, Parnes J, Hansen A, Kiyohara S, Finger TE (2013) Evolutionary origins of taste buds: phylogenetic analysis of purinergic neurotransmission in epithelial chemosensors. *Open Biol* 3:130015
- Kirschvink JL, Dizon AE, Westphal JA (1986) Evidence from Strandings for Geomagnetic Sensitivity in Cetaceans. *J Exp Biol* 120:1–24
- Kishida T, Kubota S, Shirayama Y, Fukami H (2007) The olfactory receptor gene repertoires in secondary-adapted marine vertebrates: evidence for reduction of the functional proportions in cetaceans. *Biol Lett* 3:428–430
- Kishida T, Thewissen J, Hayakawa T, Imai H, Agata K (2015) Aquatic adaptation and the evolution of smell and taste in whales. *Zool Lett* 1:1–10
- Kishida T, Thewissen J, Usip S, Suydam RS, George JC (2015) Organization and distribution of glomeruli in the bowhead whale olfactory bulb. *PeerJ* 3:e897
- Klinowska M (1985) Cetacean Live Stranding Sites Relate to Geomagnetic Topography. *Aquat Mamm* 1:27–32
- Knowlton AR, Kraus SD (2001) Mortality and serious injury of northern right whales (*Eubalaena glacialis*) in the western North Atlantic Ocean. *J Cetacean Res Manag*:193–208
- Komatsu S, Yamasaki F (1980) Formation of the pits with taste buds at the lingual root in the striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*. *J Morphol* 164:107–119
- Kowalewsky S, Dambach M, Mauck B, Dehnhardt G (2006) High olfactory sensitivity for dimethyl sulphide in harbour seals. *Biol Lett* 2:106–109
- Kraus S, Brown M, Caswell H (2005) North Atlantic right whales in crisis. *Science* 309:561–562
- Kremers D, Célérier A, Schaal B, Campagna S, Trabalon M, Böye M, Hausberger M, Lemasson A (2016) Sensory Perception in Cetaceans: Part II—Promising Experimental Approaches to Study Chemoreception in Dolphins. *Front Ecol Evol* 4:1–9

- Kremers D, López Marulanda J, Hausberger M, Lemasson A (2014) Behavioural evidence of magnetoreception in dolphins: detection of experimental magnetic fields. *Naturwissenschaften* 101:907–911
- Kruger L (1959) The thalamus of the dolphin (*Tursiops truncatus*) and comparison with other mammals. *J Comp Neurol* 111:133–194
- Kubanek J, Snyder LH (2015) Reward Size Informs Repeat-Switch Decisions and Strongly Modulates the Activity of Neurons in Parietal Cortex. *Cereb Cortex*:bhw230
- Kurt Thaw A (1996) Changes in taste threshold over the life span of the Sprague-Dawley rat. *Chem Senses* 21:189–193
- Kuznetsov VB (1990) Chemical sense of dolphins: Quasi-olfaction. In: Thomas JA, Kastelein RA (eds) *Sensory Abilities of Cetaceans*. NATO ASI Series. Series A. Life Sciences. Springer Science+Business Media, New York, p 481–503
- Lacy Costello B De, Amann A, Al-Kateb H, Flynn C, Filipiak W, Khalid T, Osborne D, Ratcliffe NM (2014) A review of the volatiles from the healthy human body. *J Breath Res* 8
- Lacy Costello B De, Ewen R, Ewer AK, Garner CE, Probert CSJ, Ratcliffe NM, Smith S (2008) An analysis of volatiles in the headspace of the faeces of neonates. *J Breath Res* 2:1–8
- Lammers MO, Au WWL, Herzig DL (2003) The broadband social acoustic signaling behavior of spinner and spotted dolphins. *J Acoust Soc Am* 114:1629–1639
- Landsberg JH, Flewelling LJ, Naar J (2009) *Karenia brevis* red tides, brevetoxins in the food web, and impacts on natural resources: Decadal advancements. *Harmful Algae* 8:598–607
- Larson JK, McCormick MI (2005) The role of chemical alarm signals in facilitating learned recognition of novel chemical cues in a coral reef fish. *Anim Behav* 69:51–57
- Laska M, Genzel D, Wieser A (2005) The number of functional olfactory receptor genes and the relative size of olfactory brain structures are poor predictors of olfactory discrimination performance with enantiomers. *Chem Senses* 30:171–175
- Laska M, Lord E, Selin S, Amundin M (2010) Olfactory discrimination of aliphatic odorants in South African fur seals (*Arctocephalus pusillus*). *J Comp Psychol* 124:187–93
- Laska M, Svelander M, Amundin M (2008) Successful acquisition of an olfactory discrimination paradigm by South African fur seals, *Arctocephalus pusillus*. *Physiol Behav* 93:1033–1038
- Leck C, Persson C (1996) Seasonal and short-term variability in dimethyl sulfide, sulfur dioxide and biogenic sulfur and sea salt aerosol particles in the arctic marine boundary layer during summer and autumn. *Tellus, Ser B Chem Phys Meteorol* 48:272–299
- Leinders-Zufall T, Cockerham RE, Michalakis S, Biel M, Garbers DL, Reed RR, Zufall F, Munger SD (2007) Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14507–12
- Levin MJ, Pfeiffer CJ (2002) Gross and Microscopic Observations on the Lingual Structure of the Florida Manatee *Trichechus manatus latirostris*. *Anat Histol Embryol* 285:278–285
- Lewis CH, Molloy SF, Chambers RM, Davenport J (2007) Response of common musk turtles (*Sternotherus odoratus*) to intraspecific chemical cues. *J Herpetol* 41:349–353
- Li YM (1983) The tongue of the Baiji, *Lipotes vexillifer*. *Acta Zool Sin* 35:35–47
- Liberles SD (2015) Trace amine-associated receptors: Ligands, neural circuits, and behaviors. *Curr Opin Neurobiol* 34:1–7
- Liu Z, Liu G, Hailer F, Orozco-terWengel P, Tan X, Tian J, Yan Z, Zhang B, Li M (2016) Dietary

- specialization drives multiple independent losses and gains in the bitter taste gene repertoire of Laurasiatherian Mammals. *Front Zool* 13:28–37
- Lockyer CH, Brown SG (1981) The migration of whales. In: Aidley DJ (ed) *Animal Migration*. Cambridge University Press, Cambridge, UK., p 105–137
- Logan DW, Marton TF, Stowers L (2008) Species specificity in major urinary proteins by parallel evolution. *PLoS One* 3:e3280
- Lohani D, Glotin H (2017) Visualizing bio-acoustic big data with t-sne. *LSIS DYNi*. Toulon, France
- Lohmann KJ, Hester JT, Lohmann CMF (1999) Long-distance navigation in sea turtles. *Ethol Ecol Evol* 11:1–23
- Lopes M, Borger-Turner JL, Eskelinen H, Kuczaj II SA (2016) The Influence of Age , Sex , and Social Affiliation on the Responses of Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) to a Novel Stimulus Over Time. *Anim Behav Cogn* 3:32–45
- Lowell WR, Flanigan WF (1980) Marine mammal chemoreception. *Mamm Rev* 10:53–59
- Lübbert M, Kyereme J, Rothermel M, Wetzel CH, Hoffmann K-P, Hatt H (2013) In vivo monitoring of chemically evoked activity patterns in the rat trigeminal ganglion. *Front Syst Neurosci* 7:1–13
- Lundström JN, Boesveldt S, Albrecht J (2011) Central Processing of the Chemical Senses: An Overview. *ACS Chem Neurosci* 2:5–16
- Maaten L Van der, Hinton G (2012) Visualizing non-metric similarities in multiple maps. *Mach Learn* 87:33–55
- Mardon J, Bonadonna F (2009) Atypical homing or self-odour avoidance? Blue petrels (*Halobaena caerulea*) are attracted to their mate's odour but avoid their own. *Behav Ecol Sociobiol* 63:537–542
- Mardon J, Nesterova a P, Traugott J, Saunders SM, Bonadonna F (2010) Insight of scent: experimental evidence of olfactory capabilities in the wandering albatross (*Diomedea exulans*). *J Exp Biol* 213:558–563
- Mardon J, Saunders SM, Anderson MJ, Couchoux C, Bonadonna F (2010) Species, gender, and identity: Cracking petrels' sociochemical code. *Chem Senses* 35:309–321
- Margolis FL (1972) A brain protein unique to the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:1221–4
- Marriott S, Cowan E, Cohen J, Hallock RM (2013) Somatosensation, echolocation, and underwater sniffing: adaptations allow mammals without traditional olfactory capabilities to forage for food underwater. *Zoolog Sci* 30:69–75
- Marubini F, Gimona A, Evans PGH, Wright PJ, Pierce GJ (2009) Habitat Preferences and Interannual Variability in Occurrence of the Harbour Porpoise *Phocoena phocoena* off Northwest Scotland. *Mar Ecol Prog Ser* 381:297–310
- Mason RT, Parker MR (2010) Social behavior and pheromonal communication in reptiles. *J Comp Physiol A Neuroethol Sensory, Neural, Behav Physiol* 196:729–749
- Mass AM, Supin AY (2007) Adaptive features of aquatic mammals' eye. *Anat Rec* 290:701–715
- McArdle BH, Anderson MJ (2001) Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology* 82:290–297
- McGlone JJ, Anderson DL (2002) Synthetic maternal pheromone stimulates feeding behavior and weight gain in weaned pigs. *J Anim Sci* 80:3179–3183
- McGowen MR, Clark C, Gatesy J (2008) The vestigial olfactory receptor subgenome of odontocete

- whales: phylogenetic congruence between gene-tree reconciliation and supermatrix methods. *Syst Biol* 57:574–590
- Meredith RW, Gatesy J, Emerling CA, York VM, Springer MS (2013) Rod monochromacy and the coevolution of cetacean retinal opsins. (J Zhang, Ed.). *PLoS Genet* 9:e1003432
- Miller PJO, Biassoni N, Samuels A, Tyack PL (2000) Whale songs lengthen in response to sonar. *Nature* 405:903–903
- Mills D, Marchant-Forde J, Morton D, Phillips C, McGreevy P, Nicol C, Sandoe P, Swaisgood R (2010) *The Encyclopedia of Applied Animal Behaviour and Welfare*. CABI Publishing, London, UK
- Minguez E (1997) Olfactory nest recognition by British storm-petrel chicks. *Anim Behav* 53:701–707
- Misund O, Beltestad A (1996) Target-strength estimates of schooling herring and mackerel using the comparison method. *ICES J Mar Sci* 53:281–284
- Mojet J, Christ-Hazelhof E, Heidema J (2001) Taste perception with age: generic or specific losses in threshold sensitivity to the five basic tastes? *Chem Senses* 26:845–860
- Mombaerts P (2004) Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat Rev Neurosci* 5:263–278
- Montgomery J, Baker CF, Carton AG (1997) The lateral line can mediate rheotaxis in fish. *Nature* 389:960–963
- Morgan KN, Tromborg CT (2007) Sources of stress in captivity. *Appl Anim Behav Sci* 102:262–302
- Morrison EE, Costanzo RM (1992) Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. *Microsc Res Tech* 23:49–61
- Muchlinski MN, Docherty BA, Alport LJ, Burrows AM, Smith TD, Paesani SM (2011) Behavioral and ecological consequences of sex-based differences in gustatory anatomy in *Cebus apella*. *Anat Rec* 294:2179–2192
- Müller-Schwarze D (1991) The chemical ecology of ungulates. *Appl Anim Behav Sci* 29:389–402
- Muñoz A (2004) Chemo-orientation using conspecific chemical cues in the stripe-necked terrapin (*Mauremys leprosa*). *J Chem Ecol* 30:519–530
- Muraco HS (2015) Reproductive biology of the female bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). PhD dissertation. Mississippi State University, MS, USA.
- Muraco H, Kuczaj S (2015) Conceptive Estrus Behavior in Three Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). *Anim Behav Cogn* 2:30–48
- Nei M, Niimura Y, Nozawa M (2008) The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nat Rev Genet* 9:951–963
- Nevitt G (1999) Olfactory foraging in Antarctic seabirds: A species-specific attraction to krill odors. *Mar Ecol Prog Ser* 177:235–241
- Nevitt GA, Bonadonna F (2005) Sensitivity to dimethyl sulphide suggests a mechanism for olfactory navigation by seabirds. *Biol Lett* 1:303–5
- Nevitt G a, Losekoot M, Weimerskirch H (2008) Evidence for olfactory search in wandering albatross, *Diomedea exulans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4576–4581
- Nevitt G, Reid K, Trathan P (2004) Testing olfactory foraging strategies in an Antarctic seabird assemblage. *J Exp Biol* 207:3537–3544
- Nevitt GA, Veit RR, Kareiva P (1995) Dimethyl sulfide as foraging cue for Antarctic Procellariiform

- seabirds. *Nature* 376:680–682
- Newsome D, Rodger K (2013) Feeding of wildlife: an acceptable practice in ecotourism? In: Ballantyne R, Packer J (eds) *International handbook on ecotourism*. Edward Elgar Publishing limited, UK, p 436–451
- Norris KS, Dohl TP (1979) The structure and functions of cetacean schools. In: L. M. Herman E (ed) *Cetacean behavior: Mechanisms and functions*. Wiley-Interscience, New York, NY, p 211–261
- Norris KS, Wursig B, Wells RS, Wursig M (1994) *The Hawaiian spinner dolphin*. University of California Press, Berkley, USA. pp. 408
- Nowacek DP, Friedlaender AS, Halpin PN, Hazen EL, Johnston DW, Read AJ, Espinasse B, Zhou M, Zhu Y (2011) Super-aggregations of krill and humpback whales in Wilhelmina bay, Antarctic Peninsula. *PLoS One* 6:2–6
- Nowacek DP, Johnson MP, Tyack PL (2004) North Atlantic right whales (*Eubalaena glacialis*) ignore ships but respond to alerting stimuli. *Proc R Soc London Ser B, Biol Sci* 271:227–231
- Nweeia MT, Eichmiller FC, Hauschka P V., Donahue GA, Orr JR, Ferguson SH, Watt CA, Mead JG, Potter CW, Dietz R, Giuseppetti AA, Black SR, Trachtenberg AJ, Kuo WP (2014) Sensory ability in the narwhal tooth organ system. *Anat Rec* 297:599–617
- O'Donoghue SH, Whittington PA, Dyer BM, Peddemors VM (2010) Abundance and distribution of avian and marine mammal predators of sardine observed during the 2005 KwaZulu-Natal sardine run survey. *African J Mar Sci* 32:361–374
- Oelschläger HA, Buhl EH (1985) Development and rudimentation of the peripheral olfactory system in the harbor porpoise *Phocoena phocoena* (Mammalia: Cetacea). *J Morphol* 184:351–360
- Oelschläger HA, Buhl E (2008) The dolphin brain-A challenge for synthetic neurobiology. *Brain Res Bull* 75:450–459
- Oeschlager HA, Buhl E, Dann JF (1987) Development of the nervus terminalis in mammals Including toothed whales and humans. *Ann N Y Acad Sci* 519:447–464
- Oeschlager HA, Oeschlager J (2009) Brain. In: Perrin W, Wursig B, Thewissen J (eds) *Encyclopedia of marine mammals*, 2nd edn. Academic Press, London, UK, p 134–149
- Panigada S, Pesante G, Zanardelli M, Capoulade F, Gannier A, Weinrich MT (2006) Mediterranean fin whales at risk from fatal ship strikes. *Mar Pollut Bull* 52:1287–1298
- Paris CB, Atema J, Irisson JO, Kingsford M, Gerlach G, Guigand CM (2013) Reef Odor: A Wake Up Call for Navigation in Reef Fish Larvae. *PLoS One* 8:1–8
- Pêches et Océans Canada (2017) Mort de baleines noires dans le golfe du Saint-Laurent. [Site internet visité le 20/01/2018]. URL: <http://dfo-mpo.gc.ca/science/environmental-environnement/narightwhale-baleinenoirean/index-fra.html>.
- Peichl L, Behrmann G, Kröger RHH (2001) For whales and seals the ocean is not blue: A visual pigment loss in marine mammals. *Eur J Neurosci* 13:1520–1528
- Peltier H, Authier M, Deaville R, Dabin W, Jepson PD, Canneyt O van, Daniel P, Ridoux V (2016) Small cetacean bycatch as estimated from stranding schemes: The common dolphin case in the northeast Atlantic. *Environ Sci Policy* 63:7–18
- Perrin W, Wursig B, Thewissen J (2009) *Encyclopedia of Marine Mammals*, 2nd ed. Academic Press, London, UK
- Pfeiffer DC, Wang a., Nicolas J, Pfeiffer CJ (2001) Lingual ultrastructure of the long-finned pilot whale (*Globicephala melas*). *Anat Histol Embryol* 30:359–365

- Pierre JP, Norden WS (2006) Reducing seabird bycatch in longline fisheries using a natural olfactory deterrent. *Biol Conserv* 130:406–415
- Pihlström H (2008) Comparative anatomy and physiology of chemical senses in aquatic mammals. In: Thewissen J, Nummela S (eds) *Sensory Evolution on the Threshold: Adaptations in Secondarily Aquatic Vertebrates*. University of California Press, Berkley, CA, p 95–109
- Pitcher BJ, Harcourt RG, Schaal B, Charrier I (2011) Social olfaction in marine mammals: wild female Australian sea lions can identify their pup's scent. *Biol Lett* 7:60–62
- Pombo S, Moreira F (2010) Contribution to the Chemoreception Capacity of Juvenile Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*, L.). Master Thesis, Universisase da Madeira, Portugal. pp.71
- Porritt F, Mansson R, Berry A, Cook N, Sibbald N, Nicklin S (2015) Validation of a short odour discrimination test for working dogs. *Appl Anim Behav Sci* 165:133–142
- Poysa H (1992) Group foraging in patchy environments: the importance of coarse-level local enhancement. *Ornis Scand* 23:159–166
- Prada PA, Curran AM, Furton KG (2010) Comparison of extraction methods for the removal of volatile organic compounds (VOCs) present in sorbents used for human scent evidence collection. *Anal Methods* 2:470–478
- Quick NJ, Isojunno S, Sadykova D, Bowers M, Nowacek DP, Read AJ (2017) Hidden Markov models reveal complexity in the diving behaviour of short-finned pilot whales. *Sci Rep* 7:45765
- R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Version 3.4.0 (2017-04-21). Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>.
- Ramírez F, Gutiérrez-Expósito C, Afán I, Giménez J, Stephanis R de, Forero M (2015) Human influence on gull non-breeding distribution: potential consequences of changes in fishing practices. Model selection and model averaging based on information criteria (AICc and alike) (available at www.cran.r-project.org/web/packages/MuMIn/index). *h. Mar Ecol Prog Ser* 527:221–232
- Reeves R, McClellan K, Werner T (2013) Marine mammal bycatch in gillnet and other entangling net fisheries, 1990 to 2011. *Endanger Species Res* 20:71–97
- Reidenberg JS, Laitman JT (2008) Sisters of the sinuses: Cetacean air sacs. *Anat Rec* 291:1389–1396
- Reilly S, Hedley S, Borberg J, Hewitt R, Thiele D, Watkins J, Naganobu M (2004) Biomass and energy transfer to baleen whales in the South Atlantic sector of the Southern Ocean. *Deep Res Part II Top Stud Oceanogr* 51:1397–1409
- Ren Y, Shimada K, Shirai Y, Fujimiya M, Saito N (1999) Immunocytochemical localization of serotonin and serotonin transporter (SET) in taste buds of rat. *Mol Brain Res* 74:221–224
- Reynolds AM, Cecere JG, Paiva VH, Ramos JA, Focardi S (2015) Pelagic seabird flight patterns are consistent with a reliance on olfactory maps for oceanic navigation. *Proc Biol Sci* 282
- Ridgway SH (1988) The cetacean central nervous system. In: *Comparative Neuroscience and Neurobiology. Readings from the Encyclopedia of Neuroscience*. Birkhäuser, Boston, MA, USA pp 20–25
- Ridgway SH (1990) The central nervous system of the Bottlenose dolphin. *The Bottlenose dolphin*:69–97
- Ridgway SH, Breathnach AS, Ridgway SH (1988) The cetacean central nervous system. *Comp Neurosci Neurobiol* 35:20–25
- Ridgway SH, Carder DA (1993) Features of Dolphin Skin With Potential Hydrodynamic Importance.

- IEEE Eng Med Biol Mag 12:83–88
- Rinberg D, Gelperin A (2006) Olfactory neuronal dynamics in behaving animals. *Semin Cell Dev Biol* 17:454–461
- Risch D, Corkeron PJ, Ellison WT, Parijs SM van (2012) Changes in humpback whale song occurrence in response to an acoustic source 200 km away. *PLoS One* 7:2–7
- Rolls ET (2004) The functions of the orbitofrontal cortex. *Brain Cogn* 55:11–29
- Rothermel M, Ng BSW, Grabska-Barwinska A, Hatt H, Jancke D (2011) Nasal chemosensory-stimulation evoked activity patterns in the rat trigeminal ganglion visualized by in vivo voltage-sensitive dye imaging. *PLoS One* 6:e26158
- Ryg M, Solberg Y, Lydersen C, Smith T (1992) The scent of rutting male ringed seals (*Phoca hispida*). *J Zool* 22:681–689
- Safi K, Gagliardo A, Wikelski M, Kranstauber B (2016) How Displaced Migratory Birds Could Use Volatile Atmospheric Compounds to Find Their Migratory Corridor: A Test Using a Particle Dispersion Model. *Front Behav Neurosci* 10:1–9
- Sakamoto KQ, Takahashi A, Iwata T, Trathan PN (2009) From the eye of the albatrosses: A bird-borne camera shows an association between albatrosses and a killer whale in the Southern Ocean. *PLoS One* 4:2–5
- Samuelson MM, Lauderdale LK, Pulis K, Solangi M, Hoffland T, Lyn H (2016) Olfactory Enrichment in California Sea Lions (*Zalophus californianus*): An Effective Tool for Captive Welfare? *J Appl Anim Welf Sci* 8705:1–11
- Savoca MS, Nevitt GA (2014) Evidence that dimethyl sulfide facilitates a tritrophic mutualism between marine primary producers and top predators. *Proc Natl Acad Sci* 111:4157–4161
- Savoca MS, Tyson CW, McGill M, Slager CJ (2017) Odours from marine plastic debris induce food search behaviours in a forage fish. *Proc R Soc - Biol Sci* 284:20171000
- Savoca MS, Wohlfeil ME, Ebeler SE, Nevitt GA (2016) Marine plastic debris emits a keystone infochemical for olfactory foraging seabirds. *Sci Adv* 2:e1600395–e1600395
- Schaal B (2010) Mammary Odor Cues and Pheromones. In: Litwack G (ed) *Vitamins and Hormones*, 1st edn. Academic Press, London, UK, p 83–136
- Schultz EF, Tapp JT (1973) Olfactory control of behavior in rodents. *Psychol Bull* 79:21–44
- Schwacke LH, Smith CR, Townsend FI, Wells RS, Hart LB, Balmer BC, Collier TK, Guise S De, Fry MM, Guillette LJ, Lamb S V., Lane SM, McFee WE, Place NJ, Tumlin MC, Ylitalo GM, Zolman ES, Rowles TK (2014) Health of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Barataria Bay, Louisiana, following the Deepwater Horizon oil spill. *Environ Sci Technol* 48:93–103
- Schwanzel-Fukuda M, Garcia MS, Morrell JI, Pfaff DW (1987) Distribution of luteinizing hormone-releasing hormone in the nervus terminalis and brain of the mouse detected by immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 255:231–244
- Scott-Phillips TC (2008) Defining biological communication. *J Evol Biol* 21:387–395
- Senigaglia V, Stephanis R de, Verborgh P, Lusseau D (2012) The role of synchronized swimming as affiliative and anti-predatory behavior in long-finned pilot whales. *Behav Processes* 91:8–14
- Shane SH (1995) Behavior patterns of pilot whales and Risso's dolphins off Santa Catalina Island, California. *Aquat Mamm* 21:195–197
- Shane SH, Wells RS, Wursig B (1986) Ecology, behavior and social organization of the bottlenose

- dolphin: a review. *Mar Mammal Sci* 2:34–63
- Shepard BD, Pluznick JL (2016) How does your kidney smell? Emerging roles for olfactory receptors in renal function. *Pediatr Nephrol* 31:715–723
- Shibuya T, Ijima M, Tonosaki K (1970) Responses of the olfactory nerve in the seagull, *Larus crassirostris*. *Zool. Mag. Tokyo* 79:237–239
- Shindo J, Yamada TK, Yoshimura K, Kageyama I (2008) Morphology of the tongue in a newborn Stejneger's beaked whale (*Mesoplodon stejnegeri*). *Okajimas Folia Anat Jpn* 84:121–124
- Shine R, Bonnet X, Elphick MJ, Barrott EG (2004) A novel foraging mode in snakes: Browsing by the sea snake *Emydocephalus annulatus* (Serpentes, Hydrophiidae). *Funct Ecol* 18:16–24
- Shumway SE, Allen SM, Boersma PD (2003) Marine birds and harmful algal blooms: Sporadic victims or under-reported events? *Harmful Algae* 2:1–17
- Silva T, Gislason A, Astthorsson OS, Marteinsdóttir G (2017) Distribution, maturity and population structure of *Meganyctiphanes norvegica* and *Thysanoessa inermis* around Iceland in spring. *PLoS One* 12:1–21
- Silverman ED, Veit RR, Nevitt GA (2004) Nearest neighbors as foraging cues: Information transfer in a patchy environment. *Mar Ecol Prog Ser* 277:25–35
- Simon SA, Araujo IE de, Gutierrez R, Nicoletis MAL (2006) The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nat Rev Neurosci* 7:890–901
- Simon M, Johnson MP, Madsen PT (2012) Keeping momentum with a mouthful of water: behavior and kinematics of humpback whale lunge feeding. *J Exp Biol* 215:3786–3798
- Sims DW, Southall EJ, Humphries NE, Hays GC, Bradshaw CJA, Pitchford JW, James A, Ahmed MZ, Brierley AS, Hindell MA, Morritt D, Musyl MK, Righton D, Shepard ELC, Wearmouth VJ, Wilson RP, Witt MJ, Metcalfe JD (2008) Scaling laws of marine predator search behaviour. *Nature* 451:1098–U5
- Smith F, Allen SJ, Bejder L, Brown AM (2017) Shark bite injuries on three inshore dolphin species in tropical northwestern Australia. *Mar Mammal Sci*:1–13
- Smith S, Burden H, Persad R, Whittington K, Lacy Costello B de, Ratcliffe NM, Probert CS (2008) A comparative study of the analysis of human urine headspace using gas chromatography–mass spectrometry. *J Breath Res* 2:37022
- Smith EA, Macfarlane GT (1997) Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe* 3:327–337
- Smith TL, Turnbull BS, Cowan DF (1999) Morphology of the complex laryngeal gland in the atlantic bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. *Anat Rec* 254:98–106
- Sørensen TB, Kinze CC (1994) Reproduction and reproductive seasonality in Danish harbour porpoises, *Phocoena phocoena*. *Ophelia* 39:159–176
- Souffleurs d'Ecume (2016) Limiter les risques de collisions entre navires de commerce et grands cétacés : Présentation générale du système REPCET V.1. La Celle, France
- Southwood A, Fritsches K, Brill R, Swimmer Y (2008) REVIEW: Sound, chemical, and light detection in sea turtles and pelagic fishes: sensory-based approaches to bycatch reduction in longline fisheries. *Endanger Species Res* 5:225–238
- Southwood A, Higgins B, Brill R, Swimmer Y (2007) Chemoreception in Loggerhead Sea Turtles: An Assessment of the Feasibility of Using Chemical Deterrents to Prevent Sea Turtle Interactions with Longline Fishing Gear. Honolulu, Hawaii, USA. pp.25

- Springer MS, Gatesy J (2017) Inactivation of the olfactory marker protein (OMP) gene in river dolphins and other odontocete cetaceans. *Mol Phylogenet Evol* 109:375–387
- Stacey N, Sorensen P (2009) Hormonal Pheromones in Fish. *Horm brain Behav* 1:639–681
- Stafford K, Fox C, Clark D (1998) Long-range acoustic detection and localization of blue whale calls in the northeast Pacific ocean. *J Acoust Soc Am* 104:3616–3625
- Stamaton KA, Croft DB, Shaughnessy PD, Waples KA, Briggs S V. (2010) Behavioral responses of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) to whale-watching vessels on the southeastern coast of Australia. *Mar Mammal Sci* 26:98–122
- Steiger S, Schmitt T, Schaefer HM (2011) The origin and dynamic evolution of chemical information transfer. *Proc R Soc B Biol Sci* 278:970–979
- Stephanis R De, Cornulier T, Verborgh P, Sierra JS, Gimeno NP, Guinet C (2008) Summer spatial distribution of cetaceans in the Strait of Gibraltar in relation to the oceanographic context. *Mar Ecol Prog Ser* 353:275–288
- Stephanis R De, Garcia-Toscar S, Verborgh P, Esteban-Pavo R, Perez S, Minvielle-Sebastia L, Guinet C (2008) Diet of the social groups of long-finned pilot whales (*Globicephala melas*) in the Strait of Gibraltar. *Mar Biol* 154:603–612
- Stern SJ (2009) Migration and movement patterns. In: Perrin W, Wursig B, Thewissen J (eds) *Encyclopedia of Marine Mammals*, 2nd ed. Academic Press, London, UK, p 726–730
- Sticken J, Dehnhardt G (2000) Salinity discrimination in harbour seals: A sensory basis for spatial orientation in the marine environment? *Naturwissenschaften* 87:499–502
- Stimpert AK, Wiley DN, Au WWL, Johnson MP, Arsenault R (2007) “Megapclicks”: acoustic click trains and buzzes produced during night-time foraging of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *Biol Lett* 3:467–470
- Stoffel MA, Caspers BA, Forcada J, Giannakara A, Baier M, Eberhart-Phillips L, Müller C, Hoffman JI (2015) Chemical fingerprints encode mother–offspring similarity, colony membership, relatedness, and genetic quality in fur seals. *Proc Natl Acad Sci* 112:E5005–E5012
- Strehl A, Ghosh J (2002) Cluster ensembles—a knowledge reuse framework for combining multiple partitions. *J Mach Learn Res* 3:583–617
- Su CY, Menuz K, Carlson JR (2009) Olfactory Perception: Receptors, Cells, and Circuits. *Cell* 139:45–59
- Supin A, Popov V, Mass A (2001) *The Sensory Physiology of Aquatic Mammals*. Springer Science+Business Media, New York, USA
- Taylor P, Leonardos G, Kendall D, Barnard N (1969) Odor Threshold Determinations of 53 Odorant Chemicals. *J Air Pollut Control Assoc* 19:91–95
- Thewissen JGM, George J, Rosa C, Kishida T (2011) Olfaction and brain size in the bowhead whale (*Balaena mysticetus*). *Mar Mammal Sci* 27:282–294
- Thomas J, Kastelein R (1990) *Sensory Abilities of Cetaceans: Laboratory and Field Evidence*. NATO ASI Series. Series A. Life Sciences. Springer Science+Business Media, New York, USA
- Thomas J, Kastelein R, Supin A (1992) *Marine Mammal Sensory Systems*. Plenum Press, New York, USA
- Thompson PO, Cummings WC, Ha SJ (1986) Sounds, source levels, and associated behavior of humpback whales, Southeast Alaska. *J Acoust Soc Am* 80:735–740

- Thriel C van, Schäper M, Kiesswetter E, Kleinbeck S, Juran S, Blaszkewicz M, Fricke HH, Altmann L, Berresheim H, Brüning T (2006) From chemosensory thresholds to whole body exposures - Experimental approaches evaluating chemosensory effects of chemicals. *Int Arch Occup Environ Health* 79:308–321
- Torres LG (2017) A sense of scale: Foraging cetaceans' use of scale-dependent multimodal sensory systems. *Mar Mammal Sci*:1–24
- Turner SM, Malin G, Nightingale PD, Liss PS (1996) Seasonal variation of dimethyl sulphide in the North Sea and an assessment of fluxes to the atmosphere. *Mar Chem* 54:245–262
- Vaglio S (2009) Chemical communication and mother-infant recognition. *Commun Integr Biol* 2:279–281
- Vanderlaan ASM, Taggart CT (2009) Efficacy of a voluntary area to be avoided to reduce risk of lethal vessel strikes to endangered whales. *Conserv Biol* 23:1467–1474
- Vanselow KH, Ricklefs K, Colijn F (2009) Solar driven geomagnetic anomalies and sperm whale (*Physeter macrocephalus*) strandings around the North Sea: An analysis of long term datasets. *Open Mar Biol J* 3:89–94
- Vaziri SAJ, Hughes NC, Sampson H, Darlington G, Jewett MAS, Grant DM (2001) Variation in enzymes of arylamine procarcinogen biotransformation among bladder cancer patients and control subjects. *Pharmacogenet Genomics* 11:7–20
- Verborgh P, Stephanis R De, Pérez S, Jaget Y, Barbraud C, Guinet C (2009) Survival rate, abundance, and residency of long-finned pilot whales in the strait of Gibraltar. *Mar Mammal Sci* 25:523–536
- Vieuille-Thomas C, Signoret JP (1992) Pheromonal transmission of an aversive experience in domestic pig. *J Chem Ecol* 18:1551–1557
- Vikingsson GA, Pike DG, Valdimarsson H, Schleimer A, Gunnlaugsson T, Silva T, Elvarsson BT, Mikkelsen B, Oien N, Desportes G, Bogason V, Hammond PS (2015) Distribution, abundance, and feeding ecology of baleen whales in Icelandic waters: have recent environmental changes had an effect? *Front Ecol Evol* 3:1–18
- Vilensky JA (2014) The neglected cranial nerve: Nervus terminalis (cranial nerve N). *Clin Anat* 27:46–53
- Waerebeek K Van, Baker AN, Félix F, Gedamke J, Iñiguez M, Sanino GP, Secchi E, Sutaria D, Helden A van, Wang Y (2007) Vessel collisions with small cetaceans worldwide and with large whales in the Southern Hemisphere, an initial assessment. *Lat Am J Aquat Mamm* 6:43–69
- Walker MM, Kirschvink JL, Ahmed G, Dizon AE (1992) Evidence that fin whales respond to the geomagnetic field during migration. *J Exp Biol* 171:67–78
- Wartzok D, Ketten DR (1999) Marine Mammal Sensory Systems. In: Reynolds J, Rommel S (eds) *Biology of marine mammals*. Smithsonian Institution Press, Washington D.C. (USA), p 117–175
- Weller DW (2009) Predation on Marine Mammals. In: Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM (eds) *Encyclopedia of Marine Mammals*, 2nd ed. Academic Press, London, UK, p 923–932
- Wells DL (2009) Sensory stimulation as environmental enrichment for captive animals: A review. *Appl Anim Behav Sci* 118:1–11
- Werth AJ (2004) Functional Morphology of the Sperm Whale (*Physeter macrocephalus*) Tongue, with Reference to Suction Feeding. *Aquat Mamm* 30:405–418
- Whitehead H (1983) Structure and stability of humpback whale groups off Newfoundland. *Can J Zool* 61:1391–1397

- Wicher D (2012) Functional and evolutionary aspects of chemoreceptors. *Front Cell Neurosci* 6:1–4
- Wiedenmann B, Franke WW (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41:1017–28
- Wikelski M, Arriero E, Gagliardo A, Holland RA, Huttunen MJ, Juvaste R, Mueller I, Tertitski G, Thorup K, Wild M, Alanko M, Bairlein F, Cherenkov A, Cameron A, Flatz R, Hannila J, Hüppop O, Kangasniemi M, Kranstauber B, Penttinen M-L, Safi K, Semashko V, Schmid H, Wistbacka R (2015) True navigation in migrating gulls requires intact olfactory nerves. *Sci Rep* 5:17061
- Willis DN, Morris JB (2013) Modulation of sensory irritation responsiveness by adenosine and malodorants. *Chem Senses* 38:91–100
- Willson MF, Womble JN (2006) Vertebrate exploitation of pulsed marine prey: A review and the example of spawning herring. *Rev Fish Biol Fish* 16:183–200
- Wiltschko R, Schiffner I, Fuhrmann P, Wiltschko W (2010) The role of the magnetite-based receptors in the beak in pigeon homing. *Curr Biol* 20:1534–1538
- Wiltschko W, Wiltschko R (2007) Magnetoreception in birds: two receptors for two different tasks. *J Ornithol* 148:61–76
- Winston JS, Gottfried J a., Dolan RJ (2005) Integrated Neural Representations of Odor Intensity and Affective Valence in Human Amygdala. *J Neurosci* 25:8903–8907
- Wisenden BD, Thiel TA (2002) Field verification of predator attraction to minnow alarm substance. *J Chem Ecol* 28:433–438
- Wisenden BD, Vollbrecht KA, Brown JL (2004) Is there a fish alarm cue? Affirming evidence from a wild study. *Anim Behav* 67:59–67
- Wong L, Oakley B, Lawton A, Shiba Y (1994) Keratin 19-like immunoreactivity in receptor cells of mammalian taste buds. *Chem Senses* 19:251–264
- Wright KLB, Pichegru L, Ryan PG (2011) Penguins are attracted to dimethyl sulphide at sea. *J Exp Biol* 214:2509–2511
- Wyatt TD (2014) Pheromones and animal behavior: Chemical signals and signatures. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Yarmolinsky D a., Zuker CS, Ryba NJP (2009) Common Sense about Taste: From Mammals to Insects. *Cell* 139:234–244
- Yoshimura K, Hama N, Shindo J, Kobayashi K, Kageyama I (2008) Light and scanning electron microscopic study on the lingual papillae and their connective tissue cores of the Cape hyrax *Procavia capensis*. *J Anat* 213:573–582
- Yoshimura K, Kobayashi K (1997) A comparative morphological study on the tongue and the lingual papillae of some marine mammals —Particularly of four species of odontoceti and zalophus—. *Shigaku* 85:385–407
- Yu L, Jin W, Wang JX, Zhang X, Chen MM, Zhu ZH, Lee H, Lee M, Zhang YP (2010) Characterization of TRPC2, an essential genetic component of VNS chemoreception, provides insights into the evolution of pheromonal olfaction in secondary-adapted marine mammals. *Mol Biol Evol* 27:1467–1477
- Zagzebski K a., Gulland FMD, Haulena M, Lander ME, Greig DJ, Gage LJ, Hanson MB, Yochem PK, Stewart BS (2006) Twenty-Five Years of Rehabilitation of Odontocetes Stranded in Central and Northern California, 1977 to 2002. *Aquat Mamm* 32:334–345

- Zerbini AN, Clapham PJ, Wade PR (2010) Assessing plausible rates of population growth in humpback whales from life-history data. *Mar Biol* 157:1225–1236
- Zhang C, Cotter M, Lawton A, Oakley B, Wong L, Zeng Q (1995) Keratin 18 is associated with a subset of older taste cells in the rat. *Differentiation* 59:155–162
- Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJP (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: Different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112:293–301
- Zhu K, Zhou X, Xu S, Sun D, Zhou K, Yang G (2014) The loss of taste genes in cetaceans. *BMC Evol Biol* 14:218–228
- Zoeger J, Dunn, Fuller M (1981) Magnetic material in the head of the common Pacific dolphin. *Science* 213:892–894
- Zufall F, Munger SD (2016) *Chemosensory Transduction: The Detection of Odors, Tastes, and Other Chemostimuli*, Academic Press, London (UK)

Etude Comportementale des Capacités Chimio-sensorielles des Cétacés

Au cours d'une histoire évolutive singulière, les systèmes sensoriels des cétacés se sont adaptés à la vie en milieu aquatique. Aujourd'hui, alors que la littérature scientifique regorge de travaux sur leurs capacités acoustiques exceptionnelles, l'utilisation des sens chimiques par ces mammifères marins demeure encore largement méconnue. En effet, malgré quelques rares observations suggérant qu'ils pourraient détecter les composés sécrétés par leurs proies et leurs congénères, les arguments anatomiques et génétiques sont plutôt en faveur d'une régression voire d'une disparition de leurs capacités chémoréceptrices. Les cétacés auraient-ils perdu l'usage de ce canal sensoriel pourtant fondamental pour l'alimentation, la navigation et la reproduction chez les autres grands prédateurs marins ? L'objet principal de ma thèse était donc de déterminer si ces animaux sont capables de percevoir et d'utiliser les indices chimiques présents dans leur environnement en me basant principalement sur une approche comportementale. J'ai ainsi étudié les réactions des cétacés à dents (Odontocètes) et à fanons (Mysticètes) face à différents stimuli solubles ou volatiles, liés directement ou indirectement à leur alimentation. Après avoir mis en évidence, dans des conditions contrôlées, que le grand dauphin discrimine des extraits solubles de ses proies, j'ai développé un protocole permettant de mesurer la réponse des animaux (déplacements et comportements de surface) à des stimuli chimiques, dans leur milieu naturel. Des expériences en Méditerranée occidentale ont révélé que les grands dauphins et les globicéphales (Odontocètes) réagissent au sulfure de diméthyle (DMS), une molécule volatile émise dans les zones de forte productivité primaire. J'ai ensuite mesuré, chez la baleine à bosse (mysticète), la réaction au DMS et à des extraits de proies (krill) dans ses zones de reproduction (Océan Indien) et de nourrissage (Atlantique Nord et Antarctique). Les animaux ont été attirés par l'extrait de krill et ont exploré la zone de stimulation plus longtemps que lors des essais témoins, alors que le DMS n'a pas semblé induire de telles réponses. Nos résultats comportementaux ayant mis en évidence une chémoréception fonctionnelle chez les cétacés, j'ai tenté dans un second temps d'identifier ses bases anatomiques et chimiques. Dans ce but, j'ai initié l'exploration des muqueuses orales et nasales par des techniques d'immunohistochimie, ainsi que l'analyse chimique de leurs sécrétions (urines et fèces) à la recherche de potentielles phéromones. Cette approche innovante et multidisciplinaire a permis de dévoiler l'implication des signaux chimiques dans l'écologie des cétacés. Au-delà de leur aspect fondamental, ces résultats pourraient trouver des applications concrètes pour la gestion et la conservation de ces espèces emblématiques et menacées.

Mots-clés : Ecologie comportementale, Chémoréception, Communication chimique, Cétacés, Mysticètes, Odontocètes

Behavioural Study of Cetaceans' Chemosensory abilities

During the course of a unique evolutionary process, the sensory systems of cetaceans (whales, dolphins and porpoises) have secondarily adapted to life in an aquatic environment. While the extraordinary acoustic capacities of these animals have been widely studied, surprisingly little is known about their chemosensory abilities. The results of some sparse behavioural studies suggest that cetaceans can detect molecules secreted by, for example, a prey or congener. In contrast, anatomical and genetic investigations have concluded that cetacean chemosenses are greatly reduced or even absent. This poses the question; have cetaceans truly lost the use of the sensory channels that play a major role in the feeding, orientation and reproduction behaviours of other marine predators? The main objective of this thesis was, therefore, to establish whether these animals are capable of perceiving biologically-relevant chemical cues and exhibiting a behavioural response. For this project, I studied the reactions of both toothed (Odontoceti) and baleen (Mysticeti) whales to various soluble or volatile food-related stimuli. I first worked with captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and showed they could discriminate soluble extracts of their piscine prey. I then developed a novel protocol to measure the responses (surface behaviour and movements) of cetaceans to chemical cues in their natural habitat. Using this protocol, experiments performed in the western Mediterranean Sea revealed that both bottlenose dolphins and pilot whales (*Globicephala melas*) react to dimethyl sulfate (DMS), a volatile molecule found in areas of high primary productivity. Using the same protocol, I subsequently measured the reactions of a mysticete species, the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) to DMS and to krill extract (their natural prey) in three different locations: in their reproduction zone in the Indian Ocean, and in their feeding grounds in the North Atlantic and Antarctic Ocean. I found that the humpback whales were attracted by krill extract and explored the stimulus area longer than during control trials, while DMS did not seem to trigger such responses. As the results of the behavioural studies suggested the presence of functional chemical senses, I initiated two further studies; (1) a neuroanatomical and immunohistochemical exploration of tissues in the oral and nasal pathways, in order to identify potential chemosensory receptor cells in four species of odontocete, and (2) a chemical analysis of odontocete secretions (urine or feces) in search for potential semiochemicals. Overall, this innovative and multidisciplinary research project revealed that chemical signals are potentially very important in the behavioral ecology of cetaceans. Moreover, these results contribute not only to our fundamental knowledge of the sensory biology of these animals, but they could also have important practical implementations in the conservation of these iconic and threatened species.

Keywords: Behavioural ecology, chemoreception, Chemical communication, Cetaceans, Mysticeti, Odontoceti
