



HAL
open science

Étude des grands mammifères marins en Méditerranée pour mieux adapter les politiques de conservation

Céline Tardy

► **To cite this version:**

Céline Tardy. Étude des grands mammifères marins en Méditerranée pour mieux adapter les politiques de conservation. Sciences agricoles. Université Paris sciences et lettres, 2021. Français. NNT : 2021UPSLP064 . tel-04089946

HAL Id: tel-04089946

<https://theses.hal.science/tel-04089946>

Submitted on 5 May 2023

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

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

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'École Pratique des Hautes Études

**Étude des grands mammifères marins en Méditerranée
pour mieux adapter les politiques de conservation**

Soutenue par

Céline TARDY

Le 09 juillet 2021

École doctorale n° 472

**École doctorale de l'École
Pratique des Hautes Études**

Spécialité

**Biodiversité, Génétique et
Évolution**

Composition du jury :

Claudie DOUMS UMR7205 MNHN	<i>Président</i>
Cécile FAUVELOT UMR9220 ENTROPIE	<i>Rapporteur</i>
Jean-Luc JUNG UMR7205 Univ. Brest	<i>Rapporteur</i>
Aurélien BESNARD UMR5175 CEFE	<i>Examineur</i>
Olivier REY UMR5244 IHPE	<i>Examineur</i>
Hélène LABACH Miraceti	<i>Membre invitée</i>
Denis ODY WWF-France	<i>Co-encadrant de thèse</i>
Serge PLANES USR3278 CRIOBE	<i>Directeur de thèse</i>



À mes grands-parents qui n'auront pas vu aboutir ce projet,

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de doctorat. Je remercie donc vivement Cécile Fauvelot et Jean-Luc Jung d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit ainsi que Claudie Doums, Aurélien Besnard et Olivier Rey en tant qu'examineurs et Hélène Labach en tant que membre invité.

Je souhaite également remercier mes encadrants de thèse. Toute ma reconnaissance va à Serge Planes et Denis Ody qui m'ont permis de réaliser ce doctorat. Merci de m'avoir fait confiance il y a 4 ans maintenant et de m'avoir offert la possibilité de me lancer dans cette aventure. Merci à vous deux d'avoir mis à ma disposition tous les moyens dont j'ai eu besoin au cours de ces années. Merci Serge d'avoir fait confiance à Denis quand il t'a proposé que l'on construise à trois ce projet, merci de m'avoir tant fait évoluer au sein du laboratoire en me donnant ta confiance. Merci Denis pour tous les moments que l'on a passé ensemble, que ce soit au bureau à Marseille mais aussi et surtout pendant toutes les missions en mer, qui je l'espère continueront encore longtemps.

Un immense merci également au WWF-France pour m'avoir accueillie durant ces années et pour avoir co-financé cette thèse. Merci aussi à l'ANRT pour avoir co-financé cette thèse.

Merci à Hélène Labach, mon premier mentor (car oui, maintenant il y a aussi Serge et Denis). Cela fait six ans maintenant que tu m'as accueillie au sein du GIS3M (qui a bien évolué depuis), et jusqu'à présent tu m'as toujours suivie sans me lâcher. Merci, car sans toi je ne serais pas là !

Un merci tout particulier à tous les bénévoles du WWF qui ont fait partie intégrante de cette thèse et qui m'ont permis d'acquérir de nouvelles données chaque année. Un merci particulier à Frédéric Bassemayousse et Sébastien Personnic, nos professionnels de l'arbalète, sans vous cette thèse n'aurait pu avoir lieu.

Un immense merci à Nathalie Tolou et Emilie Boissin. Nathalie, merci de m'avoir permis de me sentir comme chez moi dans le laboratoire de biologie moléculaire à mon arrivée, et de m'avoir enseignée tout ce que tu savais sur les microsatellites. Émilie, que dire à part merci, merci pour tout ce que tu as fait et donné pour moi, merci pour nos discussions, ton aide dans les analyses, les relectures, mais aussi dans les moments off sur la terrasse ou au lac. Merci à toutes les deux pour votre amitié !

Enfin voilà le temps de remercier tous ceux qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail, grâce à tous les moments partagés ici et ailleurs, et qui ont fait que ces quatre années ont été cette belle aventure.

À Marseille,

Je tiens à remercier Claire et Basile ainsi que la bande de Cabriès pour les week-ends passés ensemble à Marseille et aux alentours. Merci à Claire et Hugo pour les moments passés au GIS3M, au Reverdigo notre QG et à notre colloq' dans un studio. Merci à Théa, ma fidèle collègue du WWF Marseille, pour les fous rires que l'on a eu que ce soit à Marseille ou bien à Barcelone. Merci à tous mes fidèles coéquipiers de mission : Seb tu es mon grand frère désormais donc attention c'est un rôle important, Anouck, Aurore, Marion, Jean-Noël, Alexis, Julie et merci à tous ceux que je ne cite pas.

À Perpignan,

Un grand merci à mon équipe de choc Claire et Titouan, et aux nombreux moments que l'on a passés au Fla' et tout ce que cela entraîne. Claire, on a commencé ensemble, on finira ensemble ! Titouan, merci pour toutes ces soirées à discuter de nos vies et à débattre sur tous les sujets possibles. Merci à toute la Team étudiante du CRIOBE, je ne vous oublierai jamais ni les moments que l'on a passé ensemble, Charles, Jérèm', Nina, Jérémy, Jason, Hendrikje, Gonzalo, Victor, Chloé, Pauline. Merci aux anciens qui ont et qui sont toujours là pour moi, Nao, Lauric, Mélodie, Louis. Merci à « mes stagiaires » vous qui m'avez fait tant évoluer, Maëva, la première des premières, James, « je suis l'anglais », Kim et Violaine, vous deux faites désormais parties de notre team doctorants. Merci à Guillaume d'avoir été là au début, notamment avec tes barbecues et tes nuits blanches à discuter. Merci à Fabien pour tous les moments que l'on a passé ensemble. Merci à Camille, la doctorante d'en bas, très belle rencontre. Un immense merci à Clara, depuis que tu es arrivée à Perpignan tu me supportes tous les jours dans mes folies et depuis quelques mois tu me supportes aussi en tant que colocataire, ce qui n'est pas chose facile surtout en fin de thèse !

Dans le reste du monde,

Merci à mes amies de La Réunion, Marion et Sarah, même si maintenant vous êtes à l'autre bout du monde, quand on se voit c'est comme si c'était hier. Je vous aime ! Merci à Biagio, mon homologue cétaqués italien, c'est toujours un grand plaisir de discuter avec toi. Je tiens également à remercier tous mes amis d'Auvergne qui font partis de ma famille de cœur

aujourd'hui, Carine, Claire, Joss, Betty, Guy, Michelle, Didier, Armelle, ... ! Merci à la famille Luque qui m'a adoptée depuis plus de quinze ans et qui m'a donné le goût du voyage et de l'aventure.

Et pour finir je tiens bien évidemment à remercier mes parents malgré la distance vous avez toujours été présent, toujours derrière moi à me soutenir quoi qu'il advienne. Maman, papa, je ne vous l'ai jamais dit, mais je vous aime ! Un grand merci aussi à toute ma famille normande qui est là pour me soutenir, vous me manquez, promis je vais me rattraper et venir vous voir plus souvent !

Table des matières

Chapitre 1 – Introduction Générale.....	20
1. Génétique des populations	22
1.1 Les avancées d’hier et d’aujourd’hui.....	22
1.2 La diversité génétique et ses processus évolutifs	23
2. Diversification.....	25
2.1 Spéciation	25
2.2 Biogéographie.....	27
3. Les différents marqueurs.....	28
3.1 Les marqueurs nucléaires	29
3.2 Les marqueurs mitochondriaux	30
4. Apport de la génétique dans la conservation	31
5. Le cas de la Mer Méditerranée.....	33
5.1 L’histoire de ce bassin	33
5.2 Les cétacés en Méditerranée.....	34
6. Le Rorqual commun, <i>Balaenoptera physalus</i>	36
6.1 Son histoire évolutive	36
6.2 En Mer Méditerranée.....	37
7. Problématiques.....	39
Chapitre 2 – Identification et caractérisation de marqueurs génétiques.....	40
1. Introduction.....	44
2. Article 1 : Les marqueurs microsatellites	46
2.1 Abstract.....	47
2.2 Introduction	48
2.3 Material and Methods	49
2.3.1 Biological samples	49
2.3.2 DNA extraction and design of new microsatellite markers	50
2.3.3 Molecular analysis.....	51
2.3.4 Data analysis	51
2.4 Results	52
2.4.1 Marker amplification on <i>B. physalus</i> samples	52
2.4.2 Genetic diversity of <i>B. physalus</i>	56
2.4.3 Cross-species amplification.....	56
2.5 Discussion.....	61

3.	Article 2 : Les haplotypes	66
3.1	Abstract.....	67
3.2	Introduction	68
3.3	Materials and methods	69
3.3.1	Study area and sampling	69
3.3.2	Genetic analyses	69
3.4	Results and Discussion	70

Chapitre 3 – Abondance de la population de Rorqual commun en Méditerranée Nord-occidentale.....73

1.	Introduction.....	80
2.	Article	82
2.1	Abstract.....	83
2.2	Introduction	84
2.3	Materials and methods.....	87
2.3.1	Data collection.....	87
2.3.2	Microsatellite loci genotyping.....	88
2.3.3	Photo-identification	89
2.3.4	Capture-recapture modelling and abundance estimation	89
2.4	Results	92
2.4.1	Genotype collection.....	92
2.4.2	Photograph collection.....	92
2.4.3	Combined collection	93
2.4.4	Goodness-of-fit tests	94
2.4.5	Estimated abundance.....	95
2.5	Discussion.....	98

Chapitre 4 – Taille efficace actuelle et historique de la population de Rorqual commun en Méditerranée Nord-occidentale.....96

1.	Introduction.....	106
2.	Article	108
2.1	Abstract.....	109
2.2	Introduction	110
2.3	Materials and methods.....	113
2.3.1	Sample collection and DNA extraction.....	113
2.3.2	Microsatellite molecular analyses	113
2.3.3	Mitochondrial DNA analyses	114
2.3.4	Contemporary effective population size.....	114

2.3.5	Demographic reconstruction	115
2.4	Results	116
2.4.1	Genetic diversity	116
2.4.2	Contemporary effective size estimation	117
2.4.3	Demographic changes	117
2.5	Discussion.....	119
Chapitre 5 – Structure génétique de la population Méditerranéenne de Rorqual commun		116
1.	Introduction.....	130
2.	Article 1 : Structure de la population Méditerranéenne de Rorqual commun	132
2.1	Abstract.....	133
2.2	Introduction	134
2.3	Results	136
2.3.1	Kinship.....	136
2.3.2	Structure.....	137
2.3.3	Inbreeding	138
2.4	Discussion.....	140
2.5	Methods	145
2.5.1	Sample collection.....	145
2.5.2	Laboratory analysis	146
2.5.3	Statistical analysis.....	146
3.	Article 2 : La découverte de vrais frères/sœurs comme démonstration de fidélité de reproduction chez les baleines.....	154
3.1	Abstract.....	155
3.2	Main text.....	156
3.3	Materials and Methods	163
3.3.1	Data Collection.....	163
3.3.2	DNA extraction	163
3.3.3	Sex determination.....	163
3.3.4	Microsatellite loci genotyping.....	164
3.3.5	Mitochondrial DNA sequencing	164
3.3.6	Kinships analysis.....	165
Chapitre 6 – Discussion Générale et Perspectives.....		151
1.	Synthèses des résultats et discussion générale.....	170
1.1	Paramètres démographiques de la population de Rorqual commun.....	170
1.2	Structuration de la population.....	174

1.3	Bilan / État de santé	177
2.	Perspectives.....	178
2.1	Recherche fondamentale.....	178
2.2	Conservation.....	180
	Références bibliographiques.....	164
	Annexes.....	198
	Annexe 1 : Évolution des populations de Rorqual commun et de Dauphin bleu et blanc sur 25 ans dans le Nord-Ouest de la Méditerranée	222
	Annexe 2 : Prédation des anguilles de Méditerranée occidentale par les cétacés	224
	Annexe 3 : Évènements de naissance et de lactation de Cachalot dans le Nord-Ouest de la Méditerranée.....	226
	Annexe 4 : Rapport scientifique du WWF de 2019 portant sur l'analyse de contaminants micro-plastiques, les phtalates, pour trois espèces de cétacés	228
	Annexe 5 : Rapport scientifique du WWF de 2016 sur l'analyse d'hormones sexuelles chez le Rorqual commun et le Cachalot	258

Liste des figures

- Figure 1.** Différents niveaux hiérarchiques des liens génétiques (d'après Avise et al. 1987). 23
- Figure 2.** Différents processus montrant les effets directs et indirects de la diversité génétique sur les propriétés écologiques des populations, des communautés et des écosystèmes. Les lignes noires indiquent les conséquences écologiques directes de la diversité génétique, les lignes noires en pointillées indiquent les effets de la sélection naturelle qui dépendent de la diversité génétique, et les lignes grises représentent les effets indirectement liés à la diversité génétique (d'après Hughes et al. 2008). 24
- Figure 3.** Représentation graphique des trois principaux modes de spéciation et des arbres génétiques correspondants (d'après Harrison 1991). 26
- Figure 4.** Schéma de l'hérédité nucléaire (à gauche) et de l'hérédité mitochondriale (au milieu). Les mitochondries ont une origine maternelle tandis que les gènes nucléaires sont biparentaux (à gauche ; d'après <http://evolution.berkeley.edu>). 29
- Figure 5.** Principales étapes de l'évolution géologique de la Mer Méditerranée. En blanc : la terre, et en gris : la mer. (a) Triassic, 220-200 Ma ; (b) Début du Miocène, 12-13 Ma ; (c) fin du Miocène (crise Messénienne), 5-6 Ma ; (d) fin du Pléistocène, 20 000 y (d'après Bianchi and Morri 2000). 33
- Figure 6.** Les cétacés de la Mer Méditerranée (d'après ACCOBAMS, www.accobams.org).36
- Figure 7.** Distribution potentielle du Rorqual commun en Méditerranée (ACCOBAMS 2021). 38
- Figure 8.** Principal Coordinates Analysis on 5 cetacean species genotyped with newly developed and previously published microsatellite markers (32 microsatellite loci; A and B) or only with previously published (7 microsatellite loci; C and D). A: Axis 1 (16%) and 2 (11%). B: Axis 1 (16%) and 3 (6%). C: Axis 1 (14%) and 2 (9%). D: Axis 1 (14%) and 3 (5%). B.p.: *Balaenoptera physalus*, M.n.: *Megaptera novaeangliae*, B.a.: *Balaenoptera acutorostrata*, P.m.: *Physeter macrocephalus*, G.m.: *Globicephala melas*. 61
- Figure 9.** Map of sampling locations in the Northwestern Mediterranean Sea (490 individuals; orange), the North Atlantic Ocean (13 individuals; green) and the North Sea (2 individuals; blue). Stars represent stranded individuals, and dots represent samples from biopsies. 69
- Figure 10.** Median-joining networks of fin whale control region haplotypes. Relationships among haplotypes determined by analysis of the different size of the sequences: A) 188bp; B) 288bp and C) 409bp. Colour corresponds to the haplotype origin. Circle sizes are proportional to the number of sequences (from GenBank and this study) per haplotype. 75
- Figure 11.** Northwestern Mediterranean Sea, including track effort (black lines) obtained while conducting boat surveys between 2008 and 2019, and Pelagos sanctuary (light-grey in the background). 87

Figure 12. Recapture probability of the fin whale (<i>Balaenoptera physalus</i>) estimated from CJS model (model 2 in Table 2) on genotype collection, with associated 95% confidence intervals.	95
Figure 13. Abundance estimation for the fin whale (<i>Balaenoptera physalus</i>) with associated 95% confidence intervals, for photo-identification, microsatellite genotype, both collections, and for corrected estimates from photographs.	96
Figure 14. Map of the fin whale samples, <i>Balaenoptera physalus</i> , collected in the Northwestern Mediterranean Sea.	113
Figure 15. Distribution of allele frequency in the Mediterranean fin whale population (N = 495 individuals for 29 microsatellite markers) as inferred from the Bottleneck software.	118
Figure 16. Bayesian skyline plot obtained with the mitochondrial DNA dataset and the Beast package, retracing changes in effective population size for the Mediterranean fin whale population through time (Mya).	119
Figure 17. Distribution of the A) Number of individuals per family within the Mediterranean fin whale population, and B) Genetic degree (number of first-order genetic relationships an individual has).	136
Figure 18. Parentage network of fin whales from the Mediterranean population (N = 212) and stranded individuals from North Atlantic (N = 2). Each individual is indicated by a node. Circles and squares represent Mediterranean (MED) and North Atlantic (ATL) individuals, respectively. Pink, blue and green colors represent females (F), males (M) and undetermined (U) individuals, respectively. Red, black and grey links represent full-sibs (FS), half-sibs (HS) and parent-offspring (PO) relationships, respectively.	137
Figure 19. Bayesian clustering analysis showing the most likely partition for the Mediterranean fin whale population, with K=7. Each individual is represented by a colored vertical line. Same color in different individuals indicates that they belong to the same cluster, and when individuals have at least 50% of a cluster, they are grouped together. Other individuals are merged into the “independent” group.	138
Figure 20. Map of the study’s sampled locations for <i>Balaenoptera physalus</i> in the Mediterranean Sea (N = 495), the North Atlantic Ocean (N = 11) and the North Sea (N = 2). Dots represent samples from biopsies and stars represent stranded individuals.	145
Figure 21. Map of the three pairs of full-siblings. The pair BR08-CR10 is represented by squares on the map, with two sightings of CR10. The pair ER25-GR42 corresponds to circles with only one sighting per individual. The last pair DR40-MR13 is characterized by triangles on the map, with three sightings of DR40.	158
Figure 22. Pedigree representation for each pair of full-siblings (FS). On each representation, the squares correspond to males and the circles to females. Full symbols characterize the sampled individuals with their names, whereas empty symbols are for hypothetical individuals (which have been reconstructed by kinship software). Each line connects a parent with one of its offspring.	162

Figure S1. Bayesian skyline plot obtained with the mitochondrial DNA dataset, showing changes in effective population size for the Mediterranean fin whale through time (Mya). The point “a” corresponds to the inflexion point of the curve whereas the point “b” corresponds to the end of the curve. 126

Figure S2. Results of the STRUCTURE runs: plots of (A) the log likelihood, and (B) Evanno’s delta K distribution for the Mediterranean dataset. 150

Figure S3. Principal Coordinates Analysis (PCoA) of the eight clusters identified by STRUCTURE for the Mediterranean fin whale population. Coordinate 1 explains 2.5% of the variation while coordinate 2 explains 2.3% of the variation. 150

Figure S4. Parentage network of fin whales from the Mediterranean population (N = 212) and stranded individuals from North Atlantic (N = 2). Each individual is indicated by a node. Circles and squares represent Mediterranean (MED) and North Atlantic (ATL) individuals, respectively. Node colors represent the individual cluster from STRUCTURE output (C1 to C7 and independent), and black represents indefinite clusters. Red, black and grey links represent full-sibs (FS), half-sibs (HS) and parent-offspring (PO) relationships, respectively. 151

Liste des tableaux

Table 1. Characterization of the 32 microsatellite markers used for this study on *Balaenoptera physalus* together with the seven loci also tested but that did not amplify. Ta: annealing temperature in degrees; N: number of samples; Na: number of alleles; PA: priv private alleles; H_0 : observed heterozygosities; H_E : expected heterozygosities; F_{IS} : fixation index following Weir and Cockerham; *: indicates significant departures from Hardy-Weinberg Equilibrium ($p < 0.05$); ‡: loci presenting null alleles; †: loci that did not amplify in this study. B.p.: *Balaenoptera physalus*, M.n.: *Megaptera novaeangliae*. 53

Table 2. Results of the cross-species amplifications using the fin-whale loci. Size range is in base pairs. PA: private alleles 58

Table 3. Fin whale, *Balaenoptera physalus*, haplotypes. The first column corresponds to the haplotype numbers. The second column represents the polymorphic sites that defined the 12 haplotypes observed in the 505 individuals. The number above corresponds to the nucleotide position of the polymorphic sites starting from the first position of the mtDNA control region fragment sequenced for this study. Sequence identity to reference sequence in top row (Haplotype 1) is indicated by a dot. The third to the sixth columns list the number of individuals by region with respect to haplotype; MED: Mediterranean Sea; ATL: North Atlantic; NORTH: North Sea. New haplotypes were submitted to GenBank. 72

Table 4. Summary of fin whales (*Balaenoptera physalus*) identified from 2008 to 2019 in the Northwestern Mediterranean Sea, by microsatellite genotypes and photographs..... 93

Table 5. Summary of goodness-of-fit test results for a study on the fin whale, for photo-identification and microsatellite genotype collections. 94

Table 6. Cormack-Jolly-Seber models fitted to data from 2008 to 2019 for photo-identification and microsatellite genotype collections. Npar: number of parameters; AICc: Akaike Information Criterion; \hat{c} : parameter of the deviance of the given model relative to the most parameter-saturated model; QAICc: Quasi-likelihood AICc; Δ QAICc: difference in QAICc with the best-fitting model. Φ : survival probability; P: recapture probability; c: parameter is constant over time; t: parameter varies with capture occasion; m: parameter is heterogeneous. 97

Table 7. Effective population size estimates (N_e) for the fin whale population as calculated by four different methods and three distinct software, from microsatellite data. CI: confidence interval..... 117

Table 8. Summary table of the tests used for detecting recent effective population size reductions (“bottlenecks”) from microsatellite data under three evolution models (IAM: Infinite Allele Model, TPM: Two-Phase Model, SMM: Stepwise Mutation Model)..... 118

Table 9. Characteristics of each group identified by STRUCTURE software: N, number of individuals; A_r , mean allelic richness; H_0 , observed heterozygosity; H_s , expected

heterozygosity; F_{IS} , values of the inbreeding coefficient; F_{ST} , genetic differentiation based on 29 microsatellite markers. SE: standard error. Significance of values are given as follows: NS: non-significant, $* < 0.05$ 139

Table 10. Details of the three pairs of full-siblings (FS). 159

Table S1. Statistical summary of microsatellite markers used on fin whale, *Balaenoptera physalus*, samples. HE: expected heterozygosities; H0: observed heterozygosities; FIS: inbreeding coefficient; * indicates significant values of FIS with $*p\text{-value} < 0.05$, $**p\text{-value} < 0.01$ 124

Table S2. Summary of haplotypes used on fin whale, *Balaenoptera physalus*, samples. 125

Table S3. Descriptive statistics of the 29 microsatellite markers used to study the Mediterranean fin whale population. H0: observed heterozygosity; HS: expected heterozygosity; F_{ST} : genetic differentiation; F_{IS} : values of the inbreeding coefficient; SE: standard error. 152

Préambule

Les travaux de recherches développés dans ce mémoire de thèse portent sur un modèle biologique emblématique de la Mer Méditerranée : le Rorqual commun *Balaenoptera physalus* (Linnaeus, 1758). Ce cétacé est la deuxième espèce la plus grande actuellement sur Terre, après la baleine bleue *Balaenoptera musculus* (Linnaeus, 1758). La population Méditerranéenne de Rorqual commun fait partie des plus petites populations de cette espèce et est fortement impactée et menacée par les diverses activités anthropiques, qui sont, elles en augmentation constante.

Les connaissances sur la population méditerranéenne de Rorqual commun ont été enrichies ces 20 dernières années avec la création et les financements du sanctuaire Pélagos et les efforts des associations. Le WWF a mené chaque année des expéditions scientifiques en mer afin d'améliorer ces connaissances, et de pouvoir proposer des mesures et des outils de conservation pour cette espèce, mais aussi pour les autres cétacés fréquentant la Méditerranée française. Le WWF possède à l'heure actuelle une des plus grandes bases de données sur les cétacés en Méditerranée, avec notamment plus de 1 200 observations de Rorquals communs entre 2006 et 2019.

Afin de valoriser les données et les résultats des différentes campagnes, une bourse doctorale Cifre a été obtenue dans le cadre d'un partenariat entre le WWF-France et le laboratoire de recherche CRIOBE-USR3278. C'est dans ce contexte que cette thèse s'est déroulée, dans le but d'étudier la population de Rorqual commun de Méditerranée et d'exploiter au mieux tout le travail de suivi du WWF pour mieux la préserver. Différentes approches complémentaires ont été utilisées, à l'aide d'outils de génétique et de photo-identification.

Les chapitres 2 à 5 sont rédigés en anglais sous forme d'articles scientifiques. Dans le chapitre 2, la première partie est publiée dans la revue Molecular Biology Reports, tandis que la deuxième partie est soumise pour publication dans la revue Marine Biodiversity. Le chapitre 3 est soumis pour publication dans la revue Marine Ecology. Le chapitre 4 est soumis pour publication dans la revue Molecular Ecology. Au sein du chapitre 5, une partie est soumise pour publication dans la revue Scientific Reports, tandis que l'autre partie est soumise pour publication dans la revue Current Biology. Les annexes comportent également des articles

*scientifiques soumis et en préparation, correspondant à des travaux réalisés au cours de cette thèse. De plus, deux rapports scientifiques du WWF auxquels j'ai participé sont en annexe, dont un antérieur à la thèse. L'annexe 1, portant sur l'évolution des populations de Rorqual commun et Dauphin bleu et blanc sur 25 ans dans le Nord-Ouest de la Méditerranée est soumise pour publication dans la revue Aquatic Conservation. L'annexe 2, portant sur la prédation des anguilles, *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758), dans l'Ouest de la Méditerranée est soumise pour publication dans la revue Marine Ecology Progress Series. L'annexe 3, portant sur l'observation d'une naissance de Cachalot, *Physeter macrocephalus* Linnaeus, 1758, et d'un évènement de lactation en Mer Ligure est en préparation pour publication dans la revue Deep Sea Research. L'annexe 4 correspond à un rapport scientifique du WWF de 2019 portant sur l'analyse de contaminants micro-plastiques, les phtalates, pour trois espèces de cétacés. L'annexe 5 correspond à un rapport scientifique du WWF de 2016 portant entre autres sur l'analyse d'hormones sexuelles chez le Rorqual commun et le Cachalot.*

Glossaire

Abondance : nombre d'individus présent dans la population. L'abondance correspond à la taille réelle de la population.

ADNmt : Acide Désoxy-riboNucléique mitochondrial. Il désigne le matériel génétique présent dans les mitochondries, ce génome n'est transmis que par la mère.

ADNnu : L'ADN nucléaire constitue le matériel génétique et provient des deux parents.

Allèle : correspond à une forme possible d'un gène.

Espèce : réunit les individus capables de se reproduire entre eux et donner une descendance viable et fertile. Ces individus présentent un ensemble de caractéristiques morphologiques, anatomiques, physiologiques, biochimiques et génétiques, communes.

Gène : entité physique transmise par les parents aux enfants, lors du processus de reproduction : les caractères héréditaires dépendent des gènes. Un gène correspond à une séquence spécifique de composants, les nucléotides, le long d'une molécule d'ADN.

Génotype : constitution génétique d'un individu. Le génotype décrit donc les allèles spécifiques d'un individu à tous les locus qui déterminent le caractère en question.

Hétérozygote : individu ayant deux allèles différents à un locus donné.

Homozygote : individu ayant deux allèles identiques à un locus donné.

Locus : position d'un gène le long de l'ADN.

Microsatellite : séquence d'ADN formée par une répétition continue de motifs composés de 2 à 4 nucléotides le plus souvent.

Mutation : modification du matériel génétique, cette modification est héréditable.

Nucléotide : élément constitutif d'une molécule d'ADN, constitué par la liaison d'un nucléoside (sucre + base azotée) et de l'acide phosphorique. Il existe 4 nucléotides différents pour l'ADN : adénine A, thymine T, cytosine C et guanine G.

Phénotype : expression physique d'un génotype.

Photo-identification : méthode qui permet d'identifier les animaux à partir de leurs marques naturelles. Elle consiste en l'étude de photographies prises sur le terrain pour repérer les différences et reconnaître ainsi chaque individu observé.

Population : groupe d'individus de la même espèce vivant dans une zone géographique suffisamment restreinte pour que tout membre de la population puisse se croiser avec tout autre.

Taille efficace : taille de la population idéale ayant le même taux de dérive génétique et de consanguinité que la population considérée. La taille efficace est parfois considérée comme une approximation du nombre d'individus reproducteurs ayant effectivement contribué à la génération suivante.



Chapitre 1

Introduction Générale

1. Génétique des populations

1.1 Les avancées d'hier et d'aujourd'hui

La première personne à étudier le déterminisme et la transmission des caractères est Gregor Mendel en 1865. Suite à ses travaux, une nouvelle discipline apparaît : la génétique des populations, qui vise à étudier la transmission de l'information héréditaire et son utilisation dans le développement et le fonctionnement des organismes. Au début du 20^{ième} siècle, cette discipline apparaît comme une synthèse entre la vision Mendélienne de l'hérédité et la vision Darwinienne de l'évolution.

Ensuite, au cours de la première moitié du 20^{ième} siècle, des théories mathématiques voient le jour, élaborées par Fisher, Haldane et Wright. Cette époque sera nommée néo-Darwinisme et va entraîner un essor de la génétique des populations. Cependant, son application reste limitée car restreinte à des approches phénotypiques, basées sur les caractères extérieurs. L'arrivée des outils moléculaire après 1950 va permettre de comprendre que l'information génétique est chimiquement codée par l'ADN (l'acide désoxyribonucléique). Une cartographie de cet ADN va être rapidement réalisée afin de comprendre les processus d'hérédité et de liaison génétique.

Au milieu des années 1960, un premier outil moléculaire a été développé : l'électrophorèse des protéines enzymatiques qui a permis de mettre en évidence une grande variabilité génétique, élément utile pour étudier la génétique des populations et la biologie de l'évolution. Ensuite à la fin des années 1970, sont apparus des outils d'analyses de l'ADN nucléaire via des enzymes restrictives, puis vers 1980, des analyses de l'ADN mitochondrial et des approches d'empreinte génétique via l'ADN nucléaire ont été développées. Ces dernières sont très populaires et toujours d'actualités. Ces avancées ont notamment été permises via la mise au point de la technique d'amplification de l'ADN grâce à la PCR (Polymerase Chain Reaction) en 1988, permettant de différencier les fragments de gènes cibles. Dans les années 1990, de nouvelles technologies en biochimie ont permis le séquençage de l'ADN afin d'obtenir la séquence nucléotidique de base et de référence.

À l'heure actuelle, les informations génétiques sont largement utilisées en biologie et permettent d'étudier et de comprendre de nombreux aspects tels que le comportement, les histoires de vie et l'évolution des relations entre les organismes.

En fonction des outils et des méthodes utilisés, les réponses aux questions biologiques seront différentes de même que l'échelle à laquelle on se situe (**Figure 1**). La génétique permet

notamment d’aller du macro au micro et de : i) déterminer les liens et les structures qui constituent les espèces ; ii) différencier des espèces qui sont reproductivement isolées ; iii) différencier des populations et/ou sous-espèces ; iv) déterminer les échanges entre les individus d’un même groupe ou d’une population ; v) identifier les liens de parenté entre des individus (paternité, maternité, frère-sœur) ; vi) identifier les clones et/ou reconnaître un individu suivant une carte génétique.

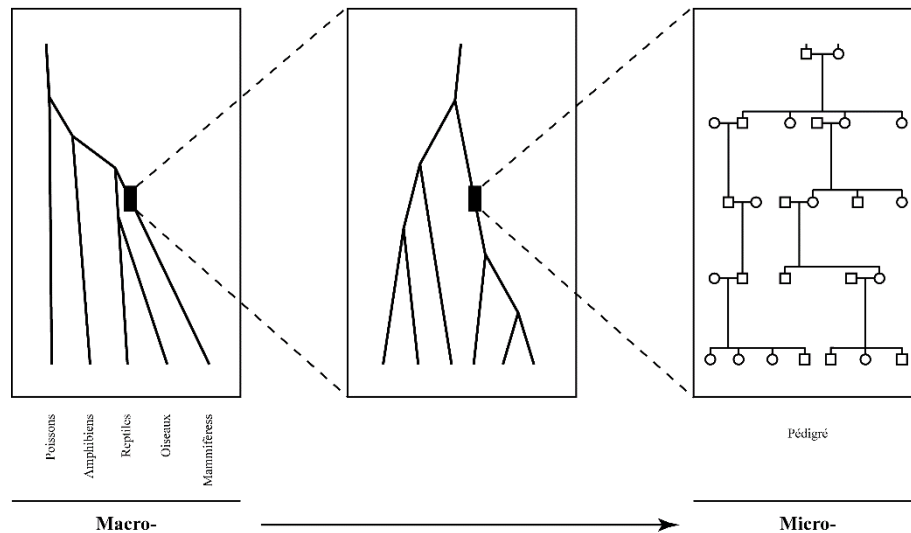


Figure 1. Différents niveaux hiérarchiques des liens génétiques (d'après Avise et al. 1987).

Pour répondre à ces questions biologiques, il est nécessaire d’étudier la diversité génétique au sein d’une population et entre les populations. La diversité génétique est modulée par quatre processus évolutifs : la mutation, la sélection naturelle, la dérive génétique et la migration (Wright 1931; Hartl and Clark 1997).

1.2 La diversité génétique et ses processus évolutifs

La diversité génétique est une mesure quantifiant l’ampleur de la variabilité génétique au sein d’une population (Hughes et al. 2008). C’est la source fondamentale de la biodiversité. La diversité génétique est le résultat de mutations, *i.e.* un changement génétique dû à la transformation d’un allèle donné en un autre allèle donné au cours de la duplication de l’ADN, qui pourront ensuite se propager dans les populations. La diversité génétique a des effets directs et indirects sur les propriétés écologiques des populations, des communautés et des écosystèmes (**Figure 2**).

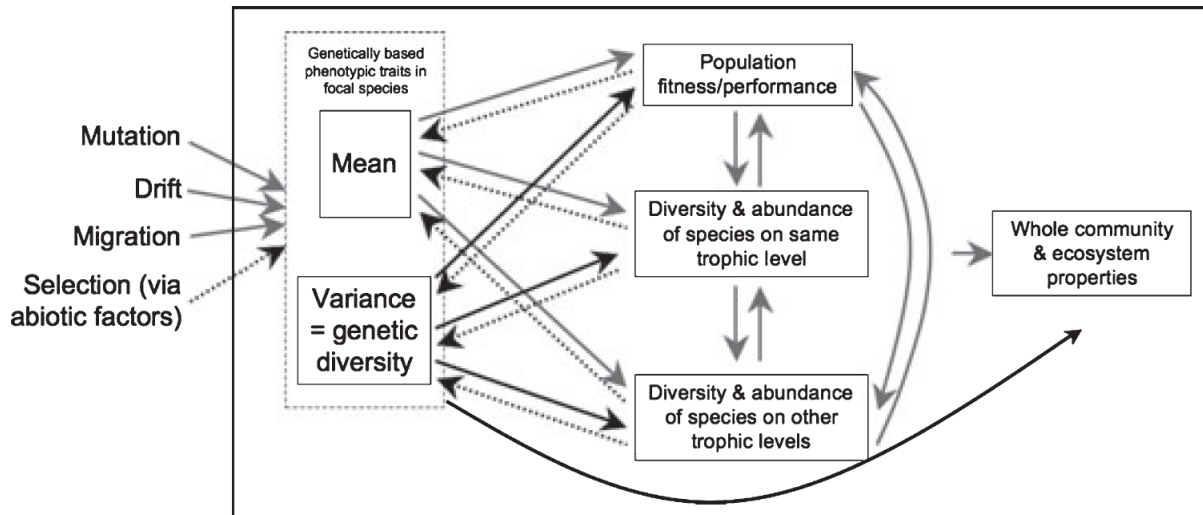


Figure 2. Différents processus montrant les effets directs et indirects de la diversité génétique sur les propriétés écologiques des populations, des communautés et des écosystèmes. Les lignes noires indiquent les conséquences écologiques directes de la diversité génétique, les lignes noires en pointillées indiquent les effets de la sélection naturelle qui dépendent de la diversité génétique, et les lignes grises représentent les effets indirectement liés à la diversité génétique (d'après Hughes et al. 2008).

Ces mutations sont spontanées et permanentes dans la séquence du génome d'un organisme. De plus, elles sont héréditaires. Les taux de mutations varient entre les espèces et sont considérés comme étant lents (de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-6} mutations par gène par génération). Les mutations peuvent être délétères, neutres ou avantageuses. Alors que les mutations neutres sont conservées ou éliminées aléatoirement, les mutations délétères ou avantageuses vont être soit éliminées, soit fixées par la sélection naturelle. Le processus de sélection naturelle induit le maintien des individus les plus aptes à survivre ou à se reproduire, quelle que soit la raison pour laquelle ils possèdent une telle aptitude. La sélection naturelle est une force majeure de l'évolution car elle peut affecter un ou plusieurs loci en même temps avec différents effets sur chacun. Plusieurs types de sélection existent : 1) directionnelle, lorsqu'un phénotype présente un avantage évolutif, 2) balancée, si plusieurs phénotypes optimaux sont possibles, 3) stabilisatrice, si elle élimine les mutations extrêmes comme celles diminuant le succès reproducteur. Le processus de dérive génétique, quant à lui, correspond à une fluctuation aléatoire des fréquences alléliques d'une génération à l'autre. Cette dérive est plus prononcée dans les populations où la taille efficace (nombre d'individus participant « efficacement » à la génération suivante) est petite, soit quand les allèles de faible fréquence ont plus de chance d'être perdus. La dérive génétique réduit la valeur adaptative des individus présents dans les populations impactées par ce processus (e.g. succès reproducteur diminué, risque de maladies

augmenté, consanguinité) et limite le potentiel évolutif de ces populations à évoluer par sélection naturelle. Ces deux processus (sélection naturelle et dérive génétique) accentuent la différenciation des populations en fixant, aléatoirement ou non, des allèles. À l’opposé, le processus de migration, qui correspond au déplacement d’un ou de plusieurs individus entre différentes populations, va apporter de nouveaux allèles au sein des populations recevant des migrants. La migration peut être forte et ainsi limiter la divergence génétique pour *in fine* homogénéiser génétiquement les populations entre elles (Hartl and Clark 1997).

Ces différents processus peuvent être combinés ou bien se succéder et surtout impacter toutes les espèces vivantes. Par exemple, la combinaison de la dérive génétique et de la sélection naturelle sur une espèce va entraîner un plus grand phénomène, appelé spéciation.

Un exemple important de spéciation est celui qui a induit l’apparition de nombreuses espèces de cétacés. Les importants changements de température des océans ainsi que la transgression de l’équateur sont les raisons de cette spéciation, car ils ont induit des fragmentations des zones d’alimentation (Davies 1963; Pastene et al. 2007). Les cétacés ont donc évolué de manières différentes entre les deux hémisphères. On retrouve de chaque côté de l’équateur des espèces de cétacés qui présentent des distributions et des morphes similaires. Ces espèces auraient évolué de la même manière mais de façon discontinue de chaque côté de l’équateur. C’est notamment le cas pour la baleine de Minke qui a vu son espèce se différencier en deux espèces : le petit Rorqual de l’Atlantique Nord, *Balaenoptera acutorostrata* et le petit Rorqual de l’Antarctique, *Balaenoptera bonaerensis*. Cette différenciation a eu lieu après le Pliocène quand les températures ont diminué et qu’un gradient de température pôle-équateur s’est reformé fragmentant ainsi la zone d’alimentation (Pastene et al. 2007). Cette spéciation correspond à une spéciation allopatrique. Cependant, plusieurs modèles de spéciation existent.

2. Diversification

2.1 Spéciation

Le processus de spéciation consiste en l’accumulation de mutations empêchant la reproduction ou la production de descendants viables et/ou féconds. Il aboutit à la perte de la capacité à se reproduire de deux populations auparavant interfécondes. Les processus évolutifs favorisant la spéciation vont donc augmenter la divergence génétique inter-populationnelles et diminuer le polymorphisme intra-populationnel (Gavrilets 2003). Il existe plusieurs modèles de

spéciation, dont trois principaux : la spéciation allopatrique, parapatrique et sympatrique (**Figure 3**).

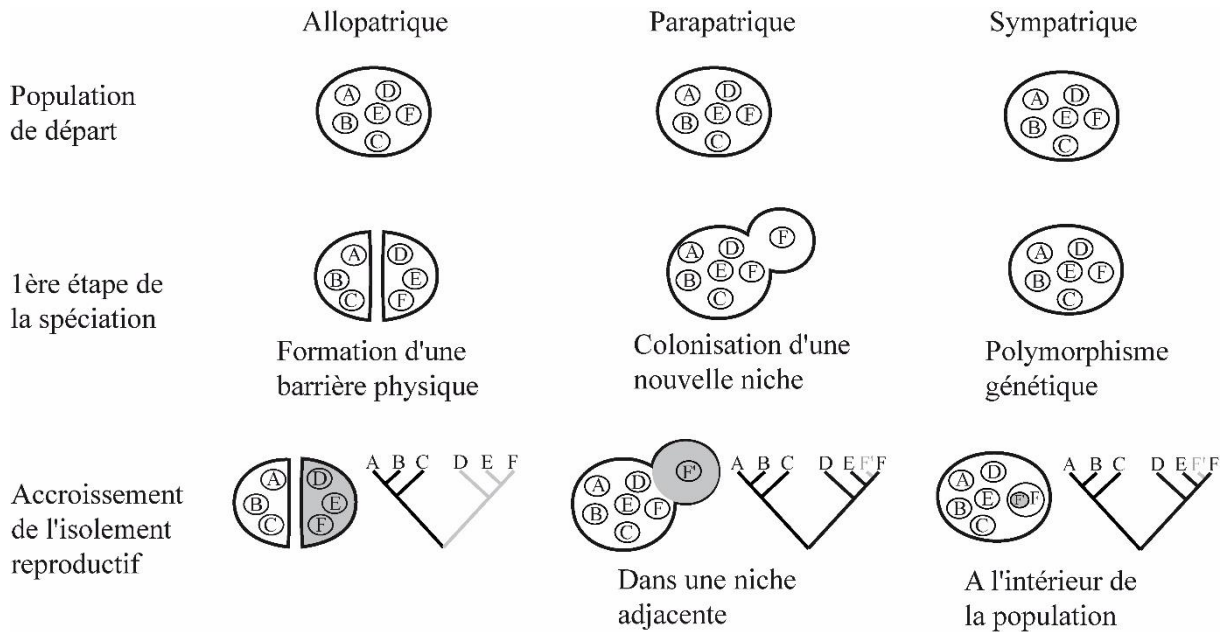


Figure 3. Représentation graphique des trois principaux modes de spéciation et des arbres génétiques correspondants (d'après Harrison 1991).

La spéciation allopatrique est une spéciation biogéographique, c'est-à-dire qu'une barrière extrinsèque (de nature non génétique) apparaît au sein d'une population la scindant en deux parties et empêchant les flux de gènes (Mayr 1978). La nature et la fréquence des génotypes présents dans chacune des deux parties différeront. C'est pourquoi après un certain temps, ce modèle va induire la formation de deux nouvelles espèces. Le temps nécessaire dépendra de la présence ou non d'évènements de migration et de leur fréquence, car ce processus freinera la divergence génétique. Ce phénomène de spéciation allopatrique peut intervenir à différentes échelles spatiales, suivant les aires de répartition des espèces.

La spéciation sympatrique est une spéciation locale, c'est-à-dire qu'une nouvelle lignée va se former au sein de l'habitat de l'espèce/lignée d'origine (Smith 1966). Théoriquement ces deux lignées peuvent se reproduire entre elles puisqu'elles continuent de cohabiter, par conséquent un flux de gènes persiste au cours des premières étapes de divergence (Harrison 1991). L'obtention de deux espèces différentes peut se produire si cette spéciation

s'accompagne d'autres facteurs comme le choix d'un nouvel habitat, d'une nouvelle source de nourriture et/ou le choix de partenaires sexuels préférentiel (Smith 1966).

La spéciation parapatrique est une spéciation intermédiaire entre allopatrique et sympatrique, c'est-à-dire que les habitats seront contigus mais non chevauchants et sans reproduction entre les deux espèces (Mayr 1978).

2.2 Biogéographie

Au cours des deux derniers siècles, l'Homme a accumulé un grand nombre de données sur la faune et la flore qui l'entoure et s'est rendu compte que les organismes vivants présentaient une distribution particulière à la surface de la Terre. Ces distributions ont majoritairement été guidées par les caractéristiques de l'environnement (océan, montagne, ...). Le concept de biogéographie est ainsi apparu. Il correspond à l'étude des organismes vivants dans l'espace et le temps (Cox and Moore 2000), afin d'expliquer quels ont été les événements passés et présents qui ont amené aux distributions actuelles. Le premier événement qui a conduit à une disparité puis une différenciation des espèces est le mouvement des plaques tectoniques, depuis la Pangée jusqu'à nos jours.

Un exemple flagrant de biogéographie due au mouvement des plaques tectoniques concerne les mammifères. Une étude réalisée en 2000 a revu l'ensemble de l'Histoire biogéographique des mammifères (Cox 2000). À l'époque de la Pangée, un seul continent abritait l'ensemble des mammifères vivants. Par la suite, les espèces se sont dispersées et ont divergé en fonction de l'apparition des continents. Le mouvement des plaques combiné aux fluctuations climatiques et aux mouvements des animaux ont conduit à la description de six régions zoo-géographiques (Néarctique, Néotropical, Africaine, Paléarctique, Orientale et Australienne) possédant chacune leur faune spécifique.

L'évolution et le développement d'un grand nombre de marqueurs moléculaires ont apporté de nouvelles approches et méthodes pour étudier la phylogéographie, *i.e.* la biogéographie sur laquelle on calque les processus évolutifs sous-jacents (Parker and Jorgensen 2003; Rigg 2003).

Ces marqueurs moléculaires ont été très utiles notamment pour l'étude des poissons d'eau douce des États-Unis où aucune différence morphologique n'était présente, tels que le poisson-castor (*Amia calva* Linnaeus, 1766) et les Centrarchidae. Une première étude portant

sur le poisson-castor présent à l'Est des États-Unis (Bermingham and Avise 1986) a montré qu'il y avait une considérable variation et différenciation génétique au sein de l'espèce, via l'ADNmt. Mais aussi, que les génotypes n'étaient pas distribués de manière aléatoire au sein des différentes rivières du fait d'une coupure géographique nette entre les rivières des bassins versants Est et Ouest de la région. Ces résultats ont été validés par l'obtention de résultats identiques chez une dizaine d'autres espèces de poissons (Bermingham and Avise 1986; Avise and Hamrick 2001). La barrière géographique se situant à l'Ouest de la péninsule Floridienne.

Ces phénomènes de changements géographiques passés et présents ne sont pas limités au monde terrestre, et ont également touchés les espèces marines. C'est notamment le cas pour les cétacés et plus précisément pour le Rorqual commun *Balaenoptera physalus* (Linnaeus, 1758), comme nous allons le voir par la suite.

Afin d'étudier tout cela, un grand nombre de marqueurs moléculaires a été développé, que ce soit avec l'ADN mitochondrial (ADNmt) ou avec l'ADN nucléaire (ADNnu).

3. Les différents marqueurs

Les avantages et les inconvénients entre les différents marqueurs disponibles ont été largement étudiés et discutés (*e.g.* Sunnucks 2000; Wilson and Ferguson 2002). Nous pouvons distinguer globalement deux types de marqueurs, les marqueurs mitochondriaux et les marqueurs nucléaires, présents sur l'ADNmt et l'ADNnu, respectivement (**Figure 4**).

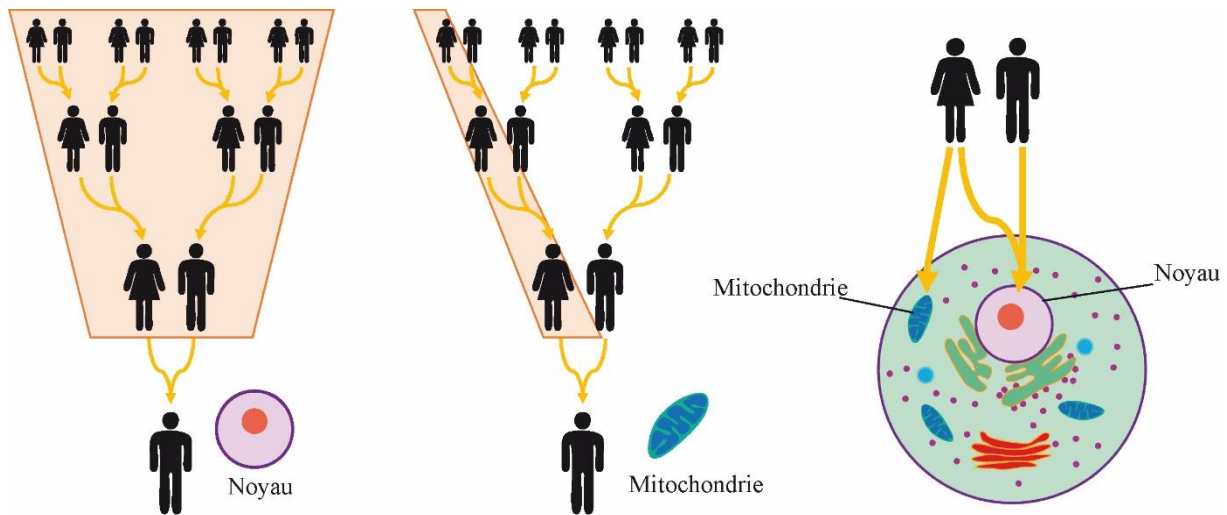


Figure 4. Schéma de l'hérédité nucléaire (à gauche) et de l'hérédité mitochondriale (au milieu). Les mitochondries ont une origine maternelle tandis que les gènes nucléaires sont biparentaux (à gauche ; d'après <http://evolution.berkeley.edu>).

3.1 Les marqueurs nucléaires

En ce qui concerne l'ADNnu, il a une hérédité biparentale (**Figure 4**), *i.e.* chaque parent transmet un allèle à sa descendance via les chromosomes. Il est linéaire et ouvert, possède deux brins et contient plus de 20 000 gènes. Les principaux marqueurs utilisés, notamment pour la génétique des populations, sont les microsatellites et les « single nucleotide polymorphisms » (SNPs). Un microsatellite correspond à une courte séquence nucléotidique composée d'un motif répété en tandem (en général di-, tri- ou tétranucléotides ; Weber and May 1989), avec des variations dans le nombre de copies qui permettent une distinction des allèles. Un grand nombre de marqueurs (> 20) permet l'identification unique et immuable des individus (Lamb et al. 2019). L'ensemble des allèles identifiés pour tous les marqueurs va constituer le génotype d'un individu. Ceci est possible car les microsatellites ont un taux de mutation encore plus élevé que l'ADNmt pour la plupart des espèces animales (Wilson et al. 1985; Vawter and Brown 1986). Les SNPs correspondent quant à eux à une variation d'une seule paire de bases, soit un seul nucléotide. Ils sont stables, abondants et distribués uniformément dans le génome. Cependant, il est nécessaire d'analyser plusieurs milliers de SNPs pour identifier un individu ou une population. Les marqueurs nucléaires sont particulièrement utilisés pour estimer les niveaux de consanguinité, les variations génétiques ou la structure des populations.

Les taux de mutation des marqueurs microsatellites sont plus élevés que dans d'autres régions du génome dû à la présence de simples répétitions de séquences (Li et al. 2002). Deux

mécanismes sont responsables des mutations dans les loci microsatellites : 1) le mauvais appariement des brins d'ADN lors de la réplication, 2) la recombinaison. Les taux de mutations des microsatellites ont généralement été estimés à 10^{-3} mutations par génération (Ellegren 2000). Plusieurs théories ont été développées pour définir le modèle d'évolution de ces marqueurs. Le modèle « pas à pas » (Stepwise Mutation Model, SMM) où chaque mutation va induire le gain ou la perte d'un seul motif de répétition avec des fréquences à peu près identiques (Valdes et al. 1993). Cependant, le mécanisme actuel de mutation des microsatellites semble plus compliqué que ce que propose le modèle SMM (Li et al. 2002; Anmarkrud et al. 2008). Le modèle de mutation par « allèles infinis » (Infinite Allele Model, IAM), où chaque mutation crée un nouvel allèle inexistant jusqu'alors dans la population par ajout ou suppression d'une ou plusieurs unités de répétition, ne semble pas non plus approprié. Deux autres modèles ont ensuite été proposés, le modèle à « deux phases » (Two Phase Model, TPM) qui est un modèle intermédiaire aux deux précédents, et le modèle par « pas généralisé » (Generalized Stepwise Mutation Model, GSM) qui est une version simplifiée du TPM. La plupart des études montrent que ces deux derniers modèles sont les plus réalistes pour modéliser les mutations des marqueurs microsatellites (voir Schlötterer (2000) et Ellegren (2000)), même s'il est maintenant admis qu'il existe beaucoup de variations selon les marqueurs et les espèces (Schlötterer 2000; Ellegren 2000).

3.2 Les marqueurs mitochondriaux

Les marqueurs mitochondriaux, et par conséquent l'ADN mitochondrial, ont une origine exclusivement maternelle (**Figure 4**). L'ADNmt est organisé de manière circulaire et fermée, possède deux brins, contient 37 gènes (composés de courtes séquences) et environ 93% de l'ADNmt est codant (Chinnery and Hudson 2013). Les principaux gènes utilisés pour étudier l'ADNmt sont la COI (cytochrome oxydase I), la COIII, le 12S et le cytochrome b. Un autre gène est largement utilisé, le D-loop, qui est un des seuls à ne pas être codant. De plus, il contient le site de départ de la réplication de l'ADNmt, c'est pourquoi on l'appelle aussi région de contrôle. L'utilisation d'un gène plutôt qu'un autre dépend de l'espèce étudiée, des données déjà existantes et de l'échelle temporelle à laquelle on travaille, le taux de mutation variant d'un gène à l'autre. L'identification de la séquence d'un gène va produire un barcode qui sera propre à l'espèce voire à une population.

L'ADNmt a largement été utilisé dans les études phylogéographiques, car il présente des taux de mutation relativement rapides (mais tout de même plus faibles que ceux des marqueurs microsatellites) et ne subit pas de recombinaisons entre loci (Avisé et al. 1987; Avisé 2000). L'ADNmt est très informatif et permet d'étudier la structure génétique des populations et leur histoire évolutive, mais aussi d'étudier les relations phylogénétiques entre espèces apparentées. L'ADNmt présente une taille efficace quatre fois plus réduite que celle du génome nucléaire (Lynch 1997), ce qui le rend plus sensible à la dérive génétique et aux goulots d'étranglement ou bottleneck (réduction temporaire de la taille de la population provoquant une perte de diversité génétique ; Birky et al. 1983). L'important taux de mutation de l'ADNmt peut être dû à plusieurs facteurs, comme 1) peu de contraintes fonctionnelles car l'ADN mitochondrial ne code que peu de polypeptides et ne produit pas de protéines directement impliquées dans sa réplication, transcription, ou traduction ; 2) le fait qu'il ne soit pas lié fortement aux histones, elles-mêmes conservatives et induisant des taux d'évolution contraints ; et 3) la création en continue de nouveaux allèles mitochondriaux (Rand 2001; Avisé 2009). Bien que semblant contre-intuitif du fait de la conservation de la structure des gènes mitochondriaux sur un temps évolutif long, la séquence nucléotidique mitochondriale évolue rapidement.

Les taux d'évolution étant variables selon les différentes parties d'une molécule, selon les différentes molécules, mais aussi selon les espèces, le choix du marqueur à étudier a une importance cruciale. Suivant le marqueur moléculaire choisi, les analyses de génétique des populations seront différentes, de même que les questions biologiques auxquelles on répondra. Toutes ces études sont complémentaires, et une fois que toutes les données de structure et démographique sont obtenues, le futur de la population peut être prédit.

4. Apport de la génétique dans la conservation

La génétique est un outil essentiel et efficace pour gérer des populations naturelles ou captives ainsi que pour les conserver (Gray 1996). Vrijenhoek (1994) et Hedrick (2005) ajoutent même que la génétique de conservation a le potentiel de « remettre en ordre les choses » en restaurant ce qui est possible plutôt que simplement préserver ce qui reste après les activités anthropiques. La conservation a pour but de protéger la diversité génétique qui a été produite par l'évolution de notre planète sur plus de 3.5 milliards d'années. La diversité génétique est désormais reconnue comme une forme de biodiversité par l'IUCN (Union Internationale pour

la Conservation de la Nature) nécessitant d'être conservée (McNeely et al. 1990). Les liens entre diversité génétique et conservation peuvent être à tous niveaux : gènes, individus, populations, espèces, genres, ... Pour conserver une espèce, il est nécessaire de prendre en compte tout un habitat et un environnement où développer des efforts de conservation, par risque de manquer un élément important dans la vie et/ou le développement de cette espèce. La protection de l'habitat et/ou de l'environnement d'une espèce permettra aussi de protéger les autres espèces environnantes. La dichotomie entre se focaliser sur une espèce et protéger un habitat/écosystème est toujours présente (Armsworth et al. 2007). De même, selon Hughes et al. (1997), il est plus important de protéger des populations génétiquement distinctes en voies d'extinction que des espèces en voies d'extinction. La conservation de plusieurs populations distinctes permet de maximiser le potentiel évolutif de l'espèce et de réduire son risque d'extinction à long terme. Il est plus facile d'agir sur des populations que sur l'espèce, en général il est trop tard quand l'espèce est en voie d'extinction pour agir.

De nombreux généticien-statisticiens ont développé des méthodes et des modèles pour étudier les populations à des fins de conservation. Ces méthodes et modèles permettent de définir les liens phylogénétiques entre les populations, de déterminer les paramètres démographiques, la structure, l'évolution de ces populations. Les paramètres démographiques tels que la survie des individus, la taille de la population, le succès reproducteur, la consanguinité ... sont de premières importances pour alerter sur la nécessité de mettre en place des plans de conservation des populations (Lacy 1988; Lande 1988). L'étude génétique d'une population permet d'estimer tous ces paramètres, via l'utilisation de différents marqueurs génétiques. Les 2 principaux niveaux de variation génétique qui sont étudiés en conservation sont : 1) les différences génétiques entre les individus au sein d'une population, et 2) les différences génétiques entre les populations au sein d'une espèce. Le premier niveau va surtout renseigner sur la structure démographique et l'évolution de la population, tandis que le deuxième niveau va informer sur les potentiels échanges génétiques entre les populations. Ces deux niveaux jouent donc des rôles importants et complémentaires en termes de conservation mais aussi dans la gestion des espèces. Par exemple, des analyses génétiques de baleines de Minke, *Balaenoptera acutorostrata* Lacépède, 1804, du Nord-Pacifique ont montré que 20 à 40% de la viande de baleines vendue dans les marchés Coréens et Japonais provenait d'une population de baleines protégée et génétiquement isolée présente en mer du Japon (Baker et al. 2000).

5. Le cas de la Mer Méditerranée

5.1 L'histoire de ce bassin

La Mer Méditerranée est un vestige de l'océan Téthys, présent il y a environ 200 millions d'années (**Figure 5a**), qui a séparé deux supercontinents : Laurasia au Nord et le Gondwana au Sud. Ensuite, vers 12-13 Ma, la communication avec l'Océan Indien a cessé (**Figure 5b**), rendant ainsi la Méditerranée semi-fermée avec un degré de fermeture estimé à 99% (Lejeusne et al. 2010). Durant le Miocène (5,6-5,3 Ma), la communication entre la Méditerranée et l'Atlantique s'est trouvée fermée à plusieurs occasions (**Figure 5c**), on appelle cette période la crise de salinité Messinienne. Ces ouvertures/fermetures ont fortement impacté la faune et la flore méditerranéenne en repeuplant la mer avec des espèces d'origine Atlantique mais aussi en asséchant fortement la mer, respectivement (Lejeusne et al. 2010). Cette histoire géologique a apporté un grand nombre de changements environnementaux conduisant à des processus de spéciation, et aboutissant à la création de nombreuses espèces endémiques de la Mer Méditerranée. Depuis la fin du Pléistocène jusqu'à nos jours, on considère que la Mer Méditerranée est semi-fermée (**Figure 5d**). Une variété de climats y cohabitent ensemble : froid, tempéré et subtropical (Bianchi and Morri 2000).

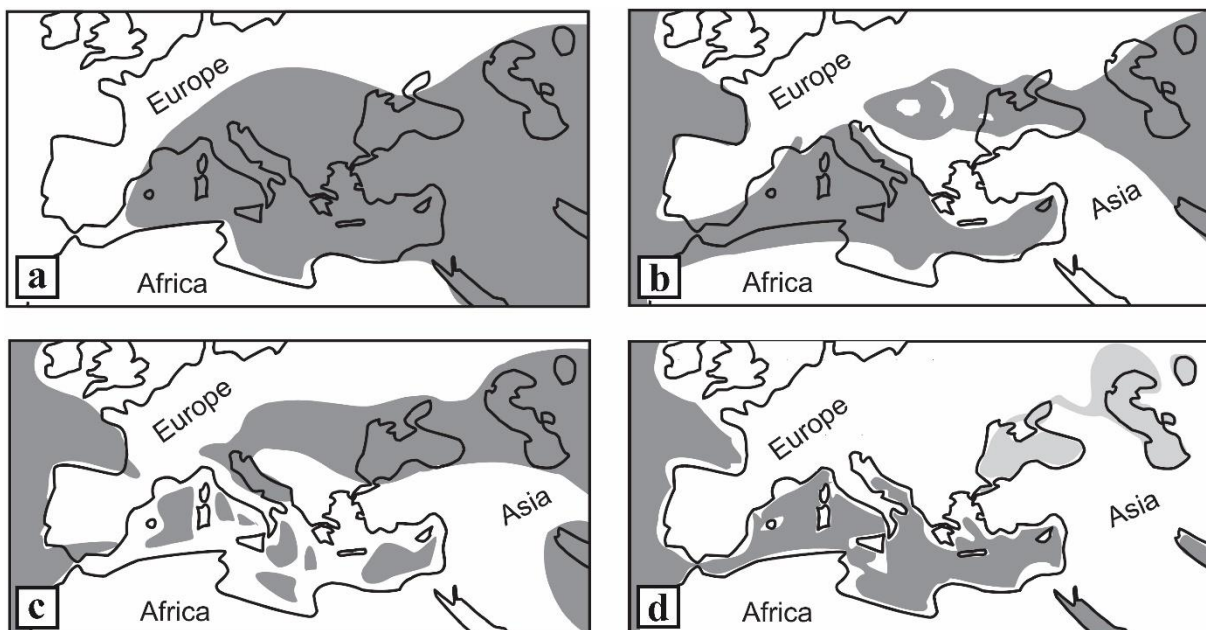


Figure 5. Principales étapes de l'évolution géologique de la Mer Méditerranée. En blanc : la terre, et en gris : la mer. (a) Triassic, 220-200 Ma ; (b) Début du Miocène, 12-13 Ma ; (c) fin du Miocène (crise Messinienne), 5-6 Ma ; (d) fin du Pléistocène, 20 000 y (d'après Bianchi and Morri 2000).

La Mer Méditerranée abrite 7% de la biodiversité marine mondiale, parmi laquelle un cinquième serait considéré comme endémique (Coll et al. 2010). De plus, la Méditerranée présente des caractéristiques géomorphologiques particulières, telles que des canyons sous-marins, des monts sous-marins, des volcans, des tranchées profondes, ... Cette diversité des conditions environnementales conduit à des écosystèmes très divers qui font de la Mer Méditerranée un des « hotspots » de biodiversité mondiaux (Myers et al. 2000). Cependant, elle fait aussi partie des régions les plus impactées par l'Homme et les plus peuplées (Halpern et al. 2008) avec une augmentation des menaces anthropiques qui impactent tous les niveaux de la biodiversité (Coll et al. 2010; Micheli et al. 2013) dont les cétacés. Notamment le trafic maritime qui est particulièrement intense et en croissance constante (Notarbartolo-Di-Sciara and Birkun 2010), le changement climatique (Lejeusne et al. 2010) et les invasions biologiques (Katsanevakis et al. 2013).

Les cétacés (baleines, dauphins et marsouins) sont des mammifères marins qui contribuent aux grands équilibres et au maintien de la biodiversité marine (Katona and Whitehead 1988). Ils jouent un rôle important en tant que prédateurs supérieurs (Bowen 1997) ou comme des sentinelles ou indicateurs de santé du milieu dans lequel ils se trouvent. Ils peuvent aussi être des espèces parapluies, dont la conservation sera d'autant plus cruciale qu'elle permettra la protection d'autres espèces (Moore 2008; Coll et al. 2010).

5.2 Les cétacés en Méditerranée

Historiquement, les cétacés sont culturellement et économiquement importants même en Méditerranée, que ce soit pour l'huile, les os, les dents et la viande. Au cours des 19^{ème} et 20^{ème} siècles, la chasse baleinière a drastiquement réduit la taille des populations de grands cétacés autour du globe (Palsbøll et al. 2013), sauf en Mer Méditerranée où seules deux expéditions ont eu lieu (Aguilar and Borrell 2007). La chasse baleinière s'arrêtant à Gibraltar, elle était concentrée sur le côté Atlantique du Déroit. Cette chasse a notamment décimé la population de Rorqual commun présente dans cette zone (Palsbøll et al. 2004).

Aujourd'hui, les cétacés de Méditerranée sont toujours importants mais pour des raisons différentes, pour leur contribution à l'état de santé d'un écosystème, mais aussi pour le tourisme qui est grandissant. Cependant, les activités humaines représentent toujours la plus grande menace pour les cétacés, qu'elles soient indirectes comme les pollutions sonores et chimiques, le changement climatique ou bien directes avec les collisions ou les captures accidentelles

(Harwood 2001). En particulier, les collisions avec les navires de commerce et les ferries sont la principale cause de mortalité d'origine anthropique pour le Rorqual commun (Panigada et al. 2006).

Les fortes activités anthropiques combinées à la présence d'un grand nombre d'espèces de cétacés ont conduit l'Italie, la France et la Principauté de Monaco à créer en 2002 le Sanctuaire Pélagos pour la protection des mammifères marins en Méditerranée. Ce sanctuaire est un espace maritime de 87 500 km² situé dans le bassin Corso-Liguro-Provençal. Ce sanctuaire représente environ 3% de la Méditerranée.

En Méditerranée, 21 espèces de cétacés ont été observées, et aucune n'est endémique de la zone (Reeves and Notarbartolo-Di-Sciara 2006). Cependant, dix espèces sont considérées comme résidentes (**Figure 6**), correspondantes à des sous-populations, et sont régulièrement observées : le Grand Dauphin *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821), le Dauphin bleu et blanc *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833), le Dauphin commun *Delphinus delphis* Linnaeus, 1758, le Dauphin de Risso *Grampus griseus* (G. Cuvier, 1812), le Dauphin à bec étroit *Steno bredanensis* (G. Cuvier in Lesson, 1828), le Globicéphale noir *Globicephala melas* (Traill, 1809), la Baleine à bec de Cuvier *Ziphius cavirostris* Cuvier, 1823, l'Orque *Orcinus orca* (Linnaeus, 1758), le Cachalot *Physeter macrocephalus* Linnaeus, 1758 et le Rorqual commun *Balaenoptera physalus* (Linnaeus, 1758) (Pace et al. 2015). En plus de ces espèces, trois sont considérées comme des visiteurs, sept comme des itinérants et une comme étrangère. La distribution de toutes ces espèces varie en fonction des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques des masses d'eau qu'elles utilisent.

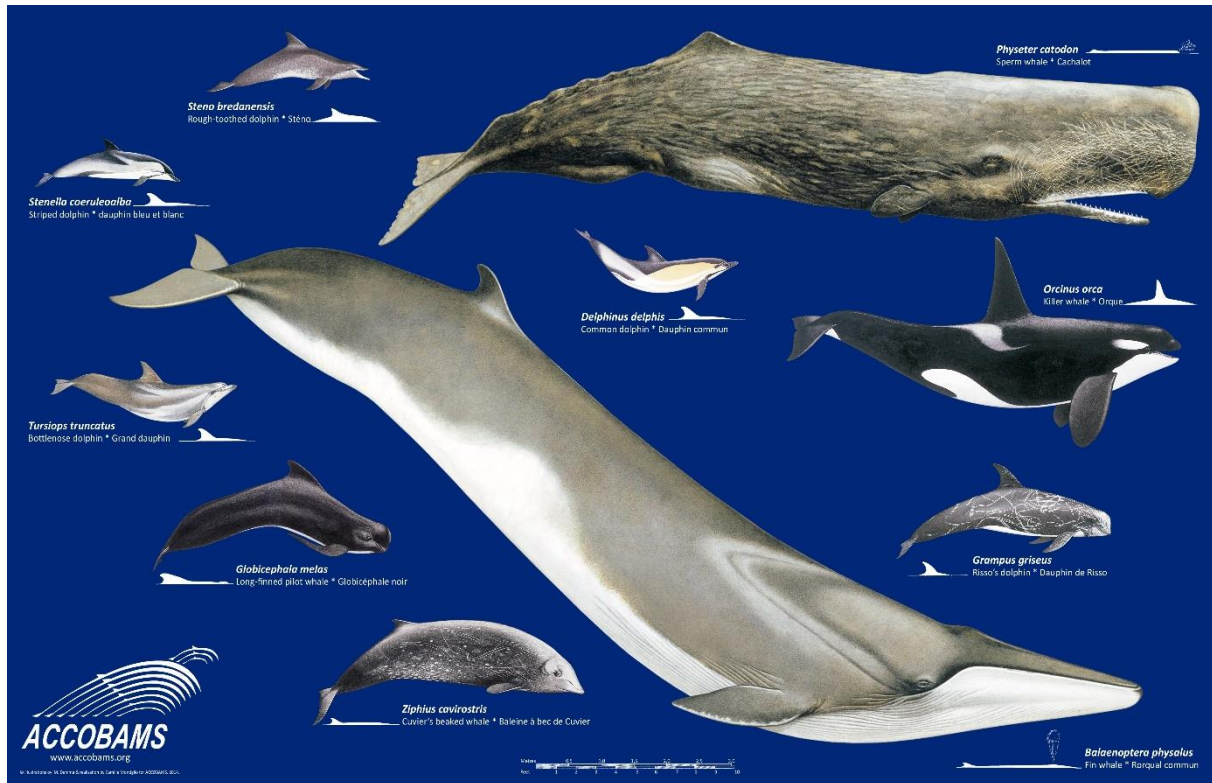


Figure 6. Les cétacés de la Mer Méditerranée (d'après ACCOBAMS, www.accobams.org).

6. Le Rorqual commun, *Balaenoptera physalus*

6.1 Son histoire évolutive

L'apparition des cétacés a, depuis toujours, intéressé un grand nombre de chercheurs. Cependant, elle reste source de débats. En ce qui concerne la radiation de l'ordre des cétacés en deux groupes, les Mysticètes (baleines à fanons) et les Odontocètes (baleines à dents), une étude a montré qu'elle aurait eu lieu il y a 30 à 35 millions d'années (Arnason et al. 2004). Par la suite, les Odontocètes ont divergé en quatre lignées distinctes (Physeteridae, Platanistidae, Ziphiidae et Delphinoidea), de même que les Mysticètes (Balaenidae, Neobalaenidae, Eschrichtiidae et Balaenopteridae). A l'heure actuelle, on estime le nombre d'espèces de cétacés à 86, mais ce nombre est en diminution car des espèces sont en voie d'extinction, comme le vaquita (marsouin du Golfe de Californie) et le dauphin de Chine.

Une étude s'est focalisée sur l'histoire démographique des baleines (Árnason et al. 2018), et a montré que toutes les espèces de baleines présentaient une diminution de la taille globale des populations après la transition du Plio-Pléistocène (2,6 Ma) jusqu'à nos jours. Cependant, il est nécessaire de descendre à une plus fine échelle spatiale, car chaque espèce de

baleines possède différentes populations qui en général sont propres à une zone géographique avec très peu d'échanges entre les zones. C'est notamment le cas pour le Rorqual commun.

Le Rorqual commun, *Balaenoptera physalus*, est la deuxième plus grande espèce sur Terre, après la baleine bleue *Balaenoptera musculus* (Linnaeus, 1758). Sa population mondiale a diminué de plus de 70% au cours des trois dernières générations (1927-2007, (Reilly et al. 2013). En 2018, sa population mondiale a été estimée à 100 000 individus (Cooke 2018), le classant comme « Vulnérable » auprès de la liste rouge des espèces menacées créée par l'IUCN. Deux études récentes ont montré que les populations présentes dans les Hémisphères Nord et Sud étaient génétiquement différentes, voire constituaient des sous-espèces, mais aussi qu'une différence existait entre les populations Nord Atlantique et Nord Pacifique (Archer et al. 2013, 2019). Certaines connexions des populations existent entre les 3 bassins (Nord Pacifique, Nord Atlantique et Hémisphère Sud) mais elles sont très complexes et leurs mises en évidence dépendent fortement de la taille d'échantillonnage (Cabrera et al. 2019).

Le comportement de reproduction du Rorqual commun est encore méconnu. Cependant, selon les informations collectées via des autopsies sur des échouages ou des individus chassés, leur comportement de reproduction se baserait sur la compétition entre mâles pour monopoliser les femelles et réduire la compétition de sperme (Lockyer 1984; Aguilar and García-Vernet 2018). Le cycle de reproduction est biennal, avec une reproduction pendant l'hiver, une mise bas d'un seul nouveau-né l'hiver suivant, et un allaitement jusqu'à la fin de l'été suivant (Mizroch et al. 1984). En moyenne, le Rorqual commun est mature sexuellement vers 8 ans (Aguilar and García-Vernet 2018) et a un temps de génération de 25,9 ans (Taylor et al. 2007a) (temps moyen entre deux générations consécutives ; chez l'Homme, il est en moyenne de 25 ans).

6.2 En Mer Méditerranée

Le Rorqual commun est présent dans toute la Mer Méditerranée, mais principalement de l'Espagne à la Mer Ionienne (**Figure 7**), avec une occurrence variable en fonction de la zone (Notarbartolo-di-Sciara et al. 2003). En été, il est plus abondant dans la partie Nord-Ouest de la Méditerranée, plus précisément dans le bassin Corso-Liguro-Provençal et le Golfe du Lion, en raison des fortes densités de krill, *Meganyctiphanes norvegica* (M. Sars, 1857), sa proie principale (Notarbartolo-di-Sciara et al. 2003; Druon et al. 2012). Quelques mouvements d'individus ont été observés à travers le Déroit de Gibraltar à différentes périodes de l'année,

que ce soit via des observations visuelles ou bien de la télémétrie satellitaire (Bentaleb et al. 2011; Gauffier et al. 2018). Cependant, malgré ces mouvements, le flux de gènes entre la population méditerranéenne et la population voisine de l'Atlantique est limité (Bérubé et al. 1998; Palsbøll et al. 2004). En effet, différentes études basées sur de la génétique, de l'acoustique, des isotopes stables et de la télémétrie ont suggéré que la population méditerranéenne était isolée et résidente (Bérubé et al. 1998; Bentaleb et al. 2011; Castellote et al. 2012; Panigada et al. 2017).

Au début du 20^{ième} siècle, la taille de la population méditerranéenne de Rorqual commun a diminué et les migrations entre l'Atlantique et la Méditerranée ont été réduites, en raison de la chasse baleinière (Sanpera and Aguilar 1992). Au sein de la Méditerranée, différentes estimations de taille de la population ont été réalisées, dans le bassin Ouest, elle a été estimée à 3 583 individus (Forcada et al. 1996) et à 1 800 individus dans la partie Nord de ce bassin (Notarbartolo-di-Sciara et al. 2003). Une récente étude (ACCOBAMS 2021), couvrant 77% de la Méditerranée, a estimé la population entre 2 000 et 13 000 individus (suivant si les données étaient récoltées via des survols aériens ou via des bateaux). Cependant les tendances au fil des années de l'abondance du Rorqual commun restent inconnues, de même que la structuration de cette population méditerranéenne.

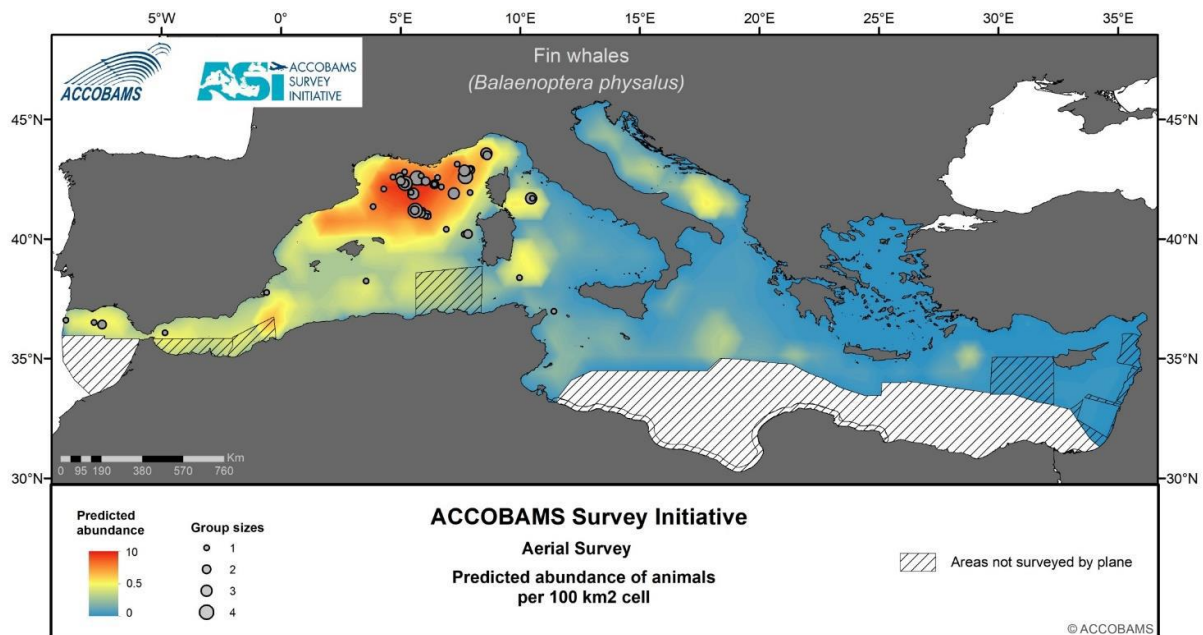


Figure 7. Distribution potentielle du Rorqual commun en Méditerranée (ACCOBAMS 2021).

7. Problématiques

Au vu des recherches passées et des connaissances acquises, une étude approfondie de la population méditerranéenne de Rorqual commun était nécessaire, étant donné sa vulnérabilité. L'objectif principal de cette thèse est donc d'améliorer nos connaissances sur cette population et plus généralement sur l'espèce. La zone d'étude de cette thèse couvre la partie Nord-Ouest du bassin occidental de la Méditerranée. Cette zone est privilégiée par le Rorqual commun pour s'alimenter en période estivale. Afin de répondre au mieux aux questions mises en exergue, une grande base de données était à disposition : ~15 ans de missions en mer, ~1 200 observations de Rorqual commun, ~700 échantillons de peau, ~650 individus photo-identifiés.

Le **chapitre 2** de cette étude correspond à une partie méthodologique avec le développement de marqueurs génétiques nécessaires à l'étude de la population. La caractérisation de nouveaux marqueurs nucléaires (hérédité biparentale) va venir compléter le nombre de marqueurs existants, nombre qui était insuffisant pour établir la fiche identité de chaque individu et les liens de parenté. Une caractérisation haplotypique de chaque individu a également été réalisée afin de servir de base de données pour des analyses approfondies. Le chapitre 2 est présenté sous la forme de deux articles scientifiques, le premier est publié dans la revue *Molecular Biology Reports*, tandis que le deuxième est soumis pour publication dans la revue *Marine Biodiversity*.

Le **chapitre 3** se penche sur une révision et une actualisation de la taille de la population de Rorqual commun en Méditerranée ainsi que sur une caractérisation de tendance passée. Il s'attache à répondre aux questions de recherche suivantes :

Quelle est la taille actuelle de la population de Rorqual commun présente en Méditerranée Nord-Occidentale ? Comment a-t-elle évolué depuis les dernières estimations ? Le chapitre 3 est présenté sous la forme d'un article scientifique soumis pour publication dans la revue *Marine Ecology*.

Le **chapitre 4** se focalise sur la taille efficace de cette population, qui est un paramètre important pour déterminer l'état de santé génétique d'une population. Des marqueurs nucléaires ont été utilisés afin d'estimer la taille efficace actuelle. De plus, une reconstruction de l'évolution de cette taille au fil des siècles a pu être réalisée via l'étude d'un marqueur mitochondrial. Ce chapitre s'attache à répondre aux questions de recherche suivantes :

Quelle est la taille efficace de la population de Rorqual commun de Méditerranée ? Quelle a été l'évolution de la population de Rorqual commun pendant les dernières centaines de milliers d'années ? Le chapitre 4 est présenté sous la forme d'un article scientifique soumis pour publication dans la revue *Molecular Ecology*.

Le **chapitre 5** vise à étudier la structuration génétique de la population méditerranéenne de Rorqual commun, à déterminer les liens de parenté entre les individus échantillonnés, mais aussi à caractériser si la population a souffert ou non de dépression de consanguinité. Pour réaliser cela, une utilisation poussée des marqueurs microsatellites développés au cours de cette thèse a été nécessaire. Ce chapitre permet d'adresser les questions suivantes :

Comment la population méditerranéenne du Rorqual commun est structurée ? Quelles sont les relations interindividuelles au fil des générations ? Le chapitre 5 est présenté sous la forme de deux articles scientifiques, un premier est soumis pour publication dans la revue *Scientific Reports*, et le second est soumis pour publication dans la revue *Current Biology*.

Enfin, le **chapitre 6** dresse le bilan des connaissances acquises lors de ce travail de thèse sur l'étude de la population de Rorqual commun en Méditerranée, avec ses potentielles implications en terme de conservation de l'espèce. Le chapitre 6 apporte une discussion entre la population méditerranéenne de Rorqual commun et d'autres espèces de cétacés méditerranéens et/ou d'autres populations de Rorqual commun.



Chapitre 2

Identification et caractérisation de marqueurs génétiques

Published: Tardy, C., Planes, S., Jung, J. L., Ody, D., Boissin, E. (2020). Characterization of 25 new microsatellite markers for the fin whale (*Balaenoptera physalus*) and cross-species amplification in other cetaceans. *Molecular Biology Reports*, 47(9), 6983-6996.

Submitted in Marine Biodiversity: Tardy, C., Boissin, E., Ody, D., Planes, S. New insight into genetic structure and haplotype diversity of the fin whale, *Balaenoptera physalus*, from the Mediterranean Sea

1. Introduction

La première partie des résultats de cette thèse est consacrée à la caractérisation de 25 nouveaux marqueurs microsatellites ainsi qu'à l'identification de six nouveaux haplotypes pour le Rorqual commun, *Balaenoptera physalus*. Cette partie est en quelque sorte méthodologique mais elle est déterminante pour la suite des analyses réalisées lors des différents chapitres de cette thèse.

La nécessité de développer des nouveaux marqueurs nous est apparue suite à différentes recherches bibliographiques. Le nombre de marqueurs existant n'était pas assez élevé pour avoir une identification et une reconnaissance génétique robuste des individus. De plus, des chercheurs ont recommandé d'utiliser un minimum de 20 marqueurs pour la suite des analyses. Tester ces nouveaux marqueurs sur différentes espèces étaient pour nous une évidence, afin d'informer d'autres chercheurs de leur possible transposabilité à d'autres espèces. Ceci permettra dans le futur de comparer différentes populations et/ou différentes espèces.

La deuxième partie de ce chapitre sert à identifier les haplotypes de chaque individu et à caractériser leur distribution au sein de la population Méditerranéenne de Rorqual commun. Ces haplotypes permettent également d'estimer l'isolement de cette population par comparaison avec les autres populations (à partir des données en libre accès sur GenBank).

En résumé, cette étude vise à répondre principalement à quatre questions : 1) Est-ce que les marqueurs microsatellites développés sont assez informatifs pour étudier la population ? 2) Ces marqueurs peuvent-ils être utiles pour étudier d'autres espèces de cétacés ? 3) Est-ce que la population Méditerranéenne de Rorqual commun présente des haplotypes privés ? 4) Comment cette population est-elle mitochondrialement structurée par rapport aux autres populations mondiales ?

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet de deux articles, un est publié dans la revue internationale *Molecular Biology Reports* (2019 impact factor : 1.402), l'autre est soumis dans *Marine Biodiversity*.

Tardy, C., Planes, S., Jung, J. L., Ody, D., Boissin, E. (2020). Characterization of 25 new microsatellite markers for the fin whale (*Balaenoptera physalus*) and cross-species amplification in other cetaceans. *Molecular Biology Reports*, 47(9), 6983-6996.

Tardy, C., Boissin, E., Ody, D., Planes, S. New insight into genetic structure and haplotype diversity of the fin whale, *Balaenoptera physalus*, from the Mediterranean Sea.

2. Article 1 : Les marqueurs microsatellites

Characterization of 25 new microsatellite markers for the fin whale (*Balaenoptera physalus*) and cross-species amplification in other cetaceans

Céline Tardy^{1,2*}, Serge Planes^{2,3}, Jean-Luc Jung⁴, Denis Ody¹, Emilie Boissin^{2,3}

¹ WWF-France, Paris, France

² PSL Research University: EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, 66860 Perpignan, France

³ Laboratoire d'Excellence "CORAIL", Perpignan, France

⁴ Univ Brest, Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Sorbonne Université, ISYEB, 29200 Brest, France

* Corresponding author: celine.tardy63@gmail.com

Received: 1 April 2020 / Accepted: 28 August 2020 / Published online: 6 September 2020

Keywords: Microsatellite, Genetic diversity, Fin-whale, Cross-species transfer, Northwestern Mediterranean Sea

2.1 Abstract

Cetaceans are large mammals widely distributed on Earth. The fin whale, *Balaenoptera physalus*, is the second largest living animal. In the 20th century, commercial whaling reduced its global population by 70%, and in the Mediterranean Sea not only was their overall population depleted but the migration between the Mediterranean Sea and the Atlantic Ocean was reduced. Previous genetic studies identified isolation between these two regions, with a limited gene-flow between these adjacent populations based on nuclear and mitochondrial markers. However, only limited information exists for the Mediterranean population as genetic diversity and abundance trends are still unknown. In this study, 39 highly polymorphic microsatellite markers were tested, including 25 markers developed *de novo* together with 14 markers previously published. An average allelic diversity of 8.3 alleles per locus was reported, ranging from 3 to 15 alleles per locus, for *B. physalus*. Expected heterozygosity was variable among loci and ranged from 0.34 to 0.91. Only two markers in the new set were significantly deviant from the Hardy Weinberg equilibrium. Cross-species amplification was tested in four other cetacean species. A total of 27 markers were successfully amplified in the four species (*Balaenoptera acutorostrata*, *Megaptera novaeangliae*, *Physeter macrocephalus* and *Globicephala melas*). A multivariate analysis on the multilocus genotypes successfully discriminated the five species. This new set of microsatellite markers will not only provide a useful tool to identify and understand the genetic diversity and the evolution of the *B. physalus* population, but it will also be relevant for other cetacean species, and will allow further parentage analyses. Eventually, this new set of microsatellite markers will provide critical data that will shed light on important biological data within a conservation perspective.

2.2 Introduction

Cetaceans are large mammals that are widely distributed throughout the world. All species are impacted by human activities (bycatch, overexploitation of prey resources, ship-strikes, noise and chemical pollution; (Harwood 2001). Commercial whaling dramatically reduced the population of the fin whale, *Balaenoptera physalus* (Linnaeus 1758) by over 70% during the 20th century (Brownell and Yablokov 2009). In 2018, global abundance was roughly estimated at 100 000 individuals (Cooke 2018) and *B. physalus* remains vulnerable on the IUCN Red List of Threatened Species. However, increases in local population sizes have been recorded for several populations since an international moratorium on commercial whaling was implemented in 1982 (Cooke 2018).

At the beginning of the 20th century, the Mediterranean population was depleted and migrations between the Atlantic and the Mediterranean were reduced, due to whaling (Sanpera and Aguilar 1992). Within the Mediterranean, different local estimations of abundance were made; in the western basin: 3 583 individuals (Forcada et al. 1996) and in the northern part of this basin: 1 800 individuals (Notarbartolo-di-Sciara et al. 2003). Abundance trends of *B. physalus* in the Mediterranean Sea are still unknown. Previous genetic analyses have suggested a genetic isolation of the Mediterranean *B. physalus* population, with a limited gene-flow with the adjacent Atlantic population (Bérubé et al. 1998). To better understand and protect the *B. physalus* population, different parameters (e.g. abundance, effective size, gene-flow, etc.) are required and some should be updated. To do this, genetic markers, such as microsatellite markers, are useful as they enable changes in genetic diversity to be identified and for the structure of natural populations to be studied (Weber and May 1989). Furthermore, a large number of markers (> 20) allow for the identification of individuals, by producing a unique and immutable identification tag for each organism (Lamb et al. 2019). Through the identification of individuals, the study of both connectivity and the parentage link between groups of individuals is possible, and in turn, the protection of the population may be enhanced.

Microsatellite markers have been widely used since the 1990s (Weber and May 1989). Microsatellites consist of short nucleotide tandem repeats with DNA sequences that are highly variable in length (Weber and May 1989) and commonly dispersed throughout the eukaryotic nuclear genome. Microsatellite length determination generally relies on the design of a PCR-primer pair flanking the variable repeat, and is therefore often species-specific. This method is costly and time-consuming, and for these reasons, testing the transferability to related species is important and is of great interest for further study. The cross-species transferability of

microsatellites is unevenly distributed across taxa. For example, microsatellites are more conserved between humans and primates (Clisson et al. 2000), than between oyster species (Hedgecock et al. 2004). Mutations in the sequence of microsatellite markers are an important component of the variation between individuals and species (Crouau-Roy et al. 1996). Consequently, some markers may be polymorphic in one species but monomorphic in another (Crouau-Roy et al. 1996; Clisson et al. 2000). In *B. physalus*, some microsatellite markers were previously published (Valsecchi and Amos 1996; Palsbøll et al. 1997b; Bérubé et al. 1998, 2000, 2005), but were initially developed for the humpback whale, *Megaptera novaeangliae*. Less than ten specific markers have been developed for *B. physalus*, which is an insufficient number of markers for accurate population structure and parentage analyses.

The aim of this study was to develop *de novo* microsatellites for our target species, *B. physalus*, in order to extend the set of available markers for the study of the Mediterranean population during other biological and conservation studies. To take advantage of the time and cost associated with the creation of a new set of markers, we also tested the newly developed and previously published markers for cross-amplification in four other cetacean species.

2.3 Material and Methods

2.3.1 Biological samples

Fifty samples of our target species *B. physalus* were used in this study. For cross-species amplification, four cetaceans species were selected to test the transferability of microsatellite markers: four minke whales, *Balaenoptera acutorostrata*, three *M. novaeangliae*, ten sperm whales, *Physeter macrocephalus*, and ten long-finned pilot whales, *Globicephala melas*. Samples from *B. physalus*, *P. macrocephalus* and *G. melas* come from biopsy darts fired from a crossbow taken by the NGO WWF in the North-western part of Mediterranean Sea between 2006 and 2018. In the field, samples were stored in 70% ethanol. For *B. acutorostrata*, two samples come from specimens stranded along the Mauritanian coast in 2013 (CITES export permit no. 2014-001 and CITES import permit no. FR1402900008-1 provided by the designated authorities in Mauritania and France, respectively) and two others from whale meat (a steak and a sausage) bought in the fishmarket of Bergen (Norway) in July 2018. The samples of *M. novaeangliae* are biopsies taken by the NGO Cetamada near Sainte Marie Island in the North-eastern coast of Madagascar in 2013 (n=1) and 2016 (n=2).

2.3.2 DNA extraction and design of new microsatellite markers

Total genomic DNA was isolated from 12 *B. physalus* individuals using the Genra PureGene tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sent to GenoScreen molecular marker services (Lille, France) for microsatellite library preparation and sequencing. A total of 1 µg from an equimolar DNA pool of the 12 specimens was used for the development of Illumina TruSeq Nano library, sequenced on MiSeq platform with Nano v2 500 cycles chip. After de-multiplexing, the resulting paired-end reads quality was checked with FastQC v0.11.15 software. Then, the remaining data were subject to assembly/merging through Velvet v1.2.10 program. Finally, the assembly with the best remapping rate was analysed with the QDD v3.1 bioinformatics program (Megléczy et al. 2014). QDD is designed to deal with all steps of treatment of raw sequences until PCR primers are obtained: removal of adapters/vectors, detection of microsatellites, detection of redundancy/possible mobile element association, selection of sequences with target microsatellites and primer design by using BLAST, ClustalW and Primer3 programs. The default setting used for QDD were 200 bp flanking region length, sequence removal less than 80 bp, a minimum at 95% of pairwise identity between sequences of a contig, a minimum at 66% of sequences that must have the same base at a site to accept it as a consensus. The design of primer was determined with the following setting values: a minimum PCR product size at 90 bp and a maximum at 300 bp, a PCR product size interval for iterative primer design at 50 bp, an optimum length of a primer at 20 bp with a minimum at 18 bp and a maximum at 27 bp. Among 3 609 736 raw sequences, 82 283 merged sequences were obtained and 5 044 primer sets were designed. Based on this dataset, 33 primer pairs were selected, according to the repeat number (≥ 9), motif and PCR product size (≥ 100 bp), and tested. Additionally, 14 primer pairs previously published in (Valsecchi and Amos 1996; Palsbøll et al. 1997b; Bérubé et al. 1998, 2000, 2005) were also tested. Most of them were initially developed for *M. novaeangliae*. To identify redundant sequences, we ran the BLASTN algorithm with default values for the parameters (megablast with: word size: 28; match/mismatch scores: 1/-2; gap cost: linear; filter: low complexity regions; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Zhang et al. 2000) for each of the 33 new sequences for which suitable primers were designed and for the 14 previously published on the *B. physalus* genome assembly (Genbank accession number: GCA 008795845.1).

2.3.3 Molecular analysis

The newly developed loci together with those which were previously published (Valsecchi and Amos 1996; Palsbøll et al. 1997b; Bérubé et al. 1998, 2000, 2005) were genotyped in our target species and cross-tested in four other cetacean species to verify their transferability. For the characterisation of newly developed microsatellites, DNA was extracted from small tissue fragments ($< 0.5 \text{ cm}^3$) using the Genra PureGene tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany).

PCR amplifications were performed using Type-it Microsatellite PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) in 12.5 μL total volume reactions containing 4 μL Type-it Multiplex PCR Master Mix 2X (contains HotStarTaq[®] Plus DNA Polymerase, Type-it Microsatellite PCR Buffer with 6 mM MgCl_2 and dNTPs), 6 μL RNase-free water, 1 μL of primers (2 μM forward and reverse primers diluted in TE pH 8 buffer) and 1.5 μL of DNA template at 50 ng/ μL . Forward primers were labelled with a fluorescent dye (PET, NED, VIC or 6-FAM, Applied Biosystems). Amplifications were carried out as follows: 5 min at 95°C, followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, 1 min 30 s at optimal annealing temperature (53-63°C, depending on the locus), 30 s at 72°C and a final extension for 30 min at 60°C. All loci were combined in six multiplexes according to their size range and primer annealing temperature to perform PCR (Table 1). Each PCR product was run through 1.5% agarose gel and visualized using ethidium bromide to verify amplifications. PCR products were sent to GenoScreen (Lille, France) and allele sizes were assessed using an Applied Biosystems 3730 Sequencer. For accurate sizing, an internal size ladder (GeneScan 500 LIZ, Applied Biosystems) was used.

2.3.4 Data analysis

Allele sizes were scored and checked manually using GENEMAPPER software v.5 (Applied Biosystems). All ambiguous peak profiles were considered as missing data. Controls for the presence of null alleles, scoring errors and large allele dropout were performed with MICRO-CHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). Allele frequencies, total number of alleles (N_a) and private allele numbers (PA) were identified and estimated in GenAlEx v.6.503 (Peakall and Smouse 2012). Observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities were estimated for each locus using GENETIX v.4.05.2 (Belkhir et al. 2004). GENETIX was also used to identify the inbreeding coefficient (F_{IS}) and linkage disequilibrium (LD). Finally, a Principal

Coordinates Analysis (PCoA) was computed in GenALEX with pairwise population matrix unbiased genetic distances in order to explore genetic variance among individuals and species.

2.4 Results

2.4.1 Marker amplification on *B. physalus* samples

Of the 47 primer pairs (33 newly developed and 14 previously published) tested on *B. physalus* in this study, 32 successfully amplified (70%). For the fifteen markers that did not amplify, eight were newly developed and seven previously published (**Table 1**). Thus, half of the previously published markers amplified, among which six were initially developed for *M. novaeangliae* and one for *B. physalus* (**Table 1**). For the seven markers that did not amplify (**Table 1**), five were developed for *M. novaeangliae*, one for *P. macrocephalus* and one for *B. physalus*.

Table 1. Characterization of the 32 microsatellite markers used for this study on *Balaenoptera physalus* together with the seven loci also tested but that did not amplify. Ta: annealing temperature in degrees; N: number of samples; Na: number of alleles; PA: private alleles; H₀: observed heterozygosities; H_E: expected heterozygosities; F_{IS}: fixation index following Weir and Cockerham; *: indicates significant departures from Hardy-Weinberg Equilibrium (p<0.05); ‡: loci presenting null alleles; †: loci that did not amplify in this study. B.p.: *Balaenoptera physalus*, M.n.: *Megaptera novaeangliae*.

Locus	Primer sequence	Repeat motif	Source species	Ta (°C)	Size range (bp)	Genome coordinates	GenBank accession	Multiplex number	N	Na	PA	H ₀	H _E	F _{IS} (W&C)	Cross species amplification (success/total)
Bp451306	F: GGAAGAAGTCCTGGAGTGATGG R: GGGTTTGCAATGCAGGGATG	(AC) ₂₂	B.p.	53	244-264	29 362- 29 793	MT514926	1	50	10	5	0.7400	0.7424	0.013	4/4
Bp673257	F: CCTTCCTCCTCAAGAGATTGGG R: GCTGTACAACATGCAAAGAGGA	(AGAT) ₁₆	B.p.	53	173-197	423 381- 423 838	MT585351	1	50	7	0	0.7600	0.7918	0.050	4/4
Bp1125752	F: ACCTGAGGTACCCAGCGTTA R: AGAGCAACATCACATTTGTCCA	(AC) ₁₆	B.p.	53	120-134	519 907- 519 488	MT585352	1	50	7	4	0.7400	0.7162	-0.023	4/4
Bp1178841	F: GGCAGGAAGACATATAAATCAGCA R: CCCACTGCCTAGAAAGCCTT	(AC) ₁₈	B.p.	53	242-278	631 007- 631 464	MT585353	1	50	13	10	0.8800	0.8454	-0.031	4/4
Bp311392	F: AGAAGGGACAGTGAGAGGGA R: ACAGCCGAACCAGAGAATCG	(AC) ₁₄	B.p.	55	211-221	-	MT585354	2	50	6	2	0.6600	0.6998	0.067	4/4
Bp1229316	F: ATGCTAAGCTCCAGCCTTGC R: GGTGTGACTACGAACGTCTCA	(AGG) ₁₂	B.p.	55	153-165	316 754- 316 921	MT585355	2	50	4	1	0.5800	0.5670	-0.013	4/4
Bp989588	F: AGTTAGTTTCACTCTCCAGGG R: TGGTAACAGGAGAGTAAAGCAGA	(ATC) ₉	B.p.	55	262-271	264 038- 264 464	MT585356	2	50	3	0	0.5200	0.4864	-0.059	4/4
Bp740180	F: TATCACTCTTCAGCAGCGCA R: AAATGCTGCGGCTCTTAGGT	(AC) ₁₉	B.p.	57	160-194	-	MT585357	3	50	15	3	0.9184	0.9017	-0.008	4/4
Bp1446664	F: GGTAAGGGACGTCGACCAAC R: TGTGGATGCAGACTCAGCAG	(AC) ₁₃	B.p.	57	224-232	273 322- 273 745	MT585358	3	50	5	1	0.7400	0.6934	-0.057	4/4
Bp1043662	F: GGTGTAGCCACATTCTTGGA R: CAGGTTCACTGGGAATGTCTGA	(AGAT) ₁₁	B.p.	57	126-154	713 761- 714 188	MT585359	3	50	8	3	0.7600	0.7800	0.036	3/4
Bp1311471	F: GGTTTAGACTCCACGCTTCCA R: CAGCCATGTAGCCTTGGGAA	(AAC) ₉	B.p.	57	260-272	237 046- 237 471	MT585360	3	50	3	1	0.3400	0.3394	0.008	4/4
Bp958405	F: AGACTGTTGCGATTACAGCT R: ACAAGGAGGGTTTGCATGCT	(AC) ₁₇	B.p.	60	180-202	686 971- 687 410	MT585361	4	50	8	3	0.8000	0.8016	0.012	4/4
Bp1057120	F: GTTTGTGAAATTGTTCCCTTCTCA R: GCAACAAGCCCATGTACATATGG	(AC) ₂₀	B.p.	60	273-305	-	MT585362	4	50	11	2	0.8000	0.8548	0.074	4/4
Bp1357166	F: ACCACGCAGTTAACATATTCTGG R: ACAAAGAATGGTGTAGATTTATTGCT	(AC) ₁₇	B.p.	60	294-306	354 233- 354 826	MT585363	4	50	7	2	0.8600	0.7442	-0.146 *	4/4
Bp1069071	F: CAAGTTTCTCTTGTCTGGACCA R: CCTTTGGGAGCACAGTGGTT	(AC) ₁₅	B.p.	60	174-184	601 048- 601 473	MT585364	5	50	5	2	0.8400	0.7582	-0.098	4/4

GT271 ¹⁵	F: GCTCACACTGGTAATCTGTGG R: CCCTAGGAAGGATAGACATAG	(GT)	M.n.	62	112-128	202 383- 202 553	AF309694.1	-	-	-	-	-	-	-
GT575 ¹⁵	F: TATAAGTGAATACAAAGACCC R: ACCATCAACTGGAAGTCTTTC	(GT)	M.n.	60	140-154	1 178 324- 1 178 546	AF309698.1	-	-	-	-	-	-	-
GT142 ¹⁴	F: CTGAGTAATATCCACCATAC R: ATGGATAAAGAAGATGTGGGG	(GT)	B.p.	60	72-90	-	DQ151658.1	-	-	-	-	-	-	-

2.4.2 Genetic diversity of *B. physalus*

The thirty-two amplified loci were polymorphic (from three to fifteen alleles) and were kept for cross-species transferability tests. Twenty-three loci contained dinucleotide repeats, with the number of alleles ranging from three to fifteen (for a total of 202 alleles), four were trinucleotide repeats with number of alleles ranging from three to six (16 alleles in total), and five contained tetranucleotide repeats with five to fifteen alleles (42 alleles in total).

After analysis with MICROCHECKER, null alleles were detected in three loci (from our new set: Bp1430262, Bp747752, and Bp1003953). There was no evidence of scoring errors or large allele dropout in any other loci. Test for linkage disequilibrium revealed that 14% of the pairwise locus combinations were linked ($p < 0.05$), and distributed among all loci in *B. physalus*. The three loci with null alleles (Bp1430262, Bp747752 and Bp1003953) showed a significant probability of linkage disequilibrium (29%, 35% and 19% respectively). Due to null alleles and linkage disequilibrium, these loci were removed from further analyses in *B. physalus*.

The 29 polymorphic loci that showed no evidence of null alleles revealed distinct allele polymorphisms from three (Bp1311471) to fifteen alleles (Bp740180, GATA417, and GT122; **Table 1**) per locus, with an average of 8.3 alleles per locus. In total, for all loci, 240 alleles were detected in *B. physalus*. Expected heterozygosity (H_E) varied between 0.34 and 0.91 (mean \pm standard deviation values: 0.75 ± 0.13) whereas observed heterozygosity (H_0) ranged from 0.34 to 0.98 (mean \pm standard deviation values: 0.75 ± 0.13 ; **Table 1**). The inbreeding coefficient varied from -0.146 to 0.231, with three loci significantly deviant from the Hardy Weinberg equilibrium (HWE; loci TAA023, Bp1357166 and Bp779455) and with a significant probability of linkage disequilibrium too (13%, 13% and 23% respectively).

2.4.3 Cross-species amplification

All 32 loci were also tested for amplification in four other cetacean species (*M. novaeangliae*, *B. acutorostrata*, *P. macrocephalus* and *G. melas*; **Table 2**). The success of the amplification varied among species, and 27 loci were amplified with success in all four species. Cross-amplification revealed a variation in polymorphism depending on the locus and the species from one to nine alleles per locus. The lowest percentages of polymorphic loci were for *B. acutorostrata* and *G. melas* with 72% and 75%, respectively. Furthermore, the five species presented private alleles, with numbers ranging from one to thirteen. *Balaenoptera physalus*

presented a large number of private alleles, in total 105, with an average of 3.28 per locus. *Physeter macrocephalus* and *G. melas* revealed 39 and 31 private alleles, respectively; with an average of 1.22 and 0.97 private alleles per locus, while *M. novaeangliae* and *B. acutorostrata* showed 28 and 19 private alleles, respectively; with an average of 0.88 and 0.59 per locus. The number of private alleles was dependent on the locus. Loci Bp451306 and Bp1430262 allowed for the species to be distinguished, due to a large number of private alleles per species. Regarding the PCoA, the second axis separated the species into four groups (**Figure 8A**). *Balaenoptera physalus*, *P. macrocephalus* and *G. melas* were isolated whereas *M. novaeangliae* and *B. acutorostrata* were congregated. The third axis clearly divided the specimens into five groups (**Figure 8B**), corresponding to the five species. In contrast, the PCoA with the seven previously published microsatellite markers allowed odontocetes (*G. melas* and *P. macrocephalus*) to be differentiated from mysticetes (*M. novaeangliae*, *B. acutorostrata* and *B. physalus*), but did not allow differentiation between the three mysticete species (**Figure 8C-AD**). The addition of the new set of microsatellite markers thus provides a finer resolution and allows for all species to be differentiated.

Table 2. Results of the cross-species amplifications using the fin-whale loci. Size range is in base pairs. PA: private alleles

Locus		Common Minke Whale (<i>Balaenoptera acutorostrata</i>)	Humpback Whale (<i>Megaptera novaeangliae</i>)	Sperm Whale (<i>Physeter macrocephalus</i>)	Long-finned Pilot Whale (<i>Globicephala melas</i>)
Bp451306	N/Ntotal	4/4	3/3	10/10	10/10
	Size range	242	246-250	264-288	258-276
	No. of alleles	1	3	8	4
	No. of PA	1	1	6	1
Bp673257	N/Ntotal	3/4	3/3	9/10	10/10
	Size range	173-189	161-205	169-181	145
	No. of alleles	5	4	4	1
	No. of PA	0	2	1	1
Bp1125752	N/Ntotal	4/4	3/3	10/10	10/10
	Size range	136-142	114-120	122-124	112
	No. of alleles	2	2	2	1
	No. of PA	1	1	0	1
Bp1178841	N/Ntotal	3/4	3/3	10/10	10/10
	Size range	246	246-252	234-256	228-248
	No. of alleles	1	4	7	2
	No. of PA	0	0	4	1
Bp311392	N/Ntotal	4/4	2/3	9/10	8/10
	Size range	203-205	205-207	201-219	201-223
	No. of alleles	2	2	5	3
	No. of PA	1	1	0	0
Bp1229316	N/Ntotal	4/4	3/3	6/10	5/10
	Size range	150-156	156-159	159-162	144-165
	No. of alleles	2	2	2	4
	No. of PA	1	0	0	1
Bp989588	N/Ntotal	3/4	3/3	10/10	6/10
	Size range	280	271	262-271	256-271
	No. of alleles	1	1	2	3
	No. of PA	1	0	0	1
Bp740180	N/Ntotal	3/4	3/3	9/10	10/10
	Size range	168-188	172-184	172-192	158-166
	No. of alleles	6	5	9	3
	No. of PA	0	0	1	2
Bp1446664	N/Ntotal	3/4	3/3	10/10	5/10
	Size range	226-238	246-282	240-248	228-232
	No. of alleles	3	4	5	3
	No. of PA	1	2	3	0
Bp1043662	N/Ntotal	4/4	3/3	10/10	4/10
	Size range	130-138	162-178	126-134	126-150
	No. of alleles	2	3	3	4
	No. of PA	0	0	4	3
Bp1311471	N/Ntotal	4/4	3/3	9/10	10/10

	Size range	266	266-269	245-260	263
	No. of alleles	1	2	2	1
	No. of PA	0	0	1	1
Bp958405	N/Ntotal	3/4	3/3	10/10	10/10
	Size range	174-178	174-192	196-214	186-210
	No. of alleles	3	2	7	5
	No. of PA	2	0	3	1
Bp1057120	N/Ntotal	3/4	2/3	10/10	10/10
	Size range	285-287	273	291-307	277-289
	No. of alleles	2	1	8	2
	No. of PA	1	0	2	1
Bp1357166	N/Ntotal	3/4	3/3	10/10	10/10
	Size range	278	288-294	292-302	296-300
	No. of alleles	1	3	6	3
	No. of PA	1	2	1	0
Bp1069071	N/Ntotal	3/4	2/3	10/10	10/10
	Size range	174	178-182	166	204
	No. of alleles	1	2	1	1
	No. of PA	0	0	1	1
Bp531923	N/Ntotal	4/4	3/3	8/10	10/10
	Size range	220-240	222-236	220-230	212-246
	No. of alleles	4	4	5	6
	No. of PA	2	1	0	1
Bp999219	N/Ntotal	2/4	2/3	6/10	10/10
	Size range	271-283	263-265	255-285	275-283
	No. of alleles	3	2	5	3
	No. of PA	1	2	0	0
Bp779455	N/Ntotal	3/4	3/3	8/10	10/10
	Size range	182-198	168-172	182-194	164-202
	No. of alleles	5	3	4	8
	No. of PA	0	3	0	0
Bp1418059	N/Ntotal	3/4	2/3	10/10	10/10
	Size range	284-296	286-294	256	264
	No. of alleles	5	3	1	1
	No. of PA	0	0	1	1
Bp814420	N/Ntotal	1/4	2/3	10/10	10/10
	Size range	167-169	149-153	155-167	145-159
	No. of alleles	2	3	5	5
	No. of PA	1	0	2	0
Bp564742	N/Ntotal	2/4	3/3	6/10	10/10
	Size range	231-251	227-235	233-239	253-255
	No. of alleles	3	4	3	2
	No. of PA	0	1	1	0
Bp1047889	N/Ntotal	1/4	2/3	2/10	8/10
	Size range	275-277	263-277	265-271	273-295
	No. of alleles	2	4	3	3

	No. of PA	1	1	0	3
Bp1430262	N/Ntotal	3/4	3/3	10/10	10/10
	Size range	264-266	268-288	278-292	298-308
	No. of alleles	2	5	7	4
	No. of PA	2	1	2	4
Bp747752	N/Ntotal	4/4	2/3	2/10	6/10
	Size range	190	214-222	202-206	190-202
	No. of alleles	1	3	2	3
	No. of PA	0	2	0	0
Bp1003953	N/Ntotal	3/4	3/3	10/10	10/10
	Size range	168	184-186	162	176
	No. of alleles	1	2	1	1
	No. of PA	1	1	1	1
GATA098	N/Ntotal	4/4	3/3	5/10	10/10
	Size range	80-92	72-100	80-96	68
	No. of alleles	4	2	5	1
	No. of PA	0	1	0	1
GT011	N/Ntotal	3/4	3/3	10/10	10/10
	Size range	119-133	123-137	107-131	121-129
	No. of alleles	3	4	7	5
	No. of PA	0	1	1	0
EV37	N/Ntotal	3/4	3/3	10/10	10/10
	Size range	207-209	197-211	213-239	183-197
	No. of alleles	2	5	5	4
	No. of PA	0	0	4	3
GATA417	N/Ntotal	3/4	3/3	10/10	10/10
	Size range	184-240	180-228	168-184	104
	No. of alleles	4	5	3	1
	No. of PA	0	0	1	1
GT122	N/Ntotal	4/4	3/3	10/10	10/10
	Size range	134-140	128	126-138	122-152
	No. of alleles	4	1	5	4
	No. of PA	1	1	2	1
GT211	N/Ntotal	3/4	3/3	10/10	10/10
	Size range	195-203	201-207	187-201	183-187
	No. of alleles	4	2	4	3
	No. of PA	0	1	0	2
TAA023	N/Ntotal	4/4	2/3	3/10	6/10
	Size range	87	81	87-150	81-96
	No. of alleles	1	1	5	3
	No. of PA	0	0	1	0

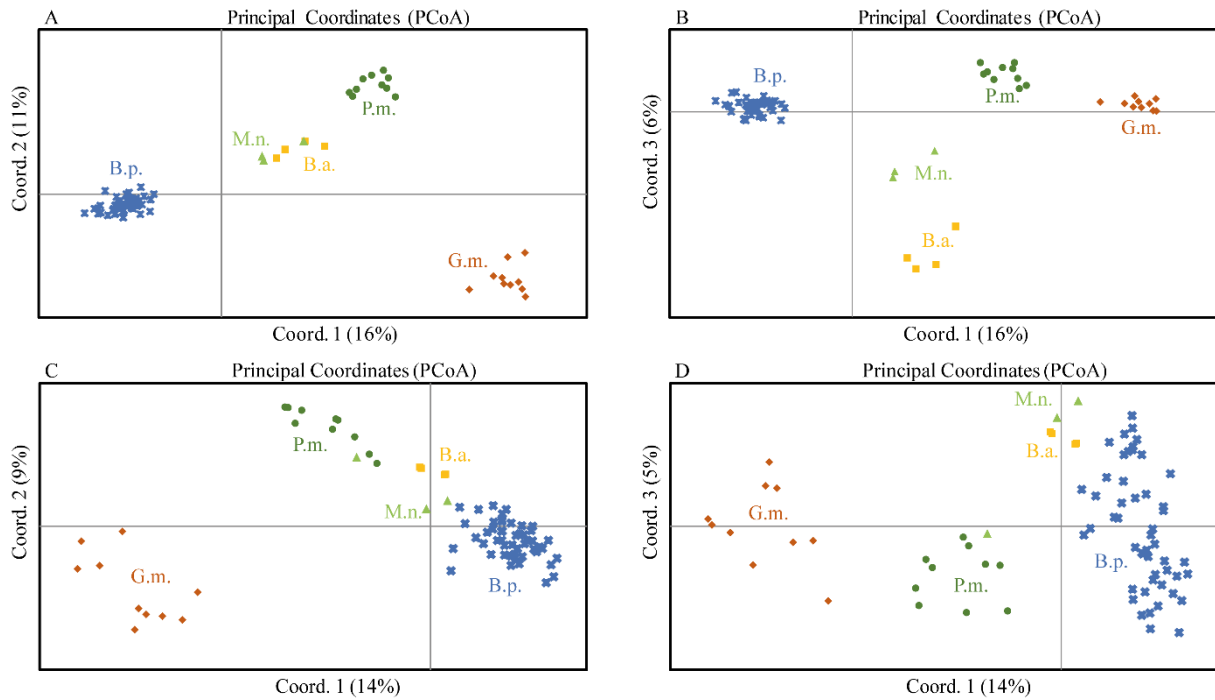


Figure 8. Principal Coordinates Analysis on 5 cetacean species genotyped with newly developed and previously published microsatellite markers (32 microsatellite loci; A and B) or only with previously published (7 microsatellite loci; C and D). A: Axis 1 (16%) and 2 (11%). B: Axis 1 (16%) and 3 (6%). C: Axis 1 (14%) and 2 (9%). D: Axis 1 (14%) and 3 (5%). B.p.: *Balaenoptera physalus*, M.n.: *Megaptera novaeangliae*, B.a.: *Balaenoptera acutorostrata*, P.m.: *Physeter macrocephalus*, G.m.: *Globicephala melas*.

2.5 Discussion

In this study, 32 microsatellite markers were tested on five cetacean species. Twenty-five were newly developed for *B. physalus*. The 32 loci were amplified in five species, providing a valuable tool for future studies of cetacean populations.

On the 14 previously published markers, only seven could be amplified in this study, while all were verified by their authors on *B. physalus* with success. Locus GT142 was tested at five temperatures (53, 55, 57, 60 and 63°C) for amplification, like all microsatellite markers, but none of the temperatures showed an amplification. The non-amplification of this locus can be due to mutations in the primer sites in our population of *B. physalus* (Paetkau and Strobeck 1995), and the displacement of the primer could resolve the non-amplification of the locus GT142. For loci GATA053, GT271 and GT575, the non-amplification appeared when we added the fluorescent dye, for each locus we tested only the temperature of their multiplex. A solution for these loci would have been to test all of the temperatures again, but at this stage, the multiplexes were already established and because we had enough loci to study the

population, no further tests were performed. The last three loci that did not amplify (GATA028, EV01 and EV94) were lost during the last step, corresponding to the PCR multiplex with fluorescent dye on the primer. One reason for this may be the interaction between primers of two loci in multiplex PCR, which can lead to poor PCR sensitivity and specificity and/or the preferential amplification of non-target loci (Edwards and Gibbs 1994; Hayden et al. 2008).

The new set of microsatellite markers displayed numerous dinucleotide repeats (76%), compared to tri- (12%) and tetranucleotide repeats (12%), as also seen in others studies (Palsbøll et al. 1997b; Bourret et al. 2008). In general, tri- and tetranucleotides are preferred to dinucleotides, since variations in the number of repeat units are easier to detect between individuals due to the larger number of base pair differences between alleles (Liu et al. 1995). These differences remove potential biases such as stuttering and ambiguous allele sizing (Edwards et al. 1991). However, dinucleotides are also very informative since they usually exhibit higher number of alleles and higher polymorphism. In cetaceans, dinucleotide repeats were found to be significantly more polymorphic than tetranucleotide repeats (Bourret et al. 2008). In our case, dinucleotides and tetranucleotides have the same level of polymorphism, approximatively 8 alleles per locus. Twenty-nine loci were used resulting in a total of 240 alleles in the dataset, which seems sufficiently robust to study the structure, parentage and history of the *B. physalus* population (Rosenberg et al. 2001).

The heterozygosity levels were coherent with results published for *B. physalus* populations from other regions (Bérubé et al. 2006; Rivera-León et al. 2019). Some of the previously published loci (EV37: Valsecchi and Amos 1996; GATA417: Palsbøll et al. 1997; and GT211: Bérubé et al. 2000) displayed higher heterozygosity levels in our population (EV37: 0.9000; GATA417: 0.9800; GT211: 0.8200) than in other studies (e.g. EV37: 0.75; GATA417: 0.70; GT211: 0.64 in Bérubé et al. 2002). Only four loci presented significant heterozygote deficiency. The percentage of heterozygote deficiency in our population (14%) is less than in other cetacean species for the same region (*Stenella caeruleoalba*: 33%, Bourret et al. 2007; *P. macrocephalus*: 25%, Engelhaupt et al. 2009). A high level of heterozygote deficiency could be explained by a significant inbreeding within the population or a ‘Wahlund effect’ due to sampling distinct populations (Crouau-Roy 1988). The level of heterozygosity is linked to the level of linkage disequilibrium (LD), and markers with low heterozygosity have been demonstrated to show less LD than those with high heterozygosity (Crouau-Roy et al. 1996). Locus TAA023 was significantly deviant from HWE in our population in the Mediterranean Sea, but was not deviant in other regions (Gulf of California: Rivera-León et al.

2019), contrary to loci GATA098, EV37 and GT211 which were not deviant in our population but were deviant in other regions.

The level of LD (14%) was similar to the one estimated for *B. physalus* in different regions (13% in Bérubé et al. 1998). This level depends on species and populations, and while some cetacean species show a level of LD below 2% (Frasier et al. 2006) as in the present study, many species show no LD (Cunha and Watts 2007). Globally, cetaceans have limited LD in comparison to other species: 78% for Hula painted frog (Perl et al. 2018), 35% for chimpanzee (Crouau-Roy et al. 1996).

The new set of microsatellites included three loci with null alleles. One of them presented a departure from HWE that could be explained by null alleles (Panova et al. 2008). Bp747752 showed null alleles, a departure from HWE and linkage disequilibrium, and should be removed for all further analyses. Regarding loci Bp1430262 and Bp1003953, analyses should be performed with and without them to detect any biases that they may trigger in the results. However, the presence of null alleles are dependent on the *B. physalus* population, and while some loci were detected as likely having null alleles in the Gulf of California (Rivera-León et al. 2019) this was not the case in our region. The design of new primers could reveal new alleles for many of the homozygous individuals of these three loci.

The 32 microsatellites used in the present study showed a high probability of being polymorphic in different cetacean species (> 72%). Cetaceans have already demonstrated a success greater than 70% for cross-amplification between sub-orders, Odontoceti and Mysticeti (Valsecchi and Amos 1996). Cetaceans, birds, and frogs are known to have microsatellites with a high degree of success with respect to cross-species amplification (Primmer et al. 2005). The successful cross-species amplification provides evidence of conserved DNA sequences bordering microsatellite regions for these taxa, confirming previous studies (Coughlan et al. 2006; Chen and Yang 2009). The success or failure of cross-amplification does not depend on the taxonomic classification system (Avise and Johns 1999). However, some taxa show a low probability of having polymorphic loci through cross-amplification, such as fishes (Barbara et al. 2007) and bivalves (Hedgecock et al. 2004). With regards to our results, the new set of loci could be useful for further studies on other cetacean species.

Furthermore, all loci revealed at least one private allele for one or several species. Some species have numerous private alleles for a single locus. *Balaenoptera physalus* presented the highest number of private alleles, due to the development of microsatellite markers specifically

for this species. Next, *P. macrocephalus* and *G. melas*, the two species most phylogenetically distant, displayed the highest number of private alleles. Identification of private alleles showed that the microsatellite markers could be useful to distinguish species. The number of private alleles is a measure of genetic distinctiveness (Kalinowski 2004). However, a large number of private alleles could also be an artefact of low sample size. Increasing the number of samples decreases the average frequency of private alleles in the species (Slatkin 1985). Nonetheless, the number of private alleles for *B. physalus*, which presents a higher sampling effort compared to the other species, suggests that these microsatellite markers are very informative for the study of population structure in this species.

Microsatellite markers can help to detect hybridization events, when markers are numerous and informative. In the infraorder Cetacea, 62 putative hybridization events have been reported in captive and natural populations (Bérubé and Palsbøll 2018). In captivity, all hybridizations occurred only in Odontoceti species and more precisely in the *Delphinoidea* superfamily while in the natural population, 13 concerned Mysticeti species. Our target species *B. physalus* is involved in 11 hybridizations with *Balaenoptera musculus*. A complementary use of nuclear and mitochondrial markers makes it possible to better identify the parental species (Amaral et al. 2014). Our microsatellite markers will likely enable the detection and study of hybridization within the *Balaenoptera* genus.

The cross-amplification revealed some genetic differentiation between species (**Figure 8**). When considering only axes 1 and 2, two species (*M. novaeangliae* and *B. acutorostrata*) are grouped together (**Figure 8A**), but are separated when considering the third axis (**Figure 8B**). Cross-amplification was tested on two Odontoceti species (*P. macrocephalus* and *G. melas*) and three Mysticeti species (*B. physalus*, *B. acutorostrata* and *M. novaeangliae*). The emergence and diversification of Mysticeti and Odontoceti occurred 35 Ma ago (Fordyce 2018). This divergence time did not prevent most of the loci developed for *B. physalus* (Mysticeti) from amplifying in Odontoceti species.

Phylogenetic studies have incorporated *M. novaeangliae* within the *Balaenoptera* genus (Sasaki et al. 2005). The proximity of *M. novaeangliae* and *B. acutorostrata* with our target species is congruent with the phylogeny. The two Odontoceti species are the most distant on the PCoA, with *G. melas*, the most isolated, belonging to Delphinidae. Overall, for cetaceans, the cross-amplification was successful regardless of genetic distances, but the success seems to be species-dependent in other groups (Peyran et al. 2020).

The success of amplification (25 *de novo* and seven previously published) and the high degree of polymorphism detected suggests that these newly developed microsatellite markers will be suitable to infer genetic diversity, population and family structures. Furthermore, the cross-species transferability was successful and provides a new set of markers for four other cetacean species spread across the phylogeny, and will likely be useful for many other cetacean species. The availability of numerous microsatellite markers is critical for studying and understanding such ecologically important migratory populations.

Acknowledgements

We thank WWF-France for providing samples from *Balaenoptera physalus*, *Physeter macrocephalus*, *Globicephala melas*. We are also grateful to all the volunteers of WWF-France who participated in the campaigns at sea. We thank W. Mullié in Mauritania for the collection of *Balaenoptera acutorostrata* samples. Thank you to J. Almany for english corrections.

Compliance with ethical standards

The sampling was non-lethal and *a priori* approved by the DREAL (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) of Provence-Alpes Côte d'Azur.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

3. Article 2 : Les haplotypes

New insight into genetic structure and haplotype diversity of the fin whale, *Balaenoptera physalus*, from the Mediterranean Sea

Céline Tardy^{1,2*}, Emilie Boissin^{2,3}, Denis Ody¹, Serge Planes^{2,3}

¹ WWF-France, Paris, France

² PSL Research University: EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, 66860 Perpignan, France

³ Laboratoire d'Excellence "CORAIL"

*Corresponding author: celine.tardy63@gmail.com

Keywords: Fin whale; *Balaenoptera physalus*; Mitochondrial DNA; control region; Mediterranean Sea; Haplotype

3.1 Abstract

The fin whale, *Balaenoptera physalus*, is present in all oceans, as well as in the Mediterranean Sea. The Mediterranean fin whale is impacted by several anthropogenic threats among which ship-strikes are the main cause of human-induced mortality. To understand how the Mediterranean population is structured and its link to the North Atlantic population, we sequenced a portion of the hypervariable mitochondrial DNA control region (D-loop). Our sampling was composed of 490 Mediterranean fin whale individuals and an additional 13 from the North Atlantic and two from the North Sea. Twelve haplotypes were identified, among which eight were recovered exclusively from the Mediterranean Sea samples. In the Mediterranean population, the overall nucleotide diversity was estimated at 0.00461 (SD=0.00034) and the haplotype diversity at 0.501 (SD=0.024), values lower than those reported for fin whale populations in other oceans. After comparison with all sequences available from GenBank, we identified a total of six new haplotypes, each originating from a single individual, including two private haplotypes for the Mediterranean population. The haplotype network revealed that the eight haplotypes recovered from our Mediterranean samples are segregated into two distinct lineages inside the “North Atlantic group”, emphasizing the isolation of the Mediterranean population. The Mediterranean population needs to be considered as a separate populational unit in future management strategies.

3.2 Introduction

The fin whale, *Balaenoptera physalus*, is distributed across all oceans worldwide. An early genetic study established that the Southern and Northern hemisphere populations are distinct subspecies, with the tropical zone creating a barrier to gene flow (Archer et al. 2013). Archer et al. (2019) showed further genetic differentiation between the North Pacific and the North Atlantic populations. Cabrera et al. (2019) demonstrated that the connectivity between these three basins (North Pacific, North Atlantic, and Southern Hemisphere) was more complex and more strongly dependent on sample sizes, than previously thought. Concerning the Mediterranean Sea, a number of cetacean species (bottlenose dolphin, sperm whale, ...) have been recognized as genetically or demographically distinct subpopulations (Pace et al. 2015).

Early studies suggested that the small Mediterranean fin whale population (<1,500 individuals; Tardy et al. submitted; Notarbartolo-di-Sciara et al. 2003) was likely resident and genetically distinct from Atlantic individuals through mitochondrial and nuclear DNA analyses (Bérubé et al. 1998; Notarbartolo-di-Sciara et al. 2003). A limited gene flow and a movement of an individual (by satellite tracking) were identified between the Mediterranean Sea and the Atlantic (Palsbøll et al. 2004; Bentaleb et al. 2011). So far, only three private haplotypes have been identified in the Mediterranean population from a short sequence of mitochondrial DNA (mtDNA-D-Loop, 188 base pairs; Bérubé et al. 1998). However, no study focussed specifically on Mediterranean fin whales, and the few studies that have incorporated data from the Mediterranean, have integrated data from less than 100 individuals sampled in the Mediterranean Sea (Bérubé et al. 1998; Archer et al. 2019). These studies were not optimized (sample sizes, number of markers, sequence length) to study a small population or to confirm the isolation of the Mediterranean population.

Here, an in-depth analysis of the genetic diversity of the Mediterranean fin whale population was conducted by investigating the presence of private haplotypes as a sign of local isolation. Previous fin whale genealogy studies have shown that the vast majority of mtDNA haplotypes, based on 188bp of the D-Loop, were separated by only a few substitutions (Bérubé et al. 1998). In the present study, we sequenced a longer fragment of the mtDNA on approximately 500 individuals to enable a comparison with recent large-scale surveys in the Atlantic (Cabrera et al. 2019; Archer et al. 2019).

3.3 Materials and methods

3.3.1 Study area and sampling

The study area is located in the Northwestern Mediterranean Sea (**Figure 9**). Whale sightings and skin samples from biopsy darting were collected between June and September from 2008 until 2019, except for 2015, where no sampling campaign was conducted. In total, 490 fin whales were sampled, which likely corresponds to nearly a third of the total Mediterranean population (Notarbartolo-di-Sciara et al. 2003). In addition, 15 biopsies were collected by the French National Stranding network (RNE) from stranded animals in the North Atlantic Ocean and the North Sea (**Figure 9**).

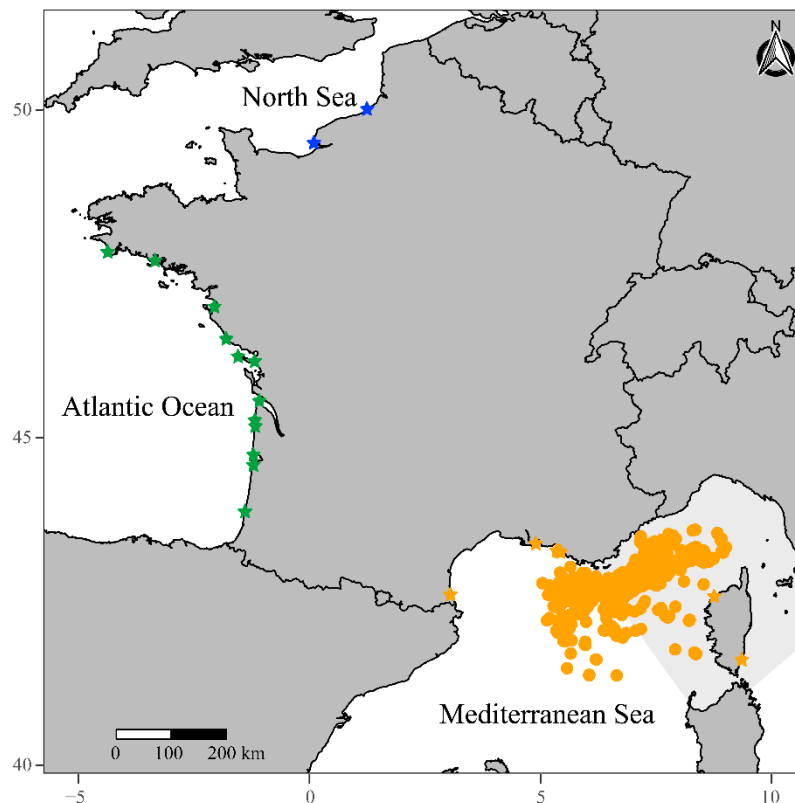


Figure 9. Map of sampling locations in the Northwestern Mediterranean Sea (490 individuals; orange), the North Atlantic Ocean (13 individuals; green) and the North Sea (2 individuals; blue). Stars represent stranded individuals, and dots represent samples from biopsies.

3.3.2 Genetic analyses

Genomic DNA was extracted from 505 fin whales using the Gentra PureGene tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). PCR amplification was performed for a portion of the

hypervariable mtDNA control region (D-Loop, 465 base pairs (bp)) using primers TRO (Archer et al. 2013) and D (Rosel et al. 1994). PCR amplification for almost the entire D-Loop (808bp/928bp) was performed following Arnason et al. (1993) methods for each haplotype identified within the small fragment, to verify if additional parts of the control region might be informative. PCR products were sent to GenoScreen (Lille, France) for sequencing, in both directions. Sequences were quality checked and aligned using Geneious v.5.5.9 (Kearse et al. 2012). The number of haplotypes (H), haplotype (Hd) and nucleotide (π) diversities were calculated in DNAsp v.5 (Librado and Rozas 2009).

The D-Loop sequence dataset was compared to sequences available on GenBank to identify putative new haplotypes (**Table S1**). Three datasets were compiled corresponding to three different sequence lengths. Unrooted median-joining haplotype networks (Bandelt et al. 1999) were constructed for each of the three datasets using NETWORK v.10.1 (www.fluxus-engineering.com).

The first dataset was restricted to 188bp of the D-Loop (short fragment) to fit with all available sequences. This first dataset aggregated our sequences with 153 sequences from Archer et al. (2013), 274 sequences from Archer et al. (2019), three sequences from Kim et al. (2018), 21 sequences from Sremba et al. (2015), and 51 sequences published in Bérubé et al. (1998). In total, the first dataset included 514 sequences of which 502 came from GenBank, and 12 from this study.

The second dataset compiled the same sources as those used in the first, but retained sequences longer than 288bp (medium fragment), equating to a total of 493 sequences of which 481 came from GenBank, and 12 from this study. The medium fragment size corresponds to the fragment size used in previously published studies on Mediterranean haplotypes (Bérubé et al. 1998).

The third dataset compiled the same sources as those used in the other datasets, but retained sequences longer than 409bp (long fragment), equating to a total of 442 sequences (430 from GenBank and 12 from this study).

3.4 Results and Discussion

When considering only our newly generated sequences from the 505 individuals sequenced for 465bp of the D-Loop (long fragment), a total of 20 polymorphic sites, of which

nine were singleton variable sites, defined 12 haplotypes (**Table 3**). For almost the entire D-loop (808bp), the sequencing revealed 22 polymorphic sites, equating to only two additional sites for nearly 350bp added. For that reason, we chose to consider the first 465bp sequenced fragment for further analyses. From the 12 identified haplotypes, one, seven, and eight haplotypes were identified for the North Sea, North Atlantic, and Mediterranean Sea sampling areas, respectively. The majority of our samples had mitochondrial sequences of haplotype Hap1, Hap2, and Hap4, accounting for 77 (15.2%), 340 (67.3%), and 56 (11.1%) individuals, respectively.

Table 3. Fin whale, *Balaenoptera physalus*, haplotypes. The first column corresponds to the haplotype numbers. The second column represents the polymorphic sites that defined the 12 haplotypes observed in the 505 individuals. The number above corresponds to the nucleotide position of the polymorphic sites starting from the first position of the mtDNA control region fragment sequenced for this study. Sequence identity to reference sequence in top row (Haplotype 1) is indicated by a dot. The third to the sixth columns list the number of individuals by region with respect to haplotype; MED: Mediterranean Sea; ATL: North Atlantic; NORTH: North Sea. New haplotypes were submitted to GenBank.

	7 7	8 8	1 7	1 7	1 4	1 9	2 1	2 6	2 1	2 3	2 4	2 6	2 7	2 7	2 9	3 0	3 0	3 1	3 1	3 1	3 1	3 3	3 8	4 2	4 0	MED	ATL	NORTH	Total (%)	GenBank
Hap 1	T	A	C	T	T	T	T	G	T	C	A	A	C	A	C	A	T	C	C	C						77	-	-	77 (15.2%)	Fragment of KC572860
Hap 2	T	333	5	2	340 (67.3%)	Fragment of MT4109212.1
Hap 3	.	.	C	T	.	T	G	T	.	T	.	G	12	1	-	13 (2.6%)	MZ047783	
Hap 4	.	.	C	.	.	C	.	T	.	T	G	T	.	T	.	A	54	2	-	56 (11.1%)	Fragment of KC572859.1	
Hap 5	.	.	C	.	.	C	.	T	.	.	G	T	.	T	.	A	6	-	-	6 (1.2%)	Fragment of KC572856	
Hap 6	.	.	C	C	.	C	.	T	.	T	G	T	.	T	.	A	6	-	-	6 (1.2%)	Fragment of KC582218 and KC582151	
Hap 7	.	.	T	T	G	1	-	-	1 (0.2%)	MZ047784	
Hap 8	.	.	T	T	1	-	-	1 (0.2%)	MZ047785	
Hap 9	.	G	.	.	C	C	.	A	C	T	G	.	G	T	.	C	-	1	-	1 (0.2%)	MZ047786	
Hap 10	.	.	C	.	.	C	.	T	.	T	G	T	.	T	.	G	-	2	-	2 (0.4%)	KC582227.1	
Hap 11	C	T	T	-	1	-	1 (0.2%)	MZ047787	
Hap 12	C	.	T	.	G	.	T	.	.	.	G	-	1	-	1 (0.2%)	MZ047788	
																									Total	490	13	2	505	

When comparing to available sequences, the ‘small size’ dataset (i.e. 188bp) revealed a total of 78 haplotypes with 28 polymorphic sites, and the haplotypes were previously identified. For the ‘medium size’ dataset (i.e. 288bp), we counted 121 haplotypes with 48 polymorphic sites and no new haplotypes were discovered. For the ‘long size’ dataset (i.e. 409bp), we identified 106 haplotypes with 56 polymorphic sites, among which six haplotypes were new.

Among these six new haplotypes, three haplotypes were from individuals sampled in the North Atlantic (Hap9: 0.2%, Hap11: 0.2%, and Hap12: 0.2%), two from individuals sampled in the Mediterranean Sea (Hap7: 0.2% and Hap8: 0.2%) and one haplotype was recovered from individuals from both regions (Hap3: 2.6%). Haplotype Hap3 is the fourth haplotype most present in the Mediterranean Sea with 12 individuals and only one from the North Atlantic. These six new haplotypes are among the rarest in our dataset, and represent about 3% of the individuals sequenced (**Table 3**).

In the Mediterranean Sea, from which 97% of our samples originate, the overall nucleotide diversity was estimated at 0.00461 (SD=0.00034), similarly to a previous estimation ($\pi=0.0057$; Bérubé et al. 1998). This Mediterranean nucleotide diversity is two times lower than the values estimated in the populations of other oceans for a similar fragment size of the D-Loop (Bérubé et al. 1998; Archer et al. 2019). The same pattern arises regarding the haplotype diversity, which is 0.501 (SD=0.024) in the Mediterranean Sea whereas it is at least 0.960 in other regions (Archer et al. 2019). Similarly, differences in genetic diversity are reported for the long-finned pilot whale, between the Mediterranean Sea and other regions (Kraft et al. 2020). However, nucleotide diversity for the fin whale is much higher than that of the long-finned pilot whale in the Mediterranean Sea ($\pi=0.00138$; Kraft et al. 2020). This difference is not surprising, as a previous study demonstrated that mysticetes and non-matrilineal odontocetes present a higher nucleotide diversity than matrilineal odontocetes (Whitehead et al. 2017).

The presence of private haplotypes in the Mediterranean Sea supports the genetic isolation hypothesis. When considering our dataset only, five private haplotypes were observed (Hap1, Hap5, Hap6, Hap7, and Hap8) for the Mediterranean Sea that add to the three previously identified by Bérubé et al. (1998), for the medium size fragment. However, when we compared with all available sequences in GenBank, the haplotype Bp46 (AF120001; Bérubé et al. 1998) matched with our Hap1 (only found in the Mediterranean Sea) and with the complete genome KC572860 (Archer et al. 2013) found in the North Atlantic, so this is not a private haplotype for the Mediterranean Sea. Similarly, Hap5 corresponds to the complete genome KC572856

(Archer et al. 2013) sequenced from a North Atlantic individual and Hap6 corresponds to a fragment of two partial sequences, KC582218 and KC582151, from North Atlantic samples (Archer et al. 2019), so these haplotypes are also not private to the Mediterranean. Regarding the two other private haplotypes from Bérubé et al. (1998), Bp47 and Bp48 (AF120002 and AF120003), as no matching was found they can be considered private to the Mediterranean Sea. Overall, we identified two new private haplotypes, Hap7 and Hap8, which add to the two private haplotypes from Bérubé et al. (1998) for the Mediterranean population. Furthermore, from stranded animals in the North Atlantic, four private haplotypes were identified (Hap9, Hap10, Hap11, and Hap12) among which three are new. In summary, the Mediterranean fin whale population presents four private haplotypes which suggests genetic isolation.

For the ‘long fragment’ network (**Figure 10**), the “North Atlantic group” is divided into two subgroups. One subgroup contains four haplotypes present in our Mediterranean samples among which is the new haplotype, Hap3. The other subgroup has the four other Mediterranean haplotypes among which are two new haplotypes (Hap7 and Hap8), plus the two other new haplotypes from the North Atlantic (Hap11 and Hap12). Thus, two lineages of fin whale are present in the Mediterranean Sea. North Atlantic and Mediterranean populations were previously suggested to be distinct (Bérubé et al. 1998; Giménez et al. 2013), however, a certain overlap exists between these two populations that could be explained by a low recurrent gene flow. Given the number of individuals per haplotype, the first lineage is more represented in the Mediterranean population (84%; Hap2 and Hap1 and with the two newly identified haplotypes Hap7 and Hap8) than the second lineage (16%; Hap3, Hap4, Hap5, and Hap6). Similarly, two populations of Mediterranean fin whales seem to be identified by acoustic monitoring (Castellote et al. 2012), which might correspond to our two lineages. The dominant lineage could correspond to the resident population of Mediterranean fin whales while the minor lineage could correspond to the migrant individuals that travel between the North Atlantic and the Mediterranean (Notarbartolo-Di-Sciara et al. 2016). To confirm this hypothesis, further analyses using nuclear markers, should be conducted. However, by increasing the fragment size, we have reduced the number of haplotypes available in the North Atlantic due to the small size of the previously published sequences. If we add more individuals, we could remove the signal of two lineages, as recently demonstrated for the subspecies separation (Cabrera et al. 2019).

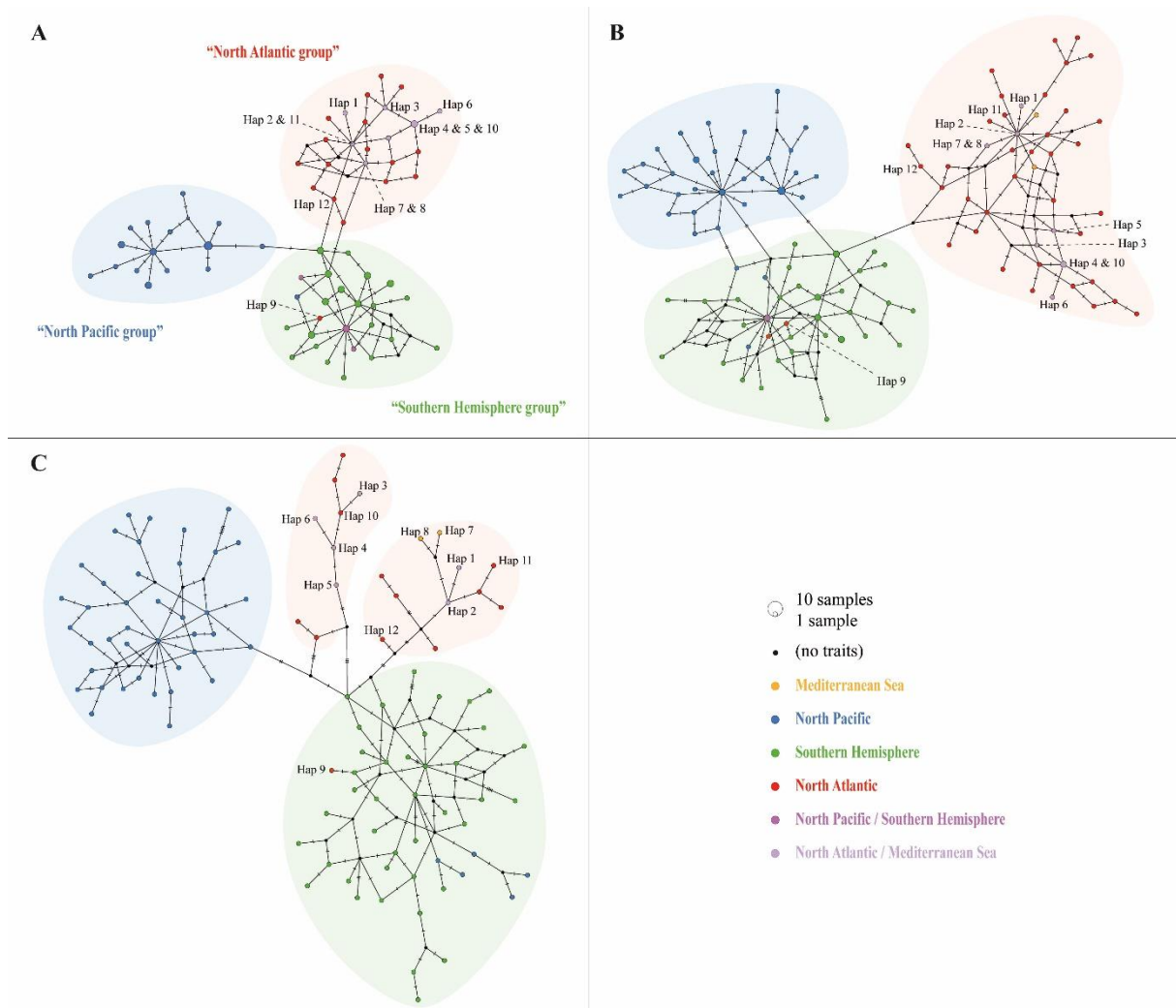


Figure 10. Median-joining networks of fin whale control region haplotypes. Relationships among haplotypes determined by analysis of the different size of the sequences: A) 188bp; B) 288bp and C) 409bp. Colour corresponds to the haplotype origin. Circle sizes are proportional to the number of sequences (from GenBank and this study) per haplotype.

Overall, from the six new haplotypes among which two are private haplotypes exclusive to the Mediterranean population, we confirm that the Mediterranean population demonstrates local diversification and limited gene flow to the Atlantic, retaining the new genetic diversity within the Mediterranean. Our study adds support to the hypothesis of an isolated population in the Mediterranean Sea with genetic differentiation in progress. The difference in genetic diversity between the Mediterranean population and populations from other regions is correlated to its smaller size and its limited connection with the North Atlantic, such as proposed for the Sea of Cortez that corresponds to a distinct population in the North Pacific (Bérubé et al. 2002). As a consequence, the Mediterranean fin whale population should be treated as a separate unit in future conservation plans.

Acknowledgments

We thank WWF-France and the French National Stranding Network (RNE) for providing samples from *Balaenoptera physalus*. We are also grateful to all of the volunteers of WWF-France who participated in the campaigns at sea. We also thank J. Almany for English corrections.

Declarations

Funding: This research was funded by WWF-France and ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, grant CIFRE n°2017/0124).

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Availability of data and material: GenBank accession numbers of all the D-loop sequences used in this study are listed in Table 3 and Table S1.

Code availability: Not applicable

Authors' contribution: Conceptualization, C.T., E.B., S.P.; Formal analysis, C.T.; Resources, C.T, D.O., S.P.; Writing – original draft preparation, C.T.; Writing – review and editing, C.T., E.B., D.O., S.P.; Visualization, C.T.; Supervision, D.O., S.P.

Supplementary Data

Table S1. Haplotypes used in analyses for this study.



Chapitre 3

Abondance de la population de Rorqual commun en Méditerranée Nord-occidentale

Submitted in Marine Ecology: Tardy, C., Ody, D., Gimenez, O., Planes, S. Abundance of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the Northwestern Mediterranean Sea, using photo-identification and microsatellite genotyping

1. Introduction

La deuxième partie des résultats de cette thèse est consacrée à l'estimation de l'abondance de la population de Rorqual commun présente dans la partie Nord-Occidentale de la Méditerranée. Cette zone correspond à une zone d'alimentation pour cette espèce, c'est pourquoi on y retrouve en période estivale de nombreux Rorquals communs. Les dernières estimations ont plus de 20 ans, il est nécessaire de les actualiser et voir son évolution au cours des 10 dernières années.

L'article présenté dans ce chapitre estime l'abondance via des modèles de capture-marquage-recapture. Ces modèles sont largement utilisés pour ce type d'analyse. Différentes bases de données ont été utilisées : une basée sur une identification individuelle par photo-identification puis une basée sur une identification génotypique, et enfin une combinant les deux précédentes. La moitié des données de photo-identification avait préalablement été traitée au cours du Volontariat Service Civique que j'ai réalisé avant la thèse. L'autre moitié a été traitée au cours de cette thèse en suivant le même protocole. Les données génotypiques ont été obtenues à partir des marqueurs microsatellites développés au cours du premier chapitre.

En résumé, cette étude vise à répondre principalement à trois questions : 1) Quelle est la taille actuelle de la population de Rorqual commun présente en Méditerranée Nord-Occidentale ? 2) Quelle est la tendance observée depuis les dernières estimations, il y a 20 ans ? 3) Quelle est la probabilité de survie d'un Rorqual commun dans cette zone ?

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis dans la revue internationale *Marine Ecology*.

Tardy, C., Ody, D., Gimenez, O., Planes, S. Abundance of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the Northwestern Mediterranean Sea, using photo-identification and microsatellite genotyping

2. Article

Abundance of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the Northwestern Mediterranean Sea, using photo-identification and microsatellite genotyping

Céline Tardy^{1,2}, Denis Ody¹, Olivier Gimenez³, Serge Planes^{2,4}

¹ WWF-France, Paris, France

² PSL Research University: EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, 66860 Perpignan, France

³ CEFE, Univ. Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Univ. Paul Valéry Montpellier 3, Montpellier, France

⁴ Laboratoire d'Excellence "CORAIL", Perpignan, France

* Corresponding author: celine.tardy63@gmail.com

Keywords: Abundance, capture-recapture, fin-whale, microsatellite, photo-identification

2.1 Abstract

The Mediterranean fin whale population, *Balaenoptera physalus*, is resident, with almost no exchanges with the Atlantic population. The latest abundance estimates for the Northwestern Mediterranean date back nearly 20 years, and an update is critical for conservation. Capture-recapture approaches using dorsal photographs and genetic identity collections over a 10-year period were used to estimate the population abundance. We identified 332 individuals using photographs and 470 using genotypes, with a total of 546 individuals identified between 2008 and 2019. The percentage of recapture from year to year varied between 15 and 17%. Using Cormack-Jolly-Seber models, the global abundance of fin whales in the Northwestern Mediterranean is estimated at 1,295 individuals (95%CI: 1,116-1,474) with a survival probability of 0.945 (95%CI: 0.690-0.993) from genotypes. Abundance estimates from combined collections (photographs and genotypes) and corrected photograph estimates were similar to the genetic ones. However, with 866 individuals (95%CI: 764-969), photograph abundance estimate was lower due to the implementation of important quality control measures to avoid misidentification. Future studies should prioritise the genetic approach which is the least biased and the most conservative. The genetic abundance estimates show relative stability over time, when compared to 1990 estimates, and should be included in future conservation actions.

2.2 Introduction

Abundance, the number of individuals in a population, is a fundamental parameter in evolution, ecology, and conservation. To protect endangered populations, estimates of abundance and survival probability over extended study periods are needed to determine temporal trends (Childerhouse et al. 2008) and to determine the causes of observed trends in population dynamics (Pace et al. 2017).

The type of method used for estimation depends on the nature of the population investigated, namely whether it is “closed” or “open”. A closed population refers to a population which remains unchanged during the investigation, while an open population refers to a dynamic population that will change through the import and export of individuals via migration processes and through the birth and death of individuals. Quantifying the abundance of populations and the trends in abundance are essential in conservation biology. Several methods are commonly used to estimate abundance (e.g. Lebreton *et al.*, 1992; Schwarz and Seber, 1999; Lukacs and Burnham, 2005) and most of them are based on statistics from capture-recapture data (Schwarz and Seber 1999).

In capture-recapture protocols, individuals are first captured and then marked with a unique identifier at which point they are then released back into their natural habitat. As the sampling protocol continues, new individuals are caught along with individuals that were previously caught, now considered “recaptures”. From these data (recapture vs new first capture), it is possible to provide robust estimates of abundance and survival probability, which are required to determine population status, though they remain difficult to obtain for wide-ranging, mobile species that make recaptures more unlikely. The capture-recapture approach allows for the estimation of demographic parameters (e.g. abundance, survival), group structure, site fidelity and movement patterns (Hammond 1986; Hammond et al. 1990).

For cetaceans, most capture-recapture approaches require individual identification that is undertaken by one of three methods: satellite telemetry (Panigada et al. 2015), genotyping (Bérubé et al. 1998), and photo-identification (Photo-ID; Whooley *et al.*, 2011). Photo-ID and genetic tools are the most commonly used methods because they rely on permanent characteristics, in contrast to satellite telemetry, which can be deployed for only few months at most.

Photo-ID is a useful tool to study free-ranging species, like cetaceans. It is a widely-used method based on stable markings (i.e. which do not vary through time; Blackmer *et al.*,

2000), and allows for the distinction of individuals (Hammond et al. 1990). Most of these marks are the result of injuries that have affected the dermis, such as nicks and notches in the trailing edges of dorsal fins and scars on the body, although the shape of the dorsal fin and pigmentation patterns are also used to identify individuals (Urian et al. 2015).

Genetic analyses are less frequently used than photo-identification to estimate abundance because they require sampling tissue from the animals, but both methods can be used for the same analysis. The use of microsatellite markers allows individuals to be identified (number of markers > 20), by reconstructing their genotypes and by producing a unique and immutable identification tag for each organism (Lamb et al. 2019). However, the assignment of duplicate individual depends highly on the probability of identity, which depends on the variability of the markers. This technique is widely used in biology, medicine, and forensics, to track the movement of individuals, and for population and conservation genetics (Palsbøll et al. 1997a; Chistiakov et al. 2006).

Based on individual and recapture identification, it is possible to estimate abundance for a given species and to derive certain characteristics of population dynamics (Hammond et al. 1990). A census could be done in an exhaustive way when the population is resident inside a limited area that is easily accessed (Shane et al. 1986), or by estimation when only a sample of the population can be identified (Wilson et al. 1999; Notarbartolo-di-Sciara et al. 2003). The estimation approach by capture-recapture is often used to estimate the abundance of cetaceans over a long-term study period (Hammond 1986) and when the detection of individuals is heterogeneous, i.e. detection depend on covariates like offshore distance and visibility. Comparison of data sources (photographs and genotypes) yields limited ranges in estimates of abundance. This kind of study was conducted for the humpback whale in Oceania, *Megaptera novaeangliae*, where the photograph estimate was lower than the genotype estimate due to several factors (different levels of effort and/or data collection strategies; Constantine *et al.*, 2012), yet for the right whale, *Eubalaena australis*, abundance estimates from photographs and genotypes were comparable due to a similar data collection strategy (datasets collected at the same time in the same surveys) and a high overlap (~16%) between the two datasets (Carroll et al. 2011). The result of data source comparison seems to be species and area-dependent, but also largely dependent on the sample size and data collection strategies.

Whaling during the 19th and 20th centuries significantly reduced the abundance of whale populations across the globe (Palsbøll et al. 2013). However, the degree of the reduction in abundance caused by whaling and current human activities remains unknown. Human activities

are the greatest threat to large whales (ship-strikes, bycatch, noise, and chemical pollution; Harwood, 2001), and they are steadily increasing. Today, most countries recognize that it is important to have a precise estimate of abundance for each population to understand the severity of these impacts and to take action to mitigate them. Further, regular estimates of abundance should be acquired in order to detect changes to these populations.

The worldwide population of fin whales, *Balaenoptera physalus* (Linnaeus, 1758), the second-largest species in the world, has decreased by more than 70% over the last three generations (1927-2007; Reilly *et al.*, 2013). In 2018, global world abundance was roughly estimated at 100,000 individuals (Cooke 2018), and the species remains “vulnerable” with regard to the global population on the IUCN Red List of Threatened Species. The fin whale is present throughout the Mediterranean basin (Notarbartolo-di-Sciara *et al.* 2003) with a population that is considered as resident, displaying a significant level of differentiation in the mitochondrial DNA from the North Atlantic population (Bérubé *et al.* 1998). However, limited gene flow exists between the North Atlantic and the Mediterranean populations (Palsbøll *et al.* 2004). Breeding and feeding areas are different between these two populations (Aguilar *et al.* 2002), further reinforcing the isolation of the Mediterranean population, and increasing its vulnerability. The fin whale is more abundant in the Northwestern part of the Mediterranean Sea during summer probably due to high densities of its principal prey, the krill *Meganyctiphanes norvegica* (Notarbartolo-di-Sciara *et al.* 2003). The most recent estimate of global abundance for the entire western basin was 3,500 fin whales (distance sampling method: 95% CI: 2,130-6,027; Forcada *et al.*, 1996) and 1,800 individuals in the Northwestern basin (data collection of publications; Notarbartolo-di-Sciara *et al.*, 2003). However, these estimates were made almost 20 years ago and an appreciable decrease in abundance by a factor of six was estimated between 1990 and 2009 (Panigada *et al.* 2011). As such, an updated population estimate and temporal monitoring are required.

In the present study, we used a Cormack-Jolly-Seber (CJS) model to determine individual survival probability and to estimate abundance of the fin whale in the Northwestern Mediterranean Sea based on long-term monitoring conducted in summer over the last 10 years. We applied a CJS model to individuals identified separately from photographs and/or genotypes. Both types of data (photographs and genotypes) have advantages and disadvantages, but the comparison of the two collections provides a better estimate of abundance and survival probability than with one collection. Also, running the model using multiple data sources improves accuracy and precision by reducing biases from single data sources (Boulangier *et al.*

2008), and by comparison, can increase the viability of obtaining reliable estimates from one data source. Estimates calculated here will be compared with previous estimates for the species in the area and elsewhere to assess their relative importance and evolution, both of which (survival and abundance) will be essential for future conservation planning efforts.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Data collection

The target study area of approximately 91,000 km² is located in the Northwestern Mediterranean Sea, including a major part of the Pelagos Sanctuary (an International Sanctuary for Marine Mammals, **Figure 11**).

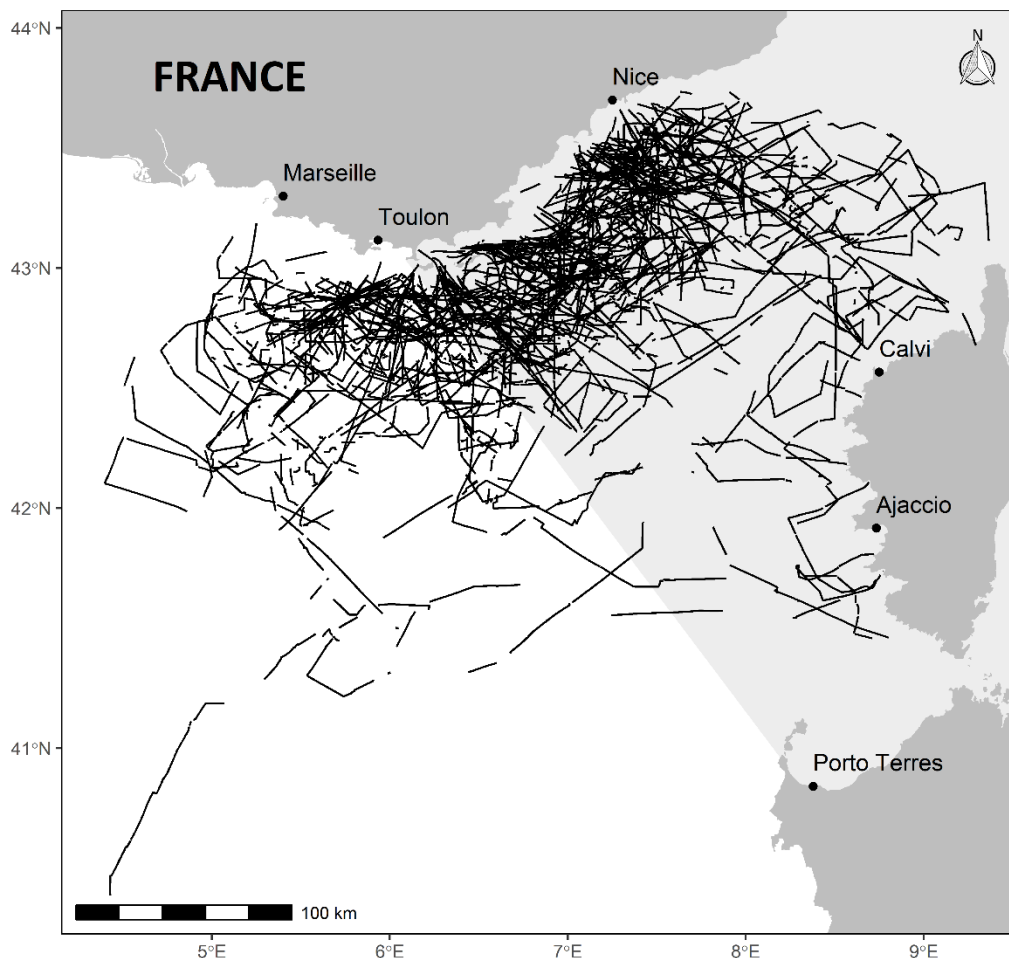


Figure 11. Northwestern Mediterranean Sea, including track effort (black lines) obtained while conducting boat surveys between 2008 and 2019, and Pelagos sanctuary (light-grey in the background).

Whale sightings were collected from sailboats, each of which had trained observers on board, who continuously scanned the sea with binoculars. When a fin whale was sighted, photographs and skin biopsies were taken from an inflatable dinghy for identification and its position was recorded. Only adult fin whales were identified, as calves are not present in this area. Images were taken with a Canon 30D digital camera from 2008 to 2016, and from 2017 to 2019, a Canon 80D digital camera fitted with a Canon 70 to 200 mm lens was used. Skin samples were collected using biopsy darts fired from a crossbow. In the field, samples were stored in 70% ethanol. However, the survey effort was weather-dependent, and when sea conditions were worse than Beaufort scale 3, the effort was stopped. In total, approximately 27,400 km were surveyed (**Figure 11**), between 2008 and 2019 during the summer season (between June and September), except in 2015 where no sampling campaign was conducted.

2.3.2 Microsatellite loci genotyping

DNA was extracted from 612 skin biopsies using the Genra PureGene tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). A total of 32 microsatellite markers were used in six multiplexes PCRs (Tardy et al. 2020). PCR amplifications were performed using Type-it Microsatellite PCR kits (Qiagen, Hilden, Germany) in 12.5 μL total volume reactions containing 4 μL Type-it Multiplex PCR Master Mix, 6 μL RNase-free water, 1 μL of primers (2 μM forward and reverse primers diluted in TE pH 8 buffer) and 1.5 μL of DNA template at 50 ng/ μL . Amplifications were carried out for 5 min at 95°C, followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, 1 min 30 s at annealing temperature (53-63°C, depending on the locus), 30 s at 72°C, and a final extension for 30 min at 60°C. PCR products were sent to the GenoScreen platform (Lille, France) for fragment analysis and allele sizes were visualized using an Applied Biosystems 3730 Sequencer. For accurate sizing, an internal size ladder (GeneScan 500 LIZ, Applied Biosystems) was included. Allele sizes were scored and checked manually using GENEMAPPER software v.5 (Applied Biosystems). All ambiguous peak profiles were considered as missing data. For one genotype, a maximum of eight missing data was allowed on 32 microsatellite markers. The sex of individuals was genetically identified by amplifying fragments of the ZFX and ZFY genes (Bérubé and Palsbøll 1996). Sequencing of the mtDNA control region (465 bp) was performed using primers TRO (Archer et al. 2013) and D (Rosel et al. 1994).

Controls for the presence of null alleles and large allele dropout were performed with MICRO-CHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). Repeated genotypes were identified and estimated in GenAlex v.6.503 (Peakall and Smouse 2012). Two samples are considered as belonging to the same individual when all alleles are identical, supported by control region

haplotypes and sex. Lastly, in situations where between one and ten differences were detected between the two genotypes, all tests were performed again to remove possible contamination or genotyping errors to verify the individual's identity or difference. In the microsatellite analysis, it was possible for different individuals to have identical profiles with 99% certainty when an insufficient number of loci was used. We estimated by computing the probability of identity (P_{ID}), and we estimated the P_{ID} among siblings if there is the potential for relatives to be present in samples. There were estimated following (Paetkau et al. 1995) and using R package PopGenUtils (Tourvas 2021). The P_{ID} values among the 29 microsatellite loci (after removing three null alleles) were lower than 0.01 ($P_{ID} = 5.87 \times 10^{-33}$; $P_{ID-sibs} = 1.89 \times 10^{-12}$) indicating that this microsatellite panel may be suitable for individual identification.

2.3.3 Photo-identification

Seven hundred and one individuals were identified via photo-identification. Photo-ID was done on the right side, with a focus on two parts: the dorsal fin and the chevron (a light “V” shaped pigmentation pattern behind the head; Agler *et al.*, 1990). For each individual and for each encounter, the best photograph was selected and scored, as (3) poor, (2) fair, and (1) good or excellent, based on the lighting, focus, size, and the angle of the body relative to the photographic frame. Then, each individual was scored with respect to its markings, as (3) not distinctive with superficial lesions, (2) slightly distinctive with deep scars and minor lesions, (1) distinctive or very distinctive with a damaged fin or important scars on the fin. To minimize heterogeneity in captures due to misidentification of non-distinctive fins, both scores were added, and only photographs with a score inferior or equal to 3 were kept for a standardized comparison between individuals. This type of quality control reduces error rates due to false positives and/or false negatives (type 1 and type 2 errors; Friday *et al.*, 2008; Barendse *et al.*, 2011; Urian *et al.*, 2015). Following these steps, photographs allowed individuals to be identified and for re-sightings to be determined. As recommended by Friday *et al.* (2000), the quality control review of all catalogues was conducted by a single researcher (the first author) to ensure consistency.

2.3.4 Capture-recapture modelling and abundance estimation

To allow for the comparison of abundance estimates over time, biases due to variation in sampling effort were reduced by creating a grid of 5 km per 5 km in our spatial area and by

selecting per year cells where the total effort (km) exceeded the surface area (km²) of the same zone (km/km² > 1 km⁻¹; Gnone *et al.*, 2011). Only the data present in these cells were included in this study. After this step, photo-ID and genotype data were treated separately, in order to compare estimates from both data sources. The last step was to combine both collections to increase the number of individuals sighted and to estimate the population abundance. Several individuals were both photo-identified and sampled for genotyping, while others were either photo-identified or sampled. All concordances of data are known from sampling surveys.

In this study, each capture occasion (one year of survey) spanned the summer season (June to September) to avoid sparseness in the data due to non-detections (Cooch and White 2011), and yielded a total of 11 capture occasions, corresponding to 11 years of effort with one field season per year. A matrix was then constructed, which included the detection/non-detection of each fin whale for each capture occasion.

The CJS model is commonly used in the modelling of capture-recapture data (Lebreton *et al.* 1992). In open populations, the CJS model is suitable for the estimation of population parameters when birth, death, and emigration are stochastic between sampling periods, and is thus widely used for cetaceans (e.g. Wierucka *et al.*, 2014; Schleimer *et al.*, 2019). To determine which CJS model best fit our data, goodness-of-fit tests (GOF; Pradel *et al.*, 2005) were conducted using the R package R2ucare (Gimenez *et al.* 2018). The GOF tests test for any violations of the assumptions of homogeneity of capture and survival probabilities, transience and trap-dependence. Unequal survival or recapture probabilities could be due to biological factors, such as a transient effect or trap-dependence phenomena. Transience could reflect the behaviour of some individuals that passed by the study area only once and therefore had a low probability of being re-sighted (Pradel *et al.* 1997; Madon *et al.* 2013). This is due to the small spatial size of the area compared to the global area used by a population. Trap-dependence refers to the effect of previous detections on the recapture probability due to, e.g., animal behaviour or the observers' protocol (Pradel and Sanz-Aguilar, 2012).

Following GOF tests, the estimation of abundance and apparent survival probability was conducted using the R package RMark (Laake 2013). The study population was considered demographically open (i.e. births and deaths are possible). The standard model of CJS for open populations was used to estimate recapture probabilities (p) and survival (ϕ) for each season (Lebreton *et al.* 1992). Capture-recapture models for open populations, such as CJS, rely on a series of assumptions: (a) the mark (or the recognition system) should be reliable during the study period; (b) the capture of an animal should not modify the probability of being recaptured;

(c) all of the individuals of the population should have the same survival probability at each sampling event; (d) capture occasions are short in time compared to the interval between two successive occasions (Hammond 1990; Lebreton et al. 1992). Some individuals maintained their identifying marks throughout the study. Moreover, each photograph was quality controlled to avoid misidentification, and only unambiguous individual identifications were retained (Assumption “a”). We considered that assumptions “b” and “c” were respected by a constant effort to photograph and sample fin whales over the study period and were confirmed by the GOF tests. Assumption “d” was certified by grouping all of the summer months to form one capture occasion per year and to have a larger and constant interval between occasions.

We built several models based on different combinations of effects on recapture probabilities and survival following the notation: constant over capture occasions (c) and fully time-dependent (t; Lebreton *et al.*, 1992). Moreover, heterogeneity in the recapture probabilities may be expected due to individual attributes (e.g. age, body mass, social status) and habitat features (home-range location and composition; Cubaynes *et al.*, 2010). To address heterogeneity, a finite mixture model was tested to account for this parameter (Pledger et al. 2003) with two groups of individuals, one with a high probability of recapture (p_{high}) and the other one with a low probability of recapture (p_{low}).

In total, six models were tested on both matrices (photo-ID and genotypes) and the combined collection, which is the matrix combining individual identification by photo-ID and/or by genotypes. Furthermore, model over-dispersion was also examined by calculating \hat{c} , the overdispersion parameter, for each CJS model. The \hat{c} parameter is the deviance of a given model relative to the most parameter-saturated model, divided by the degrees of freedom of the given model. To find the best-fitting model, models were compared under Akaike’s Information Criterion (AIC; Akaike, 1973), which provided an estimate of the divergence between an approximate model and the reality depending on the number of parameters in the model. Therefore, when \hat{c} parameters were > 1 , the relevant corrections were applied to the given model to obtain the Quasi-likelihood AIC. The model with the lowest AIC value or QAIC was selected. Abundance estimates were obtained as a ratio of captured individuals per season by their associated probabilities. The bootstrap technique was used to calculate a confidence interval for abundance, whereby we resampled individuals with replacement to get 1,000 bootstrapped samples (Cubaynes et al. 2010).

After all estimates were obtained, those from photo-identification were corrected by the proportion of marked individuals for each capture occasion since all the whales did not exhibit

enough marks for individual identification. Total abundance was estimated as the abundance of marked fin whales on the proportion of marked fin whales for each capture occasion. Log-normal confidence intervals for the total abundance were obtained (Burnham 1987).

2.4 Results

2.4.1 Genotype collection

All 32 microsatellite markers were successfully amplified. However, three loci revealed the presence of null alleles (Bp1430262, Bp747752, and Bp1003953) and were removed in further analyses. All samples available from 2008 to 2019 were then analysed with 29 microsatellite markers. From the 547 genotypes, 470 individuals with unique genotypes were identified. The inter-annual percentage of recapture was 15.3%, where a total of 72 individuals were recaptured with 67 captured twice, and with 5 captured three times. The number of identified individuals increased steadily from 2008 to 2019. Each year, most of the samples were composed of new individuals and only a small portion of recaptures (average at 1.9% per year; **Table 4**). Within-year sample sizes ranged from 9 (in 2008) to 69 (in 2011), with an average of 50 samples per year.

2.4.2 Photograph collection

After conducting a quality control check for each photograph, 393 remained for the analysis with 332 single individuals identified and used to build the catalogue of photo-identification. Noticeably, for these 332 individuals, eleven presented marks from ship-strike, representing 3.3% of individuals. Through an analysis of recaptures, a total of 54 individuals were re-sighted, with 49 sighted twice, three individuals recaptured three times and two recaptured four times. The inter-annual percentage of recapture was 16.3%, with a small portion of intra-annual recapture (3.8%). Over the years, the number of identified individuals increased progressively (**Table 4**). The mean number of individuals identified by photo-ID per year was 36 with a range from 10 (in 2008) to 67 (in 2017).

Table 4. Summary of fin whales (*Balaenoptera physalus*) identified from 2008 to 2019 in the Northwestern Mediterranean Sea, by microsatellite genotypes and photographs.

Year	Effort (km)	Genotypes				Photographs			
		Ind. captured	New ind.	No. of recapture	Cumul. ind. captured	Ind. captured	New ind.	No. of recapture	Cumul. ind. captured
2008	2,274	9	9	0	9	10	10	0	10
2009	2,389	38	37	1	46	22	22	0	32
2010	2,963	64	60	4	106	38	35	3	67
2011	4,411	69	63	6	169	39	33	6	100
2012	3,046	57	51	6	220	32	28	4	128
2013	2,946	61	53	8	273	27	20	7	148
2014	3,281	49	43	6	316	26	23	3	171
2016	1,975	64	54	10	370	60	51	9	222
2017	1,407	62	46	16	416	67	56	11	278
2018	731	21	18	3	434	22	18	4	296
2019	1,950	53	36	17	470	50	36	14	332

2.4.3 Combined collection

When genotype and photograph collections were combined, a total of 546 individuals were identified by one or both methods in the study area between 2008 and 2019. A total of 249 individuals were both photo-identified and sampled, corresponding to 45.6% of the total identified individuals. In contrast, 84 fin whales (15.4%) were only photo-identified, and 213 (39%) were only DNA sampled.

2.4.4 Goodness-of-fit tests

For the two collections, the global GOF test was not significant (photographs: $\chi^2 = 11.779$, $df = 27$, $p = 0.995$; genotypes: $\chi^2 = 23.438$, $df = 31$, $p = 0.833$). None of the tests showed significant departure from transient effect or trap-dependence assumptions (**Table 5**). When the two datasets were combined, the results did not indicate lack of fit ($\chi^2 = 40.402$, $df = 32$, $p = 0.146$).

Table 5. Summary of goodness-of-fit test results for a study on the fin whale, for photo-identification and microsatellite genotype collections.

Collection	Tests	χ^2	df	<i>P-value</i>
Photo-identification	3sr	0.822	8	0.999
	3sm	0.585	5	0.989
	2ct	5.400	8	0.714
	2cl	4.972	6	0.547
	Goodness-of-fit	11.779	27	0.995
Microsatellite genotype	3sr	1.848	9	0.994
	3sm	0.787	5	0.978
	2ct	1.644	6	0.949
	2cl	0.000	0	1.000
	Goodness-of-fit	23.438	31	0.833
Both collections	3sr	5.063	9	0.829
	3sm	4.418	5	0.491
	2ct	0.000	5	1.000
	2cl	0.000	0	1.000
	Goodness-of-fit	40.402	32	0.146

2.4.5 Estimated abundance

For the genotype collection, comparison of the six models showed that the model that best fitted the data was model 2 (QAICc: 203.2; **Table 6**) with time-dependent recapture probabilities (p) and a constant survival (ϕ). The three models with constant survival had more support than those with time effect. The survival probability was 0.945 (95% CI: 0.690-0.993) for the best model. The recapture probability had low estimate values under 0.2 with a slightly declining trend over the years (**Figure 12**), ranging from 0.116 in 2009 to 0.009 in 2018. Using this model, the global abundance of fin whales in the Northwestern Mediterranean Sea was estimated at 1,295 individuals from all samples collected through 2008 to 2019 (95% CI: 1,116-1,474). Annual abundance estimates varied from 326 (95% CI: 232-429) in 2009 to 2,256 (95% CI: 1,397-3,331) in 2018 (**Figure 13**).

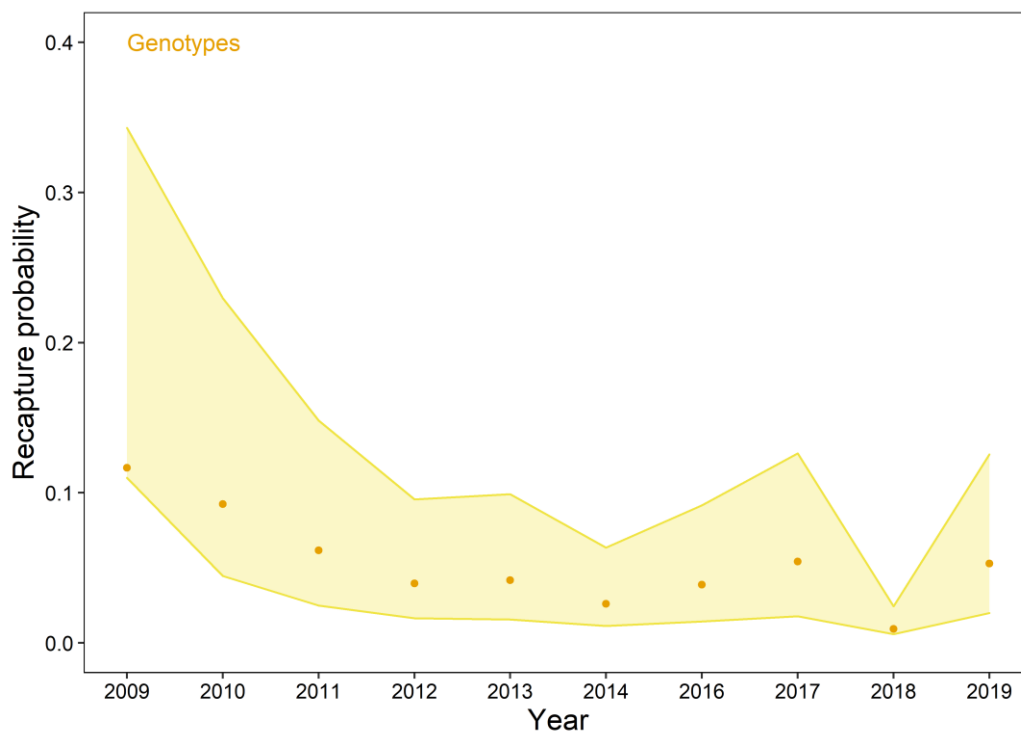


Figure 12. Recapture probability of the fin whale (*Balaenoptera physalus*) estimated from CJS model (model 2 in Table 2) on genotype collection, with associated 95% confidence intervals.

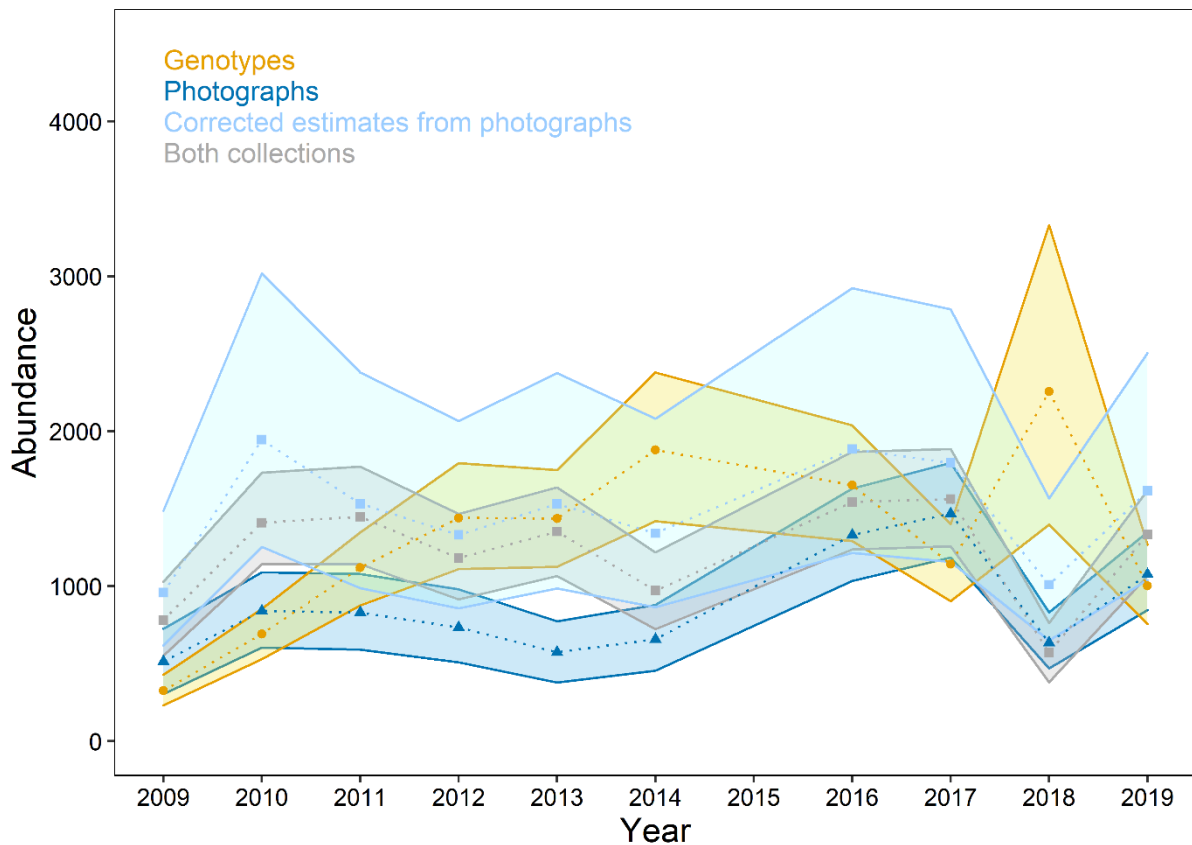


Figure 13. Abundance estimation for the fin whale (*Balaenoptera physalus*) with associated 95% confidence intervals, for photo-identification, microsatellite genotype, both collections, and for corrected estimates from photographs.

For the photograph collection, the best model was model 5 (QAICc: 162.0; **Table 6**) with heterogeneity in the recapture probability. Similar to the genotype collection, the three models with constant survival had more support than those with time effect. The probabilities were 0.969 (95% CI: 0.504-0.999) for survival and 0.118 (95% CI: 0.001-0.944) for high recapture probability (p_{high}) and 0.043 (95% CI: 0.018-0.100) for low recapture probability (p_{low}). This collection provided a global abundance of 866 individuals during the entire period surveyed (95% CI: 764-969). Annual abundance estimates varied from 514 (95% CI: 304-725) in 2009 to 1,468 (95% CI: 1,185-1,797) in 2017 (**Figure 13**). Those values were corrected each year for the total population abundance, which ranged from 958 (95% CI: 618-1,487) in 2009 to 1,946 (95% CI: 1,254-3,020) in 2010. The global corrected abundance for the fin whale population was estimated at 1,495 individuals from all samples collected through 2008 to 2019 (95% CI: 1,387-1,602).

For combined collections, comparison of the six models indicated that the model that best fit the data was model 1 (QAICc: 259.6, **Table 6**), with constant recapture probabilities (p) and a constant survival (ϕ). The survival probability was 0.924 (95% CI: 0.808-0.972) and the recapture probability 0.052 (95% CI: 0.038-0.072) for model 1. The global abundance of fin whales in the study area was estimated at 1,215 individuals (95% CI: 1,109-1,322) and estimates varied from 572 (95% CI: 381-762) in 2018 to 1,562 (95% CI: 1,257-1,886) in 2017 (**Figure 13**).

Table 6. Cormack-Jolly-Seber models fitted to data from 2008 to 2019 for photo-identification and microsatellite genotype collections. Npar: number of parameters; AICc: Akaike Information Criterion; \hat{c} : parameter of the deviance of the given model relative to the most parameter-saturated model; QAICc: Quasi-likelihood AICc; Δ QAICc: difference in QAICc with the best-fitting model. Φ : survival probability; P : recapture probability; c : parameter is constant over time; t : parameter varies with capture occasion; m : parameter is heterogeneous.

Collection	Models	Npar	AICc	\hat{c}	QAICc	Δ QAICc
Photo-identification	5. $\phi c Pm$	4	513.6	3.28	162.0	0
	2. $\phi c Pt$	11	513.0	3.44	164.3	2.3
	1. $\phi c Pc$	2	509.6	3.10	167.2	5.2
	4. $\phi t Pt$	20	530.5	3.78	169.1	7.1
	6. $\phi t Pm$	13	527.8	3.45	171.1	9.1
	3. $\phi t Pc$	11	523.5	3.34	172.0	10
Microsatellite genotype	2. $\phi c Pt$	11	678.7	3.62	203.2	0
	5. $\phi c Pm$	4	683.6	3.34	209.9	6.7
	1. $\phi c Pc$	2	679.5	3.25	211.7	8.5
	3. $\phi t Pc$	11	692.2	3.48	214.6	11.4
	4. $\phi t Pt$	20	695.4	3.66	218.5	15.3
	6. $\phi t Pm$	13	696.4	3.37	224.6	21.4
Both collections	1. $\phi c Pc$	2	883.2	3.44	259.6	0
	2. $\phi c Pt$	11	875.7	3.58	260.2	0.6
	4. $\phi t Pt$	20	892.3	3.84	261.5	1.9
	5. $\phi c Pm$	4	887.3	3.44	263.6	4
	3. $\phi t Pc$	11	892.8	3.47	272.5	12.9
	6. $\phi t Pm$	13	897.0	3.47	276.5	16.9

2.5 Discussion

In this study, we used the CJS model based on an extensive dataset, allowing access to a large catalogue of genotypes and photographs, with a total of 470 individuals that were clearly differentiated and identified by genotypes and 332 by photographs. In total, 546 fin whales were identified in the Northwestern Mediterranean Sea.

For each collection (photographs and genotypes) a minimum of 15% recapture was recorded, meaning that approximately 85% of individuals were only seen once. A large number of unseen individuals and constant growth of the cumulative number of identified individuals (**Table 4**) suggest that the entire population was far from being observed, even with 10 years of recurrent monitoring. Moreover, new individuals joined this population every year (births, immigration) yet the percentage is unknown. However, the existence of inter-annual recaptures indicates that some individuals are either sedentary or return regularly to this area, suggesting a relative site fidelity for the Northwestern Mediterranean Sea. Nevertheless, this fidelity only concerned a minor part of the population when considering the total number of individuals identified (546 fin whales) and the highest population estimate (~1,500 individuals) in a single area, representing only 3.6% of the surface of the Mediterranean. Greater site fidelity would imply more recaptures. Even so, a site fidelity was already confirmed (Forcada et al. 1995; Laran and Gannier 2008) and justified by a remarkable primary production during the summer, inducing a large abundance of krill *M. norvegica* (Labat and Cuzin-Roudy 1996).

From the capture-recapture model, the global abundance obtained from the genotype collection, the combined collections, and from the photographs were similar, with estimates varying between 1,200 and 1,500 individuals. The estimate from the photograph collection was lower than the three others. This difference is due to the quality control applied to the photographs which considerably reduces the size of the final collection (Friday et al. 2008); by half in our case. With the quality control, animals with no permanent marks and no distinguishable characteristics are excluded from the collection and subsequently in the estimate of total population size (Urian et al. 2015). For this reason, the abundance was corrected to take into account unmarked individuals. Concerning the combined collections, we might expect to have a higher abundance, or at least a more precise estimate, than those from the two separate collections (Madon et al. 2011). Surprisingly, this was not the case. One explanation may be that the simpler data-fitting model had constant survival and recapture probabilities compared to other models used in this study. A method was developed by Madon *et al.* (2011) to estimate abundance from two sources of data, but they found that the abundance may be underestimated

due to heterogeneity in recapture probability and due to the difficulty to obtain a correct adjustment factor, which is the ‘Probability of true identity’ (Bonner 2013). For these reasons we did not use this model.

It is not surprising that similar abundance estimates resulted from models which used the genotype collection and corrected photograph estimates, as the data were collected at the same time and because the overlap between the two collections was high (45.6%). Another study presented similar abundance estimates and an overlap at 16% for the New Zealand right whale population, between photograph and genotype collections (Carroll et al. 2011) due to data collected from the same platform. In another study which estimated the abundance of humpback whales in New-Caledonia, the estimate from the genotype collection was higher than those yielded from the photograph collection (Madon et al. 2011; Constantine et al. 2012), and the inverse for a similar study conducted for the west South African population (Barendse et al. 2011) and likely dependent on the sampling effort regionally dedicated to each method. Indeed, by increasing the sampling effort, the number of recaptures will also increase, and the abundance estimate will be more precise. Constantine *et al.* (2012) also mentioned the inclusion of transients in the genotype collection, which has important consequences on the estimation of abundance, especially for males. Our results indicate that independent of the best fit model, if the sampling effort is similar and estimates from photographs are corrected, the abundance estimates are similar.

In light of the similarities between each global estimation, we chose as an ecological indicator for conservation the slightly more precise abundance estimate from the genotype collection, equating to 1,295 fin whales (95% CI: 1,116-1,474) which visit the Northwestern Mediterranean Sea during the summer season. Our estimates contribute to the knowledge about this species. The total number of fin whales present in the entire Mediterranean Sea still remains unknown, but some estimates exist at different spatial scales. At the occidental basin scale, 3,500 individuals were estimated (95% CI: 2,130-6,027; Forcada *et al.*, 1996), 1,800 in the Northern part of this basin (Notarbartolo-di-Sciara et al. 2003), and 901 individuals (95% CI: 591-1,374) in the Ligurian-Corsican-Provencal basin (Northeastern part of occidental basin; Forcada *et al.*, 1995). Our spatial scale falls within the limits established by the two previously defined spatial scales, and the estimate we obtained from the genotype collection is congruent with previous ones, but rests in the low range.

We chose to use the estimates from the genotype collection for the reliability of the genetic identification of individuals. In this study, a large number of microsatellite markers

were used (29) and a maximum of eight missing data in the genotype were considered. Given that 14 markers are enough to identify an individual (Rew et al. 2011) if the probability of identity is low (Paetkau et al. 1995), we have considerably reduced the number of errors in the genotype due to misidentification of microsatellites which would lead to an upward bias in abundance estimates by classifying recaptures as new captures (Lukacs and Burnham 2005; Wright et al. 2009). However, obtaining a biopsy is technically more complicated and invasive than taking a photo. It requires the person sampling to be much closer to the whale than what is required for the photographic approach, and may also introduce some individual heterogeneity in recapture probability. This could be a result of individuals responding differently to being approached by boats. A study revealed that for 20% of re-sighted humpback whales, no biopsy was collected (Barendse et al. 2011). However, if this percentage is confirmed, we should observe a difference between the estimate from genotypes and the corrected estimate from photographs, but it is not the case. Furthermore, a potential heterogeneity in recapture probability was thus assessed in our analyses.

The CJS model used to estimate abundance of the fin whale generated an individual survival probability, that it is a product of true survival and permanent emigration. Survival probabilities varied between 0.924 and 0.969 for the three models. These values are consistent with the estimated value for a whale population which is homogeneously structured, with sexual parity (Buckland 1990). These survival probabilities are also typical for a long-lived species (Bloch et al. 1993; Verborgh et al. 2009). These probabilities represent the survival probability of mature and immature individuals because they were indistinguishable from photographs and genotypes. Immature survival is typically lower than mature survival and survival probability tends to increase as the animal approaches maturity (Gaillard et al. 1998). It is thus likely that the actual value for mature individuals alone will be higher than those estimated in this study. This high probability of survival could also be less precise due to the short length of the study relative to the long generation time of the fin whale (25.9 yr; Taylor *et al.*, 2007), which is more than twice as long as the study period.

Our updated estimate of abundance and its trends will be useful for future fin whale conservation and management planning efforts in this area. The Mediterranean Sea is a biodiversity hotspot and includes a large number of cetaceans (Viale 1985). The fin whale is the second most commonly observed species after the striped dolphin, and migrates to the Northwestern part for feeding during summer, while the vessel traffic is high (Notarbartolo-di-Sciara et al. 2003; Panigada et al. 2006). Collisions with large vessels present a major

conservation issue for the fin whale because they represent the primary fatal threat (Pace et al. 2015). The number of stranded fin whales from 1990 to 2009 was constant over time with an average of 2.5 individuals per year (Dhermain et al. 2015). Our photograph collection revealed that 3.3% of fin whales displayed marks from ship-strikes. This rate is higher than the rate that was estimated between 1990 and 2001 for the same region (2.4%; Panigada *et al.*, 2006). Obviously, the number of ship-strikes is underestimated for the fin-whale, because generally not all ship-strikes are reported. Estimates of abundance did not show a significant declining trend. Some slight variations are visible from one year to another, and as researchers previously explained, these variations could reflect the overall trend in the fin whale population (Laran and Gannier 2008), or artefacts within the variability of inter-annual recaptures. Furthermore, detecting changes in abundance from abundance estimates is notoriously difficult for cetaceans as discussed by Taylor *et al.* (2007b) and by Authier *et al.* (2020). Taylor *et al.* (2007b) recommend annual surveys, over a minimum period of at least 15 years, and the use of models that include covariates to remove some of the “noise”, which we did. However, to demonstrate these variations and the underlying reasons for them (anthropogenic or natural threats), ecosystem models and demographic parameters such as recruitment, immigration rate, and birth interval, are needed.

Acknowledgements

We thank WWF-France for providing photographs and samples from *Balaenoptera physalus*. We are also grateful to all the volunteers of WWF-France who participated in the campaigns at sea. We also thank J. Almany for English corrections.

Funding information

This research was funded by WWF-France and ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, grant CIFRE n°2017/0124).

Author contributions

Céline Tardy: Conceptualization; data curation; formal analysis; investigation; methodology; visualization; writing – original draft; writing – review & editing. **Denis Ody:**

Conceptualization; data curation; supervision; writing – review & editing. **Olivier Gimenez:** Methodology; writing – review & editing. **Serge Planes:** Conceptualization; resources; supervision; writing – review & editing.

Declaration of interests

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval: All applicable national and/or institutional guidelines for sampling, care, and experimental use of organisms for the study were followed, and all necessary permissions and approvals were obtained.

Consent to participate: Consent on behalf of all the authors

Consent for publication: Consent on behalf of all the authors

Data availability statement

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on request.



Chapitre 4

Taille efficace actuelle et historique de la population de Rorqual commun en Méditerranée Nord-occidentale

Submitted in Molecular Ecology: Tardy, C., Planes, S., Ody, D., Boissin, E. Contemporary and historical effective population sizes in the Mediterranean fin whale population, *Balaenoptera physalus*

1. Introduction

La troisième partie des résultats de cette thèse est consacrée à l'estimation de la taille efficace de la population de Rorqual commun de Méditerranée mais aussi à son évolution au fil des siècles et millénaires passés.

La taille efficace correspond au nombre d'individus participant « efficacement » à la génération suivante. Ce paramètre est important en conservation car il peut être impacté par des facteurs environnementaux, comportementaux, ... De plus, si l'échantillonnage est représentatif de la population, ce paramètre donnera l'information sur la totalité de la population et non sur une « sous-population » comme le fait l'abondance (qui estime le nombre d'individus présent dans une zone d'étude). C'est pourquoi au sein du chapitre précédent, nous avons estimé la taille de la population dans la Méditerranée Nord-occidentale, alors que dans ce chapitre nous estimons la taille efficace de toute la population Méditerranéenne. Pour réaliser les analyses présentes dans ce chapitre, les haplotypes identifiés au sein de la première partie des résultats seront utilisés.

En résumé, cette étude vise à répondre principalement à ces questions : 1) Quelle est la taille efficace actuelle de la population de Rorqual commun présente en Méditerranée ? 2) Quelle a été l'évolution de la population de Rorqual commun pendant les dernières centaines de milliers d'années ?

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis dans la revue internationale *Molecular Ecology*.

Tardy, C., Planes, S., Ody, D., Boissin, E. Contemporary and historical effective population sizes in the Mediterranean fin whale population, *Balaenoptera physalus*

2. Article

Contemporary and historical effective population sizes in the Mediterranean fin whale population, *Balaenoptera physalus*

Céline Tardy^{1,2,*}, Serge Planes^{2,3}, Denis Ody¹, Emilie Boissin^{2,3}

¹ WWF-France, Paris, France

² PSL Research University: EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, 66860 Perpignan, France

³ Laboratoire d'Excellence "CORAIL", Perpignan, France

* Corresponding author: celine.tardy63@gmail.com

Keywords: Fin whale, *Balaenoptera physalus*, Mediterranean Sea, historical effective size, contemporary effective size, mitochondrial DNA, nuclear DNA

2.1 Abstract

The fin whale, *Balaenoptera physalus*, is the largest species of cetacean found in the Mediterranean Sea. This population faces multiple anthropogenic threats as a consequence of living in a heavily populated sea, and is confirmed to be genetically isolated from the Atlantic population. The present study investigates the effective population size through time, to understand how the population has evolved over millions of years to the present within the Mediterranean Sea. The dataset consists of 495 skin samples collected between 2006 and 2019 in the Northwestern Mediterranean Sea. Historical and contemporary effective population sizes were estimated using nuclear and mitochondrial markers. The contemporary effective size was estimated between 400 and 500 individuals, also defined as a minimum threshold to maintain sufficient evolutionary potential in perpetuity. Similar to results reported in previous studies, a slight decrease in effective size is observed over millions of years, and a steep decline can be detected starting from 260,000 years ago. These new estimates highlight a risk of extinction for the Mediterranean fin whale population and further conservation measures should be taken to limit any further decrease in their population.

2.2 Introduction

In conservation, high levels of genetic diversity together with low levels of inbreeding are important to maintain viable, long-term populations. For this reason, the concept of effective population size (N_e) was developed and corresponds to the size of an idealized population with the same amount of genetic drift as in the actual population being considered (Wright 1931). This concept was originally established for non-overlapping generations (Wright 1931) but was later extended to overlapping generations (Felsenstein 1971) and structured populations (Caballero 1994). Different methods have been developed to quantify N_e , and these methods can be based on different spatial (local vs global) and temporal scales (contemporary vs historical; see Ryman et al. 2019). Under equilibrium conditions and with large and constant population sizes, all of the N_e estimators tend to have similar values for a given method (Hill 1972; Whitlock and Barton 1997). This is because N_e can be influenced by many environmental, demographic, and behavioral factors as well as the abundance and isolation of habitat (Allendorf and Luikart 2009). A variety of approaches are used to estimate N_e using either genetic or demographic data. The genetic approaches can be based on the level of heterozygosity, fluctuations in allele frequencies, linkage disequilibrium among loci, or pedigree inbreeding coefficient (Frankham et al. 2002). Depending on which genetic approach is used, a historical and a contemporary N_e can be assessed. Contemporary N_e can be estimated from nuclear microsatellite markers whereas historical N_e must be estimated from mitochondrial DNA (mtDNA). Both estimates are required to better understand the population evolution, dynamics, and conservation biology (Frankham et al. 2002). Reductions in population size will result in a loss of genetic diversity and an increase in inbreeding, which together result in an increased extinction risk that must be considered in the conservation of endangered species. Tracking historical changes in distribution and abundances enables us to better understand how past climate changes have influenced the diversification of lineages, and enable predictions for future climate scenarios to be made, over both short-term and long-term periods (Fordham et al. 2014).

Combining estimates of contemporary and historic N_e is particularly relevant for species and populations that have been extensively exploited (e.g. whales) and which are now endangered. For endangered wild species, estimating effective population size and monitoring its change over time is critical to evaluate the status of its genetic health, and to integrate the risk of inbreeding and inbreeding depression, which together allow for a robust assessment of the risk of extinction to be made (Wang et al. 2016). Whaling dramatically reduced the size of

many baleen whale populations, including the blue whale (*Balaenoptera musculus*) and the fin whale (*Balaenoptera physalus*; Clapham and Baker 2018) populations, which had important consequences for their distribution, connectivity, and genetic diversity. Some populations now show signs of recovery (e.g. George et al. 2004; Rugh et al. 2005; Pavanato et al. 2017) whilst others remain very small (Kraus et al. 2005; Wade et al. 2011; Bradford et al. 2017). Their lack of recovery is largely explained by indirect modern anthropogenic threats, such as entanglement in fishing gear and ship strikes (Panigada et al. 2006; Moore 2014; Vianna et al. 2016), since these species are still highly protected and thus no longer face direct threats, such as whaling. However, questions about the natural capacity of these populations to recover after having dropped to very low effective population sizes remain unanswered.

Many cetacean phylogeny studies based on the mitochondrial genome (Archer et al 2013; Morin et al 2010) or particular gene regions have been published, such as those which focused on the control region (D-loop; Hatch et al 2006; Jackson et al 2014; Pomilla et al 2014) and cytochrome b (Amaral et al 2012; May-Collado and Agnarsson 2006; McGowen et al 2009). Nevertheless, temporal dynamics remain inconclusive, and only a single study explored the demographic history for all baleen whales (Árnason et al. 2018). However, the authors did not address the population size changes for each population of cetacean and instead focused on a global vision. Their main result shows a decreasing N_e for all baleen whales from just after the Plio-Pleistocene transition (2.6 Mya) to the present. While this provides a general trend for the effective population size for baleen whales, this work is limited for use in conservation planning since conservation management requires that each population be considered as independent such that each population can be attributed its own conservation status (Allendorf and Luikart 2009).

The fin whale, *Balaenoptera physalus*, is the only baleen whale known to be present in the semi-closed Mediterranean Sea. However, this species is among the least studied of all cetaceans in the Mediterranean Sea due to its pelagic distribution and behavior, and this population is among the least known of all fin whale populations. The Mediterranean population of fin whales is distinct from those of the North Atlantic, and has been estimated at 3,600 individuals in the western basin (Forcada et al. 1996), with 1,300-1,500 individuals estimated for the Northwestern part (Tardy et al. submitted). The genetic consequences in small populations depend on the effective population size rather than on the number of individuals in the population (i.e. census size; Frankham et al. 2002). The effective population size is typically much lower than census size, and it is generally assumed that N_e usually corresponds to 10%

of the total population size (Frankham et al. 2002; Allendorf and Luikart 2009). But clearly this ratio is highly variable and specific analyses must be conducted to calculate effective and total population sizes. In whales, a recent study estimated an effective population size of ~28,300 individuals for the fin whale in the eastern North Pacific and approximately 330 individuals in the Gulf of California (Rivera-León et al. 2019). The census population sizes were already calculated for the eastern North Pacific population (8,000-11,000; Barlow et al. 1995) and for the Gulf of California population (546 individuals; Tershy et al. 1990). In whales, it is clear that the ratio between effective and total population sizes is variable. In the present work, we investigate the effective population size of the Mediterranean fin whale population, and its evolution through time, from past to present, in order to acquire information which is critical to the improved protection of this vulnerable species.

Genetic methods are the most direct for N_e estimation because they assess levels of drift, integrated over all possible causes, between generations and thus provide a baseline. Several genetic methods are available, and for that reason, in this paper, we associated estimations from mtDNA and nuclear data. However, the mitochondrial and nuclear datasets were not combined into a single analysis due to the domination of the mtDNA on the nuclear information, as mtDNA presents a high variation and a low assumed ploidy (Jockusch et al. 2015). For the estimation of contemporary N_e , we compared four approaches using a nuclear microsatellite dataset. We then retraced past demographic changes using a mitochondrial dataset. Allying both estimates allowed us to discuss population evolution and extinction risks. For example, in Yellowstone grizzly bears (*Ursus arctos*; Miller and Waits 2003), the contemporary N_e estimate suggests a risk of extinction due to a low genetic diversity and a decrease in N_e . However, historical samples prove a historically low genetic diversity and a very low rate of decline. Further, N_e currently seems to be higher (~100) than it was during the 20th century (~80). The viability of the population is unlikely to be substantially reduced by genetic factors over the next several generations (Miller and Waits 2003). This study shows that it is important to consider and compare both historical and contemporary parameters, such as N_e , within a conservation perspective.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Sample collection and DNA extraction

Tissue samples were collected during boat surveys between 2006 and 2019, except in 2015 where no sampling campaign was done. Surveys were conducted in the Northwestern Mediterranean Sea (**Figure 14**), including the western part of the Pelagos Sanctuary (i.e. an International Sanctuary for Marine Mammals). Tissue samples (N=495) come from biopsy darts fired from a crossbow. Samples were stored in 70% ethanol. DNA was extracted from the epidermal layer using the Genra PureGene tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany).

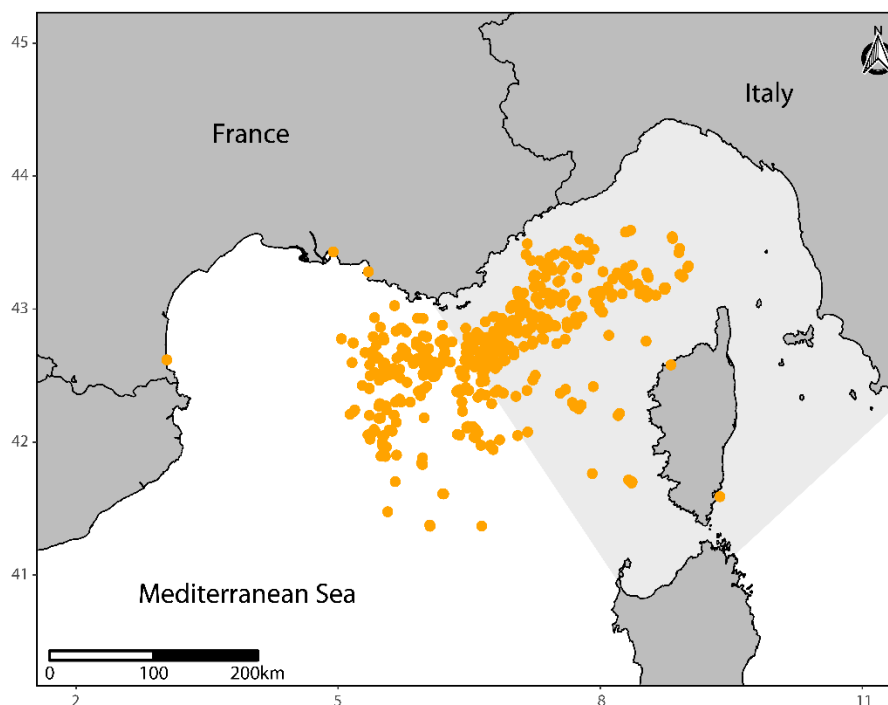


Figure 14. Map of the fin whale samples, *Balaenoptera physalus*, collected in the Northwestern Mediterranean Sea.

2.3.2 Microsatellite molecular analyses

Thirty-two cetacean di-, tri- and tetra- nucleotide microsatellite loci were used in six multiplexes (Valsecchi and Amos 1996; Palsbøll et al. 1997b; Bérubé et al. 1998, 2000, 2005; Tardy et al. 2020). PCR amplifications were performed following Tardy et al. (2020). The allele size in base pairs was identified manually using GENEMAPPER software v.5 (Applied Biosystems). All ambiguous peak profiles were considered as missing data. For one genotype, the maximum number of missing data was eight for 32 microsatellite markers. Controls for the presence of null alleles, stutters, and large allele dropout were performed using MICRO-

CHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). The presence of null alleles was detected in three loci (Bp1430262, Bp747752, and Bp1003953), no evidence of scoring errors or large allele dropout was present in any other loci. Following Tardy et al. (2020), these three loci were removed for all further analyses. Consequently, we screened a total of 29 loci on 495 samples. The total number of alleles, observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities, and inbreeding coefficient (F_{IS}) were calculated using GENETIX v.4.05.2 (Belkhir et al. 2004).

2.3.3 Mitochondrial DNA analyses

A 465 bp fragment within the mtDNA control region was amplified with primers TRO (Archer et al. 2013) and D (Rosel et al. 1994). PCR amplifications were performed using Taq DNA Polymerase kit (Roche, Penzberg, Germany) in 25 μ L total volume reactions containing 2.5 μ L PCR Reaction Buffer with $MgCl_2$ at 10X, 2.5 μ L oligonucleotide primers at 2 μ M, 0.125 μ L Taq DNA Polymerase at 5X, 0.6 μ L of each primer at 10 μ M, 2.5 μ L of DNA template at 50 ng/ μ L and TE pH8 buffer to complete the reaction volume. Amplifications were carried out as follows: 2 min 30 s at 94°C, followed by 35 cycles of 45 s at 94°C, 1 min at 56°C, 1 min 30 s at 72°C and a final extension for 5 min at 72°C. PCR products were sent to GenoScreen platform (Lille, France) for sequencing to be run on an Applied Biosystems 3730 sequencer. The nucleotide polymorphisms were confirmed by sequencing PCR products in both directions. Sequences were quality checked and aligned using Geneious v.5.5.9 (Kearse et al. 2012). The final alignment was composed of 490 sequences (five samples have failed) and was performed using ClustalW with default parameter values (Thompson et al. 1994).

2.3.4 Contemporary effective population size

To estimate the contemporary effective population size (N_e) of the Northwestern Mediterranean population using the microsatellite dataset, we used four methods which are implemented in three software (LDNE v.1.31, Waples and Do 2008; NeEstimator v.2.1, Do et al. 2014; COLONY v.2.0.6.5, Jones and Wang 2010): a method based on linkage disequilibrium (LD), the heterozygote-excess method, the molecular co-ancestry method and the sibship assignment method. The first method is based on the fact that genetic drift generates nonrandom association among alleles in different loci and is generally useful for estimating N_e with highly polymorphic markers (Waples and Do 2008). The second method is based on the number of breeders that produced the sampled progeny based on a genotype dataset; the number of

breeders is conversely correlated to the number of heterozygotes (Zhdanova and Pudovkin 2008). The third method is based on the number of alleles shared among sampled individuals (Nomura 2008). The fourth method is based on the occurrence of full-sibs and half-sibs among sampled individuals (Wang 2009). These four methods have the advantage that only a single cohort is considered, though we cannot estimate how many generations are overlapping.

2.3.5 Demographic reconstruction

We tested for deviations of the mitochondrial site frequency spectrum from the neutral model using two parameters of population size changes or selective process: Tajima's D (Tajima 1989) and Fu's F_s (Fu 1997). They were obtained from coalescent simulations using DnaSP v.5.10 (Librado and Rozas 2009). These simulations assume that effective population change (i.e. growth or decline) will reveal a genetic signature different from that observed with a constant population size (Rogers and Harpending 1992). Tajima's and Fu's tests suggest signatures of population expansion when their estimators presented significant negative values and suggest signatures of selection or population bottleneck when their estimators presented significantly positive values (Tajima 1989; Fu 1997).

The microsatellite dataset was also used to detect whether there was a recent bottleneck using Bottleneck v.1.2.02 (Cornuet and Luikart 1996). This software looks at whether or not there is an excess of heterozygosity. The three available tests "sign", "standardized differences" (Cornuet and Luikart 1996), and "Wilcoxon sign rank" (Luikart et al. 1998) were performed under three models (infinite allele model, IAM, stepwise-mutation model, SMM, and two-phased model, TPM) with default parameters. For the three tests, the null hypothesis predicts no significant heterozygosity excess, i.e. no recent bottleneck. The sign test compares the difference between the observed and the expected heterozygosity across all loci, whereas the standardized test considers the magnitude of the heterozygosity excess/deficiency, i.e. it divides the difference between observed and expected by each standard deviation (Cornuet and Luikart 1996). The Wilcoxon test is non-parametric and it proposes an indicator of the allele frequency distribution which discriminates bottlenecked population from stable populations (Luikart et al. 1998). The Mode-shift indicator test was also used to detect potential bottlenecks, it is a graphical descriptor of the shape of the allele frequency distribution (Luikart et al. 1998). A natural population without a bottleneck has a large proportion of alleles at low frequencies. In this test, the alleles are grouped into ten frequency classes to investigate whether the distribution

follows the normal L-shaped form, i.e. where alleles with low frequencies (<0.2) are the most numerous.

Finally, we also tested for demographic changes in effective population size using the Bayesian skyline plot framework (BSP; Ho and Shapiro 2011) applied to the 490 mitochondrial control region sequences. This analysis was performed using the software BEAST v.1.10.4 (Suchard et al. 2018). The calibration age prior was defined as a minimum of 4 Mya between *Balaenoptera physalus* and *Megaptera novaeangliae*, which are the two phylogenetically closest species (Dornburg et al. 2012; Yu et al. 2017; Cabrera et al. 2019). Following the results of the analysis with MrAic v.1.4.6 (Nylander 2004), we selected the HKY+I model as the best fit model of nucleotide substitutions. We used a relaxed molecular clock model, which allows substitution rates to vary across branches according to an uncorrelated lognormal distribution (Drummond et al. 2006). A mean mutation rate ranging from 0.025 to 0.045 (substitutions per site per My), previously used for the control region in suborder Mysticeti or genus *Balaenoptera* (Roman and Palumbi 2003; Alter et al. 2007), was applied.

The BSP is a piecewise-constant coalescent model, in that it allows several different constant population sizes to have existed throughout the sampled evolutionary history (in this case, 10 different population sizes) and then averages these estimates across a posteriori-sampled tree. Ten Monte Carlo Markov Chains (MCMC) were run for 10 million iterations with thinning every 100 iterations. The ten replicates were combined, and re-sampled using LogCombiner v.1.10.4 (as part of the BEAST package) to reach Effective Sampling Sizes of 200 (as advised by the developers), with a discarded burn-in of 20%. Then, Tracer v.1.7.1 (Rambaut et al. 2018) was used to compute the Bayesian Skyline Plots.

2.4 Results

2.4.1 Genetic diversity

Microsatellite polymorphism varied between three to 18 alleles per locus with a mean of 10.172 (**Table S1**). The mean value of expected heterozygosity (H_E) across loci was 0.749 ± 0.144 and varied between 0.283 (Bp1311471) and 0.909 (GATA417). The mean value of observed heterozygosity (H_O) across loci was 0.746 ± 0.145 and varied from 0.270 (Bp1311471) to 0.919 (GATA417). The inbreeding coefficient calculated for all loci was not significant ($F_{IS} = 0.005$), while four loci presented significant excesses or deficits of heterozygotes. However, these four loci were kept for the rest of the analyses.

The sequencing of the mtDNA in the control region revealed a total of 11 polymorphic sites resulting in eight haplotypes (**Table S2**). The haplotype diversity was 0.501 and the nucleotide diversity 0.00461.

2.4.2 Contemporary effective size estimation

Contemporary estimates of effective population size from microsatellite data (from 29 markers) were relatively similar, ranging from 396 to 504 individuals (**Table 7**), and independent of the method or the software used. However, only two methods from three software were reliable, those based on sibship assignment and linkage disequilibrium, as estimates from molecular co-ancestry or heterozygote excess were infinite.

Table 7. *Effective population size estimates (N_e) for the fin whale population as calculated by four different methods and three distinct software, from microsatellite data. CI: confidence interval.*

Method	Ne	CI		Software
		Lower	Upper	
Sibship assignment	396	343	467	COLONY (Jones and Wang 2010)
Linkage disequilibrium	504	455	561	LDNE (Waples and Do 2008)
Linkage disequilibrium	491	415	594	NeEstimator (Do et al. 2014)
Molecular coancestry	∞	∞	∞	NeEstimator
Heterozygote excess	∞	∞	∞	NeEstimator
Heterozygote excess	∞	∞	∞	COLONY

2.4.3 Demographic changes

Microsatellite data used to determine if a recent bottleneck occurred showed the expected number of loci with heterozygosity excess at 16.94, 17.04, and 17.07 for the IAM, TPM, and SMM models, respectively. For the same models, the observed number of loci with heterozygosity excess were 28, 24, and nine. Using the sign test, the three models were significantly positive and indicated a recent genetic bottleneck. The second test with standardized differences also rejected the assumptions of mutation-drift equilibrium in the three evolution models ($P < 0.0005$). The third test based on the Wilcoxon test also indicated an excess in heterozygosity and likely bottlenecks in the IAM and TPM models (**Table 8**), contrary to the SMM model. The Mode-shift test was then used to see the allele frequency distribution.

We detected a slight shift from a normal L-shaped distribution between 0.3 and 0.4 (**Figure 15**).

Table 8. Summary table of the tests used for detecting recent effective population size reductions (“bottlenecks”) from microsatellite data under three evolution models (IAM: Infinite Allele Model, TPM: Two-Phase Model, SMM: Stepwise Mutation Model).

	IAM	TPM	SMM
Sign test (probability)	16.94 (0.000)	17.04 (0.005)	17.07 (0.002)
Standardized differences test (probability)	6.246 (0.000)	3.523 (0.000)	-4.591 (0.000)
Wilcoxon test (probability of one tail for heterozygosity excess)	0.000	0.000	0.998

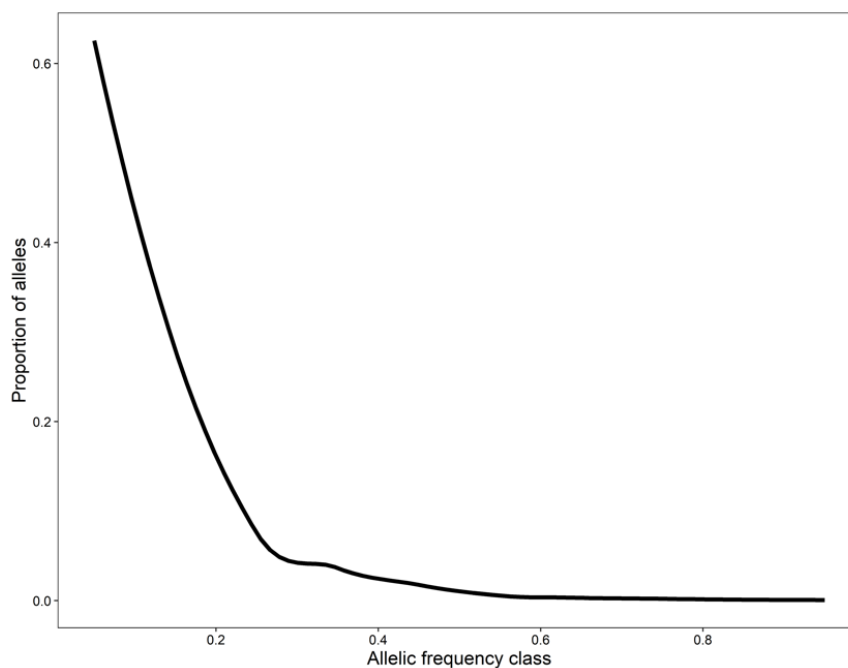


Figure 15. Distribution of allele frequency in the Mediterranean fin whale population ($N = 495$ individuals for 29 microsatellite markers) as inferred from the Bottleneck software.

The mitochondrial dataset suggested no population expansion or selection. Tajima’s D and Fu’s F were both not significant (Tajima’s D : 0.46, p value > 0.10 ; Fu’s F s: 2.83, p value = 0.06).

The most recent common ancestor (MRCA) of the global Mediterranean fin whale population existed approximately 3.68 Mya (95% HPD: 2.66-4.69). The coalescence-based Bayesian skyline plot (BSP) obtained in BEAST provides additional details on how mtDNA diversity changed over time, through to the MRCA. The BSP shows that the fin whale population size has slowly decreased through time (**Figure 16**), which according to the molecular clock used, may have started at around 0.26 Mya until the present day. During this period, the N_e decreased by 3.6 times **Figure S1**).

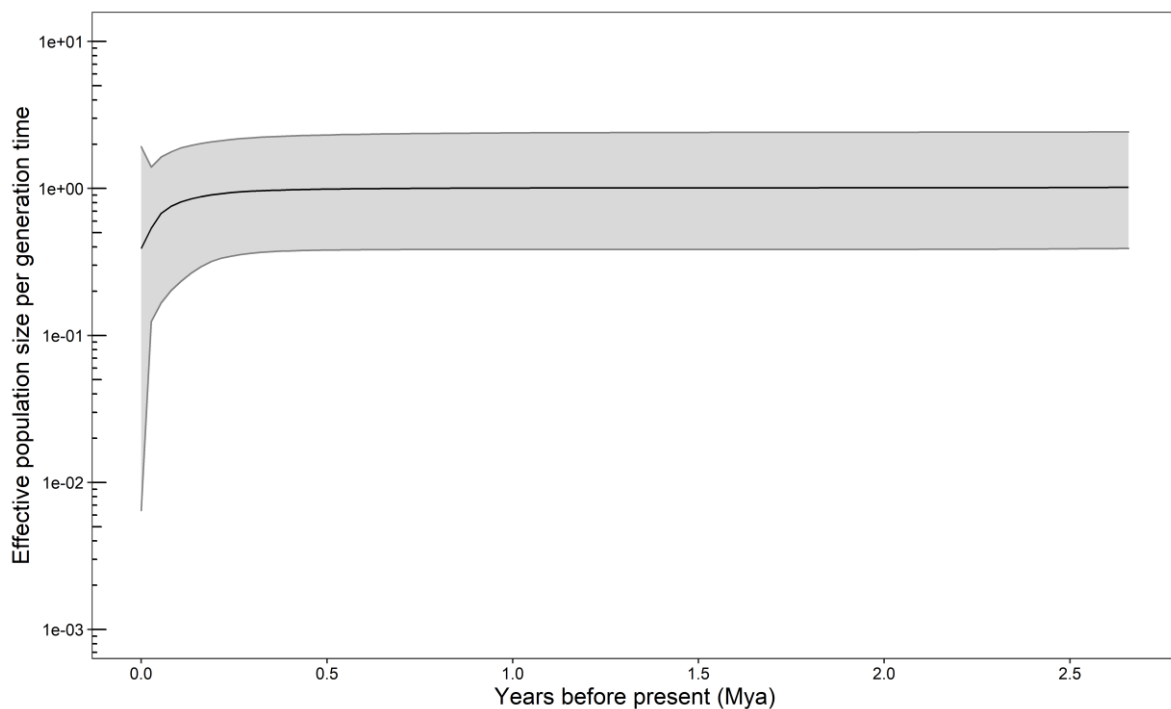


Figure 16. Bayesian skyline plot obtained with the mitochondrial DNA dataset and the Beast package, retracing changes in effective population size for the Mediterranean fin whale population through time (Mya).

2.5 Discussion

In this study, we estimated the contemporary effective population size of the Mediterranean fin whale population and its historical evolution. The motivation for this study stems from results obtained by Árnason et al. (2018), who observed a large decrease in N_e for all baleen whales from 2.6 Mya, which contributed to the isolation of the Mediterranean fin whale population and its small population size.

Present analyses of Mediterranean fin whales revealed a contemporary effective population size at a maximum of 500 individuals. This estimate corresponds to about 15% of the census size of the population estimated for the western Mediterranean basin (3,600 individuals; Forcada et al. 1996). Two reviews on N_e estimates in natural populations of over 100 species of animals and plants reported a ratio of effective to census population size between 10 and 14% (Frankham 1995a; Palstra and Ruzzante 2008). The most important factor which contributes to the reduction of this ratio is the fluctuation in population size, because when the census size decreases, alleles can be lost, but when the census size increases, alleles are not regained (Frankham et al. 2002). For this reason, thresholds for a minimum N_e have been estimated: (1) in the short-term: 50 to minimize inbreeding depression, and (2) in the long term: 500 to maintain sufficient evolutionary potential (Franklin 1980; Allendorf and Luikart 2009). However, other researchers suggest doubling both thresholds (Frankham et al. 2014). Thus, considering a threshold between 500 and 1,000, the Mediterranean fin whale population could be considered at risk and may present a low evolutionary potential.

As explained in two other reviews on N_e (Wang 2005; Luikart et al. 2010), each method has different assumptions and different time-scales on which N_e is measured. Importantly, each method does not use all of the information available in a dataset. For long-lived species, like cetaceans, the linkage disequilibrium method may provide biologically meaningful information about N_e (Waples 1991). However, we chose to estimate the N_e using different methods and across these different methods we obtained similar estimates. Furthermore, we chose to ignore N_e estimates of infinity, since they most likely reflect a lack of statistical power to estimate N_e (Waples 1989).

Among the different populations of fin whales, only one appears similar to our population when aspects of genetic diversity and habitat are considered; the small population present in the Sea of Cortez. Its population (census size) is estimated between 400 and 730 individuals (Urbán Ramírez 1997; Rivera-León et al. 2019) and constitutes a genetically isolated population with a small effective population size, ~360 individuals (Bérubé et al. 2002; Rivera-León et al. 2019). Notably, for this Sea of Cortez population, the census/effective size ratio is between 49 and 90%. This high ratio seems to be explained by a small census size, due to a multitude of recent anthropogenic pressures and a long-term low N_e spanning more than 2000 years (Rivera-León et al. 2019). In the case of the Mediterranean population, today's census size is larger (3,600 individuals; Forcada et al. 1996), which explains the lower census/effective size ratio. The Sea of Cortez population may foreshadow the future trend for

the Mediterranean population. In comparison, the world's other fin whale populations are larger in census size and/or effective size.

However, if we look at effective and census sizes and their ratio in other cetacean populations, we observe higher ratios than ours, independent of the species, the isolation of the population, or the risk of extinction (Bowhead whale: census size $N_c = 8,200$, effective size $N_e = 4,344$ or $1,918$, ratio $R = 52$ or 23% , Rooney et al. 1999; Rough-toothed dolphin: $N_c = 211$, $N_e = 186$ or 95 , $R = 88$ or 45% , Oremus et al. 2012; Bottlenose dolphin: $N_c = 193$, $N_e = 56$, $R = 29\%$, Ansmann et al. 2013; Maui's dolphin: $N_c = 63$, $N_e = 34$, $R = 54\%$, Baker et al. 2016). Similarly, Mediterranean populations showed a different N_e and ratios depending on the species. For instance, the Mediterranean population of Atlantic Bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, presents a smaller ratio than ours with an estimated N_e of 500 individuals, like our species, but with a census size of several thousands of individuals (Riccioni et al. 2010).

Our results demonstrate a high level of heterozygosity (0.749 ± 0.144) for the Mediterranean fin whale. The high values of heterozygosity at the different loci indicate that the population has preserved numerous alleles in most loci when compared to the Sea of Cortez population (mean:0.42, range: 0.12-0.68 ; Bérubé et al. 1998). Furthermore, the non-significant global F_{IS} indicated that the population did not suffer from inbreeding. This might be explained by their migration, social behaviors, and mating system (Whitehead 2003; Valsecchi et al. 2004). However, the Mediterranean population seems to have suffered from a recent bottleneck event, as revealed by the different tests and mutation models used on the microsatellite dataset. It has been demonstrated that the TPM model and the Wilcoxon rank test are more reliable as they have the highest statistical power (Luikart et al. 1998). The Mode-shift test confirms the other tests and shows a slight shift from a normal L-shaped distribution of the allele frequencies. By combination and comparison of these different inconclusive results, several assumptions can be made: i) either a bottleneck occurred in the past (more than ten generations ago; Luikart and Cornuet 1998) or it was too small to be detected (Luikart et al. 1998); ii) our study is not optimum, individuals or polymorphic loci are missing; iii) the population has not suffered from a genetic bottleneck but a demographic bottleneck; iv) the studied population is not completely isolated (Luikart et al. 1998). In the present study, we can reject the second assumption, as we analyzed almost one-quarter of the global population and the loci used are polymorphic (Tardy et al. 2020). The third and the fourth assumptions are the most reliable due to excessive hunting at the beginning of the 20th century (Pace et al. 2015) and by the presence of a reduced gene

flow with North Atlantic conspecifics (Bérubé et al. 1998). The Mediterranean population seems to have decreased to low numbers in the past, but a bottleneck event is still detectable.

Our demographic reconstruction showed a steady decrease over ~2.5 million years and a more recent steep decline since 0.26 Mya. This date coincides with a severe drop in sea level (-115 m) due to cyclic glacial and interglacial periods, which can limit or even block the exchange between the North Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea (Waelbroeck et al. 2002), though the Strait of Gibraltar remained open. This pattern corresponds to the global baleen whales' demographic evolution which shows a notable decrease of N_e after the Plio-Pleistocene transition (2.6 Mya) until 0.4 to 0.3 Mya. A second decrease occurred during the last interglacial period (~0.1 Mya; Árnason et al. 2018). Overall, the global fin whale population seems to have decreased by three over time. Our results are consistent with estimates of the global fin whale population but with a time shift of 0.1 Mya which could be explained by analytical procedures (a mitochondrial fragment against the whole mitogenome). During the bottleneck and the decline, the N_e of the Mediterranean fin whale decreased by 3.6 times when considering a generation time of 25.9 years (**Figure S1**; Taylor et al. 2007).

Based on the present results, the estimated contemporary effective population size of the Mediterranean fin whale is critical as it has reached the minimum limit required to maintain genetic diversity and evolutionary potential across generations in natural populations. Furthermore, the historical demography reconstruction revealed a steady decrease in population size over hundreds of thousands of years with a sharper decline during the last 0.26 Mya. Additionally, signatures of recent bottlenecks were revealed, further emphasizing anthropogenic pressure on whale populations. The demographic history of the Mediterranean fin whale has been marked both by cyclic glacial and interglacial periods and more recently by anthropogenic pressures, as evidenced by the N_e decrease and bottleneck analyses. These results highlight the importance of combining both historical and recent estimates, as they enabled the Mediterranean fin whale population to be considered at risk and present a low evolutionary potential. Conservation measures should be taken to reduce anthropogenic threats such as reducing the speed of ships, avoiding a fragmentation of the habitat by vessel traffic, etc. Furthermore, more genetic analyses (such as kinship identification, inbreeding level, ...) and long-term monitoring are necessary to genetically track each individual and to document the evolution of the population.

Acknowledgments

We thank WWF-France for providing samples from *Balaenoptera physalus*. We are also grateful to all of the volunteers from WWF-France who participated in the campaigns at sea. We thank the reviewers and we thank J. Almany for English corrections.

Authors' contribution

Conceptualization, C.T., E.B., S.P.; Formal analysis, C.T.; Resources, C.T, D.O., S.P.; Writing – original draft preparation, C.T.; Writing – review and editing, C.T., E.B., D.O., S.P.; Visualization, C.T.; Supervision, E.B., D.O., S.P.

Funding

This research was funded by WWF-France and ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, grant CIFRE n°2017/0124).

Declaration of interests

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval: All applicable national and/or institutional guidelines for sampling, care, and experimental use of organisms for the study were followed, and all necessary permissions and approvals were obtained.

Consent to participate: Consent on behalf of all the authors

Consent for publication: Consent on behalf of all the authors

Supplementary Information

Table S1. Statistical summary of microsatellite markers used on fin whale, *Balaenoptera physalus*, samples. H_E : expected heterozygosities; H_O : observed heterozygosities; F_{IS} : inbreeding coefficient; * indicates significant values of F_{IS} with * p -value < 0.05, ** p -value < 0.01.

Locus	Number of alleles	H_E	H_O	F_{IS}
Bp1125752	7	0.7211	0.7253	-0.005
Bp1178841	18	0.8438	0.8404	0.005
Bp451306	11	0.7879	0.7566	0.041 *
Bp673257	8	0.7765	0.8097	-0.042 *
GATA098	7	0.809	0.8062	0.004
GT011	7	0.816	0.802	0.018
Bp1229316	6	0.4957	0.4837	0.025
Bp311392	7	0.6811	0.6577	0.035
Bp989588	3	0.443	0.4402	0.007
EV37	16	0.8386	0.8441	-0.006
Bp1043662	10	0.7622	0.7577	0.007
Bp1311471	5	0.2825	0.2698	0.046
Bp1446664	8	0.6523	0.6626	-0.015
Bp740180	16	0.9043	0.885	0.022
GATA417	18	0.9092	0.9187	-0.009
GT122	18	0.8708	0.8603	0.013
Bp1057120	14	0.8666	0.8507	0.02
Bp1357166	7	0.7227	0.7457	-0.031
Bp958405	11	0.8217	0.8012	0.026
GT211	13	0.7899	0.807	-0.021
Bp1069071	7	0.7662	0.7576	0.012
Bp531923	11	0.7799	0.7713	0.012
Bp779455	13	0.8478	0.8223	0.031 *
Bp999219	11	0.8004	0.7991	0.003
TAA023	7	0.7695	0.7542	0.021
Bp1047889	6	0.5939	0.5799	0.025
Bp1418059	14	0.8628	0.8586	0.006
Bp564742	10	0.8532	0.8854	-0.037 **
Bp814420	6	0.6452	0.6741	-0.044
Mean (SE)	10.172 (4.268)	0.7488 (0.1435)	0.7458 (0.1449)	0.005

Table S2. Summary of haplotypes used on fin whale, *Balaenoptera physalus*, samples.

Haplotype	Number of individuals	GenBank
Hap1	77	Fragment of KC572860 ¹
Hap2	333	Fragment of MT4109212.1 ²
Hap3	12	MZ047783 ³
Hap4	54	Fragment of KC572859.1 ¹
Hap5	6	Fragment of KC572856 ¹
Hap6	6	Fragment of KC582218 and KC582151 ⁴
Hap7	1	MZ047784 ³
Hap8	1	MZ047785 ³

¹Archer et al. 2013; ²Unpublished; ³Tardy et al in revision; ⁴ Archer et al. 2019

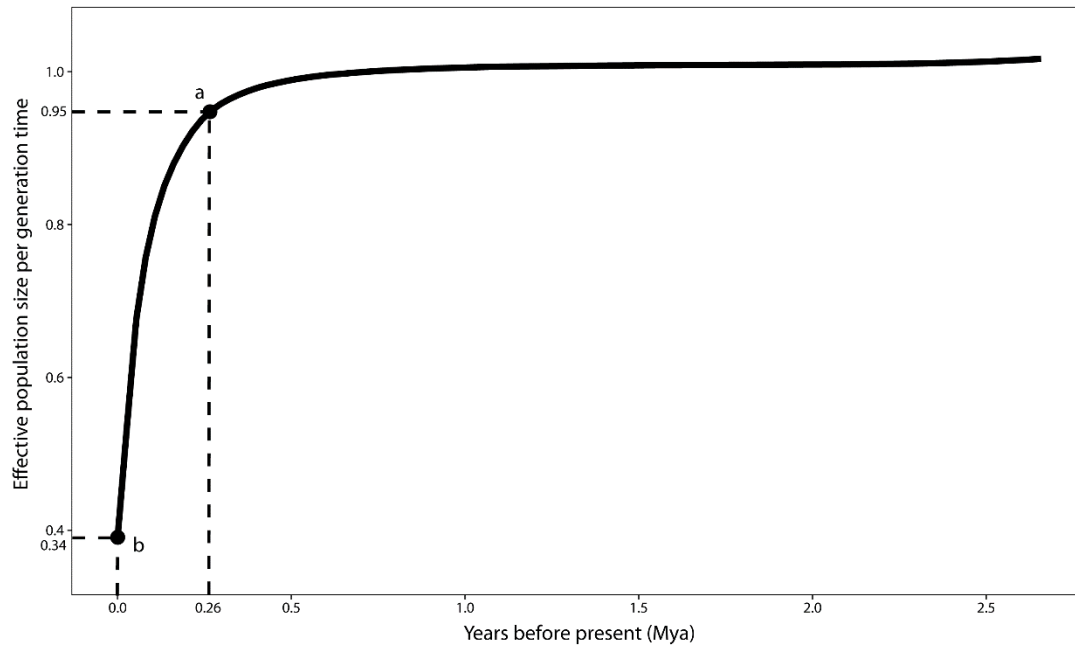


Figure S1. Bayesian skyline plot obtained with the mitochondrial DNA dataset, showing changes in effective population size for the Mediterranean fin whale through time (Mya). The point “a” corresponds to the inflexion point of the curve whereas the point “b” corresponds to the end of the curve.



Chapitre 5

Structure génétique de la population Méditerranéenne de Rorqual commun

Submitted in Scientific Reports: Tardy, C., Boissin, E., Ody, D., Planes, S. Investigation of family structure in the Mediterranean fin whale population reveals a single population, some large family groups and long-distance migration

Submitted in Current Biology: Tardy, C., Boissin, E., Ody, D., Planes, S. Full-sibs demonstrate reproductive fidelity in whales

1. Introduction

La quatrième partie des résultats de cette thèse est consacrée à la structuration de la population de Rorqual commun de Méditerranée, via l'identification des liens de parenté entre les individus échantillonnés. De plus, nous évaluerons si la population a souffert ou non de dépression de consanguinité.

La population Méditerranéenne de Rorqual commun est considérée comme résidente de la zone, donc avec peu d'échanges avec la population de l'Atlantique, et est relativement petite (< 1 500 individus, Chapitre 3). Au vu de ces caractéristiques, les moindres changements environnementaux (naturels ou anthropiques) peuvent largement impacter cette population, notamment en réduisant sa taille. C'est pourquoi, il est important de comprendre comment cette population est structurée pour pouvoir estimer son état de santé et prédire son futur. La décroissance d'une population entraîne un risque d'extinction et favorise la consanguinité. Ces paramètres sont important à prendre en compte dans la conservation d'une espèce.

La réalisation de cette étude a été permise grâce aux développements des marqueurs microsatellites (Chapitre 2). Différentes méthodes d'analyses de parenté ont été utilisées afin d'obtenir des résultats robustes et au plus proche de la réalité. Une fois les liens de parenté identifiés, les familles ont pu être reconstruites. De même, pour étudier la consanguinité différents indicateurs complémentaires ont été utilisés.

En résumé, cette étude vise à répondre principalement à trois questions : 1) Comment la population est-elle structurée ? 2) Est-ce qu'il y a des individus et/ou des familles dominantes dans la population ? 3) Est-ce que la population Méditerranéenne a souffert par le passé de dépression de consanguinité ?

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet de deux articles, un est soumis dans la revue *Scientific Reports*, l'autre est soumis dans la revue *Current Biology*.

Tardy, C., Boissin, E., Ody, D., Planes, S. Investigation of family structure in the Mediterranean fin whale population reveals a single population, some large family groups and long-distance migration

Tardy, C., Boissin, E., Ody, D., Planes, S. Full-sibs demonstrate reproductive fidelity in whales

2. Article 1 : Structure de la population Méditerranéenne de Rorqual commun

Investigation of family structure in the Mediterranean fin whale population reveals a single population, some large family groups and long-distance migration

Céline Tardy^{1,2,*}, Emilie Boissin^{2,3}, Denis Ody¹, Serge Planes^{2,3}

¹ WWF-France, Paris, France

² PSL Research University: EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, 66860 Perpignan, France

³ Laboratoire d'Excellence "CORAIL"

*Corresponding author: celine.tardy63@gmail.com

2.1 Abstract

The Mediterranean fin whale population, *Balaenoptera physalus*, is considered resident and is genetically distinct from the Atlantic population. To date, the global structure, parental links between individuals and an estimate of the level of inbreeding for this population have yet to be fully investigated. In the present study, a total of 508 fin whale samples from the Mediterranean Sea were analyzed using DNA microsatellite markers. The results showed that the population does not demonstrate a regional structure, but instead, is composed of numerous small families (e.g. 74.3% of families had only two individuals). Within these families, we found three pairs of full-sibs, 77 half-sib relationships, and 25 parent-offspring relationships. Despite the small size of the Mediterranean population and its particular habitat, the population does not suffer from inbreeding depression. We introduced further samples from the North Atlantic and the North Sea to test for connections with the Mediterranean Sea and while we confirmed that some minor connections exist, limited gene flow reinforces the view that the Mediterranean population is isolated. The isolation together with the small size of the Mediterranean population support the argument to consider this population as a separate unit in future conservation planning efforts.

2.2 Introduction

Populations are defined as units of interbreeding organisms with autonomous dynamics and recruitment. Determining a population's boundaries and its genetic structure are of great interest because they allow for migration estimates, demography, and population viability to be addressed, along with the definition of conservation units and phylogeographical patterns (Manel et al. 2005). Species are usually subdivided into local breeding populations and while for some species this structuring is easy to infer from the geographical location of individuals, for others, the demarcation of geographical populations is not as straightforward. For most species, the use of phenotypic characters to define a population's structure is extremely difficult, but with the emergence of new genetic approaches this process might become more accessible.

Genetic structure of cetacean species is well known but some key parameters are often missing at the fine-scale population level, such as the level of inbreeding or parentage links between individuals, which are critical to assess a population's health and to predict its future. A greater number of populations are becoming more and more isolated and are shrinking in size due to anthropogenic threats, which decrease the population's evolutionary potential and increase the risk of extinction through inbreeding depression, loss of genetic variation, or the accumulation of deleterious alleles (Keller and Waller 2002; Willi et al. 2006).

The Mediterranean fin whale population, *Balaenoptera physalus*, is considered the second smallest population of fin whales after that from the Sea of Cortez (Bérubé et al. 1998), with 3,600 individuals in the western basin (Forcada et al. 1996) among which 1,300 are present in the Northwestern part (Tardy et al. in revision). The fin whale is present in the central and western Mediterranean and is rare in the southern and eastern parts of the Sea (Cooke 2018). The Mediterranean population is subjected to modern anthropogenic threats among which ship strikes are the main anthropogenic cause of direct mortality (Panigada et al. 2006). Further, the poor water quality in the Mediterranean Sea may indirectly impact their reproduction and life span. This Mediterranean population is considered as isolated with respect to that of the Atlantic, as demonstrated by genetic differentiation between the two populations (Bérubé et al. 1998). Some migration between these two populations has been identified by the presence of a limited gene flow and through satellite tagging of fin whales, between the Mediterranean and the Atlantic (Palsbøll et al. 2004; Bentaleb et al. 2011). The isolation, residency, population

size, and threats raise many questions about the long-term future of the Mediterranean population.

The fin whale is one of the largest living species, and presents a demographic strategy that corresponds to long-lived species. The age of sexual maturity is around nine years, and the generation time for a non-depleted fin whale population is estimated at 25.9 years (Taylor et al. 2007a). Females have only one calf at a time and have long calving intervals of at least two years (Taylor et al. 2007a). This species is either solitary or found in small groups (3-4 individuals), and in the Mediterranean these groups are typically comprised of 1-2 individuals (Notarbartolo-di-Sciara et al. 2003; Panigada et al. 2005). For the fin whale species, some information is still unknown, such as their mating strategy and parentage within a population. In addition, for the Mediterranean population, important conservation parameters such as genetic structure and overall health, have yet to be determined.

The genetic approach is a powerful tool in the study of population structure, making it possible to detect subpopulations and to assign individuals to each (Pritchard et al. 2000). Microsatellite markers have been widely used since the 1990s (Weber and May 1989), and many of these markers have helped to provide valuable information concerning the fin whale (Tardy et al. 2020). Furthermore, these markers allow for inference of pedigrees in wild species where relationship information is impossible to collect through observation.

Microsatellite markers have been widely used to determine the level of inbreeding for both wild and livestock populations (Wang et al. 2016). Inbreeding is the result of a mating between individuals that are more genetically similar than individuals drawn at random from the population (Falconer and Mackay 1996) and reduces reproduction and offspring survival (i.e. inbreeding depression; Charlesworth and Willis 2009).

This study aimed to describe the structure of the Mediterranean fin whale population and parentage links between sampled individuals, and to determine if the population exhibits signs of inbreeding depression with respect to its isolation and small size. Further, we wanted to know if the population was made up of subgroups, if there were families or individuals that were more important than others in terms of reproduction within the population, if the Mediterranean individuals were inbred or if there was an avoidance of reproduction with related individuals. To address these questions, we screened microsatellite DNA markers from the largest sampling effort ever conducted of fin whales from the Northwestern Mediterranean Sea.

2.3 Results

2.3.1 Kinship

The parentage analysis highlighted different types of relationships between the sampled individuals. We found three pairs of full-sibs (BR08-CR10, ER25-GR42, and DR40-MR13), 77 half-sib relationships, and 25 parent-offspring relationships. On average, an individual has between one and two links with other individuals (mean = 1.25, sd = 0.51, **Figure 17A**), with a maximum of three relationships. Overall, the parentage reconstruction revealed 66 families in the dataset (**Figure 18**): one family with eleven individuals (1.5%), one family with six individuals (1.5%), two families with five individuals (3.0%), four families with four individuals (6.1%), nine families with three individuals (13.6%) and 49 families with two individuals (74.3%; **Figure 17B**).

When North Atlantic and North Sea samples were included in the analyses, two half-sib relationships were observed between stranded individuals in the North Atlantic and living individuals in the Mediterranean Sea.

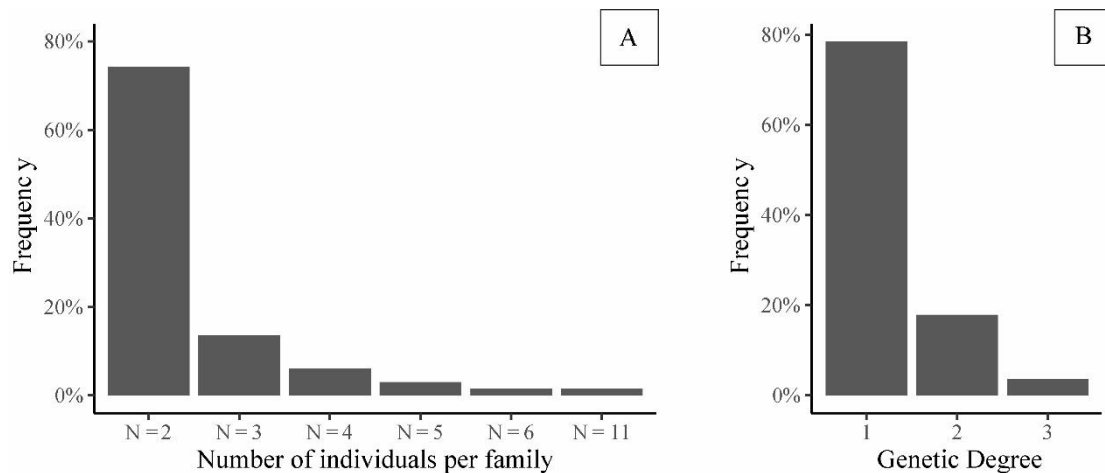


Figure 17. Distribution of the A) Number of individuals per family within the Mediterranean fin whale population, and B) Genetic degree (number of first-order genetic relationships an individual has).

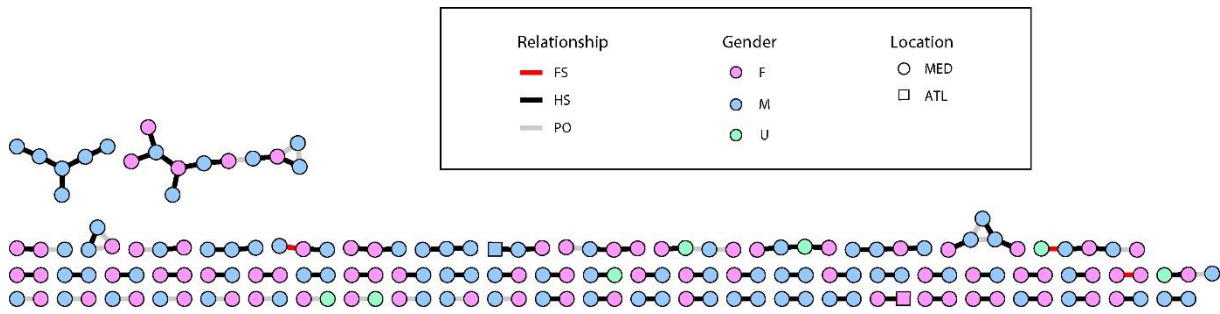


Figure 18. Parentage network of fin whales from the Mediterranean population ($N = 212$) and stranded individuals from North Atlantic ($N = 2$). Each individual is indicated by a node. Circles and squares represent Mediterranean (MED) and North Atlantic (ATL) individuals, respectively. Pink, blue and green colors represent females (F), males (M) and undetermined (U) individuals, respectively. Red, black and grey links represent full-sibs (FS), half-sibs (HS) and parent-offspring (PO) relationships, respectively.

2.3.2 Structure

The STRUCTURE analysis on the Mediterranean samples revealed $K = 7$ groups as the most likely partitioning (**Figure S2**). When the STRUCTURE output was reworked by classifying individuals in a cluster when they had at least 50% of the characteristics of this cluster, eight groups were defined. One hundred and ninety-four individuals can be classified into seven clusters, with a remaining 301 (60.8%) individuals still unclassified (**Figure 19**). Within the cluster of seven, the most abundant is C2 with 8.9% of Mediterranean individuals, and the least abundant is C3 with 2.6% of individuals. Trough, the analysis of eight groups as differentiated units we found: 1/ observed heterozygosity values (H_0) ranging from 0.700 (C7) to 0.790 (C6), and mean allelic richness ranging from 6.182 (C7) to 7.124 (Independent; **Table 9**); 2/ all pairwise F_{ST} values were not significantly different from zero (**Table 9**); 3/ the PCoA showed overlapping between the eight groups (**Figure S3**), and; 4/ the parentage networks and the STRUCTURE clustering do not match, i.e. the clusters do not correspond to families (**Figure S4**). Overall, none of the genetic analyses confirmed the STRUCTURE clustering.

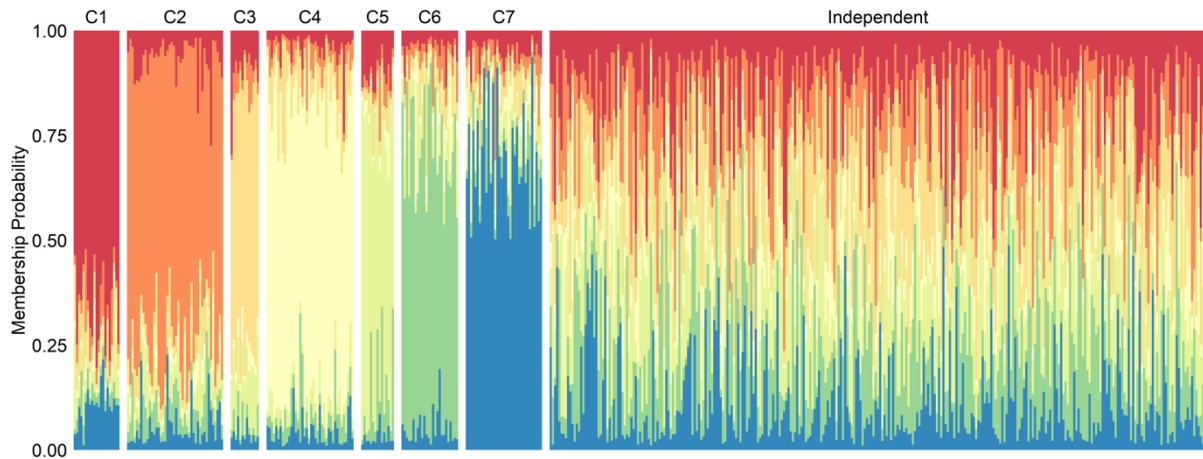


Figure 19. Bayesian clustering analysis showing the most likely partition for the Mediterranean fin whale population, with $K=7$. Each individual is represented by a colored vertical line. Same color in different individuals indicates that they belong to the same cluster, and when individuals have at least 50% of a cluster, they are grouped together. Other individuals are merged into the “independent” group.

2.3.3 Inbreeding

The total level of inbreeding, F_{IS} , was 0.013, and total genetic diversity remained high ($H_S = 0.734$; see **Table S3** for details results). For females and males, the F_{IS} was 0.0378 and 0.0281, respectively. For each population defined from the STRUCTURE analysis, F_{IS} was not significant and ranged from -0.076 to 0.045 (**Table 9**).

The mean internal relatedness (IR) value of offspring was significantly lower than expected under random mating (Monte Carlo randomization x1000: mean IR \pm standard error = 0.005 ± 0.100 and mean simulated IR \pm se = 0.598 ± 0.017 , $P < 0.001$). The observed maximum IR value was 0.291, 0.8% of all offspring showed IR values higher than 0.25 (the value expected for offspring of half-sibling mating), and 12.9% showed observed IR values higher than 0.125.

Table 9. Characteristics of each group identified by STRUCTURE software: *N*, number of individuals; *Ar*, mean allelic richness; *H₀*, observed heterozygosity; *H_s*, expected heterozygosity; *F_{IS}*, values of the inbreeding coefficient; *F_{ST}*, genetic differentiation based on 29 microsatellite markers. SE: standard error. Significance of values are given as follows: NS: non-significant, * <0.05 .

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	Independent	
N	21	44	13	40	15	26	35	301	
Ar	6.134	6.282	6.172	6.09	5.930	6.043	5.850	6.767	
(SE)	(2.025)	(2.128)	(2.377)	(2.118)	(1.934)	(1.853)	(2.115)	(2,326)	
H₀	0.712	0.728	0.766	0.714	0.722	0.772	0.693	0.731	
(SE)	(0.156)	(0.169)	(0.224)	(0.181)	(0.162)	(0.137)	(0.164)	(0.148)	
H_s	0.746	0.735	0.712	0.733	0.729	0.745	0.668	0.745	
(SE)	(0.193)	(0.165)	(0.210)	(0.163)	(0.163)	(0.139)	(0.138)	(0.150)	
F_{IS}	0.045 NS	0.010 NS	-0.076 NS	0.026 NS	0.010 NS	-0.037 NS	-0.037 *	0.019 NS	
(SE)	(0.168)	(0.118)	(0.179)	(0.136)	(0.176)	(0.115)	(0.153)	(0.066)	
F_{ST}	C1	-	0.030 NS	0.046 NS	0.045 NS	0.054 NS	0.045 NS	0.044 NS	0.019 NS
	C2	-	-	0.041 NS	0.033 NS	0.045 NS	0.038 NS	0.034 NS	0.013 NS
	C3	-	-	-	0.045 NS	0.067 NS	0.056 NS	0.049 NS	0.022 NS
	C4	-	-	-	-	0.050 NS	0.035 NS	0.031 NS	0.018 NS
	C5	-	-	-	-	-	0.043 NS	0.049 NS	0.024 NS
	C6	-	-	-	-	-	-	0.034 NS	0.019 NS
	C7	-	-	-	-	-	-	-	0.018 NS

The mean observed proportion of homozygous loci within an individual genotype (HL) value was not significantly higher than expected under random mating (Monte Carlo randomization x1000: mean HL \pm se = 0.229 \pm 0.017 and mean simulated HL \pm se = 0.226 \pm 0.004, $P = 0.798$).

The genomic inbreeding coefficient per generation was defined at $F_T = 2.8\%$, from an effective population size of 450 individuals (Tardy et al. in revision) and a generation time of 25.9 years (Árnason et al. 2018). Furthermore, the increasing rate in homozygosity per generation due to genetic drift was estimated at $\Delta F = 0.1\%$, with an effective population size of 450 individuals.

2.4 Discussion

In this study, a rare long-term monitoring dataset (13 years) and genetic analyses of the Mediterranean fin whale population, provides new insights into the genetic structure, the parentage assemblages and the levels of inbreeding within the world's second smallest fin whale population.

The analysis implemented in the software STRUCTURE highlights the presence of seven groups in the Mediterranean fin whale population. When testing genetic differentiation among the groups, F_{ST} values were not significant. Some differences in the genetic variance certainly exist between the groups segregated by STRUCTURE, but not to a level where significant genetic differentiation in allelic frequencies could be considered. More than half of individuals (60.8%) are unclassified when we look at the clustering probabilities of the Bayesian structuring. Further singular analysis showed that the “groups” from STRUCTURE did not correspond to sampling campaigns or the families which were identified in this study. This is not surprising because the fin whale is a migratory species (Notarbartolo-di-Sciara et al. 2003), and satellite tagging has shown that fin whales travel over long distances in the western basin of the Mediterranean Sea, and one individual even traveled from the Mediterranean Sea to the Atlantic (Bentaleb et al. 2011). Although we do not have samples from the eastern part of the Mediterranean due to the rarity of the fin whale (Cooke 2018), the long-distance movements of fin whales reinforced that the Mediterranean fin whale population is not genetically structured and is a single population. In contrast, four species of dolphins (bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*, Risso's dolphin *Grampus griseus*, short-beaked common dolphin *Delphinus delphis*, and striped dolphin *Stenella coeruleoalba*) have shown evidence of population structure between the eastern and western Mediterranean Sea, separated by the Italian peninsula (Gaspari et al. 2007b, a; Bearzi et al. 2008; Natoli et al. 2008). Furthermore, the western population of bottlenose dolphins presents a social structure with five distinct groups which are most likely genetically differentiated (Labach et al. 2016). These structures suggest that physical boundaries (e.g. Strait of Gibraltar, Sicily Channel) and hydrographic characteristics within the Mediterranean Sea tend to restrict the delphinids' movements, leading to population structure. Similarly, at an ocean scale, fin whales can have several populations. In the North Pacific, acoustic and genetic analyses have confirmed the presence of at least two distinct populations, and possibly three (Archer et al. 2013; Koot 2015), with one which is more closely related to the Southern Hemisphere population than to the other North Pacific populations (Archer et al. 2013). Within the North Pacific, there is an enclave in

the Gulf of California (i.e. Sea of Cortez, where a small resident population of fin whales clearly constitute a unique and separate unit of conservation (Bérubé et al. 2002). We observed the same scenario in the Mediterranean population, as the Mediterranean is a semi-closed environment in comparison to the Atlantic. In conclusion, in contrast with the dolphin species, the activity and mobility of fin whales inside the Mediterranean Sea are not constrained, leading to a unique population.

The family structure within the sampled segment of the Northwestern population was investigated using parentage analysis to evaluate the sibling and parental associations. Many species of cetaceans have been studied to investigate relationships within migratory groups, alliances, or even short-term associations (humpback whale, *Megaptera novaeangliae* (Cypriano-Souza et al. 2010); minke whale, *Balaenoptera acutorostrata* (Taguchi 2020); sperm whale, *Physeter macrocephalus* (Lyrholm et al. 1999); short-beaked common dolphin, *Delphinus delphis* (Zanardo et al. 2016); boto, *Inia geoffrensis* (Gravena et al. 2019), among others). As most of these studies investigated relatedness and did not specifically search for a parentage link, some parent-offspring pairs were reported for different species but full-sibs were only discovered for botos and short-beaked common dolphins (Zanardo et al. 2016; Gravena et al. 2019). So far, no such studies were ever conducted on Mediterranean cetaceans. In our study, three pairs of full-sibs were discovered within the Mediterranean population, and they are discussed and described in Tardy et al (in revision). This was the first time that full-sibs were confirmed in a whale species, and this result can lead one to believe that some individuals have a preferential mating partner, while the majority would exhibit non-random mating (Bérubé et al. 1998). A large number of half-sib relationships (HS: 77) as well as parent-offspring relationships (PO: 25), were identified. The HS relationship implies that one female mated with several males and one male mated with several females, which is congruent with the fin whale mating system. Their mating system is polygynandry, where multiple males and multiples females mate with each other, i.e. where one male has various female partners and where each female, in turn, has multiple male partners, a form of polygamy. However, the reproduction cycle is different for males and females, as a male can reproduce every year when a female can reproduce every 2-3 years (Taylor et al. 2007a) due to the completion of the breeding cycle which has a duration of 1.5 to 2 years (Aglar et al. 1993). Interestingly, the large number of HS (77) and the large percentage of individuals with only a single parentage link (78.5%) confirm that the entire population was not sampled and that not all of the individuals have been identified.

In addition, we identified many small families, where 74.3% of families had only two individuals and only one family had more than ten individuals. These results highlight that all individuals contribute more or less equally in maintaining the genetic diversity of the Mediterranean fin whale population. This is congruent with the solitary behavior of the fin whale (Notarbartolo-di-Sciara et al. 2003) and the high mortality of young during their first year (77%; Arrigoni et al. 2011). This also highlights the absence of a dominant male, as we were unable to identify any males with numerous progenies. In the same way, no dominant breeder has been revealed in the beluga, although large families are present and individuals have up to ten parentage links (O’Corry-Crowe et al. 2020).

Additionally, parentage analyses can shed light on putative long-distance migrations. We discovered two relationships of HS between the Atlantic and the Mediterranean. Like other baleen whale species, fin whales are thought to conform to a stereotyped migration between feeding and breeding zones. Fin whales in Australian waters travel an annual migratory distance of approximately 10,000 km (Aulich et al. 2019). Nevertheless, very little is known about possible migration patterns of this species in the Mediterranean Sea. One satellite tagging (on 21 tagged individuals; Bentaleb et al. 2011; Panigada et al. 2015) and the presence of limited gene flow demonstrated some exchange between the Mediterranean and the North Atlantic populations, combined with results from the present study confirm this genetic exchange. In the present case we can say that there is some exchange between the Mediterranean and Atlantic populations, but it is not clear whether they contribute to the reproduction. Considering the genetic differentiation observed between the Atlantic and the Mediterranean populations, we can assume that the contribution to the reproduction in their new territory is unlikely.

Results of this study confirm the high level of genetic diversity of the Mediterranean fin whale and the low level of inbreeding ($F_{IS} = 0.013$). Other whale populations present a low level of inbreeding, such as the humpback whale in the Southwestern Atlantic Ocean ($F_{IS} = 0.007$; Cypriano-Souza et al. 2010) and the minke whale in the North Atlantic ($F_{IS} = -0.0043$; Pampoulie et al. 2008).

The observed IR (mean IR \pm standard error = 0.005 ± 0.100) is significantly lower than the expected (mean simulated IR \pm se = 0.598 ± 0.017). However, the difference between the two values from tests (mean IR \pm standard error = -0.004 ± 0.011 and mean IR \pm standard error = -0.007 ± 0.011) is lower than both the observed and the expected IR obtained during this study. The tests confirm the lower observed IR than expected. As a comparison, the mean IR

value for the Mediterranean fin whale is also lower than the observed IR value for the Mediterranean bottlenose dolphin (IR = 0.036; Valsecchi et al. 2004). However, the IR for the bottlenose dolphin was estimated only for stranded individuals due to morbillivirus, so the value could be biased downwards. Like the Mediterranean fin whale population, other marine mammals have a mean observed IR value that is close to zero (e.g. long-finned pilot whales: mean IR = 0.007; grey seals: mean IR = -0.0058; Valsecchi et al. 2004), and thus it seems that this degree of inbreeding is typical for a mobile free-living species (Frère et al. 2010). Furthermore, an IR of 0 corresponds to a score of individuals born from the random pairing of unrelated parents (Amos et al. 2001). A counterexample is found in the bottlenose dolphin population in Eastern Shark bay (Western Australia) which presents an observed IR that is too high for a wild species, four times higher than expected if mating was random (Frère et al. 2010), and which corresponds to a mating pattern associated with inbreeding preference (Szulkin et al. 2013). Inbreeding in other mammals has been attributed to species that are restricted by habitat or nesting sites, and in some cases to population crashes (Randall et al. 2007; Frère et al. 2010).

Concerning the HL index which looks at the contribution of each locus with respect to their allelic variability (Aparicio et al. 2006), the observed value is similar to the expected value under equilibrium. The fin whale population presents an HL index of 0.229 indicating that the proportion of homozygous locus is that which would be expected for a random mating with high diversity. A similar value was estimated for the short-finned pilot whales (*Globicephala macrorhynchus*) in Trinidad (HL = 0.242) and a higher value for the British Virgin Islands population (HL = 0.448), though these populations are not considered to be impacted by inbreeding (Télez et al. 2014).

While most of the studies use IR and not HL, the index efficiency depends on the studied population. HL effectively estimates the heterozygosity and inbreeding in open populations with migration and admixture that increases genetic variability, whereas IR is more efficient in populations with high inbreeding (Aparicio et al. 2006). In our case, we could expect some inbreeding due to the characteristics of the fin whale population (small and isolated population) and its habitat (Nichols et al. 2014), and for that reason we tested both indexes (IR and HL) and both approaches demonstrate that the fin whale population does not suffer from an inbreeding effect.

Individuals from a small population with random mating, as would normally be assumed for the Mediterranean fin whale population, are more liable to inbreeding depression, and are thus more related to one another than individuals of a larger population (Falconer and Mackay 1996). The effective population size of the Mediterranean fin whales has been estimated at 450 individuals (Tardy et al, unpublished), and knowing that 50 individuals are enough to prevent inbreeding depression over 5 generations in the wild, and that 500 individuals are necessary to retain the evolutionary potential for fitness in perpetuity (Franklin 1980; Soulé 1980), the Mediterranean fin whale should not be heavily impacted by inbreeding depression. However, Frankham et al.(2014) suggested that previous thresholds were set too low and that to effectively prevent inbreeding depression, inbreeding thresholds should be doubled. In contrast, the southern killer whale population is very small with 80 individuals, and is suffering from inbreeding (Ford et al. 2018), while killer whales generally avoid mating with related individuals (Ford et al. 2011).

Furthermore, a species with a life-span of at least 50 years and overlapping generations has the potential for high levels of inbreeding (Ford et al. 2018). This social structure corresponds to that of the fin whale. However, the two other inbreeding coefficients (F_T and ΔF), which correspond to the inbreeding coefficient per generation and the rate of inbreeding due to genetic drift respectively, are low. The ΔF is an important parameter to be considered to conserve biodiversity, the Mediterranean fin whale population estimate is $<1\%$ ($\Delta F = 0.1\%$), the threshold for natural selection to balance inbreeding depression by individual performance and fertility (Frankham 1995b). The effect of selection to increase inbreeding can be counterbalanced by the opposite effects of avoiding mating between close relatives and the similarity of contributions to the next generation of the animals that actually contribute.

Small families, a low number of relationships per individual, and all the inbreeding coefficients, lead us to assume that the Mediterranean fin whale population has not suffered from inbreeding.

This study is the first to investigate the Mediterranean fin whale population at such a fine scale. This population seems to be panmictic over the area sampled. Some large and many small families were revealed by the parentage analyses, suggesting that no dominant breeders exist. Furthermore, relationships of half-sibs were highlighted between individuals from the Mediterranean Sea and the North Atlantic Ocean, confirming some level of exchange, although limited, between these different populations. Due to the isolation and the habitat characteristics

of the Mediterranean population, we could expect inbreeding to occur, but here, all the estimated indices suggest that the population is not suffering from inbreeding depression. These new insights significantly increase our understanding of the fin whale species in general and the Mediterranean population in particular.

2.5 Methods

2.5.1 Sample collection

Fin whale sightings and skin samples (508) were collected between 2006 and 2019 during the summer season (between June and September), except in 2015 where no campaign was conducted. In total, 13 surveys were conducted. Surveys were carried out in the Northwestern Mediterranean Sea (**Figure 20**). An additional 20 biopsies were gathered by the French National Stranding Network (RNE) from stranded animals in the Mediterranean Sea (N= 7), the North Atlantic Ocean (N= 11), and the North Sea (N= 2). Samples were all stored in 70% ethanol.

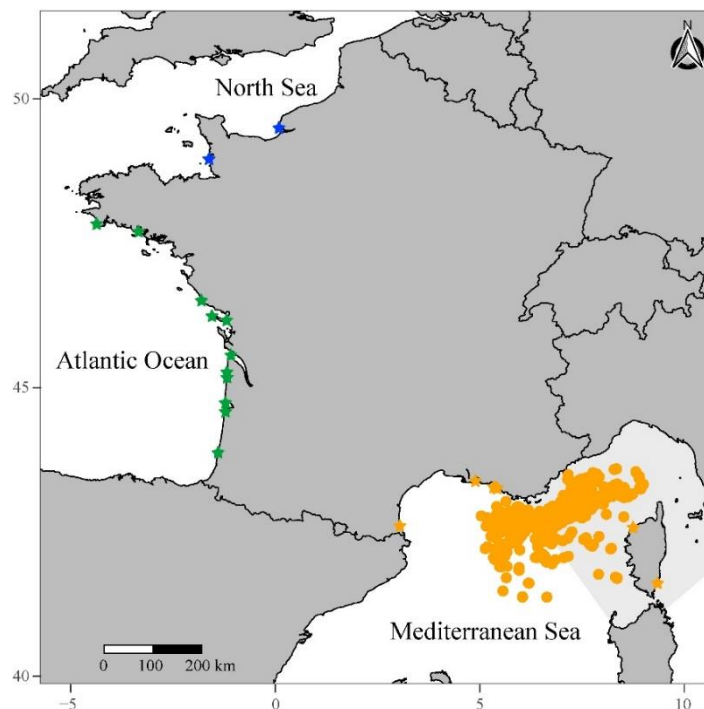


Figure 20. Map of the study's sampled locations for *Balaenoptera physalus* in the Mediterranean Sea (N = 495), the North Atlantic Ocean (N = 11) and the North Sea (N = 2). Dots represent samples from biopsies and stars represent stranded individuals.

2.5.2 Laboratory analysis

DNA was extracted from the epidermal layer for all fin whale samples using Genra PureGene tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). The sex of individuals was genetically identified by amplifying fragments of the ZFX and ZFY genes using primers developed by (Bérubé and Palsbøll 1996) and following their instructions. Thirty-two di-, tri- and tetra-nucleotide microsatellite loci were used organized into six multiplexes (Valsecchi and Amos 1996; Palsbøll et al. 1997b; Bérubé et al. 1998, 2000, 2005; Tardy et al. 2020). PCR amplifications were performed following previously developed methods (Tardy et al. 2020).

2.5.3 Statistical analysis

Allele sizes were identified manually using GENEMAPPER software v.5 (Applied Biosystems). All ambiguous peak profiles were considered as missing data. For one genotype, the maximum number of missing data was eight from a total of 32 microsatellite markers. Controls for the presence of null alleles and large allele dropout were performed using MICRO-CHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). The presence of null alleles was detected in three loci (Bp1430262, Bp747752, and Bp1003953), and these three loci were removed from further analyses. The allelic richness, observed (H_0) and expected (H_E) heterozygosities, F_{ST} , and F_{IS} were calculated for using the R package *hierfstat* (Goudet 2005).

Several algorithms are available to conduct pedigree inference (Blouin 2003), and each one is specific to a certain type of sampling and related to the type of outcomes expected. The characteristics of our dataset limit the type of approach that can be used because not all individuals of the population were sampled and because generations are overlapping. To avoid or decrease some biases, we decided to use and compare two programs: COLONY (Jones and Wang 2010) v.2.0.6.5 and ML-Relate (Kalinowski et al. 2006).

Kinship analyses were conducted on 508 individuals and were identified through the combination of two approaches: ML-Relate based on maximum likelihood (Kalinowski et al. 2006), and COLONY which considers the likelihood of the entire pedigree structure and allows for the simultaneous inference of parentage and sibship (Jones and Wang 2010). First, for COLONY analysis, input parameters for both runs were as follows: both sexes polygamous, inbreeding allowed, long runs of the full-likelihood model, high likelihood precision, no sibship prior and no updating of allele frequencies. For the first run, we put all identified fin whales as

offspring (508 individuals), males as candidate fathers (266 individuals) and females as candidate mothers (226 individuals). The probability of having a father or a mother as a candidate was defined at 0.8. For the second run of COLONY, we input all of the genotypes as offspring and no candidate mothers or fathers. Next, for ML-Relate, the entire dataset was included as input, and no specific parameters were needed. Finally, we confronted the relationships among individuals as determined by COLONY with those obtained by ML-Relate. Three different categories of relationships were considered by each program: half-siblings (HS), full-siblings (FS) and parent-offspring (PO). Only assignments found in common to all replicate runs with at least 95% confidence were considered in the results.

The most likely number of clusters based on the genetic variance of the Mediterranean population (495 individuals) was estimated using STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al. 2000). This analysis was run without prior. The parameters were set as follows: a burn-in period of 50,000 iterations followed by 200,000 recorded iterations for $K = 1$ to $K = 10$ clusters and 10 iterations per K values. The most probable number of clusters present in our dataset was determined using Evanno's ΔK (Evanno et al. 2005) approach using Structure Harvester online (Earl and VonHoldt 2012). The Structure output was treated and visualized using R v.4.0.2 (R Core Team 2016). An individual is considered as belonging to a specific cluster when at least 50% is attributed to that cluster. A cluster pairwise F_{ST} comparison following the θ estimator (Weir and Cockerham 1984) was done using the R package *hierfstat* (Goudet 2005). Also, a Principal Coordinate Analysis (PCoA) was computed using the R package *ade4* (Dray and Dufour 2007).

Three metrics were used to estimate levels of inbreeding. 1/ At the population level, the inbreeding coefficient F_{IS} was calculated with the R package *hierfstat* (Goudet 2005) to measure the intra-population heterozygosity deficiency which involves shared alleles by descent due to inbreeding. 2/ At the individual level, the relatedness of the individual's parents was measured by the internal relatedness (IR; Amos et al. 2001). The IR ranged from -1 to 1, with -1 corresponding to outbred individuals (i.e. all loci are heterozygous), and 1 corresponding to individuals derived from consanguineous mating, so parents shared many alleles and were closely related (i.e. all loci are homozygous). The observed IR was compared with the distribution of average simulated IR produced from 1,000 iterations by sampling random males and females with replacement. Since the expected value may be biased due to the input file which contained all individuals and not only the reproductive adults as recommended (we

cannot differentiate adults and juveniles in the field), we performed a test for the expected value. We then subsampled our genotype dataset which was constituted from the kinship results. Only parent-offspring pairs were considered and split into reproductive adults (for the parents) and juveniles (for offspring). Two runs were done, one with adults and juveniles in the input (mean $IR \pm$ standard error = -0.004 ± 0.011) and another with only adults (mean $IR \pm$ standard error = -0.007 ± 0.011) which allowed for the impact of the genotype redundancy to be determined. In the end, a Wilcoxon test between the two means expected IR revealed a significant difference between the two values (p-value < 0.001). 3/ An individual index of homozygosity weighting by loci (HL) was calculated, which indicates the proportion of homozygous loci within an individual genotype (Aparicio et al. 2006). This index ranges from 0 to 1, where 0 indicates that all loci are heterozygous and 1 indicates all loci are homozygous. The observed HL was compared with the distribution of average simulated HL produced from 1,000 iterations. Both indexes, IR and HL, were estimated using the software Storm (Frasier 2008).

Additionally, the inbreeding coefficient per generation (F_T) and the ΔF (the increasing rate in homozygosity per generation due to genetic drift) were also estimated following the equation described by Falconer and Mackay (Falconer and Mackay 1996).

Acknowledgments

We thank WWF-France and the French National Stranding Network (RNE) for providing samples from *Balaenoptera physalus*. We are also grateful to all the volunteers of WWF-France who participated in the campaigns at sea. We further acknowledge J. Almany for English corrections.

Author contributions

Conceptualization, C.T., E.B., S.P.; Formal analysis, C.T.; Resources, C.T, D.O., S.P.; Writing – original draft preparation, C.T.; Writing – review and editing, C.T., E.B., D.O., S.P.; Visualization, C.T.; Supervision, E.B., D.O., S.P.

Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Additional information

Funding: This research was funded by WWF-France and ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, grant CIFRE n°2017/0124).

Availability of data and material: The dataset generated during the current study is available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval: The sampling was non-lethal and *a priori* approved by the DREAL (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) of Provence-Alpes Côte d'Azur.

Supplementary Information

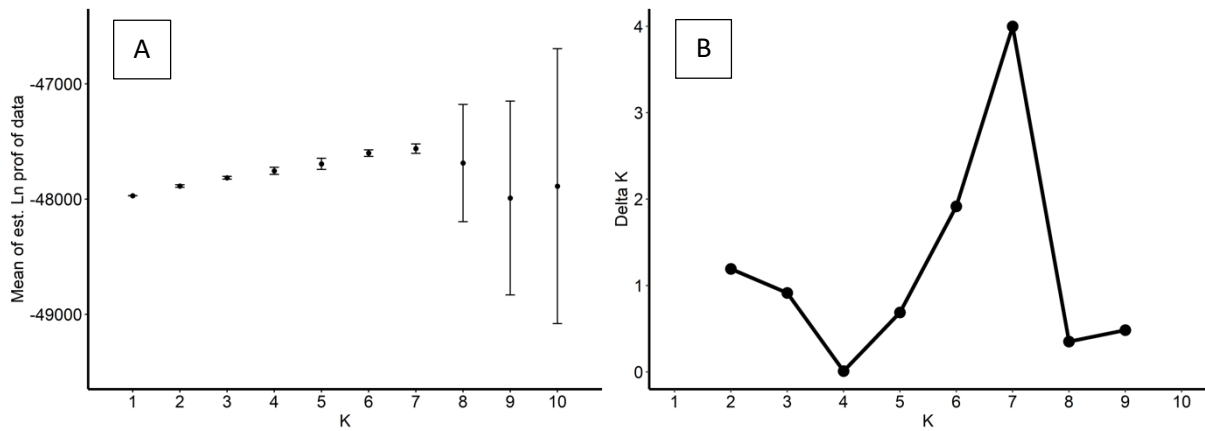


Figure S2. Results of the STRUCTURE runs: plots of (A) the log likelihood, and (B) Evanno's delta K distribution for the Mediterranean dataset.

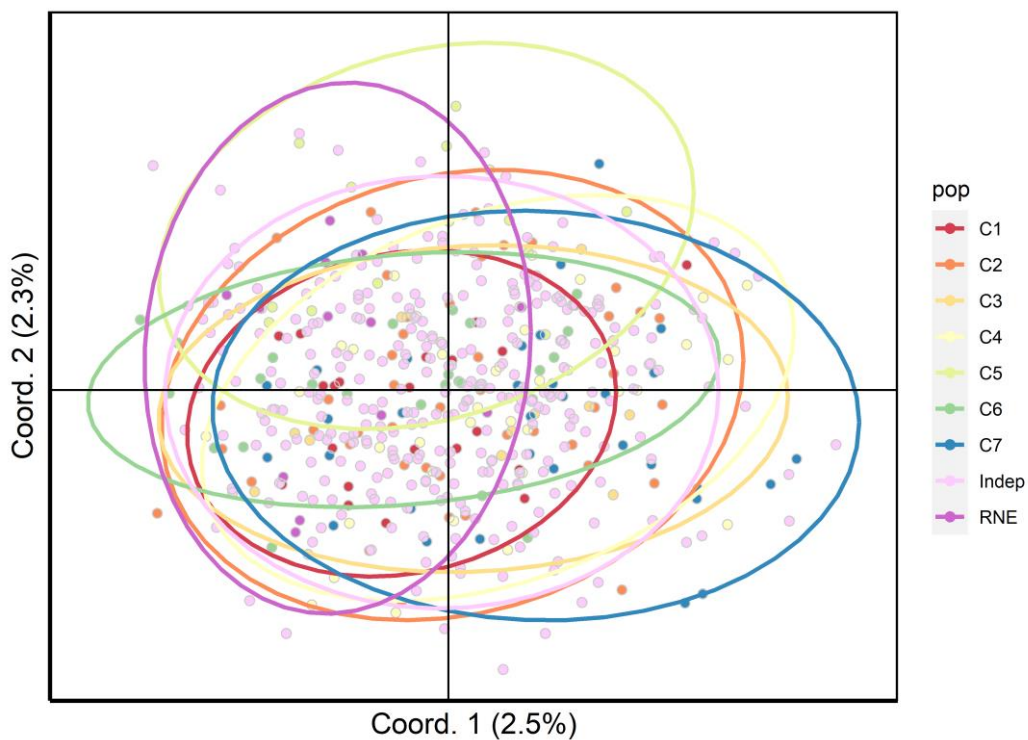


Figure S3. Principal Coordinates Analysis (PCoA) of the eight clusters identified by STRUCTURE for the Mediterranean fin whale population. Coordinate 1 explains 2.5% of the variation while coordinate 2 explains 2.3% of the variation.

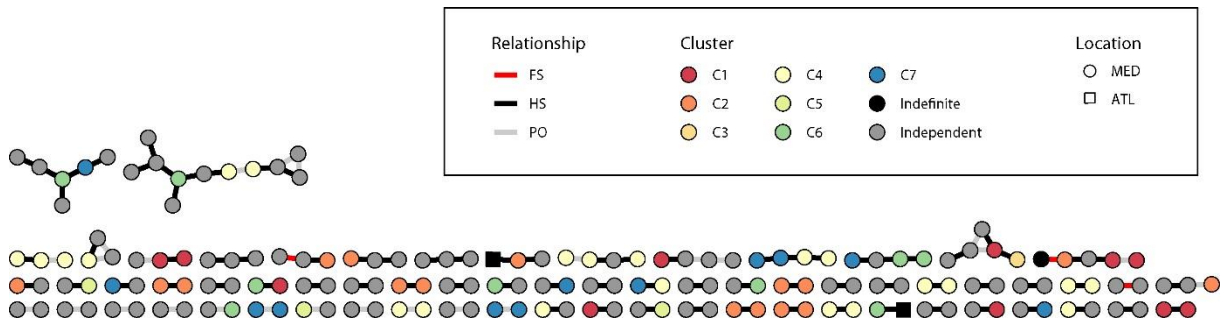


Figure S4. Parentage network of fin whales from the Mediterranean population ($N = 212$) and stranded individuals from North Atlantic ($N = 2$). Each individual is indicated by a node. Circles and squares represent Mediterranean (MED) and North Atlantic (ATL) individuals, respectively. Node colors represent the individual cluster from STRUCTURE output (C1 to C7 and independent), and black represents indefinite clusters. Red, black and grey links represent full-sibs (FS), half-sibs (HS) and parent-offspring (PO) relationships, respectively.

Table S3. Descriptive statistics of the 29 microsatellite markers used to study the Mediterranean fin whale population. H_0 : observed heterozygosity; H_S : expected heterozygosity; F_{ST} : genetic differentiation; F_{IS} : values of the inbreeding coefficient; SE : standard error.

Locus	Number of alleles	H_0	H_S	F_{ST}	F_{IS}
Bp1125752	7	0.684	0.696	0.035	0.018
Bp1178841	18	0.837	0.816	0.035	-0.025
Bp451306	11	0.756	0.790	0.017	0.044
Bp673257	8	0.831	0.760	0.032	-0.094
GATA098	7	0.775	0.799	0.031	0.029
GT011	7	0.778	0.781	0.032	0.004
Bp1229316	6	0.525	0.511	0.011	-0.027
Bp311392	7	0.642	0.656	0.060	0.021
Bp989588	3	0.451	0.434	0.035	-0.038
EV37	16	0.846	0.821	0.037	-0.030
Bp1043662	10	0.757	0.742	0.026	-0.021
Bp1311471	5	0.263	0.276	0.021	0.045
Bp1446664	8	0.701	0.647	0.017	-0.084
Bp740180	16	0.847	0.897	0.018	0.055
GATA417	18	0.918	0.877	0.036	-0.047
GT122	18	0.834	0.840	0.027	0.007
Bp1057120	14	0.649	0.806	0.076	0.195
Bp1357166	7	0.690	0.753	0.027	0.084
Bp958405	11	0.738	0.784	0.041	0.059
GT211	13	0.793	0.801	0.014	0.010
Bp1069071	7	0.755	0.752	0.025	-0.004
Bp531923	11	0.716	0.745	0.045	0.039
Bp779455	13	0.832	0.800	0.054	-0.039
Bp999219	11	0.751	0.824	0.007	0.088
TAA023	7	0.736	0.768	0.013	0.041
Bp1047889	6	0.549	0.585	0.049	0.062
Bp1418059	14	0.838	0.841	0.037	0.003
Bp564742	10	0.851	0.846	0.028	-0.007
Bp814420	6	0.668	0.649	0.029	-0.029
Overall (SE)	10.172 (4.268)	0.724 (0.138)	0.734 (0.137)	0.032 (0.015)	0.013 (0.057)

3. Article 2 : La découverte de vrais frères/sœurs comme démonstration de fidélité de reproduction chez les baleines

Full-sibs demonstrate reproductive fidelity in whales

Céline Tardy ^{1,2,*}, Emilie Boissin ^{2,3}, Denis Ody ¹, Serge Planes ^{2,3}

¹ WWF-France, Paris, France

² PSL Research University: EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, 66860 Perpignan, France

³ Laboratoire d'Excellence "CORAIL"

*Corresponding author: celine.tardy63@gmail.com

3.1 Abstract

Little is known about the reproductive behavior in fin whales, and their mating strategy remains unclear. Cetaceans exhibit a wide range of social structures and mating strategies, yet fidelity has never been observed and it is generally assumed that mating is randomly driven. Fin whales produce a single offspring followed by a year of maternal care. On average, these whales reach sexual maturity at 8 years of age. Here, microsatellite markers and parentage analyses were used in the Mediterranean fin whale population, and for the first time ever in whales, full-siblings were identified. Our results reveal that between breeding periods, long-term fidelity exists between some whales. Further research is needed to better understand fidelity as a reproductive strategy and its implications for conservation planning.

3.2 Main text

Marine mammals exhibit a range of mating strategies and parental care depending on whether the species is a baleen or a toothed whale. Baleen whales are considered as “cow-calf” pairs with roughly a year of maternal care, whereas toothed whales are subdivided into social groups, where other individuals play a significant teaching role for the offspring, i.e. alloparental care (Berta et al. 2015). Reproduction and parental identity are often hard to determine due to the difficulties associated with sighting and identifying individuals. The mating systems of balaenopterid whales is the least known of all cetacean families. The study of a humpback whale population revealed that females mate with a different male each time they are reproductively receptive (Clapham and Palsbøll 1997). Furthermore, older and/or dominant males have higher reproductive success than younger and/or subdominant males (Nielsen et al. 2001). However, the general assumption is that their mating system is random, and mating fidelity, defined here as the capacity to find full-siblings in wild populations and to then demonstrate a stable reproduction between the same male and female, has never been documented. In recent years, thanks to advances made in molecular analyses, we are now better able to explore cetacean reproduction (Green et al. 2011) using microsatellite markers to determine kinships and siblings of cetaceans (Selkoe et al. 2016) and to ultimately reveal the reproductive strategy in whales.

The fin whale, *Balaenoptera physalus*, is the largest cetacean in the Mediterranean Sea. The Northwestern part of the Mediterranean Sea is identified as a major feeding ground for this species, which led to the establishment of the Pelagos Sanctuary, though the breeding ground remains unknown. While the reproductive behavior in fin whales is still poorly known (Lockyer 1984; Aguilar and García-Vernet 2018), autopsies of individuals that were stranded or caught during whaling, revealed that their mating system likely relies on competition between males to monopolize females and to reduce sperm competition.

Between 2006 and 2019, annual campaigns were conducted in the Northwestern Mediterranean Sea to characterize and sample fin whales in the Pelagos Sanctuary. Over these 14 years of surveys, a total of 1,208 fin whales were sighted and 638 biopsies were successfully performed. After DNA extraction on all biopsies, we determined the sex of each whale from PCR amplification using specific gender determination primers (Bérubé and Palsbøll 1996). Furthermore, the amplification of the Control Region (mtDNA) was performed to replace each individual within the network of fin whale haplotypes (Archer et al. 2013). Finally, a total of

29 microsatellite markers were screened to characterize individual genotypes (Tardy et al. 2020). Comparison of genotypes led to the identification of 508 distinct fin whale individuals in the dataset with 130 samples (20%) identified as recaptures.

Parentage analyses were then performed using 29 microsatellites. To confirm each relationship (i.e. full-sibs, half-sibs), a 2-step approach was applied. First, we ran two kinship programs, COLONY (Jones and Wang 2010), twice with different parameters, followed by ML-Relate (Kalinowski et al. 2006). COLONY relies on a full likelihood approach to determine whether the individuals were more likely to be parent-offspring, full-sibling, half-sibling, or unrelated. ML-Relate uses LOD (log of the odds) scores (Thompson 1975) to infer the most likely relationship category for a dyad of individuals (same as COLONY's categories). Two runs of COLONY were conducted, one with the entire dataset input into the "offspring genotypes" category and no data input into "male genotypes" or "female genotypes" categories, and one run where we indicated male individuals (266 individuals) into "male genotypes" and female individuals (226 individuals) into "female genotypes" as putative parents. Sixteen individuals remained with undetermined sex, and were only included into the "offspring genotypes" category. Next, any putative relationships identified by each run of COLONY at 95% and 85% of probabilities were combined and compared. From the results obtained, we decided to only consider a "very high" confidence category with a probability at 95% for full-siblings (FS), half-siblings (HS) and parent-offspring (PO). One run of ML-Relate was conducted on the entire dataset. Finally, the results from COLONY and ML-Relate were compared and they were also confronted with the mitochondrial haplotypes. Notably, this confidence category showed a redundancy for all established relationships for all runs with different approaches, confirming the robustness of the parental relationships.

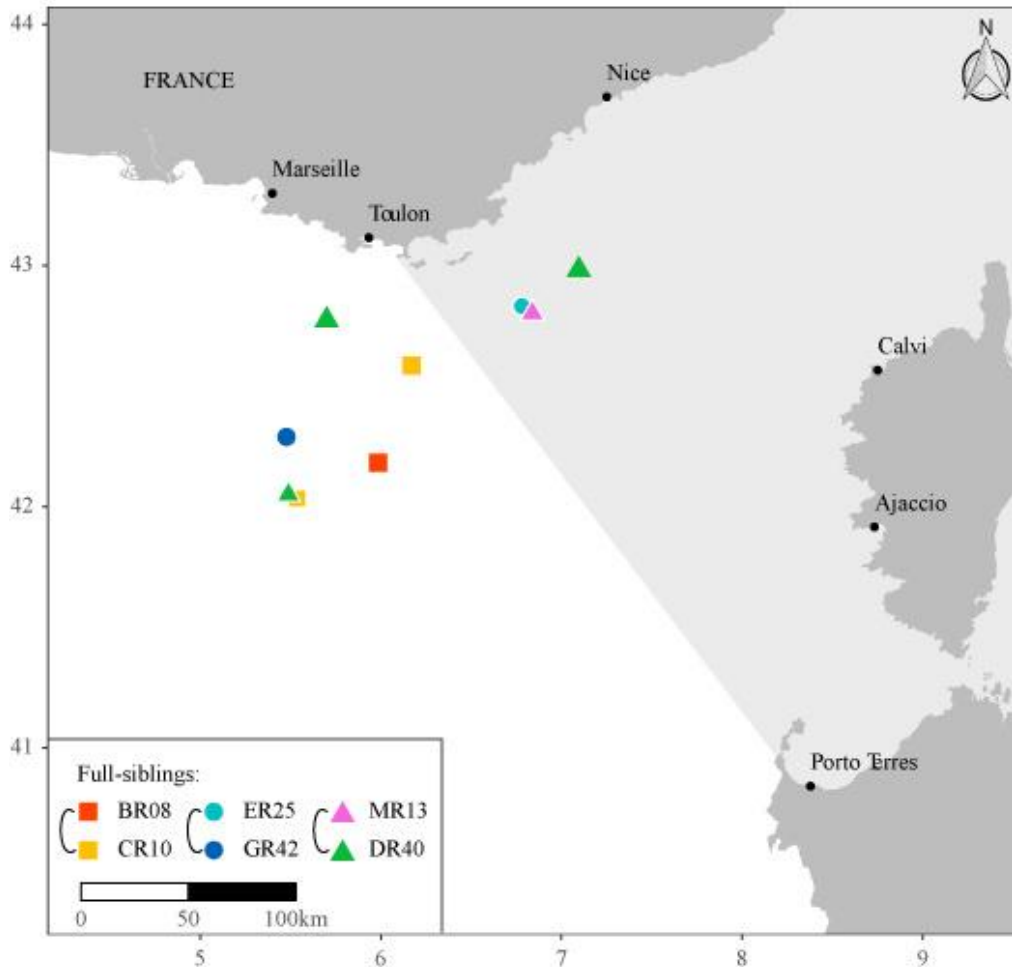


Figure 21. Map of the three pairs of full-siblings. The pair BR08-CR10 is represented by squares on the map, with two sightings of CR10. The pair ER25-GR42 corresponds to circles with only one sighting per individual. The last pair DR40-MR13 is characterized by triangles on the map, with three sightings of DR40.

We recovered three full-sibling pairs in the fin whale population sampled over 14 years of surveys in the Mediterranean Pelagos Sanctuary (**Figure 21**. Map of the three pairs of full-siblings. The pair BR08-CR10 is represented by squares on the map, with two sightings of CR10. The pair ER25-GR42 corresponds to circles with only one sighting per individual. The last pair DR40-MR13 is characterized by triangles on the map, with three sightings of DR40.). This is the first time that full-sibling relationships have been identified in baleen whales. Other studies reported kinship in cetaceans, but only with HS and/or PO relationships (Engelhaupt 2004; Cypriano-Souza et al. 2010; Rew et al. 2011; Tiedemann et al. 2014; Konrad et al. 2018). In our study, we used 29 microsatellite markers, though 14 would have been sufficient to identify full-siblings (Rew et al. 2011), confronted the nuclear results with the mtDNA haplotypes, and then combined the results from different software that use different kinship

methods. This approach is both robust and conservative, and confirms that we have two pairs of full brothers and sisters and one pair of sisters, thus a total of three pairs of siblings that share the same parents.

Individuals belonging to the three full-sibling pairs (BR08 and CR10, ER25 and GR42, DR40 and MR13) were not observed during the same sampling period or in the same area (**Figure 21** and **Table 10**). A minimum of one year and a maximum of nine years separate two individuals from the same pair. Some individuals were sighted several times and each time they were sighted they were found within a small group of two or four fin whales. The discovery of FS in the fin whale raises questions about the mating system of the species as well as the drivers for reproductive partner selection, which in this case, led to pair fidelity.

Table 10. Details of the three pairs of full-siblings (FS).

ID	Date	Group structure	Sex	Haplotype	Number of FS pair
BR08	15 Sept 2007	2 individuals	Female	Hap_1	1
CR10	17 Sept 2008	Alone	Male	Hap_1	
	13 Sept 2009	4 individuals			
ER25	21 Jul 2010		Female	Hap_2	2
GR42	09 Sept 2012	2 individuals	Male	Hap_2	
DR40	13 Sept 2009	4 individuals	Female	Hap_4	3
	15 Aug 2011	4 individuals			
	28 Aug 2018	2 individuals			
MR13	02 Sept 2018	2 individuals	Female	Hap_4	

A large number of studies have examined assortative pairing and a variety of taxa (spiders, snakes, birds, fish...) demonstrate assortative mating based on body size, including the humpback whale (Pack et al. 2012). To determine if there is a preferential mating partner, we calculated random probabilities to find full-siblings in the Mediterranean fin whale population. The Mediterranean population accounts for about 1,300 individuals (Tardy C., Ody D., Gimenez O., Planes S., In preparation) and as we found an equilibrated sex ratio in the present study, we would expect approximately 650 females and 650 males in this population. From this information, the probability for a whale to mate twice with the same individual is 2.37×10^{-6} ($P_1 = 1/(650 \times 650)$), and the probability that this event would happen three times leading to three pairs of FS is 1.33×10^{-17} ($P_3 = P_1^3$), indicating that this event (i.e. three pairs of FS) could not have happened as the result of a random process. Furthermore, since 508

individuals were sampled and three FS pairs were recovered, so if the entire Mediterranean population was sampled, we would expect to have at least ten FS pairs, as the probability increases exponentially as we reaching closer and closer to the total sampling. Considering these estimations, it is likely that the three full-sibling pairs are not the result of random mating, but instead suggests a driving process that favors fidelity in the reproductive strategy.

What drives this fidelity remains unclear as it can either be preferential attraction and mating or the result of the dominance of some males during the courtship period. To the best of our knowledge, close associations between individual males and individual females have only been observed in sperm whales, and only for a single reproductive season (Whitehead 1993). Concerning a possible phenomenon of dominance, females of some species (i.e. elephant seal, European bitterling) choose a male according to their mating strategies (i.e. male-male contests) to provide a genetic benefit to their offspring, and/or they adopt alternative mating strategies to adapt to the patchy distribution of resources in their environment (de Bruyn et al. 2011). In the present case, we did not observe close associations or male dominance. However, each pair of FS presents only one half-sib relationship (HS) with a probability greater than 95% (**Figure 22**). Individual MR16 is a HS at 95.8% of BR08-CR10, LR10 at 98.4% of ER25-GR42, and MR02 at 95.2% of DR40-MR13. Similar to FS, HS were not sighted at the same time. Furthermore, we identified a PO relationship between DR40 and NR51, the latter being the offspring. Thus, the limited number of HS allows us to refute the dominance hypothesis. If a male/father or a female/mother was dominant, we would expect to have more HS relationships for each pair of FS due to mating with several individuals.

Based on our results, it is likely that fin whales possess a mixed reproductive strategy. Some individuals would have a preferential mating partner and others would have random mating partners, i.e. a “fidelity strategy” and an “opportunist strategy”. The presence of a mixed reproductive strategy was already identified in fish, whether for females or for males (Mank and Avise 2006), and the strategy can be parasitic or cooperative depending on the individual. Furthermore, for some fish species, some of these strategies are genetically embedded and therefore heritable (Mank and Avise 2006). Further research on the fin whale mating system will help decipher if this mixed strategy is heritable.

Compared with short-lived species, long-lived mammals experience longer generation times and slower rates of reproduction (Carey 2003). For fin whales, generation time was determined to be 25.9 years (Árnason et al. 2018) and sexual maturity is reached, on average,

at 8 years of age (Aguilar and García-Vernet 2018). Longevity has not been precisely determined, but individuals up to 80-90 years of age have been identified (Aguilar and García-Vernet 2018). In the present study, a female has a maximum of three children within these three FS families. The number of FS and HS obtained from our dataset is congruent with the fin whale life history, even if the number of children can at least be doubled because the total population was not sampled (~50%). Despite the migratory behavior, fin whales return to the Northwestern Mediterranean Sea over years and generations, confirming the importance of this area for this species (Notarbartolo-di-Sciara et al. 2003).

Our study shows that the population of Mediterranean fin whales is particular with respect to its kinships. Here, we identified full-siblings for the first time ever in a cetacean species. It is now critical that survey efforts continue so that the results can be compared with other fin whale populations or other cetacean species to improve our knowledge of cetacean mating strategies and to determine how these strategies can be incorporated into conservation planning efforts. In addition, here we only considered the families of the three FS pairs but further analyses are underway to fully decipher the other families in this fin whale population. Identification of the complete structure of the Mediterranean population will be crucial to identify clusters or large families and to consider them from a conservation perspective, especially since the Northwestern Mediterranean Sea is under strong anthropogenic pressure.

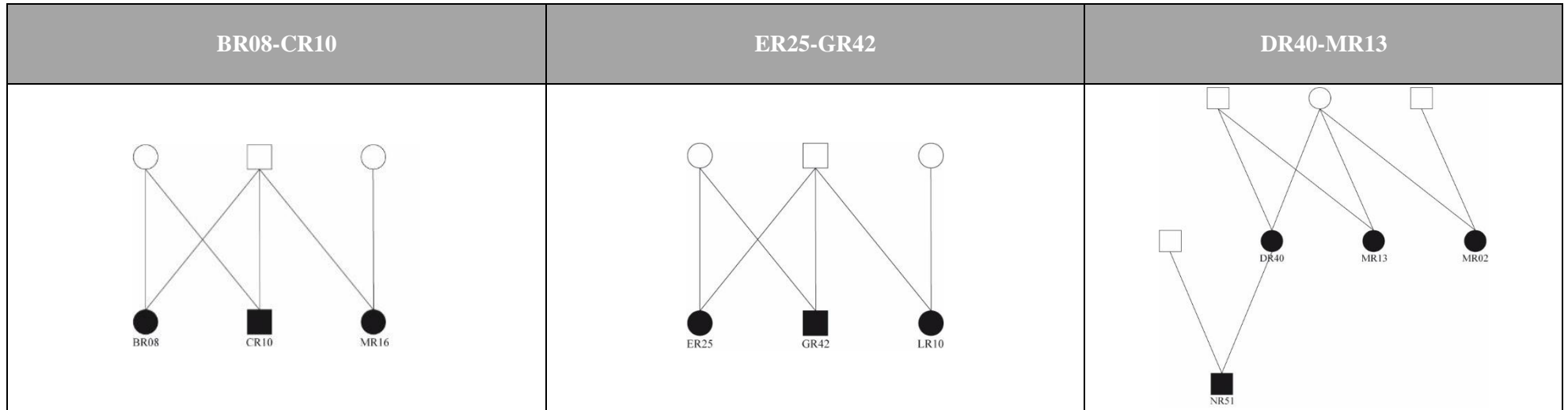


Figure 22. Pedigree representation for each pair of full-siblings (FS). On each representation, the squares correspond to males and the circles to females. Full symbols characterize the sampled individuals with their names, whereas empty symbols are for hypothetical individuals (which have been reconstructed by kinship software). Each line connects a parent with one of its offspring.

3.3 Materials and Methods

3.3.1 Data Collection

The study area is located in the Northwestern Mediterranean Sea and spans an area of approximately 91,000 km², including a major part of the Pelagos Sanctuary (i.e. an International Sanctuary for Marine Mammals). Whale sightings were collected from sailboats, each of which had trained observers on board who continuously scanned the sea with binoculars. When a fin whale was sighted, photographs and, when possible, a skin biopsy were taken for identification and its position was recorded. However, the survey effort was weather-dependent, and when sea conditions were worse than Beaufort scale 3, the effort was not recorded. In total, approximately 27,400 km of survey effort was recorded, between 2008 and 2019 during the summer season (between June and September), except in 2015 where no sampling campaign was conducted.

3.3.2 DNA extraction

DNA was extracted from 638 skin biopsies using the Genra PureGene tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). The first step consists of cell lysis, where “Cell Lysis Solution” was added to the tube with the tissue and then incubated at 55°C for 2h. Next, the protein was precipitated through the addition of the ‘Protein Precipitation Solution’. The third step involved the precipitation of DNA and cleaning with different solvents. The last step rehydrated the DNA by adding the “DNA Hydration Solution”. The DNA quality was then tested by electrophoresis through 1.5% agarose gel and quantified to ensure the same final concentration for each sample, 50 ng/μL.

3.3.3 Sex determination

The sex of individuals was genetically determined by amplifying fragments of the ZFX and ZFY genes using primers developed by (8). PCR amplifications were performed in 24 μL total volume reactions containing 5 μL of PCR Buffer at 10X, 5 μL of oligonucleotide primers at 2 μM, 0.6 μL of each primer at 50 μM, 0.125 μL of Taq at 5X, 4 μL of DNA template at 50 ng/μL and TE pH 8 buffer to complete the reaction volume. Amplifications were carried out as

follows: 2 min at 94°C, followed by 40 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 56°C, 1 min at 72°C and a final extension for 1 min at 72°C. The amplification products were separated by electrophoresis through 1.5% agarose gel and visualized using ethidium bromide. Males display two fragments from the heterozygous sequence (ZFX/ZFY), whereas females display one fragment from the homozygous sequence (ZFX/ZFX).

3.3.4 Microsatellite loci genotyping

A total of 32 microsatellite markers were used in six multiplex PCRs following methods described in Tardy *et al.* (10). PCR amplifications were performed using Type-it Microsatellite PCR kits (Qiagen, Hilden, Germany) in 12.5 µL total volume reactions containing 4 µL Type-it Multiplex PCR Master Mix, 6 µL RNase-free water, 1 µL of primers (2 µM forward and reverse primers diluted in TE pH 8 buffer) and 1.5 µL of DNA template at 50 ng/µL. Amplifications were carried out for 5 min at 95°C, followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, 1 min 30 s at annealing temperature (53-63°C, depending on the locus), 30 s at 72°C and a final extension for 30 min at 60°C. PCR products were sent to GenoScreen platform (Lille, France) for fragment analysis and allele sizes were visualized using an Applied Biosystems 3730 Sequencer. For accurate sizing, an internal size ladder (GeneScan 500 LIZ, Applied Biosystems) was used. Allele sizes were scored and checked manually using GENEMAPPER software v.5 (Applied Biosystems). All ambiguous peak profiles were considered as missing data. Controls for the presence of null alleles and large allele dropout were performed with MICRO-CHECKER v.2.2.3 (27). Repeated genotypes were identified in GenAlex v.6.503 (28).

3.3.5 Mitochondrial DNA sequencing

The first 412 base pairs of the hypervariable mtDNA control region were amplified and sequenced for the 508 identified fin whales using primers TRO (5'-CCTCCCTAAGACTCAAGG-3' (9)) and D (5'-CCTGAAGTAAGAACCAGATG-3' (29)). PCR amplifications were performed in 25 µL total volume reactions containing 2.5 µL of PCR Buffer at 10X, 2.5 µL of oligonucleotide primers at 2 µM, 0.6 µL of each primer at 10 µM, 0.125 µL of Taq at 5X, 2.5 µL of DNA template at 50 ng/µL and TE pH 8 buffer to complete the reaction volume. Amplifications were carried out as follows: 2 min 30 s at 94°C, followed by 35 cycles of 45 s at 94°C, 1 min at 56°C, 1 min 30 s at 72°C and a final extension for 5 min

at 72°C. PCR products were sent to GenoScreen platform (Lille, France) for sequencing to be run on an Applied Biosystems 3730 sequencer. Mitochondrial sequences were quality checked and aligned using Geneious v.5.5.9 (30). Alignments were performed using Clustal W with default parameter values (31).

3.3.6 Kinships analysis

Kinships were detected through the use of two software packages: ML-Relate software based on maximum likelihood (12); and COLONY (v.2.0.6.5) software based on full likelihood (11).

For COLONY analysis, input parameters for both runs were as follows: both sexes polygamous, inbreeding allowed, long runs of the full-likelihood model, high likelihood precision, no sibship prior and no updating of allele frequencies. For the first run, we put all identified fin whales as offspring (508 individuals), males as candidate fathers (266 individuals) and females as candidate mothers (226 individuals). The probability to have a father or a mother in candidates was defined at 0.8. For the second run of COLONY, we input only all the genotypes as offspring and no candidate mothers or fathers.

For ML-Relate, all the dataset was implemented as input, and no specific parameters were needed.

Later, we confronted the relationships among individuals as determined by COLONY with those obtained by ML-Relate. Three different categories of relationships were considered by each program: half-siblings (HS), full-siblings (FS) and parent-offspring (PO). Only assignments found in common to all replicate runs with at least 95% confidence were considered in the results.

Acknowledgments

We thank WWF-France and RNE (Réseau National Echouage) for providing samples from *Balaenoptera physalus*. We are also grateful to all the volunteers of WWF-France who participated in the campaigns at sea. We also thank J. Almany for English corrections. Furthermore, the work benefited from early discussion with P. Palsbøll and M. Bérubé.

Funding

This research was funded by WWF-France and ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, grant CIFRE n°2017/0124).

Author contributions

Conceptualization, C.T., E.B., S.P.; Formal analysis, C.T.; Resources, C.T, D.O., S.P.; Writing – original draft preparation, C.T.; Writing – review and editing, C.T., E.B., D.O., S.P.; Visualization, C.T.; Supervision, D.O., S.P.

Additional information

Competing interests: Authors declare no competing interests.

Data and material availability: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on request.



© Frédéric Bassemayousse / WWF

Chapitre 6

Discussion Générale et Perspectives

Cette thèse avait pour principal objectif d'étudier la population de Rorqual commun, *Balaenoptera physalus*, présente en Méditerranée à travers un panel d'outils faisant appel à la génétique des populations (marqueurs nucléaires et mitochondriaux) et à la photo-identification. Cette population résidente est emblématique de Méditerranée, et par « effet parapluie » sa conservation permet de protéger les autres espèces de cétacés présentes dans ce bassin. Dans ce contexte, cette thèse a permis de : 1) mettre au point de nouveaux marqueurs microsatellites informatifs pour plusieurs espèces de cétacés ; 2) estimer la taille réelle et efficace de la population ainsi que leurs évolutions par le passé ; 3) déterminer la structure de la population Méditerranéenne avec ses familles et ses liens de parenté.

1. Synthèses des résultats et discussion générale

1.1 Paramètres démographiques de la population de Rorqual commun

Les **chapitres 3, 4 et 5** de cette thèse ont permis de mettre à jour et d'approfondir nos connaissances de la population méditerranéenne de Rorqual commun. En effet, afin de pouvoir protéger au mieux une espèce et ses différentes populations, il est important de suivre temporellement les différents paramètres démographiques (taille réelle, taille efficace, probabilité de survie, ...).

À l'échelle globale de la Méditerranée, une récente étude – réalisée au cours des années 2018 et 2019 couvrant 77% de la Méditerranée avec des survols aériens et des observations visuelles à bord de bateaux – a estimé la taille de la population de Rorqual commun à 2 000 individus à partir des survols aériens et à environ 13 000 individus via les observations à bord de bateaux (ACCOBAMS 2021). Lorsque l'on descend à l'échelle du bassin occidental, la population a été estimée à 3 500 individus en 1996 (Forcada et al. 1996). Dans la partie Nord de ce bassin, deux études ont estimé la population entre 1 800 et 2 000 individus (Notarbartolodi-Sciara et al. 2003, **Annexe 1**: David et al. *en révision*). Les analyses réalisées dans le **chapitre 3** se focalisent aussi sur la partie Nord du bassin occidental. Nous avons estimé qu'environ 1 300 individus étaient présents dans cette zone pendant la période estivale (de juin à septembre). Notre estimation est cohérente avec les précédentes estimations bien que légèrement plus faible, cela pourrait refléter une diminution de la taille de la population, or on remarque que depuis 25 ans l'abondance des Rorquals communs est relativement stable (**chapitre 3** et **Annexe 1**), et ce quels que soient le type d'analyses ou la base de données

utilisés. Une autre hypothèse concernant cette légère différence serait un chevauchement imparfait des zones spatiales étudiées. Si on considère les différentes échelles spatiales étudiées ainsi que les différentes années d'étude, on constate qu'une grande majorité des Rorquals communs présents en Méditerranée occuperait la partie Nord-Ouest en période estivale. Cette zone a été reconnue comme zone d'intérêt pour l'alimentation des Rorquals communs au vue de la forte densité de leur proie principale, le krill (Notarbartolo-di-Sciara et al. 2003; Mannocci et al. 2018). La population méditerranéenne de Rorqual commun correspond à la deuxième plus petite population après celle présente en Mer de Cortez (546 individus; Tershy et al. 1990), les autres populations étant largement plus grandes (Atlantique Nord : 79 000 individus, Cooke 2018; Pacifique Nord-Est : 8 000-11 000 individus, Barlow et al. 1995). Les petites tailles des populations présentes en Mer Méditerranée et en Mer de Cortez sont dues à leur isolement géographique et génétique (Bérubé et al. 1998; Rivera-León et al. 2019), contrairement aux autres populations qui ont un habitat beaucoup plus large, à l'échelle d'un océan.

L'étude de la taille efficace de la population méditerranéenne de Rorqual commun remet en question la relative stabilité de la population en termes d'abondance. La taille efficace est un paramètre démographique complémentaire de la taille réelle (ou abondance) de la population. Un ratio taille efficace sur taille réelle ainsi que différents seuils de taille efficace ont été déterminés (Frankham 1995a; Allendorf and Luikart 2009). Un ratio entre 10 et 14% correspond à ce que l'on observe en moyenne pour plus de 100 espèces animales et végétales (Frankham 1995a; Palstra and Ruzzante 2008), cela signifie qu'une faible partie de la population sert à maintenir sa diversité génétique actuelle. Une taille efficace de 50 individus correspond à un seuil nécessaire pour minimiser à court terme la dépression de consanguinité (*i.e.* perte importante de diversité génétique). Une valeur de 500 individus est un seuil minimum pour que la population puisse maintenir son potentiel évolutif à long terme (Franklin 1980; Allendorf and Luikart 2009), et donc s'adapter aux conditions environnementales changeantes. L'étude réalisée dans le **chapitre 4** reconstruit l'histoire démographique de la taille efficace de la population méditerranéenne de Rorqual commun et montre une décroissance depuis 2,5 Ma. Une décroissance plus importante (d'un facteur 3,6) est observée à partir de 260 000 ans jusqu'à nos jours, pour atteindre à l'heure actuelle une taille efficace estimée à un maximum de 500 individus correspondant au seuil défini précédemment. Au sein de la population méditerranéenne, le ratio taille efficace sur taille réelle est estimé à environ 15% à partir de la première estimation d'abondance de cette population (3 500 individus ; Forcada et al. 1996), et à 38% à partir de l'abondance estimée dans le **chapitre 3** (environ 1 300 individus). La

différence de ratio est due à différentes résolutions spatiales, que ce soit pour les estimations d'abondance (bassin occidental *vs.* Nord-Ouest de ce bassin) mais aussi d'un point de vue analytique : la taille réelle est estimée pour une zone d'étude précise, tandis que la taille efficace est estimée pour une population entière, donc dans ce cas présent dans le Nord-Ouest du bassin occidental *vs.* dans toute la Mer Méditerranée. Si on retient un ratio de 15%, on peut considérer qu'une faible partie de la population sert à maintenir sa diversité génétique (Frankham 1995a; Palstra and Ruzzante 2008). En revanche, si la valeur de 38% est retenue, une plus grande partie de la population participe au maintien de la diversité génétique. Cette dernière valeur se rapproche de la valeur obtenue pour la population de Rorqual commun présente en Mer de Cortez (49 à 90% suivant la valeur de taille réelle ; Urbán Ramírez 1997; Bérubé et al. 2002; Rivera-León et al. 2019), qui est comme on l'a vu précédemment la plus petite population de Rorqual commun. La population de Mer de Cortez a subi de nombreuses pressions anthropogéniques depuis plusieurs siècles qui ont amené à une forte diminution de la taille réelle de la population puis de sa taille efficace (Rivera-León et al. 2019). Les populations méditerranéenne et de Mer de Cortez sont similaires, par leur diversité génétique, leur habitat, leur isolement vis-à-vis des autres populations, mais aussi par les menaces qui les impactent. Aujourd'hui, la population de Rorqual commun de Mer de Cortez est vulnérable face à la dérive génétique qui va réduire la diversité alors que les mutations sont trop rares pour maintenir le niveau de diversité. Ceci dans un contexte où l'on a des mortalités d'origine humaine cumulées à un changement ou une réduction d'habitat disponible (Rivera-León et al. 2019). Ces mêmes événements impactent aussi la population méditerranéenne. Les mêmes causes ayant les mêmes effets, la situation et la fragilité de la population de Rorqual commun de la Mer de Cortez doivent nous alerter sur l'avenir de la population méditerranéenne qui présente d'ores et déjà une situation génétique similaire. La population méditerranéenne peut donc être clairement considérée à risque et présenter un faible potentiel évolutif.

Au cours de cette thèse, d'autres paramètres démographiques importants ont été évalués, tels que la probabilité de survie des individus (**chapitre 3**), le taux de consanguinité (**chapitre 5**), l'évolution du sex-ratio et des statuts reproducteurs (**annexe 5**). La probabilité de survie des individus adultes a été estimée, suivant les modèles utilisés, entre 92 et 97%. Ce taux de survie élevé est caractéristique des espèces longévives qui n'ont qu'un petit à la fois et qui apportent des soins parentaux sur une longue période, généralement supérieure à un an (Bloch et al. 1993; Verborgh et al. 2009). Des valeurs similaires ont été obtenues pour une population rare de Baleine franche du Pacifique Nord à partir de données génétiques et de photo-identifications

(Wade et al. 2011), c'est-à-dire à partir des mêmes types de données que notre étude (**chapitre 3**).

Les espèces longévives, telle que le Rorqual commun, et qui présentent des générations chevauchantes (*i.e.* plusieurs générations sont présentes au même endroit et en même temps) sont plus à même de souffrir de consanguinité (Ford et al. 2018). Un habitat restreint et une récente diminution de la taille de leur population constituent généralement des circonstances favorisant la dépression de consanguinité (Randall et al. 2007; Frère et al. 2010). Si ces circonstances s'appliquent à la population méditerranéenne, les analyses réalisées au cours de cette thèse (**chapitre 5**) ont montré que ce n'était pas le cas pour la population méditerranéenne. Le faible taux de consanguinité observé (IR moyen \pm erreur standard = $0,005 \pm 0,100$, **chapitre 5**) est caractéristique des espèces naturelles migratrices (Frère et al. 2010). Deux hypothèses peuvent expliquer ce faible taux: 1) son isolement demeure modéré, altéré par un flux de gènes provenant des individus de l'Atlantique (Palsbøll et al. 2004), 2) il y a évitement, donc un choix de partenaire pour la reproduction qui serait avec les individus les plus différents génétiquement.

L'étude du sex-ratio repose sur une détermination génétique du sexe des individus car il n'est pas possible de l'identifier de manière visuelle sur le terrain. Depuis le début des campagnes de prélèvement, soit 2006, le sex-ratio est constant et à l'équilibre sur l'ensemble des années avec en moyenne 51% de mâles et 49% de femelles (**annexe 5**). La parité chez le Rorqual commun est donc respectée dans la partie Nord-Ouest de la Méditerranée. Cela a également été montré dans différentes zones pour cette espèce (*e.g.* Golfe du Maine, Mer de Cortez ; Bérubé et al. 1998). Cette parité n'est pas vraie pour toutes les espèces de grands cétacés ni pour toutes les populations, notamment pour la Baleine franche du Pacifique Nord ainsi que la population de Rorquals communs du Golfe du Saint-Laurent où le ratio est d'environ 2 pour 1 en faveur des mâles, les mâles Rorquals communs étant surnuméraires dans les grands groupes (Bérubé et al. 1998; Wade et al. 2011). À l'inverse, la population de Rorquals communs d'Islande présente un sex-ratio en faveur des femelles. Ce résultat est néanmoins entaché d'un biais d'échantillonnage potentiel car il se fonde sur des données issues de la chasse baleinière, laquelle sélectionne les femelles qui sont plus grosses que les mâles (Bérubé et al. 1998).

Concernant l'étude des statuts reproducteurs, deux paramètres ont été analysés, le taux de gestation des femelles et le taux de mâles actifs par année. Pour cela, quatre hormones

stéroïdiennes ont été caractérisées et quantifiées : la progestérone, la testostérone, l'androstènedione et l'œstradiol. Peu d'études scientifiques portent sur ce sujet car les analyses et les interprétations sont complexes, surtout pour les femelles. Chez les femelles, dans la mesure où les variations hormonales au cours du cycle sexuel et de la gestation, ne sont pas connues avec précision, les interprétations se fondent sur les connaissances physiologiques établies chez les autres espèces de mammifères (Thibault and Levasseur 2001). Les résultats obtenus ont montré que 42% des femelles Rorquals communs échantillonnées étaient gestantes, et que 64% des mâles étaient actifs sexuellement, en moyenne sur les six années d'études de 2010 à 2016 (**annexe 5**). Le taux de femelles gestantes que nous obtenons concorde avec des études réalisées sur des populations de l'hémisphère Sud et de l'Atlantique Nord (Lockyer 1984; Kjeld et al. 2006; Evans and Raga 2012). Selon les dosages obtenus et les mois d'échantillonnage (entre juin et septembre), il y aurait une forte proportion de femelles en gestation au printemps, ce qui est cohérent avec une saison d'accouplements et de naissances en automne-hiver. Pour les mâles actifs, les dosages d'androgènes (androstènedione et testostérone) obtenus sont également en accord avec la littérature, où il est indiqué qu'une augmentation de la sécrétion de ces hormones a lieu de juin à novembre pour atteindre un pic en décembre au moment de la période de reproduction (**annexe 5** ; Lockyer 1984; Kjeld et al. 2006).

1.2 Structuration de la population

Les **chapitres 2 et 5** de cette thèse permettent de mieux comprendre la structuration de la population méditerranéenne de Rorqual commun en identifiant les liens possibles avec les populations voisines et en identifiant les relations interindividuelles au sein d'une population.

La population méditerranéenne de Rorqual commun a longtemps été considérée comme résidente et isolée de celle de l'Atlantique (Bérubé et al. 1998; Giménez et al. 2013). Un certain degré de divergence a été détecté au niveau de marqueurs nucléaires (6 microsattellites analysés) et mitochondrial (288 bp ADNmt région contrôle ; Bérubé et al. 1998), mais aussi au niveau isotopique (Giménez et al. 2013) entre les populations d'Atlantique et de Méditerranée. À l'heure actuelle, le nombre de marqueurs nucléaires disponibles ainsi que la taille de fragment séquençable d'ADNmt ont augmenté. L'analyse de 29 marqueurs nucléaires a eu lieu dans le **chapitre 5 – partie 1**, et a révélé qu'il n'était pas possible d'identifier une structuration de la

population, donc qu'une seule population panmictique était présente en Méditerranée. De même, un fragment de 465 bp de l'ADNmt a été séquencé dans le **chapitre 2 – partie 2**, et parmi les huit haplotypes identifiés en Méditerranée, quatre sont privés et ne sont retrouvés que chez des individus méditerranéens. Ces haplotypes suggèrent ainsi une récente isolation génétique de la population méditerranéenne.

Palsbøll et al. (2004) ont aussi mis en évidence qu'il existerait un flux de gènes entre les populations présentes en Méditerranée et en Atlantique, via l'analyse d'un fragment de l'ADNmt. Ils ont estimé ce taux de migration à deux femelles par génération. A l'appui de cette hypothèse, on observe une migration de certains Rorquals communs à travers le Déroit de Gibraltar (Gauffier et al. 2018). Le passage au-delà du Déroit vers l'Atlantique a été confirmé par le balisage d'un individu (sur 21 individus balisés) en Méditerranée Nord-Ouest (Bentaleb et al. 2011; Panigada et al. 2015). L'analyse des liens de parenté entre les individus méditerranéens (508) et les quelques individus (13) de l'Atlantique que nous avons à disposition a aussi renforcé la présence de ce flux de gènes entre les deux populations, puisque deux relations demi-frères/demi-sœurs ont été identifiées (**chapitre 6**). Ces relations ne représentent que 2% de toutes les relations identifiées. En complément, nous avons séquencé une partie de l'ADN mitochondrial de nos 490 échantillons et replacé ce large échantillonnage méditerranéen dans un contexte plus global avec toutes les populations mondiales de Rorqual commun (**chapitre 2**). Ces analyses ont montré que les haplotypes présents en Méditerranée faisaient partie du grand groupe Atlantique (**chapitre 2 - Figure 10**) au sein duquel on remarque deux sous-groupes/lignées, séparant aussi les haplotypes méditerranéens en deux. Un suivi acoustique des Rorquals communs de Méditerranée avait déjà suggéré l'existence de deux sous-populations (Castellote et al. 2012), ce qui corrobore certains de nos résultats.

L'ensemble de ces résultats confirme le fait que les populations de Rorqual commun de Méditerranée et d'Atlantique soient distinctes, mais la présence d'un flux de gènes modéré est bien avérée. Ce flux de gènes serait d'origine maternelle étant donné la différence de structure que l'on a observé entre les analyses mitochondriales (hérédité maternelle) et nucléaires (hérédité biparentale). Ce même isolement génétique avec un léger flux de gènes a été mis en évidence pour d'autres espèces de cétacés présents en Méditerranée : le Globicéphale noir (Kraft et al. 2020), le Cachalot (Drouot et al. 2004), le Dauphin de Risso (Gaspari et al. 2007a).

L'analyse des liens de parenté – parents/enfants, demi-frères/demi-sœurs et vrais frères et sœurs (*i.e.* qui partagent les mêmes parents) – a permis une analyse plus poussée de la

structuration de la population méditerranéenne. La plus grande famille (qui représente 1,5% du nombre total de familles identifiées dans la population) comprend 11 individus (**chapitre 5 - Figure 18**) mais la majorité des familles (74,3%) n'en possède que deux. Aucune famille ni aucun individu reproducteur ne semblent être plus important d'un point de vue génétique pour la population. Tous les individus participent de manière égale au maintien de la diversité génétique de la population méditerranéenne de Rorqual commun ce qui est cohérent avec son mode de vie solitaire (Notarbartolo-di-Sciara et al. 2003) et sa forte mortalité infantile (77% de mortalité des jeunes au cours de leur première année ; Arrigoni et al. 2011). De la même manière, aucun reproducteur dominant n'a été mis en évidence chez le Béluga bien que des grandes familles soient présentes (O'Corry-Crowe et al. 2020).

Ces analyses de parenté ont permis de mettre en évidence pour la première fois en Méditerranée quelques vrais frères/sœurs. Cela signifie qu'un même mâle et une même femelle se sont retrouvés et se sont reproduit a minima deux fois ensemble à un intervalle de temps au moins égal à deux ans correspondant au cycle de reproduction des femelles (Aglar et al. 1993), mais aussi en raison de la taille et de l'intervalle de temps entre les collectes des individus concernés. Trois relations vrais frères/sœurs ont ainsi été identifiées parmi nos 508 échantillons qui représentent environ 39 % de la population, on peut donc s'attendre à ce qu'il y en ait plus. Cette découverte (**chapitre 5 – partie 2**) interroge sur le système de reproduction du Rorqual commun jusque-là considéré comme aléatoire et suggère une double stratégie. Quelques individus auraient un partenaire préférentiel, ce qui expliquerait la présence de vrais frères/sœurs, tandis que la majorité aurait une stratégie opportuniste et aléatoire, produisant des demi-frères/demi-sœurs. La présence de vrais frères/sœurs ou cette double stratégie de reproduction n'ont jamais été étudiées auparavant chez les cétacés. Cette double stratégie est au contraire commune chez certaines espèces, comme chez les poissons. Certains auteurs (Mank and Avise 2006) suggèrent une composante génétique dans ce comportement qui serait héréditaire. Il serait intéressant d'élargir notre échantillonnage afin d'être plus exhaustif sur le nombre d'individus impliqué dans des relations vrais frères/sœurs, et potentiellement estimer si ce comportement reproducteur est marqué génétiquement et est héréditaire.

1.3 Bilan / État de santé

L'ensemble des résultats présentés plus haut – taille efficace (400 à 500 individus), taille réelle (1 300 individus), flux de gènes modéré avec l'Atlantique, présence d'haplotypes privés et absence de structuration génétique, pas de consanguinité – dresse un diagnostic mitigé de la situation de la population de Rorqual commun de Méditerranée au niveau évolutif et reproductif.

En effet, si le taux de gestation des femelles reste constant et assez élevé, peu de nouveau-nés et jeunes sont observés au cours des missions en mer. Une étude sur les relevés d'échouages entre 1986 et 2007 a montré une surmortalité significative des nouveau-nés et des individus immatures liée à des causes naturelles ou anthropiques (UN/MAP 2017). Au cours de cette thèse, deux menaces anthropiques ont fait l'objet d'étude préliminaire : la contamination par les micro-plastiques (**annexe 4**) et les collisions avec les navires (**chapitre 3**).

L'impact des micro-plastiques, et notamment des phtalates, dans l'environnement marin est une question majeure actuellement, car ils sont omniprésents. Les phtalates, utilisés par exemple pour accroître la flexibilité et la souplesse des plastiques, sont reconnus comme étant des reprotoxiques et des perturbateurs endocriniens. Le Rorqual commun, dont le mode d'alimentation le conduit à filtrer de grandes quantités d'eau, est directement impacté par ce type de contamination. Dix phtalates parmi les plus communs ont été analysés dans 210 biopsies de Rorqual commun collectées au cours de 4 années. Les résultats ont montré que la totalité des individus échantillonnés étaient contaminés par au moins un phtalate, avec des teneurs significatives pour certains d'entre eux (**annexe 4**). Les études sur ce sujet sont peu nombreuses mais Fossi et al. (2016) ont également trouvé que le Rorqual commun, ainsi que le requin pèlerin, étaient largement contaminés par les micro-plastiques. Leurs analyses ont également révélé que les échantillons collectés en Mer Méditerranée était quatre fois plus contaminés que ceux de la Mer de Cortez. Si les impacts de ces molécules marqueurs de la pollution plastique sur la biologie et la physiologie des animaux sont inconnus et complexes à étudier, la mortalité induite par les macro-plastiques est en revanche bien documentée pour un grand nombre de cétacés. Près de 66% des espèces de cétacés sont impactées par l'ingestion de déchets plastiques (Fossi et al. 2018), et jusqu'à 22% des individus échoués sont morts à cause de ces ingestions de plastiques, les taux variant selon l'espèce et la zone géographique (Baulch and Perry 2014).

Les collisions avec les navires sont la première cause de mortalité d'origine anthropique des Rorquals communs (Pace et al. 2015). Si le nombre d'échouages de Rorquals communs est constant au fil des années entre 1990 et 2009, avec en moyenne entre 2 et 3 individus échoués par an (Dhermain et al. 2015), le pourcentage de ceux qui sont morts par collision a crû de 2.4% entre 1990 et 2001 à 3.3% entre 2008 et 2019 pour la partie Nord-Ouest de la Méditerranée (Panigada et al. 2006 ; **chapitre 3**). Un pourcentage très probablement sous-estimé car il ne tient pas compte des animaux morts au large qui n'ont jamais rejoint le rivage.

2. Perspectives

2.1 Recherche fondamentale

Les études menées au cours de cette thèse ont permis d'approfondir la structure de la population de Rorqual commun en Méditerranée, d'estimer sa taille efficace, mais surtout d'identifier les liens de parenté présents entre les individus méditerranéens. Certains résultats qui y sont présentés pourraient néanmoins être approfondis ou enrichis.

Des précisions pourraient être apportées dans l'estimation de la taille réelle de la population en intégrant séparément les mâles et les femelles dans les modèles de capture-marquage-recapture (CMR). Cela permettrait, bien que la parité soit respectée, d'estimer le nombre d'individus de chaque sexe, mais aussi d'estimer les probabilités de survie pour chacun des sexes séparément. En complément, de nouveaux modèles pourraient être développés en population ouverte, ce qui permettrait d'ajouter d'autres types de données à celles déjà utilisées (photo-identifications et géotypes) afin d'affiner les estimations et couvrir une plus grande zone géographique. Les données des campagnes SAMM (Suivi Aérien de la Mégafaune Marine, 2011-2012 et 2018-2019) en particulier, collectées en été mais aussi en hiver, complèteraient avantageusement le jeu de donnée que nous avons utilisé. Les modèles à développer devraient intégrer deux types d'analyses : le « distance sampling » (pour les données de survol aérien) et le CMR (pour les données génétiques et photo-identifications). Le développement de ces types de modèle est en cours de discussion avec des chercheurs du CEFE à Montpellier (Olivier Gimenez et Valentin Lauret).

Concernant les estimations et l'évolution de la taille efficace, qui sont basées sur un fragment d'ADN mitochondrial dans nos résultats, l'avancée rapide des nouvelles technologies

permet dorénavant de séquencer l'ADNmt en entier augmentant ainsi l'information disponible (nombre de mutations) et donc la précision des analyses. Le séquençage des mitogénomes complets de Rorqual commun de Méditerranée permettrait également de compléter la phylogéographie des Rorquals communs via l'intégration et la comparaison des mitogénomes existants d'autres populations, telles que celles de l'Atlantique et du Pacifique (Archer et al. 2013; Árnason et al. 2018).

Afin de comprendre comment la Méditerranée a été colonisée par le Rorqual commun, il serait intéressant de tester différents scénarii démographiques à partir des données génotypiques que nous avons obtenues en utilisant conjointement la méthode ABC (Approximate Bayesian Computation ; Beaumont et al. 2002; Beaumont 2010) et celle de la théorie de la coalescence. Ces méthodes permettent d'émettre des hypothèses sur différents scénarii possibles en incluant diverses routes d'introduction, population sources, etc. et de tester statistiquement quel scénario est le plus probable (Guillemaud et al. 2010; Estoup and Guillemaud 2010). Ces tests de scénario ont déjà largement été utilisés pour tester les goulots d'étranglement et les changements de taille efficace, mais aussi pour déterminer des routes d'introduction de nombreuses espèces invasives, révélant dans certains cas de multiples introductions (Miller et al. 2005; Boissin et al. 2012, 2016; Mutitu et al. 2020).

Les mouvements des Rorquals communs ainsi que leur occupation de la Méditerranée présentent encore quelques zones d'ombre, des projets conjoints avec des institutions italiennes et espagnoles permettraient de mettre en commun et de comparer les différents catalogues de photo-identification existants. Dans le but de déterminer s'il existe des recaptures d'individus entre ces zones et de mieux comprendre comment les individus se déplacent et à quel moment de l'année.

Au sein de la Méditerranée, d'autres espèces sont considérées comme résidentes et distinctes de celles de l'Atlantique, notamment le Cachalot et le Globicéphale noir (Engelhaupt et al. 2009; Verborgh et al. 2016), qui sont reconnus comme « En danger » et « Data déficient » en Méditerranée, respectivement selon l'IUCN (Cañadas 2012; Notarbartolo-di-Sciara et al. 2012). Ces deux espèces possèdent une structure sociale différente de celle du Rorqual commun (matriarcale vs. solitaire). Étudier ces espèces permettrait de comparer les différents paramètres démographiques ainsi que leur structure génétique avec les résultats obtenus dans cette étude pour le Rorqual commun.

2.2 Conservation

Bien que la population méditerranéenne de Rorqual commun ne présente pas de structure génétique, il est nécessaire d'éviter une fragmentation de son habitat mais aussi de sa population, notamment par exemple par la création « d'autoroutes » maritimes pour la navigation. La fragmentation de l'habitat entraînerait une réduction voire une inaccessibilité aux zones d'alimentation. La fragmentation de la population entraînerait quant à elle une augmentation de l'effet des différents processus évolutifs, qui eux induiront une réduction de la taille efficace de la population, de la variabilité génétique ainsi qu'une réduction de son potentiel évolutif (Pertoldi et al. 2007).

Une diminution de sa variabilité génétique entraînerait aussi de la consanguinité, un caractère que cette population méditerranéenne ne présente pas actuellement (**chapitre 5**). Le flux de gènes présent entre la population de Méditerranée et celle de l'Atlantique, même si modéré, est important d'un point de vue évolutif et permet de maintenir une certaine diversité génétique. Certaines stratégies de sauvetage de populations ont justement fait appel à une augmentation de flux de gènes entre populations pour maintenir celles en danger (Gotelli 1991; Guillaume and Perrin 2006), ceci a notamment été vu chez le mouflon canadien (Hogg et al. 2006), chez des oiseaux (Van Schmidt and Beissinger 2020) mais aussi chez des plantes (Eriksson et al. 2014).

Les collisions sont la principale cause de mortalité d'origine anthropique, et cette menace est croissante (environ 4% par an) comme l'indique l'augmentation du nombre d'animaux présentant des marques (**chapitre 3** ; Panigada et al 2006). Une étude réalisée par le WWF a estimé un nombre annuel de 3 168 collisions potentielles pour le Rorqual commun (Jacob and Ody 2017). Ce chiffre très supérieur aux estimations réelles suggère une capacité d'esquive de la part des animaux, dont le coût écologique (nourrissage, reproduction, socialisation, etc.) est inconnu mais potentiellement non négligeable. À l'heure actuelle, des solutions sont proposées et certaines sont mises en place, comme REPCET (un système participatif embarquer qui permet de mutualiser les observations de cétacés entre les navires équipés du système qui pourront ainsi prendre les meilleures mesures d'évitement) mais leurs limites sont nombreuses. Tous les navires ne peuvent pas être équipé d'un système de détection participatif. Une limitation de vitesse des navires de commerce et ferries serait à préconiser mais cela engendre un problème économique pour les ferries. L'autre enjeu est de pousser à la création en Méditerranée d'une « Zone Maritime Particulièrement Vulnérable », le seul outil

juridique qui permette, à ce jour, de contraindre le trafic maritime international à des mesures environnementales. À moyen terme, l'inscription de la zone du Sanctuaire Pelagos sur la liste des ZMPV permettrait de fournir les bases réglementaires pour une meilleure protection des cétacés vis-à-vis des collisions. À long terme, la création d'un système anticollision soit embarqué, soit localisé sur des routes pour les navires rapides serait une solution efficace. En complément de ces solutions matérielles ou juridique, il serait important de mieux comprendre le comportement des grands cétacés en situation de collision et l'impact potentiel de canaux concentrant la navigation.



Références bibliographiques

- ACCOBAMS (2021) Estimates of abundance and distribution of cetaceans, marine mega-fauna and marine litter in the Mediterranean Sea from 2018-2019 surveys.
- Agler BA, Beard JA, Bowman RS, Corbett HD, Frohock SE, Hawvermale MP, Katona SK, Sadove SS, Seipt IE (1990) Fin whale (*Balaenoptera physalus*) photographic identification: methodology and preliminary results from the western North Atlantic.
- Agler BA, Schooley RL, Frohock SE, Katona SK, Seipt IE (1993) Reproduction of photographically identified fin whales, *Balaenoptera physalus*, from the Gulf of Maine. *J Mammal* 74:577–587. doi: 10.2307/1382276
- Aguilar A, Borrell A (2007) Open-boat whaling on the straits of Gibraltar ground and adjacent waters. *Mar Mammal Sci* 23:322–342. doi: 10.1111/j.1748-7692.2007.00111.x
- Aguilar A, García-Vernet R (2018) Fin Whale: *Balaenoptera physalus*. In: *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press, pp 368–371
- Aguilar A, Borrell A, Reijnders PJH (2002) Geographical and temporal variation of organochlorine contaminants in marine mammals. *Mar Environ Res* 53:425–452. doi: 10.1016/S0141-1136(01)00128-3
- Akaike H (1973) Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. Springer Verlag 267–287.
- Allendorf FW, Luikart G (2009) Conservation and the genetics of populations. John Wiley & Sons
- Alter SE, Rynes E, Palumbi SR (2007) DNA evidence for historic population size and past ecosystem impacts of gray whales. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15162–15167. doi: 10.1073/pnas.0706056104
- Amaral AR, Lovewell G, Coelho MM, Amato G, Rosenbaum HC (2014) Hybrid Speciation in a Marine Mammal: The Clymene Dolphin (*Stenella clymene*). *PLoS One* 9:e83645. doi: 10.1371/journal.pone.0083645
- Amos W, Worthington Wilmer J, Fullard K, Burg TM, Croxall JP, Bloch D, Coulson T (2001) The influence of parental relatedness on reproductive success. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* 268:2021–2027. doi: 10.1098/rspb.2001.1751
- Anmarkrud JA, Kleven O, Bachmann L, Lifjeld JT (2008) Microsatellite evolution: Mutations,

- sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. *BMC Evol Biol* 8:138. doi: 10.1186/1471-2148-8-138
- Ansmann IC, Lanyon JM, Seddon JM, Parra GJ (2013) Monitoring Dolphins in an Urban Marine System: Total and Effective Population Size Estimates of Indo-Pacific Bottlenose Dolphins in Moreton Bay, Australia. *PLoS One* 8:e65239. doi: 10.1371/journal.pone.0065239
- Aparicio JM, Ortego J, Cordero PJ (2006) What should we weigh to estimate heterozygosity, alleles or loci? *Mol Ecol* 15:4659–4665. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03111.x
- Archer FI, Morin PA, Hancock-Hanser BL, Robertson KM, Leslie MS, Bérubé M, Panigada S, Taylor BL (2013) Mitogenomic Phylogenetics of Fin Whales (*Balaenoptera physalus* spp.): Genetic Evidence for Revision of Subspecies. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0063396
- Archer FI, Brownell RL, Hancock-Hanser BL, Morin PA, Robertson KM, Sherman KK, Calambokidis J, Urbán R. J, Rosel PE, Mizroch SA, Panigada S, Taylor BL (2019) Revision of fin whale *Balaenoptera physalus* (Linnaeus, 1758) subspecies using genetics. *J Mammal* 1–18. doi: 10.1093/jmammal/gyz121
- Armsworth PR, Chan KMA, Daily GC, Ehrlich PR, Kremen C, Ricketts TH, Sanjayan MA (2007) Ecosystem-Service Science and the Way Forward for Conservation. *Conserv Biol* 21:1383–1384. doi: 10.1111/j.1523-1739.2007.00821.x
- Arnason U, Gullberg A, Widegren B (1993) Cetacean mitochondrial DNA control region: Sequences of all extant baleen whales and two sperm whale species. *Mol Biol Evol* 10:960–970.
- Arnason U, Gullberg A, Janke A (2004) Mitogenomic analyses provide new insights into cetacean origin and evolution. *Gene* 333:27–34. doi: 10.1016/j.gene.2004.02.010
- Árnason Ú, Lammers F, Kumar V, Nilsson MA, Janke A (2018) Whole-genome sequencing of the blue whale and other rorquals finds signatures for introgressive gene flow. *Sci Adv* 4:eap9873. doi: 10.1126/sciadv.aap9873
- Arrigoni M, Manfredi P, Panigada S, Bramanti L, Santangelo G (2011) Life-history tables of the Mediterranean fin whale from stranding data. *Mar Ecol* 32:1–9. doi: 10.1111/j.1439-0485.2011.00437.x

- Aulich MG, McCauley RD, Saunders BJ, Parsons MJG (2019) Fin whale (*Balaenoptera physalus*) migration in Australian waters using passive acoustic monitoring. *Sci Rep* 9:8840. doi: 10.1038/s41598-019-45321-w
- Authier M, Galatius A, Gilles A, Spitz J (2020) Of power and despair in cetacean conservation: estimation and detection of trend in abundance with noisy and short time-series. *PeerJ* 8:e9436. doi: 10.7717/peerj.9436
- Avise J (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts
- Avise JC (2009) Phylogeography: Retrospect and prospect. *J Biogeogr* 36:3–15. doi: 10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x
- Avise JC, Hamrick JL (2001) *Conservation genetics: case histories from nature*. Kluwer Academic Publishers
- Avise JC, Johns GC (1999) Proposal for a standardized temporal scheme of biological classification for extant species. *Proc Natl Acad Sci* 96:7358–7363. doi: 10.1073/pnas.96.13.7358
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 18:489–522.
- Baker CS, Lento GM, Cipriano F, Palumbi SR (2000) Predicted decline of protected whales based on molecular genetic monitoring of Japanese and Korean markets. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* 267:1191–1199. doi: 10.1098/rspb.2000.1128
- Baker CS, Steel D, Hamner RM, Hickman G, Boren L, Arlidge W, Constantine R (2016) Estimating the abundance and effective population size of Maui's dolphins using microsatellite genotypes in 2015–16, with retrospective matching to 2001–16.
- Bandelt H, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37–48.
- Barbara T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol Ecol* 16:3759–3767. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03439.x

- Barendse J, Best PB, Thornton M, Elwen SH, Rosenbaum HC, Carvalho I, Pomilla C, Collins TJQ, Meÿer M, Leeney RH (2011) Transit station or destination? Attendance patterns, movements and abundance estimate of humpback whales off west South Africa from photographic and genotypic matching. *African J Mar Sci* 33:353–373. doi: 10.2989/1814232X.2011.637343
- Barlow J, Brownell Jr RL, DeMaster DP, Forney KA, Lowry MS (1995) U.S. Pacific Marine Mammal Stock Assessments.
- Baulch S, Perry C (2014) Evaluating the impacts of marine debris on cetaceans. *Mar Pollut Bull* 80:210–221. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.12.050
- Bearzi G, Fortuna CM, Reeves RR (2008) Ecology and conservation of common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in the Mediterranean Sea. *Mamm Rev* 39:92–123. doi: 10.1111/j.1365-2907.2008.00133.x
- Beaumont MA (2010) Approximate Bayesian computation in evolution and ecology. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 41:379–406. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-102209-144621
- Beaumont MA, Zhang W, Balding DJ (2002) Approximate Bayesian Computation in Population Genetics. *Genetics* 162:2025–2035. doi: 10.1093/genetics/162.4.2025
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX: Windows TM software for population genetics. Lab. Génome, Popul. Interact. CNRS Umr 5000, Univ. Montpellier II, Montpellier (France).
- Bentaleb I, Martin C, Vrac M, Mate BR, Mayzaud P, Siret D, De Stephanis R, Guinet C (2011) Foraging ecology of Mediterranean fin whales in a changing environment elucidated by satellite tracking and baleen plate stable isotopes. *Mar Ecol Prog Ser* 438:285–302. doi: 10.3354/meps09269
- Bermingham E, Avise JC (1986) Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. *Genetics* 113:939–965.
- Berta A, Sumich JL, Kovacs KM (2015) Reproductive Structures, Strategies, and Patterns. In: *Marine Mammals*. Elsevier, pp 465–532
- Bérubé M, Palsbøll PJ (1996) Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Mol Ecol* 5:1–6.

- Bérubé M, Palsbøll PJ (2018) Hybridism. In: Encyclopedia of Marine Mammals. Elsevier, pp 496–501
- Bérubé M, Aguilar A, Dendanto D, Larsen F, Notarbartolo-Di-Sciara G, Sears R, Sigurjonsson J, Urban-R. J, Palsbøll PJ (1998) Population genetic structure of North Atlantic, Mediterranean Sea and Sea of Cortez fin whales, *Balaenoptera physalus* (Linnaeus 1758): Analysis of mitochondrial and nuclear loci. *Mol Ecol* 7:585–599. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00359.x
- Bérubé M, Jørgensen H, McEwing R, Palsbøll PJ (2000) Polymorphic di-nucleotide microsatellite loci isolated from the humpback whale, *Megaptera novaeangliae*. *Mol Ecol* 9:2181–2183. doi: 10.1046/j.1365-294X.2000.105315.x
- Bérubé M, Urbán J, Dizon AE, Brownell RL, Palsbøll PJ (2002) Genetic identification of a small and highly isolated population of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the Sea of Cortez, Mexico. *Conserv. Genet.* 3:183–190.
- Bérubé M, Rew MB, Skaug H, Jørgensen H, Robbins J, Best PB, Sears R, Palsbøll PJ (2005) Polymorphic microsatellite loci isolated from humpback whale, *Megaptera novaeangliae* and fin whale, *Balaenoptera physalus*. *Conserv Genet* 6:631–636. doi: 10.1007/s10592-005-9017-5
- Bérubé M, Danielsdottir AK, Aguilar A, Arnason A, Bloch D, Dendanto D, Larsen F, Lien J, Notarbartolo-di-Sciara G, Sears R, Sigurjonsson J, Urban-R. J, Witting L, Oien N, Vikingsson GA, Palsbøll PJ (2006) High Rates of Gene Flow Among Geographic Locations in North Atlantic Fin Whales (*Balaenoptera Physalus*).
- Bianchi N, Morri C (2000) Marine biodiversity of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for future research. *Mar Pollut Bull* 40:367–376. doi: 10.1016/S0025-326X(00)00027-8
- Birky CW, Maruyama T, Fuerst P (1983) An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics* 103:513–527.
- Blackmer AL, Anderson SK, Weinrich MT (2000) Temporal Variability in Features Used To Photo-Identify Humpback Whales (*Megaptera novaeangliae*). *Mar Mammal Sci* 16:338–354. doi: 10.1111/j.1748-7692.2000.tb00929.x

- Bloch D, Lockyer C, Zachariassen M (1993) Age and growth parameters of the long-finned pilot whale off the Faroe Islands. In: Report of the International Whaling Commission Special Issue; Biology of northern hemisphere pilot whales. pp 163–207
- Blouin MS (2003) DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends Ecol Evol* 18:503–511. doi: 10.1016/S0169-5347(03)00225-8
- Boissin E, Hurley B, Wingfield MJ, Vasaitis R, Stenlid J, Davis C, de Groot P, Ahumada R, Carnegie A, Goldarazena A, Klasmer P, Wermelinger B, Slippers B (2012) Retracing the routes of introduction of invasive species: the case of the *Sirex noctilio* woodwasp. *Mol Ecol* 21:5728–5744. doi: 10.1111/mec.12065
- Boissin E, Micu D, Janczyszyn-Le Goff M, Neglia V, Bat L, Todorova V, Panayotova M, Kruschel C, Macic V, Milchakova N, Keskin Ç, Anastasopoulou A, Nasto I, Zane L, Planes S (2016) Contemporary genetic structure and postglacial demographic history of the black scorpionfish, *Scorpaena porcus*, in the Mediterranean and the Black Seas. *Mol Ecol* 25:2195–2209. doi: 10.1111/mec.13616
- Bonner S (2013) Response to: a new method for estimating animal abundance with two sources of data in capture-recapture studies. *Methods Ecol Evol* 4:585–588. doi: 10.1111/2041-210X.12047
- Boulanger J, Kendall KC, Stetz JB, Roon DA, Waits LP, Paetkau D (2008) Multiple data sources improve DNA-based mark-recapture population estimates of grizzly bears. *Ecol Appl* 18:577–589. doi: 10.1890/06-1941.1
- Bourret V, Macé M, Crouau-Roy B (2007) Genetic variation and population structure of western Mediterranean and northern Atlantic *Stenella coeruleoalba* populations inferred from microsatellite data. *J Mar Biol Assoc United Kingdom* 87:265–269. doi: 10.1017/S0025315407054859
- Bourret V, Macé M, Bonhomme M, Crouau-Roy B (2008) Microsatellites in Cetaceans: An Overview. *Open Mar Biol J* 2:38–42. doi: 10.2174/1874450800802010038
- Bowen W (1997) Role of marine mammals in aquatic ecosystems. *Mar Ecol Prog Ser* 158:267–274. doi: 10.3354/meps158267
- Bradford AL, Forney KA, Oleson EM, Barlow J (2017) Abundance estimates of cetaceans from a line-transect survey within the U.S. Hawaiian Islands Exclusive Economic Zone. *Fish*

- Bull 115:129–142. doi: 10.7755/FB.115.2.1
- Brownell RL, Yablokov A V. (2009) Whaling, Illegal and Pirate. In: Encyclopedia of Marine Mammals, Second Edi. Elsevier, pp 1235–1239
- Buckland ST (1990) Estimation of Survival Rates from Sightings of Individually Identifiable Whales. Reports Int Whal Comm (Special Issue 12) 149–153.
- Buckland ST, Anderson DR, Burnham KP, Laake JL, Borchers DL, Thomas L (2001) Introduction to Distance Sampling: Estimating Abundance of Biological Populations. Oxford University Press
- Burnham KP (1987) Design and analysis methods for fish survival experiments based on release-recapture. American Fisheries Society
- Caballero A (1994) Developments in the prediction of effective population size. Heredity (Edinb) 73:657–679. doi: 10.1038/hdy.1994.174
- Cabrera AA, Hoekendijk JPA, Aguilar A, Barco SG, Berrow S, Bloch D, Borrell A, Cunha HA, Dalla Rosa L, Dias CP, Gauffier P, Hao W, Landry S, Larsen F, Martín V, Mizroch S, Oosting T, Øien N, Pampoulie C, Panigada S, Prieto R, Ramp C, Rivera-Léon V, Robbins J, Ryan C, Schall E, Sears R, Silva MA, Urbán J, Wenzel FW, Palsbøll PJ, Bérubé M (2019) Fin whale (*Balaenoptera physalus*) mitogenomics: A cautionary tale of defining sub-species from mitochondrial sequence monophyly. Mol Phylogenet Evol 135:86–97. doi: 10.1016/j.ympev.2019.02.003
- Cañadas A (2012) Globicephala melas.
- Carey JR (2003) Life Span: A conceptual overview. Popul Dev Rev 29:1–18.
- Carroll EL, Patenaude NJ, Childerhouse SJ, Kraus SD, Fewster RM, Baker CS (2011) Abundance of the New Zealand subantarctic southern right whale population estimated from photo-identification and genotype mark-recapture. Mar Biol 158:2565–2575. doi: 10.1007/s00227-011-1757-9
- Castellote M, Clark CW, Lammers MO (2012) Fin whale (*Balaenoptera physalus*) population identity in the western Mediterranean Sea. Mar Mammal Sci 28:325–344. doi: 10.1111/j.1748-7692.2011.00491.x
- Charlesworth D, Willis JH (2009) The genetics of inbreeding depression. Nat Rev Genet

10:783–796. doi: 10.1038/nrg2664

- Chen L, Yang G (2009) A set of polymorphic dinucleotide and tetranucleotide microsatellite markers for the Indo-Pacific humpback dolphin (*Sousa chinensis*) and cross-amplification in other cetacean species. *Conserv Genet* 10:697–700. doi: 10.1007/s10592-008-9618-x
- Childerhouse S, Jackson JA, Baker CS, Gales N, Clapham PJ, Brownell Jr RL (2008) *Megaptera novaeangliae* (Oceania subpopulation). IUCN Red List Threat. Species
- Chinnery PF, Hudson G (2013) Mitochondrial genetics. *Br Med Bull* 106:135–159. doi: 10.1093/bmb/ldt017
- Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FAM (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255:1–29. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.11.031
- Clapham PJ, Baker CS (2018) Whaling, Modern. In: *Encyclopedia of Marine Mammals*. Elsevier, pp 1070–1074
- Clapham PJ, Palsbøll PJ (1997) Molecular analysis of paternity shows promiscuous mating in female humpback whales (*Megaptera novaeangliae*, Borowski). *Proc Biol Sci* 264:95–98. doi: 10.1098/rspb.1997.0014
- Clisson I, Lathuilliere M, Crouau-Roy B (2000) Conservation and evolution of microsatellite loci in primate taxa. *Am J Primatol* 50:205–214. doi: 10.1002/(SICI)1098-2345(200003)50:3<205::AID-AJP3>3.0.CO;2-Y
- Coll M, Piroddi C, Steenbeek J, Kaschner K, Ben Rais Lasram F, Aguzzi J, Ballesteros E, Bianchi CN, Corbera J, Dailianis T, Danovaro R, Estrada M, Froglià C, Galil BS, Gasol JM, Gertwagen R, Gil J, Guilhaumon F, Kesner-Reyes K, Kitsos M-S, Koukouras A, Lampadariou N, Laxamana E, López-Fé de la Cuadra CM, Lotze HK, Martin D, Mouillot D, Oro D, Raicevich S, Rius-Barile J, Saiz-Salinas JI, San Vicente C, Somot S, Templado J, Turon X, Vafidis D, Villanueva R, Voultsiadou E (2010) The Biodiversity of the Mediterranean Sea: Estimates, Patterns, and Threats. *PLoS One* 5:e11842. doi: 10.1371/journal.pone.0011842
- Constantine R, Jackson JA, Steel D, Baker CS, Brooks L, Burns D, Clapham PJ, Hauser N, Madon B, Mattila D, Oremus M, Poole MM, Robbins J, Thompson K, Garrigue C (2012) Abundance of humpback whales in Oceania using photo-identification and microsatellite

- genotyping. *Mar Ecol Prog Ser* 453:249–261. doi: 10.3354/meps09613
- Cooch E, White GC (2011) Program MARK: a gentle introduction.
- Cooke JG (2018) *Balaenoptera physalus*. IUCN Red List Threat Species 2018 eT2478A50349982. doi: 10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T2478A50349982.en
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001–2014.
- Coughlan J, Mirimin L, Dillane E, Rogan E, Cross TF (2006) Isolation and characterization of novel microsatellite loci for the short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) and cross-amplification in other cetacean species. *Mol Ecol Notes* 6:490–492. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01284.x
- Cox CB (2000) Plate tectonics, seaways and climate in the historical biogeography of mammals. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:509–516. doi: 10.1590/S0074-02762000000400012
- Cox CB, Moore PD (2000) *Biogeography: an Ecological and Evolutionary Approach*, 6th editio. Blackwell, Oxford
- Crouau-Roy B (1988) Genetic structure of cave-dwelling beetles populations: significant deficiencies of heterozygotes. *Heredity (Edinb)* 60:321–327. doi: 10.1038/hdy.1988.49
- Crouau-Roy B, Service S, Slatkin M, Freimer N (1996) A fine-scale comparison of the human and chimpanzee genomes: linkage, linkage disequilibrium and sequence analysis. *Hum Mol Genet* 5:1131–1137. doi: 10.1093/hmg/5.8.1131
- Cubaynes S, Pradel R, Choquet R, Duchamp C, Gaillard J-M, Lebreton J-D, Marboutin E, Miquel C, Reboulet A-M, Poillot C, Taberlet P, Gimenez O (2010) Importance of Accounting for Detection Heterogeneity When Estimating Abundance: the Case of French Wolves. *Conserv Biol* 24:621–626. doi: 10.1111/j.1523-1739.2009.01431.x
- Cunha H a., Watts PC (2007) Twelve microsatellite loci for marine and riverine tucuxi dolphins (*Sotalia guianensis* and *Sotalia fluviatilis*). *Mol Ecol Notes* 7:1229–1231. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01839.x
- Cypriano-Souza AL, Fernandez GP, Lima-Rosa CA V., Engel MH, Bonatto SL (2010) Microsatellite Genetic Characterization of the Humpback Whale (*Megaptera*

- novaeangliae) Breeding Ground off Brazil (Breeding Stock A). *J Hered* 101:189–200. doi: 10.1093/jhered/esp097
- Davies JL (1963) The antitropical factor in cetacean speciation. *Evolution* (N Y) 17:107–116. doi: 10.1111/j.1558-5646.1963.tb03258.x
- de Bruyn PJN, Tosh CA, Bester MN, Cameron EZ, McIntyre T, Wilkinson IS (2011) Sex at sea: alternative mating system in an extremely polygynous mammal. *Anim Behav* 82:445–451. doi: 10.1016/j.anbehav.2011.06.006
- Dhermain F, Astruc G, Cesarini C, Dupont L, Dupraz F, Godenir J, Keck N, Labach H, Wafo E (2015) Recensement des échouages de cétacés sur les côtes françaises de Méditerranée, entre 2010 et 2012. *29:103–126*.
- Do C, Waples RS, Peel D, Macbeth GM, Tillett BJ, Ovenden JR (2014) NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Mol Ecol Resour* 14:209–214. doi: 10.1111/1755-0998.12157
- Dornburg A, Brandley MC, McGowen MR, Near TJ (2012) Relaxed Clocks and Inferences of Heterogeneous Patterns of Nucleotide Substitution and Divergence Time Estimates across Whales and Dolphins (Mammalia: Cetacea). *Mol Biol Evol* 29:721–736. doi: 10.1093/molbev/msr228
- Dray S, Dufour A-B (2007) The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *J Stat Softw* 22:1–20. doi: 10.18637/jss.v022.i04
- Drouot V, Bérubé M, Gannier A, Goold JC, Reid RJ, Palsbøll PJ (2004) A note on genetic isolation of Mediterranean sperm whales (*Physeter macrocephalus*) suggested by mitochondrial DNA. *J Cetacean Res Manag* 6:29–32.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence. *PLoS Biol* 4:e88. doi: 10.1371/journal.pbio.0040088
- Druon J-N, Panigada S, David L, Gannier A, Mayol P, Arcangeli A, Cañadas A, Laran S, Di-Méglio N, Gauffier P (2012) Potential feeding habitat of fin whales in the western Mediterranean Sea: An environmental niche model. *Mar Ecol Prog Ser* 464:289–306. doi: 10.3354/meps09810
- Earl DA, VonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for

- visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4:359–361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 49:746–756.
- Edwards MC, Gibbs RA (1994) Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Res* 3:S65–S75. doi: 10.1101/gr.3.4.S65
- Ellegren H (2000) Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet* 16:551–558. doi: 10.1016/S0168-9525(00)02139-9
- Engelhaupt D (2004) Phylogeography, kinship and molecular ecology of sperm whales (*Physeter macrocephalus*).
- Engelhaupt D, Hoelzel AR, Nicholson C, Frantzis A, Mesnick SL, Gero S, Whitehead H, Rendell L, Miller PJO, De Stefanis R, Cañadas A, Airoidi S, Mignucci-Giannoni AA (2009) Female philopatry in coastal basins and male dispersion across the North Atlantic in a highly mobile marine species, the sperm whale (*Physeter macrocephalus*). *Mol Ecol* 18:4193–4205.
- Eriksson A, Elías-Wolff F, Mehlig B, Manica A (2014) The emergence of the rescue effect from explicit within- and between-patch dynamics in a metapopulation. *Proc R Soc B Biol Sci* 281:20133127. doi: 10.1098/rspb.2013.3127
- Estoup A, Guillemaud T (2010) Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Mol Ecol* 19:4113–4130. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04773.x
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Evans PG, Raga JA (2012) *Marine mammals: Biology and conservation*.
- Falconer DS, Mackay TFC (1996) *Introduction to Quantitative Genetic*. Fourth Logmann, Essex
- Felsenstein J (1971) Inbreeding and variance effective numbers in populations with overlapping generations. *Genetics* 68:581.
- Forcada J, Notarbartolo-Di-Sciara G, Fabbri F (1995) Abundance of fin whales and striped

- dolphins summering in the Corso-Ligurian Basin. *Mammalia* 59:127–140.
- Forcada J, Aguilar A, Hammond PS, Pastor X, Aguilar R (1996) Distribution and abundance of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the western Mediterranean sea during the summer. *J Zool* 238:23–34. doi: 10.1111/j.1469-7998.1996.tb05377.x
- Ford MJ, Hanson MB, Hempelmann JA, Ayres KL, Emmons CK, Schorr GS, Baird RW, Balcomb KC, Wasser SK, Parsons KM, Balcomb-Bartok K (2011) Inferred Paternity and Male Reproductive Success in a Killer Whale (*Orcinus orca*) Population. *J Hered* 102:537–553. doi: 10.1093/jhered/esr067
- Ford MJ, Parsons KM, Ward EJ, Hempelmann JA, Emmons CK, Bradley Hanson M, Balcomb KC, Park LK (2018) Inbreeding in an endangered killer whale population. *Anim Conserv* 21:423–432. doi: 10.1111/acv.12413
- Fordham DA, Brook BW, Moritz C, Nogués-Bravo D (2014) Better forecasts of range dynamics using genetic data. *Trends Ecol Evol* 29:436–443. doi: 10.1016/j.tree.2014.05.007
- Fordyce RE (2018) Cetacean Evolution. In: *Encyclopedia of Marine Mammals*. Elsevier, pp 180–185
- Fossi MC, Panti C, Guerranti C, Coppola D, Giannetti M, Marsili L, Minutoli R (2012) Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Mar Pollut Bull* 64:2374–2379. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.08.013
- Fossi MC, Coppola D, Bains M, Giannetti M, Guerranti C, Marsili L, Panti C, de Sabata E, CI?? S (2014) Large filter feeding marine organisms as indicators of microplastic in the pelagic environment: The case studies of the Mediterranean basking shark (*Cetorhinus maximus*) and fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Mar Environ Res* 100:17–24. doi: 10.1016/j.marenvres.2014.02.002
- Fossi MC, Marsili L, Bains 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. doi: 10.1016/j.envpol.2015.11.022
- Fossi MC, Bains M, Panti C, Baulch S (2018) Impacts of Marine Litter on Cetaceans. In: *Marine*

- Mammal Ecotoxicology. Elsevier, pp 147–184
- Frankham R (1995a) Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genet Res (Camb)* 66:95–107.
- Frankham R (1995b) Inbreeding depression: a threshold effect. *Conserv Biol* 9:792–799.
- Frankham R, Ballou SEJD, Briscoe DA, Ballou JD (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press
- Frankham R, Bradshaw CJA, Brook BW (2014) Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biol Conserv* 170:56–63. doi: 10.1016/j.biocon.2013.12.036
- Franklin IR (1980) Evolutionary change in small populations. *Conserv Biol An Evol Ecol Perspect* 395:135–150.
- Frasier TR (2008) STORM: Software for testing hypotheses of relatedness and mating patterns. *Mol Ecol Resour* 8:1263–1266. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02358.x
- Frasier TR, Rastogi T, Brown MW, Hamilton PK, Kraus SD, White BN (2006) Characterization of tetranucleotide microsatellite loci and development and validation of multiplex reactions for the study of right whale species (genus *Eubalaena*). *Mol Ecol Notes* 6:1025–1029. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01417.x
- Frère CH, Krützen M, Kopps AM, Ward P, Mann J, Sherwin WB (2010) Inbreeding tolerance and fitness costs in wild bottlenose dolphins. *Proc R Soc B Biol Sci* 277:2667–2673. doi: 10.1098/rspb.2010.0039
- Friday N, Smith TD, Stevick PT, Allen J (2000) Measurement of photographic quality and individual distinctiveness for Humpback whales, *Megaptera novaeangliae*. *Mar Mammal Sci* 16:355–374. doi: 10.1111/j.1748-7692.2000.tb00930.x
- Friday N, Smith TD, Stevick PT, Allen J, Fernald T (2008) Balancing bias and precision in capture-recapture estimates of abundance. *Mar Mammal Sci* 24:253–275. doi: 10.1111/j.1748-7692.2008.00187.x
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–25.
- Gaillard J-M, Festa-Bianchet M, Yoccoz NG (1998) Population dynamics of large herbivores:

- variable recruitment with constant adult survival. *Trends Ecol Evol* 13:58–63. doi: 10.1016/S0169-5347(97)01237-8
- Gaspari S, Airoidi S, Hoelzel AR (2007a) Risso's dolphins (*Grampus griseus*) in UK waters are differentiated from a population in the Mediterranean Sea and genetically less diverse. *Conserv Genet* 8:727–732. doi: 10.1007/s10592-006-9205-y
- Gaspari S, Azzellino A, Airoidi S, Hoelzel AR (2007b) Social kin associations and genetic structuring of striped dolphin populations (*Stenella coeruleoalba*) in the Mediterranean Sea. *Mol Ecol* 16:2922–2933. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03295.x
- Gauffier P, Verborgh P, Giménez J, Esteban R, Sierra JMS, Stephanis R de (2018) Contemporary migration of fin whales through the Strait of Gibraltar. *Mar Ecol Prog Ser* 588:215–228. doi: /doi.org/10.3354/meps12449
- Gavrilets S (2003) Perspective: Models of speciation: What have we learned in 40 years? *Evolution* (N Y) 57:2197–2215. doi: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb00233.x
- George JC “CRAIG,” Zeh J, Suydam R, Clark C (2004) Abundance and population trend (1978-2001) of western Arctic bowhead whales surveyed near Barrow, Alaska. *Mar Mammal Sci* 20:755–773. doi: 10.1111/j.1748-7692.2004.tb01191.x
- Giménez J, Gómez-Campos E, Borrell A, Cardona L, Aguilar A (2013) Isotopic evidence of limited exchange between Mediterranean and eastern North Atlantic fin whales. *Rapid Commun Mass Spectrom* 27:1801–1806. doi: 10.1002/rcm.6633
- Gimenez O, Lebreton J, Choquet R, Pradel R (2018) R2ucare: An r package to perform goodness-of-fit tests for capture–recapture models. *Methods Ecol Evol* 9:1749–1754. doi: 10.1111/2041-210X.13014
- Gnone G, Bellingeri M, Dhermain F, Dupraz F, Nuti S, Bedocchi D, Moulins A, Rosso M, Alessi J, Mccrea RS, Azzellino A, Airoidi S, Portunato N, Laran S, David L, Di Meglio N, Bonelli P, Montesi G, Trucchi R, Fossa F, Wurtz M (2011) Distribution, abundance, and movements of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in the Pelagos Sanctuary MPA (north-west Mediterranean Sea). *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 21:372–388. doi: 10.1002/aqc.1191
- Gotelli NJ (1991) Metapopulation Models: The Rescue Effect, the Propagule Rain, and the Core-Satellite Hypothesis. *Am Nat* 138:768–776. doi: 10.1086/285249

- Goudet J (2005) HIERFSTAT, a package for r to compute and test hierarchical F-statistics. *Mol Ecol Notes* 5:184–186. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00828.x
- Gravena W, Hrbek T, da Silva VMF, Farias IP (2019) Boto (*Inia geoffrensis* —Cetacea: Iniidae) aggregations in two provisioning sites in the lower Negro River—Amazonas, Brazil: are they related? *PeerJ* 7:e6692. doi: 10.7717/peerj.6692
- Gray AJ (1996) The genetic basis of conservation biology. In: *Conservation Biology*, I. F. Spel. pp 115–121
- Green ML, Herzing DL, Baldwin JD (2011) Reproductive success of male Atlantic spotted dolphins (*Stenella frontalis*) revealed by noninvasive genetic analysis of paternity. *Can J Zool* 89:239–253. doi: 10.1139/Z10-111
- Guillaume F, Perrin N (2006) Joint Evolution of Dispersal and Inbreeding Load. *Genetics* 173:497–509. doi: 10.1534/genetics.105.046847
- Guillemaud T, Beaumont MA, Ciosi M, Cornuet J-M, Estoup A (2010) Inferring introduction routes of invasive species using approximate Bayesian computation on microsatellite data. *Heredity (Edinb)* 104:88–99. doi: 10.1038/hdy.2009.92
- Halpern BS, Walbridge S, Selkoe KA, Kappel C V., Micheli F, D’Agrosa C, Bruno JF, Casey KS, Ebert C, Fox HE, Fujita R, Heinemann D, Lenihan HS, Madin EMP, Perry MT, Selig ER, Spalding M, Steneck R, Watson R (2008) A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. *Science (80-)* 319:948–952. doi: 10.1126/science.1149345
- Hammond PS (1986) Estimating the size of naturally marked whale populations using capture-recapture techniques. *Reports Int Whal Comm* 8:253–282.
- Hammond PS (1990) Capturing whales on film—estimating cetacean population parameters from individual recognition data. *Mamm Rev* 20:17–22. doi: 10.1111/j.1365-2907.1990.tb00099.x
- Hammond PS, Mizroch SA, Donovan GP (1990) Individual recognition of cetaceans: use of photo-identification and other techniques to estimate population parameters. *Int Whal Comm* 12:332–376.
- Harrison RG (1991) Molecular Changes at Speciation. *Annu Rev Ecol Syst* 22:281–308. doi: 10.1146/annurev.es.22.110191.001433

- Hartl DL, Clark AG (1997) Principles of population genetics. Sunderland, MA: Sinauer associates
- Harwood J (2001) Marine Mammals and Their Environment in the Twenty-First Century. *J Mammal* 82:630–640. doi: 10.1644/1545-1542(2001)082<0630:MMATEI>2.0.CO;2
- Hayden MJ, Nguyen TM, Waterman A, McMichael GL, Chalmers KJ (2008) Application of multiplex-ready PCR for fluorescence-based SSR genotyping in barley and wheat. *Mol Breed* 21:271–281. doi: 10.1007/s11032-007-9127-5
- Hedgecock D, Li G, Hubert S, Bucklin K, Ribes V (2004) Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Shellfish Res* 23:379–385.
- Hedrick P (2005) “Genetic restoration:” a more comprehensive perspective than “genetic rescue.” *Trends Ecol Evol* 20:109. doi: 10.1016/j.tree.2005.01.006
- Hill WG (1972) Effective size of populations with overlapping generations. *Theor Popul Biol* 3:278–289. doi: 10.1016/0040-5809(72)90004-4
- Ho SYW, Shapiro B (2011) Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Mol Ecol Resour* 11:423–434. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.02988.x
- Hogg JT, Forbes SH, Steele BM, Luikart G (2006) Genetic rescue of an insular population of large mammals. *Proc R Soc B Biol Sci* 273:1491–1499. doi: 10.1098/rspb.2006.3477
- Hughes AR, Inouye BD, Johnson MTJ, Underwood N, Vellend M (2008) Ecological consequences of genetic diversity. *Ecol Lett* 11:609–623. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x
- Hughes JB, Daily GC, Ehrlich PR (1997) Population diversity: its extent and extinction. *Science* (80-) 278:689–692.
- Jacob T, Ody D (2017) Caractérisation du trafic maritime et risques de collisions avec les grands cétacés dans le sanctuaire pelagos.
- Jockusch EL, Martínez-Solano I, Timpe EK (2015) The Effects of Inference Method, Population Sampling, and Gene Sampling on Species Tree Inferences: An Empirical Study in Slender Salamanders (Plethodontidae: Batrachoseps). *Syst Biol* 64:66–83. doi:

10.1093/sysbio/syu078

Jones OR, Wang J (2010) COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol Ecol Resour* 10:551–555. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02787.x

Kalinowski ST (2004) Counting Alleles with Rarefaction: Private Alleles and Hierarchical Sampling Designs. *Conserv Genet* 5:539–543. doi: 10.1023/B:COGE.0000041021.91777.1a

Kalinowski ST, Wagner AP, Taper ML (2006) ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Mol Ecol Notes* 6:576–579. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x

Katona S, Whitehead H (1988) Are Cetacea ecologically important? *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 26:553–568.

Katsanevakis S, Zenetos A, Belchior C, Cardoso AC (2013) Invading European Seas: Assessing pathways of introduction of marine aliens. *Ocean Coast Manag* 76:64–74. doi: 10.1016/j.ocecoaman.2013.02.024

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, Drummond A (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649.

Keller LF, Waller DM (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol Evol* 17:230–241. doi: 10.1016/S0169-5347(02)02489-8

Kim JH, Kim HW, Kim E-M, Sohn H (2018) Occurrence of the Omura's whale (*Balaenoptera omurai*) in Korean waters.

Kjeld M, Ólafsson Ö, Víkingsson GA, Sigurjónsson J (2006) Sex Hormones and Reproductive Status of the North Atlantic Fin Whales (*Balaenoptera physalus*) During the Feeding Season. *Aquat Mamm* 32:75–84. doi: 10.1578/AM.32.1.2006.75

Konrad CM, Gero S, Frasier T, Whitehead H (2018) Kinship influences sperm whale social organization within, but generally not among, social units. *R Soc Open Sci* 5:180914. doi: 10.1098/rsos.180914

- Koot B (2015) Winter behaviour and population structure of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in British Columbia inferred from passive acoustic data. Doctoral dissertation, University of British Columbia
- Kraft S, Pérez-Álvarez Mj, Olavarriá C, Poulin E (2020) Global phylogeography and genetic diversity of the long-finned pilot whale *Globicephala melas*, with new data from the southeastern Pacific. *Sci Rep* 10:1769. doi: 10.1038/s41598-020-58532-3
- Kraus SD, Brown MW, Caswell H, Clark CW, Fujiwara M, Hamilton PK, Kenney RD, Knowlton AR, Landry S, Mayo CA, McLellan WA, Moore MJ, Nowacek DP, Pabst DA, Read AJ, Rolland RM (2005) North Atlantic Right Whales in Crisis. *Science* (80-) 309:561–562. doi: 10.1126/science.1111200
- Laake JL (2013) RMark: An R interface for analysis of Capture-Recapture Data with MARK. AFSC Process. Rep. 2013-01 25.
- Labach H, Gimenez O, Barbier M, Jourdan J, David L, Di Méglia N, Roul M, Azzinari C, Robert N, Tomasi N (2016) Etude de la population et conservation du Grand Dauphin en Méditerranée française. Projet GDEGeM Grand Dauphin Etude et Gestion en Méditerranée 2013-2015.
- Labat J-P, Cuzin-Roudy J (1996) Population dynamics of the krill *Meganyctiphanes norvegica* (M. Sars, 1857) (Crustacea : Euphausiacea) in the ligurian Sea (NW Mediterranean Sea). Size Structure, growth and mortality modelling. *J Plankton Res* 18:2295–2312. doi: 10.1093/plankt/18.12.2295
- Lacy RC (1988) A Report on Population Genetics in Conservation. *Conserv Biol* 2:245–248. doi: 10.1111/j.1523-1739.1988.tb00181.x
- Lamb CT, Ford AT, Proctor MF, Royle JA, Mowat G, Boutin S (2019) Genetic tagging in the Anthropocene: scaling ecology from alleles to ecosystems. *Ecol Appl* 29:e01876. doi: 10.1002/eap.1876
- Lande R (1988) Genetics and demography in biological conservation. *Science* (80-) 241:1455–1460. doi: 10.1126/science.3420403
- Laran S, Gannier A (2008) Spatial and temporal prediction of fin whale distribution in the northwestern Mediterranean Sea. *ICES J Mar Sci* 65:1260–1269. doi: 10.1093/icesjms/fsn086

- Lebreton J-D, Burnham KP, Clobert J, Anderson DR (1992) Modeling Survival and Testing Biological Hypotheses Using Marked Animals: A Unified Approach with Case Studies. *Source Ecol Monogr* 62:67–118.
- Lejeusne C, Chevaldonné P, Pergent-Martini C, Boudouresque CF, Pérez T (2010) Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. *Trends Ecol Evol* 25:250–260. doi: 10.1016/j.tree.2009.10.009
- Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11:2453–2465. doi: 10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187
- Liu Z-W, Jarret RL, Kresovich S, Duncan RR (1995) Characterization and analysis of simple sequence repeat (SSR) loci in seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). *Theor Appl Genet* 91:47–52. doi: 10.1007/BF00220857
- Lockyer C (1984) Review of Baleen Whale (Mysticeti) Reproduction and Implications for Management. *Rep Int Whal Comimssion* 27–50.
- Luikart G, Cornuet J-M (1998) Empirical Evaluation of a Test for Identifying Recently Bottlenecked Populations from Allele Frequency Data. *Conserv Biol* 12:228–237. doi: 10.1046/j.1523-1739.1998.96388.x
- Luikart G, Allendorf FW, Cornuet J-M, Sherwin WB (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J Hered* 89:238–247. doi: 10.1093/jhered/89.3.238
- Luikart G, Ryman N, Tallmon DA, Schwartz MK, Allendorf FW (2010) Estimation of census and effective population sizes: the increasing usefulness of DNA-based approaches. *Conserv Genet* 11:355–373. doi: 10.1007/s10592-010-0050-7
- Lukacs PM, Burnham KP (2005) Estimating population size from DNA-based closed data capture-recapture incorporating genotyping error. *J Wildl Manage* 69:396–403.
- Lynch M (1997) Mutation accumulation in nuclear, organelle, and prokaryotic transfer RNA genes. *Mol Biol Evol* 14:914–925. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025834

- Lyrholm T, Leimar O, Johanneson B, Gyllensten U (1999) Sex-biased dispersal in sperm whales: contrasting mitochondrial and nuclear genetic structure of global populations. *Proc R Soc B Biol Sci* 266:347–354. doi: 10.1098/rspb.1999.0644
- Madon B, Gimenez O, McArdle B, Baker CS, Garrigue C (2011) A new method for estimating animal abundance with two sources of data in capture-recapture studies. *Methods Ecol Evol* 2:no-no. doi: 10.1111/j.2041-210X.2011.00091.x
- Madon B, Garrigue C, Pradel R, Gimenez O (2013) Transience in the humpback whale population of New Caledonia and implications for abundance estimation. *Mar Mammal Sci* 29:n/a-n/a. doi: 10.1111/j.1748-7692.2012.00610.x
- Manel S, Gaggiotti OE, Waples RS (2005) Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends Ecol Evol* 20:136–142. doi: 10.1016/j.tree.2004.12.004
- Mank JE, Avise JC (2006) Comparative phylogenetic analysis of male alternative reproductive tactics in ray-finned fishes. *Evolution (N Y)* 60:1311–1316. doi: 10.1111/j.0014-3820.2006.tb01209.x
- Mannocci L, Roberts JJ, Halpin PN, Authier M, Boisseau O, Bradai MN, Cañadas A, Chicote C, David L, Di-Méglio N, Fortuna CM, Frantzis A, Gazo M, Genov T, Hammond PS, Holcer D, Kaschner K, Kerem D, Lauriano G, Lewis T, Notarbartolo-Di-Sciara G, Panigada S, Raga JA, Scheinin A, Ridoux V, Vella A, Vella J (2018) Assessing cetacean surveys throughout the Mediterranean Sea: a gap analysis in environmental space. *Sci Rep* 8:3126. doi: 10.1038/s41598-018-19842-9
- Mayr E (1978) Origin and History of Some Terms in Systematic and Evolutionary Biology. *Syst Zool* 27:83. doi: 10.2307/2412818
- McNeely JA, Miller KR, Reid W V., Mittermeier RA, Werner TB (1990) Conserving the world's biological diversity. International Union for conservation of nature and natural resources
- Megléczy E, Pech N, Gilles A, Dubut V, Hingamp P, Trilles A, Grenier R, Martin J-F (2014) QDD version 3.1: a user-friendly computer program for microsatellite selection and primer design revisited: experimental validation of variables determining genotyping success rate. *Mol Ecol Resour* 14:1302–1313. doi: 10.1111/1755-0998.12271

- Micheli F, Halpern BS, Walbridge S, Ciriaco S, Ferretti F, Frascchetti S, Lewison R, Nykjaer L, Rosenberg AA (2013) Cumulative Human Impacts on Mediterranean and Black Sea Marine Ecosystems: Assessing Current Pressures and Opportunities. *PLoS One* 8:e79889. doi: 10.1371/journal.pone.0079889
- Miller CR, Waits LP (2003) The history of effective population size and genetic diversity in the Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*): Implications for conservation. *Proc Natl Acad Sci* 100:4334–4339. doi: 10.1073/pnas.0735531100
- Miller N, Estoup A, Toepfer S, Bourguet D, Lapchin L, Derridj S, Seok Kim K, Reynaud P, Furian L, Guillemaud T (2005) Multiple Transatlantic Introductions of the Western Corn Rootworm. *Science* (80-) 310:992–992.
- Mizroch SA, Rice DW, Breiwick JM (1984) The Fin Whale, *Balaenoptera physalus*. *Mar Fish Rev* 46:20–24.
- Moore MJ (2014) How we all kill whales. *ICES J Mar Sci* 71:760–763. doi: 10.1093/icesjms/fsu008
- Moore SE (2008) Marine mammals as ecosystem sentinels. *J Mammal* 89:534–540. doi: 10.1644/07-MAMM-S-312R1.1
- Mutitu EK, Hoareau TB, Hurley BP, Garnas JR, Wingfield MJ, Slippers B (2020) Reconstructing early routes of invasion of the bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae): cities as bridgeheads for global pest invasions. *Biol Invasions* 22:2325–2338. doi: 10.1007/s10530-020-02258-w
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca GA, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853–858.
- Natoli A, Cañadas A, Vaquero C, Politi E, Fernandez-Navarro P, Hoelzel AR (2008) Conservation genetics of the short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) in the Mediterranean Sea and in the eastern North Atlantic Ocean. *Conserv Genet* 9:1479–1487. doi: 10.1007/s10592-007-9481-1
- Nichols HJ, Cant MA, Hoffman JI, Sanderson JL (2014) Evidence for frequent incest in a cooperatively breeding mammal. *Biol Lett* 10:20140898. doi: 10.1098/rsbl.2014.0898
- Nielsen R, Mattila DK, Clapham PJ, Palsbøll PJ (2001) Statistical approaches to paternity

- analysis in natural populations and applications to the Atlantic humpback whale. *Genetics* 157:1673–1682.
- Nomura T (2008) Estimation of effective number of breeders from molecular coancestry of single cohort sample. *Evol Appl* 1:462–474. doi: 10.1111/j.1752-4571.2008.00015.x
- Notarbartolo-di-Sciara G, Zanardelli M, Jahoda M, Panigada S, Airoidi S (2003) The fin whale *Balaenoptera physalus* (L. 1758) in the Mediterranean Sea. *Mamm Rev* 33:105–150.
- Notarbartolo-di-Sciara G, Frantzis A, Bearzi G, Reeves RR (2012) *Physeter macrocephalus*.
- Notarbartolo-Di-Sciara G, Birkun A (2010) Conserving whales, dolphins and porpoises in the Mediterranean and Black Seas. ACCOBAMS status Rep 212 p.
- Notarbartolo-Di-Sciara G, Castellote M, Druon J-N, Panigada S (2016) Fin Whales, *Balaenoptera physalus*: At Home in a Changing Mediterranean Sea? In: *Advances in Marine Biology*. pp 75–101
- Nylander JAA (2004) MrAIC.pl. Program distributed by the author.
- O’Corry-Crowe G, Suydam R, Quakenbush L, Smith TG, Lydersen C, Kovacs KM, Orr J, Harwood L, Litovka D, Ferrer T (2020) Group structure and kinship in beluga whale societies. *Sci Rep* 10:11462. doi: 10.1038/s41598-020-67314-w
- Oremus M, Poole MM, Albertson GR, Baker CS (2012) Pelagic or insular? Genetic differentiation of rough-toothed dolphins in the Society Islands, French Polynesia. *J Exp Mar Bio Ecol* 432–433:37–46. doi: 10.1016/j.jembe.2012.06.027
- Pace DS, Tizzi R, Mussi B (2015) Cetaceans Value and Conservation in the Mediterranean Sea. *Biodivers Endanger Species*. doi: 10.4172/2332-2543.S1.004
- Pace RMI, Corkeron PJ, Kraus SD (2017) State space mark-recapture estimates reveal a recent decline in abundance of North Atlantic right whales. *Ecol Evol* 1–12. doi: 10.1002/ece3.3406
- Pack AA, Herman LM, Spitz SS, Craig AS, Hakala S, Deakos MH, Herman EYK, Milette AJ, Carroll E, Levitt S, Lowe C (2012) Size-assortative pairing and discrimination of potential mates by humpback whales in the Hawaiian breeding grounds. *Anim Behav* 84:983–993. doi: 10.1016/j.anbehav.2012.07.024
- Paetkau D, Strobeck C (1995) The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite

- null allele in bears. *Mol Ecol* 4:519–520. doi: 10.1111/j.1365-294X.1995.tb00248.x
- Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol Ecol* 4:347–354. doi: 10.1111/j.1365-294X.1995.tb00227.x
- Palsbøll PJ, Allen J, Bérubé M, Clapham PJ, Feddersen TP, Hammond PS, Hudson RR, Jørgensen H, Katona S, Larsen AH, Larsen# F, Lien J, Mattila DK, Sigurjónsson J, Sears R, Smith T, Sponer R, Stevick P, Øien N (1997a) Genetic tagging of humpback whales. *Nature* 388:767–769. doi: 10.1038/42005
- Palsbøll PJ, Bérubé M, Larsen AH, Jørgensen H (1997b) Primers for the amplification of tri- and tetramer microsatellite loci in baleen whales. *Mol Ecol* 6:893–895. doi: 10.1111/j.1365-294X.1997.tb00146.x
- Palsbøll PJ, Bérubé M, Aguilar A, Notarbartolo-Di-Sciara G, Nielsen R (2004) Discerning Between Recurrent Gene Flow and Recent Divergence Under a Finite-Site Mutation Model Applied To North Atlantic and Mediterranean Sea Fin Whale (*Balaenoptera Physalus*) Populations. *Evolution* (N Y) 58:670–675. doi: 10.1554/02-529
- Palsbøll PJ, Zachariah Peery M, Olsen MT, Beissinger SR, Bérubé M (2013) Inferring recent historic abundance from current genetic diversity. *Mol Ecol* 22:22–40. doi: 10.1111/mec.12094
- Palstra FP, Ruzzante DE (2008) Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? *Mol Ecol* 17:3428–3447. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03842.x
- Pampoulie C, Danielsdottir AK, Vikingsson GA (2008) Genetic structure of the North Atlantic common minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) at feeding grounds: a microsatellite loci and mtDNA analysis.
- Panigada S, Notarbartolo-Di-Sciara G, Zanardelli Panigada M, Airoidi S, Borsani JF, Jahoda M (2005) Fin whales (*Balaenoptera physalus*) summering in the Ligurian Sea: distribution, encounter rate, mean group size and relation to physiographic variables. *J Cetacean Res Manag* 7:137–145.
- 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.

doi: 10.1016/j.marpolbul.2006.03.014

- Panigada S, Lauriano G, Burt L, Pierantonio N, Donovan G (2011) Monitoring winter and summer abundance of cetaceans in the Pelagos Sanctuary (Northwestern Mediterranean sea) through aerial surveys. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0022878
- Panigada S, Donovan G, Druon J-N, Lauriano G, Pierantonio N, Pirotta E, Zanardelli M, Zerbini A (2015) Satellite telemetry on Mediterranean fin whales to identify critical habitats and mitigate ship strikes.
- Panigada S, Donovan GP, Druon J-N, Lauriano G, Pierantonio N, Pirotta E, Zanardelli M, Zerbini AN, Notarbartolo-Di-Sciara G (2017) Satellite tagging of Mediterranean fin whales: working towards the identification of critical habitats and the focussing of mitigation measures. *Sci Rep* 7:3365. doi: 10.1038/s41598-017-03560-9
- Panova M, Makinen T, Fokin M, Andre C, Johannesson K (2008) Microsatellite cross-species amplification in the genus *Littorina* and detection of null alleles in *Littorina saxatilis*. *J Molluscan Stud* 74:111–117. doi: 10.1093/mollus/eym052
- Parker KC, Jorgensen SM (2003) Examples of the Use of Molecular Markers in Biogeographic Research. *Phys Geogr* 24:378–398. doi: 10.2747/0272-3646.24.5.378
- Pastene LA, Goto M, Kanda N, Zerbini AN, Kerem D, Watanabe K, Bessho Y, Hasegawa M, Nielsen R, Larsen F, Palsbøll PJ (2007) Radiation and speciation of pelagic organisms during periods of global warming: the case of the common minke whale, *Balaenoptera acutorostrata*. *Mol Ecol* 16:1481–1495. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03244.x
- Pavanato H, Wedekin L, Guilherme-Silveira F, Engel M, Kinas P (2017) Estimating humpback whale abundance using hierarchical distance sampling. *Ecol Modell* 358:10–18. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2017.05.003
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460
- Perl RGB, Geffen E, Malka Y, Barocas A, Renan S, Vences M, Gafny S (2018) Population genetic analysis of the recently rediscovered Hula painted frog (*Latonia nigriventer*) reveals high genetic diversity and low inbreeding. *Sci Rep* 8:5588. doi: 10.1038/s41598-018-23587-w

- Pertoldi C, Bijlsma R, Loeschcke V (2007) Conservation genetics in a globally changing environment: present problems, paradoxes and future challenges. *Biodivers Conserv* 16:4147–4163. doi: 10.1007/s10531-007-9212-4
- Peyran C, Planes S, Tolou N, Iwankow G, Boissin E (2020) Development of 26 highly polymorphic microsatellite markers for the highly endangered fan mussel *Pinna nobilis* and cross-species amplification. *Mol Biol Rep*. doi: 10.1007/s11033-020-05338-1
- Pledger S, Pollock KH, Norris JL (2003) Open Capture-Recapture Models with Heterogeneity: I. Cormack-Jolly-Seber Model. *Biometrics* 59:786–794. doi: 10.1111/j.0006-341X.2003.00092.x
- Pradel R, Sanz-Aguilar A (2012) Modeling trap-awareness and related phenomena in capture-recapture studies. *PLoS One* 7:e32666. doi: 10.1371/journal.pone.0032666
- Pradel R, Hines JE, Lebreton J-D, Nichols JD (1997) Capture-Recapture survival models taking account of transients. *Biometrics* 53:60–72.
- Pradel R, Gimenez O, Lebreton J-D (2005) Principles and interest of GOF tests for multistate capture-recapture models. *Anim Biodivers Conserv* 28:189–204.
- Primmer CR, Painter JN, Koskinen MT, Palo JU, Merilä J (2005) Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *J Avian Biol* 36:348–360. doi: 10.1111/j.0908-8857.2005.03465.x
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155:945–959.
- R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA (2018) Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Syst Biol* 67:901–904. doi: 10.1093/sysbio/syy032
- Rand DM (2001) The Units of Selection on Mitochondrial DNA. *Annu Rev Ecol Syst* 32:415–448. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114109
- Randall DA, Pollinger JP, Wayne RK, Tallents LA, Johnson PJ, Macdonald DW (2007) Inbreeding is reduced by female-biased dispersal and mating behavior in Ethiopian

- wolves. *Behav Ecol* 18:579–589. doi: 10.1093/beheco/arm010
- Reeves RR, Notarbartolo-Di-Sciara G (2006) The status and distribution of Cetaceans in the Black sea and Mediterranean sea. IUCN Cent Mediterr Coop 137p.
- Reilly SB, Bannister JL, Best PB, Brown M, Brownell RL, Butterworth DS, Clapham PJ, Cooke J, Donovan GP, Urban J, Zerbini AN (2013) *Balaenoptera physalus*.
- Rew MB, Robbins J, Mattila D, Palsbøll PJ, Bérubé M (2011) How many genetic markers to tag an individual? An empirical assessment of false matching rates among close relatives. *Ecol Appl* 21:877–887. doi: 10.1890/10-0348.1
- Riccioni G, Landi M, Ferrara G, Milano I, Cariani A, Zane L, Sella M, Barbujani G, Tinti F (2010) Spatio-temporal population structuring and genetic diversity retention in depleted Atlantic Bluefin tuna of the Mediterranean Sea. *Proc Natl Acad Sci* 107:2102–2107. doi: 10.1073/pnas.0908281107
- Rigg LS (2003) Genetic Applications in Biogeography. *Phys Geogr* 24:355–357. doi: 10.2747/0272-3646.24.5.355
- Rivera-León VE, Urbán J, Mizroch S, Brownell RL, Oosting T, Hao W, Palsbøll PJ, Bérubé M (2019) Long-term isolation at a low effective population size greatly reduced genetic diversity in Gulf of California fin whales. *Sci Rep* 9:12391. doi: 10.1038/s41598-019-48700-5
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9:552–569. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040727
- Roman J, Palumbi SR (2003) Whales Before Whaling in the North Atlantic. *Science* (80-) 301:508–510. doi: 10.1126/science.1084524
- Rooney AP, Honeycutt RL, Davis SK, Derr JN (1999) Evaluating a Putative Bottleneck in a Population of Bowhead Whales from Patterns of Microsatellite Diversity and Genetic Disequilibria. *J Mol Evol* 49:682–690. doi: 10.1007/PL00006589
- Rosel PE, Dizon AE, Heyning JE (1994) Genetic analysis of sympatric morphotypes of common dolphins (genus *Delphinus*). *Mar Biol* 119:159–167. doi: 10.1007/BF00349552
- Rosenberg NA, Burke T, Elo K, Feldman MW, Freidlin PJ, Groenen MAM, Hillel J, Mäki-

- Tanila A, Tixier-Boichard M, Vignal A, Wimmers K, Weigend S (2001) Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics* 159:699–713.
- Rugh DJ, Hobbs RC, Lerczak JA, Breiwick JM (2005) Estimates of abundance of the eastern North Pacific stock of gray whales (*Eschrichtius robustus*) 1997-2002. *J Cetacean Res Manag* 7:1–12.
- Ryman N, Laikre L, Hössjer O (2019) Do estimates of contemporary effective population size tell us what we want to know? *Mol Ecol* 28:1904–1918. doi: 10.1111/mec.15027
- Sanpera C, Aguilar A (1992) Modern whaling off the Iberian Peninsula during the 20th century. *Rep - Int Whal Comm* 42:723–730.
- Sasaki T, Nikaido M, Hamilton H, Goto M, Kato H, Kanda N, Pastene LA, Cao Y, Fordyce RE, Hasegawa M, Okada N (2005) Mitochondrial phylogenetics and evolution of mysticete whales. *Syst Biol* 54:77–90. doi: 10.1080/10635150590905939
- Schleimer A, Ramp C, Delarue J, Carpentier A, Bérubé M, Palsbøll PJ, Sears R, Hammond PS (2019) Decline in abundance and apparent survival rates of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the northern Gulf of St. Lawrence. *Ecol Evol* ece3.5055. doi: 10.1002/ece3.5055
- Schlötterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109:365–371. doi: 10.1007/s004120000089
- Schwarz CJ, Seber GAF (1999) Estimating animal abundance: Review III. *Stat Sci* 14:427–456. doi: 10.1214/ss/1009212521
- Selkoe K, D'Aloia C, Crandall E, Iacchi M, Liggins L, Puritz J, von der Heyden S, Toonen R (2016) A decade of seascape genetics: contributions to basic and applied marine connectivity. *Mar Ecol Prog Ser* 554:1–19. doi: 10.3354/meps11792
- Shane SH, Wells RS, Würsig B (1986) Ecology, Behavior and Social Organization of the Bottlenose Dolphin: a Review. *Mar Mammal Sci* 2:34–63. doi: 10.1111/j.1748-7692.1986.tb00026.x
- Slatkin M (1985) Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution (N Y)* 53–65.
- Smith JM (1966) Sympatric Speciation. *Am Nat* 100:637–650. doi: 10.1086/282457

- Soulé M (1980) Thresholds for survival: criteria for maintenance of fitness and evolutionary potential. *Conserv Biol An Evol Ecol Perspect* 151–170.
- Sremba AL, Martin AR, Scott Baker C (2015) Species identification and likely catch time period of whale bones from South Georgia. *Mar Mammal Sci* 31:122–132. doi: 10.1111/mms.12139
- Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A (2018) Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol* 4:1–5. doi: 10.1093/ve/vey016
- Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol Evol* 15:199–203. doi: 10.1016/S0169-5347(00)01825-5
- Szulkin M, Stopher K V., Pemberton JM, Reid JM (2013) Inbreeding avoidance, tolerance, or preference in animals? *Trends Ecol Evol* 28:205–211. doi: 10.1016/j.tree.2012.10.016
- Taguchi M (2020) Genetic tagging technique : basic concept and a case study by the Institute of Cetacean Research. *Tech Reports Inst Cetacean Res* 35–40.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595.
- Tardy C, Ody D, Gimenez O, Planes S Abundance of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the Northwestern Mediterranean Sea, using photo-identification and microsatellite genotyping.
- Tardy C, Planes S, Jung J-L, Ody D, Boissin E (2020) Characterization of 25 new microsatellite markers for the fin whale (*Balaenoptera physalus*) and cross-species amplification in other cetaceans. *Mol Biol Rep* 47:6983–6996. doi: 10.1007/s11033-020-05757-0
- Taylor BL, Chivers SJ, Larese J, Perrin WF (2007a) Generation length and percent mature estimates for IUCN assessments of cetaceans.
- Taylor BL, Martinez M, Gerrodette T, Barlow J, Hrovat YN (2007b) Lessons from monitoring trends in abundance of marine mammals. *Mar Mammal Sci* 23:157–175. doi: 10.1111/j.1748-7692.2006.00092.x
- Téllez R, Mignucci-Giannoni AA, Caballero S (2014) Initial description of short-finned pilot whale (*Globicephala macrorhynchus*) genetic diversity from the Caribbean. *Biochem Syst*

- Ecol 56:196–201. doi: 10.1016/j.bse.2014.06.001
- Tershby BR, Breese D, Strong CS (1990) Abundance, seasonal distribution and population composition of balaenopterid whales in the Canal de Ballenas, Gulf of California, Mexico. Rep Int Whal Comm (Special Issue) 12:369–375.
- Thibault C, Levasseur M-C (2001) La reproduction chez les mammifères et l'homme, Quae. INRA
- Thompson EA (1975) The estimation of pairwise relationships. Ann Hum Genet 39:173–188.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673
- Tiedemann R, Tiedemann MR, Gunnlaugsson Þ, Pampoulie C, Víkingsson GA (2014) Finding relatives among North Atlantic common minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*) based on microsatellite data: the relationship between false discovery rate (FDR) and detection power.
- Tourvas N (2021) PopGenUtils: A collection of useful functions to deal with genetic data in R. R package version 0.1.6.
- UN/MAP (2017) Mediterranean Quality Status Report.
- Urbán Ramírez J (1997) El rorcual común *Balaenoptera physalus*, en el Golfo de California, México.
- Urian K, Gorgone A, Read A, Balmer B, Wells RS, Berggren P, Durban JW, Eguchi T, Rayment W, Hammond PS (2015) Recommendations for photo-identification methods used in capture-recapture models with cetaceans. Mar Mammal Sci 31:298–321. doi: 10.1111/mms.12141
- Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1993) Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. Genetics 133:737–749. doi: 10.1093/genetics/133.3.737
- Valsecchi E, Amos W (1996) Microsatellite markers for the study of cetacean populations. Mol Ecol 5:151–6. doi: 10.1111/j.1365-294X.1996.tb00301.x

- Valsecchi E, Amos W, Raga JA, Podestà M, Sherwin W (2004) The effects of inbreeding on mortality during a morbillivirus outbreak in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Anim Conserv* 7:139–146. doi: 10.1017/S1367943004001325
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
- Van Schmidt ND, Beissinger SR (2020) The rescue effect and inference from isolation–extinction relationships. *Ecol Lett* 23:598–606. doi: 10.1111/ele.13460
- Vawter L, Brown W (1986) Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science* (80-) 234:194–196. doi: 10.1126/science.3018931
- Verborgh P, De R, Pérez SS, 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. doi: 10.1111/j.1748-7692.2008.00280.x
- Verborgh P, Gauffier P, Esteban R, Giménez J, Cañadas A, Salazar JM, De Stephanis R (2016) Conservation Status of Long-Finned Pilot Whales, *Globicephala melas*, in the Mediterranean Sea. In: *Advances in Marine Biology*. pp 173–203
- Viale D (1985) Cetaceans in the northwestern Mediterranean: their place in the ecosystem. *Oceanogr Mar Biol* 23:491–571.
- Vianna T dos S, Loch C, Castilho PV de, Gaidzinski MC, Cremer MJ, Simões-Lopes PC (2016) Review of thirty-two years of toothed whale strandings in Santa Catarina, southern Brazil (Cetacea: Odontoceti). *Zool*. doi: 10.1590/S1984-4689zool-20160089
- Vrijenhoek RC (1994) Genetic diversity and fitness in small populations. In: *Conservation Genetics*. Birkhäuser Basel, Basel, pp 37–53
- Wade PR, Kennedy A, LeDuc R, Barlow J, Carretta J, Shelden K, Perryman W, Pitman R, Robertson K, Rone B, Salinas JC, Zerbini A, Brownell RL, Clapham PJ (2011) The world’s smallest whale population? *Biol Lett* 7:83–85. doi: 10.1098/rsbl.2010.0477
- Waelbroeck C, Labeyrie L, Michel E, Duplessy JC, McManus JF, Lambeck K, Balbon E, Labracherie M (2002) Sea-level and deep water temperature changes derived from benthic

- foraminifera isotopic records. *Quat Sci Rev* 21:295–305. doi: 10.1016/S0277-3791(01)00101-9
- Wang J (2005) Estimation of effective population sizes from data on genetic markers. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 360:1395–1409. doi: 10.1098/rstb.2005.1682
- Wang J (2009) A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. *Mol Ecol* 18:2148–2164. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04175.x
- Wang J, Santiago E, Caballero A (2016) Prediction and estimation of effective population size. *Heredity (Edinb)* 117:193–206. doi: 10.1038/hdy.2016.43
- Waples RS (1991) Genetic Methods for Estimating the Effective Size of Cetacean Populations. *Rep Int Whal Comimssion* 279–300.
- Waples RS, Do C (2008) LDNE: A program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Mol Ecol Resour* 8:753–756. doi: 10.1111/j.1755-0998.2007.02061.x
- Weber JL, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44:388–96.
- Weir B, Cockerham C (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution (N Y)* 1358–1370.
- Whitehead H (1993) The behaviour of mature male sperm whales on the Galapagos Islands breeding grounds. *Can J Zool* 71:689–699.
- Whitehead H (2003) Sperm whales: social evolution in the ocean. University of Chicago, press
- Whitehead H, Vachon F, Frasier TR (2017) Cultural Hitchhiking in the Matrilineal Whales. *Behav Genet*. doi: 10.1007/s10519-017-9840-8
- Whitlock MC, Barton NH (1997) The effective size of a subdivided population. *Genetics* 146:427–41.
- Whooley P, Berrow S, Barnes C (2011) Photo-identification of fin whales (*Balaenoptera physalus* L.) off the south coast of Ireland. *Mar Biodivers Rec* 4:1–7. doi: 10.1017/S1755267210001119
- Wierucka K, Verborgh P, Meade R, Colmant L, Gauffier P, Esteban R, De Stephanis R,

- Cañadas A (2014) Effects of a morbillivirus epizootic on long-finned pilot whales *Globicephala melas* in Spanish Mediterranean waters. *Mar Ecol Prog Ser* 502:1–10. doi: 10.3354/meps10769
- Willi Y, Van Buskirk J, Hoffmann AA (2006) Limits to the Adaptive Potential of Small Populations. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37:433–458. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110145
- Wilson AC, Cann RL, Carrii SM, George M, Gyllensten UB, Helm-Bychowsky KM, Higuchi RG, Palumbi SR, Prager EM, Sage RD, Stoneking M (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol J Linn Soc* 26:375–400.
- Wilson AJ, Ferguson MM (2002) Molecular pedigree analysis in natural populations of fishes: approaches, applications, and practical considerations. *Can J Fish Aquat Sci* 59:1696–1707. doi: 10.1139/f02-127
- Wilson B, Hammond PS, Thompson PM (1999) Estimating size and assessing trends in a coastal bottlenose dolphin population. *Ecol Appl* 9:288–300. doi: 10.1890/1051-0761(1999)009[0288:ESAATI]2.0.CO;2
- Wright JA, Barker RJ, Schofield MR, Frantz AC, Byrom AE, Gleeson DM (2009) Incorporating Genotype Uncertainty into Mark-Recapture-Type Models For Estimating Abundance Using DNA Samples. *Biometrics* 65:833–840. doi: 10.1111/j.1541-0420.2008.01165.x
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16:97–159.
- Yu J, Nam B-H, Yoon J, Kim EB, Park JY, Kim H, Yoon SH (2017) Tracing the spatio-temporal dynamics of endangered fin whales (*Balaenoptera physalus*) within baleen whale (Mysticeti) lineages: a mitogenomic perspective. *Genetica* 145:603–612. doi: 10.1007/s10709-017-9988-4
- Zanardo N, Bilgmann K, Parra GJ, Möller LM (2016) Socio-genetic structure of short-beaked common dolphins in southern Australia. *J Zool* 299:89–97. doi: 10.1111/jzo.12330
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *J Comput Biol* 7:203–214. doi: 10.1089/10665270050081478

Zhdanova OL, Pudovkin AI (2008) Nb_HetEx: A Program to Estimate the Effective Number of Breeders. *J Hered* 99:694–695. doi: 10.1093/jhered/esn061



Annexes

Annexe 1 : Évolution des populations de Rorqual commun et de Dauphin bleu et blanc sur 25 ans dans le Nord-Ouest de la Méditerranée

Evolution of the fin whale and striped dolphin populations over 25 years in the North-Western Mediterranean Sea

Léa David^{1*}, Marine Roul¹, Anissa Belhadjer¹, Pascal Monestiez², Céline Arnal³, Max-olivier Bourcoud⁴, Jacques Landron⁵, Céline Tardy⁶, Nathalie Di-Méglio¹

¹ EcoOcéan Institut, 18 rue des Hospices, 34090 Montpellier, France

² INRAE, BIOSP, 84914 Avignon, France

³ Cybelle Planète, Bâtiment « le Janus », 8 rue des Troènes, 34750 Villeneuve-Lès-Maguelone, France

⁴ Swiss Cetacean Society (SCS), CP 1430, 1001 Lausanne, Suisse

⁵ Participe Futur, Port Napoléon, Presqu'île du Mazet 13230 Port-Saint-Louis-du-Rhône, France

⁶ WWF-France, 6, rue des Fabres - 13001 Marseille, France

* Corresponding author: ecocean@wanadoo.fr

Submitted in: Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems

Abstract

- 1) For the first time in the North-Western Mediterranean Sea, this long-term study combines 25-years period of cetacean data pooled from different organizations using the same protocol to collect data, the line transect. Surveys were conducted from 1994 to 2018, between June and September and covered an area of 126,178 km² in the North-Western Mediterranean Sea (NWMS), totalling an effort of 85,044 km, including 55,744 km in the Pelagos Sanctuary.
- 2) Absolute abundances and trends for the fin whale and striped dolphin populations were analysed in those areas, using two complementary methods: Distance sampling for the estimation of detection probability, effective strip width and mean school size; and Kriging for the estimation of densities (number of ind./km²) and its associated variance.
- 3) Calculations of annual values for absolute abundances give a mean estimate for the whole period of 1,967 (σ : 813) fin whales and 52,313 (σ : 15,655) striped dolphins occurring in the NWMS. On average 1,310 (σ : 525) fin whales and 37,090 (σ : 10,850) striped dolphins frequent the Pelagos Sanctuary each summer, which represents each year around 67% of the fin whale and 71 % of the striped dolphins encountered in the NWMS.
- 4) Over the period of 25 years, in the Pelagos Sanctuary, a slight decrease in abundance for striped dolphins (-11.2%) and relative stability for fin whales (+ 0.6%) were showed. These differences are not statistically significant (Pettitt test, $p > 0.05$, $p > 0.20$; Mann-Kendall test, $p > 0.05$, $p > 0.20$).
- 5) Our study brings important results for the legal framework of the Marine Strategy Framework Directive under EU and for the Ecological Approach under the Barcelona Convention.
- 6) Differences in the abundance and distribution of fin whales and dolphins appear for certain years, certainly reflecting the response of these predators to spatio-temporal environmental variability at meso-scale.

Keywords

Abundance, conservation, fin whale, Marine Protected Area, Mediterranean Sea, monitoring, striped dolphin, trend

Annexe 2 : Prédation des anguilles de Méditerranée occidentale par les cétacés

Predation on migrating eels (*Anguilla anguilla* L.) from the Western Mediterranean

Håkan Westerberg^{1*}, Elsa Amilhat², Magnus Wahlberg³, Kim Aarestrup⁴, Elisabeth Faliex², Gaël Simon², Céline Tardy^{5,6}, David Righton^{7,8}

¹ Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Aquatic Resources, Institute of Freshwater Research, Stångholmsvägen 2, SE-178 93, Drottningholm, Sweden.

² Cefrem, UMR 5110 CNRS-Université de Perpignan Via Domitia, F 66860, Perpignan, France.

³ Department of Biology, University of Southern Denmark, DK-5230 Odense M, Denmark.

⁴ Technical University of Denmark, National Institute of Aquatic Resources, Silkeborg, DK-8600, Denmark.

⁵ PSL Research University: EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, 66860 Perpignan, France

⁶ WWF-France, Paris, France

⁷ Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), Lowestoft, NR33 0HT, United Kingdom.

⁸ School of Environmental Sciences, University of East Anglia, Norwich, NR4 7TJ, UK

*Corresponding author. Hakan.westerberg@slu.se

Submitted in: Marine Ecology Progress Series

Abstract

Nineteen female silver European eels (*Anguilla anguilla* L.) were tagged with satellite tags and released in the Gulf of Lion in the Mediterranean during 2013 and 2015. Sixteen tags transmitted data: five in the Atlantic Ocean, and eleven in the Mediterranean. Of those, 50% of migrating eels were consumed by marine mammals in each year, all in the Mediterranean. The diving behaviour recorded by the tags after the eels were consumed indicated that the most likely predators were deep diving toothed whales. Measurements of the acoustic target strength of the tag showed a negligible effect on the detectability by whale biosonar. Overall, the observed predation rate was similar to that reported for eels escaping into the Atlantic. However, unlike eels in the Atlantic, which are most vulnerable to predators in the first week of escapement as they traverse the continental shelf and before they reach the refuge of the deep ocean, eels escaping from the Mediterranean were predated in deep water, months after release, likely as a consequence of their migration within a relatively narrow and deep corridor in the Alboran Sea. This emphasises the challenge of accounting for natural mortality in management plans for the long-term recovery of the European eel.

Keywords

Eel migration, *Anguilla anguilla*, Mediterranean Sea, predation, toothed whales

Annexe 3 : Évènements de naissance et de lactation de Cachalot dans le Nord-Ouest de la Méditerranée

Sperm whale social units in the Western Mediterranean basin: record of a birth event in the Provençal area and a lactation event in Ligurian Sea with behavioural analysis

Biagio Violi^{1,2,*}, Céline Tardy³, Giulia Calogero², Gabriele Principato⁴, Elia Biasissi², Maurizio Würtz^{2,4}, Denis Ody³, Alexandros Frantzis⁵

¹ Department of Earth and Life Sciences (DISTAV), University of Genoa.

² Menkab il respiro del mare Association

³ WWF France

⁴ Artescienza

⁵ Pelagos Cetaceans Research Institute

*Corresponding author: violi.biagio@gmail.com

In preparation: Deep Sea Research

Abstract

Sperm whale social structure is one of the most complicated in animal kingdom. In the oceans, adult females live in mixed social unit at low latitude with immature of both sexes and calves, while males leave social units as they growth to reach high latitude. Mediterranean sperm whale population is isolated from Atlantic population and it is still not clear if sex/age classes segregation as in the oceans occur in Mediterranean. Here, we report a social unit of 3 individuals and a lactation event in Ligurian Sea in October 2017 and a photographic recapture of 2 of these 3 individuals during a birth event in September 2016 with 30 individuals. In these two events, other than the social unit occurrence, calving evidences have been observed: respectively two adult females, a nurser and a parturient, and two young individuals, a neonate and an immature individual. In addition, we describe behaviour during birth event through visual observation and underwater images. In nursing event, we observe the behaviour through drone aerial video and analyse bout of peduncle dives and report milk regurgitation.

These two events represent two records of calving activities in the north of Ligurian Provençal basin. We support the occurrence of social units in the area and reject the age/sex classes segregation in Mediterranean. The mitigation of marine traffic would be needed considering the higher risk of social unit to be threatened by this ship strikes.

Keywords

Sperm whale, social unit, birth, nursing, weaning new-born, Mediterranean, Ligurian Sea

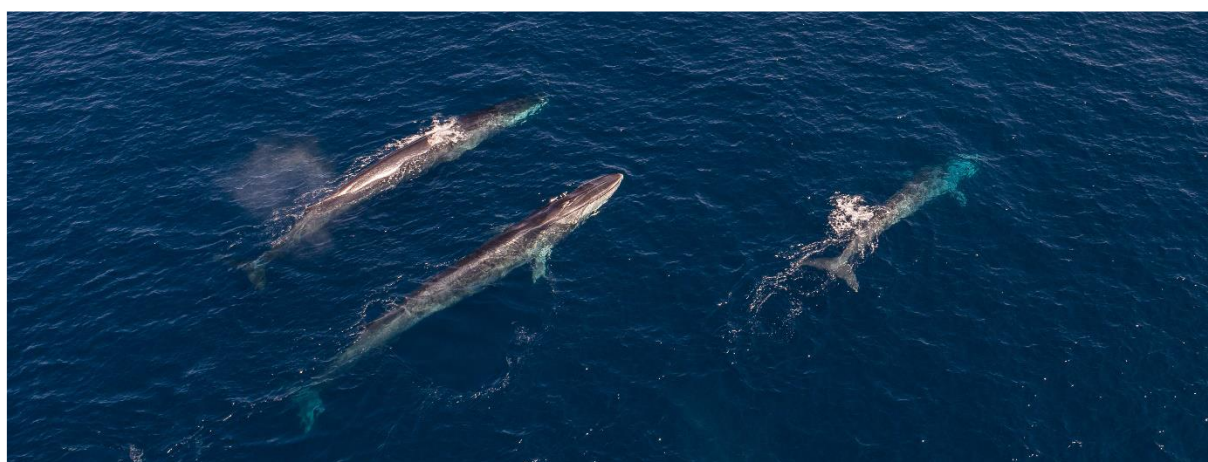
Annexe 4 : Rapport scientifique du WWF de 2019 portant sur l'analyse de contaminants micro-plastiques, les phtalates, pour trois espèces de cétacés

Évaluation de la contamination par les phtalates des grands cétacés du Sanctuaire Pelagos



Contrat 19-012-2019

RAPPORT FINAL MAI 2020



Partenaires de l'étude

Coordinateur scientifique :

WWF-France : D. Ody, T. Jacob et C. Tardy



Partenaires Institutionnels :

GIS3M : Groupement d'intérêt scientifique pour les mammifères marins de Méditerranée



Ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie



Secrétariat Exécutif du Sanctuaire Pelagos



Partenaire scientifique : analyses génétiques

Université de Perpignan, Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de l'Environnement : S. Planes et C. Tardy



Partenaires scientifiques : analyses toxicologiques

Akinao : A. Amiot



SOMMAIRE

Sommaire	3
Liste des figures	3
Liste des tableaux	4
Liste des cartes	5
1 Introduction	6
2 Moyens et méthodes	6
2.1 Collecte des échantillons	6
2.1.1 Effort de prospection	6
2.1.2 Observations et biopsies	9
2.2 Choix des phtalates.....	12
2.3 Méthode d'analyse des phtalates	13
3 Résultats	14
3.1 Teneur en eau des échantillons	14
3.2 Teneur en lipides des échantillons	14
3.3 Teneur en phtalates des échantillons	14
3.3.1 Comparaison des teneurs en phtalates entre les trois espèces	14
3.3.2 Comparaison des teneurs en phtalates entre les différentes années d'études pour le Rorqual commun	18
4 Discussion	21
5 Conclusion	25
6 Bibliographie	27
7 Annexe	29
<i>Protocole d'analyse des phtalates</i>	29

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : comparaison interannuelle de 2016 à 2019 des teneurs des 9 phtalates analysés dans les biopsies de Rorqual commun. Les valeurs 2019 pour le DBP, biaisées par une contamination au laboratoire, ne sont pas prises en compte. 19
- Figure 2** : Résultat de l'Analyse Factorielle des données mixtes. Le premier graphique représente les variables qui expliquent le plus la variance selon deux axes. Le graphique en bas à gauche exprime le poids en terme de variance des données quantitatives, du rouge pour les données qui explique le plus, au bleu pour celles qui expliquent le moins. Le graphique en bas à droite fait la même chose pour les données qualitatives. 22
- Figure 3** : Cartographie des niveaux de contamination pour les phtalates les plus représentés. 23

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Bilan chiffré des efforts de prospection.	7
Tableau 2 : Synthèse du nombre d'observations et de biopsies réalisées de 2016 à 2019 pour les 3 espèces étudiées.	10
Tableau 3 : Liste des phtalates envisagés avec en gras ceux retenus pour les analyses, utilisation principale et toxicologie.	13
Tableau 4 : Teneur en eau (%) moyenne et écart-type sur les 4 années d'études.	14
Tableau 5 : Teneur en lipides (%) moyenne et écart-type sur les 4 années d'études.	14
Tableau 6 : Synthèse des résultats obtenus pour les concentrations en phtalates, pour les trois premières années, et pour les échantillons du RNE. Le MEHP, métabolite du DEHP, n'a été recherché qu'en 2018.	16
Tableau 7 : Synthèse des résultats obtenus pour les concentrations en phtalates des échantillons de Rorqual commun par année en ng/g de poids sec. LD : limite de détection. LQ : limite de quantification.	17
Tableau 8 : comparaison des valeurs de contamination pour les 4 années (2016-2019) et pour les 9 phtalates analysés. Test Pairwise wilcoxon test : $P < 0.05$ = différence entre les années ; $P > 0.05$ = pas de différence entre les années. $p < 0.001$ = *** ; $p < 0.01$ = ** ; $p < 0.1$ = * . ND : Non Détecté, pas de comparaison dans ce cas.	20
Tableau 9 : Comparaison des teneurs en phtalates d'une mère et sa fille échantillonnées en 2016.	24
Tableau 10 : Comparaison des teneurs pour les phtalates les plus représentés d'un même individu au cours d'une même année (Inter-annuel) ou d'une année sur l'autre (Pluri-annuel).....	24
Tableau 11 : Ions qualifiants et quantifiants.	30

LISTE DES CARTES

Carte 1 : Effort de prospection et transits parcourus lors de la campagne Cap Cétacés 2016.	7
Carte 2 : Effort de prospection et transits parcourus lors de la campagne Cap Cétacés 2017.	8
Carte 3 : Effort de prospection et transits parcourus lors de la campagne Cap Cétacés 2018.	8
Carte 4 : Effort de prospection et transits parcourus lors de la campagne Cap Cétacés 2019.	9
Carte 5 : Localisation des biopsies de Rorqual commun, de Globicéphale noir et de Cachalot prélevées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.	10
Carte 6 : Localisation des biopsies de Rorqual commun, de Cachalot et de Globicéphale noir prélevées lors de la campagne Cap Cétacés 2017.	11
Carte 7 : Localisation des biopsies de Rorqual commun et de Cachalot prélevées lors de la campagne Cap Cétacés 2018.	11
Carte 8 : Localisation des biopsies de Rorqual commun prélevées au cours de la campagne Cap Cétacés 2019.	12

1 INTRODUCTION

L'impact des microplastiques dans l'environnement marin est une question majeure qui se pose aujourd'hui (Hidalgo-Ruz et al., 2012). La dégradation complète de cette forme persistante et omniprésente de micro-débris ne se fait qu'en plusieurs siècles. Ces micro-débris ont atteint des niveaux maximums de 892 000 particules/km² en Méditerranée. La taille des microplastiques inférieure à 5 mm est voisine de celle du méso zooplancton. Récemment, Collignon et al. (2012) et Fossi (2012) ont déterminé l'accumulation de particules de microplastiques dans le neuston en Méditerranée nord occidentale soulignant le haut niveau de cette menace émergente dans l'environnement méditerranéen. Les microplastiques s'accumulent en effet à la surface de la mer, en particulier dans l'habitat neustonique, habitat qui héberge de nombreux assemblages zooplanctoniques (Ryan et al. 2009). Une étude récente au niveau du bassin Nord Occidental Méditerranéen et au large de la Corse (Campagne MED) a montré des concentrations de 0.116 particules/m² et un rapport moyen de la masse de microplastiques à celle du mésozooplancton de 0.5. Ceci suggère la potentialité d'une confusion entre les proies et les microplastiques pour les organismes se nourrissant de zooplancton (Collignon et al., 2012).

C. Fossi de l'université de Sienna et ses collaborateurs ont montré qu'un total de 56 % des échantillons neustoniques et planctoniques recueillies dans le Sanctuaire Pelagos contenait des particules microplastiques.

Les impacts physiques et toxicologiques de ces déchets sont largement méconnus en particulier dans le Sanctuaire Pelagos. L'impact de l'ingestion des macrodéchets sont assez bien connus pour les invertébrés (Robards et al., 1995; . Derraik 2002; Thompson et al., 2004 ; . Ryan et al. , 2009 ; Boerger et al., 2010; Collignon et al , 2012; Possatto et al , 2011; Dantas et al , 2012; Murray et Cowie, 2011) mais pas pour les cétacés. Or, les mysticètes, filtreurs, sont particulièrement exposés à la contamination par ces polluants.

Les phtalates sont un groupe de produits chimiques dérivés (sels ou esters) de l'acide phtalique et couramment utilisés comme plastifiants des matières plastiques. Des concentrations élevées de phtalates (DEHP et MEHP) ont été détectés dans les échantillons neustoniques / planctoniques. Les concentrations de MEHP trouvés dans la graisse des rorquals communs échoués ont suggéré que les phtalates pourraient servir de traceur de la contamination par les microplastiques.

2 MOYENS ET METHODES

2.1 COLLECTE DES ECHANTILLONS

2.1.1 Effort de prospection

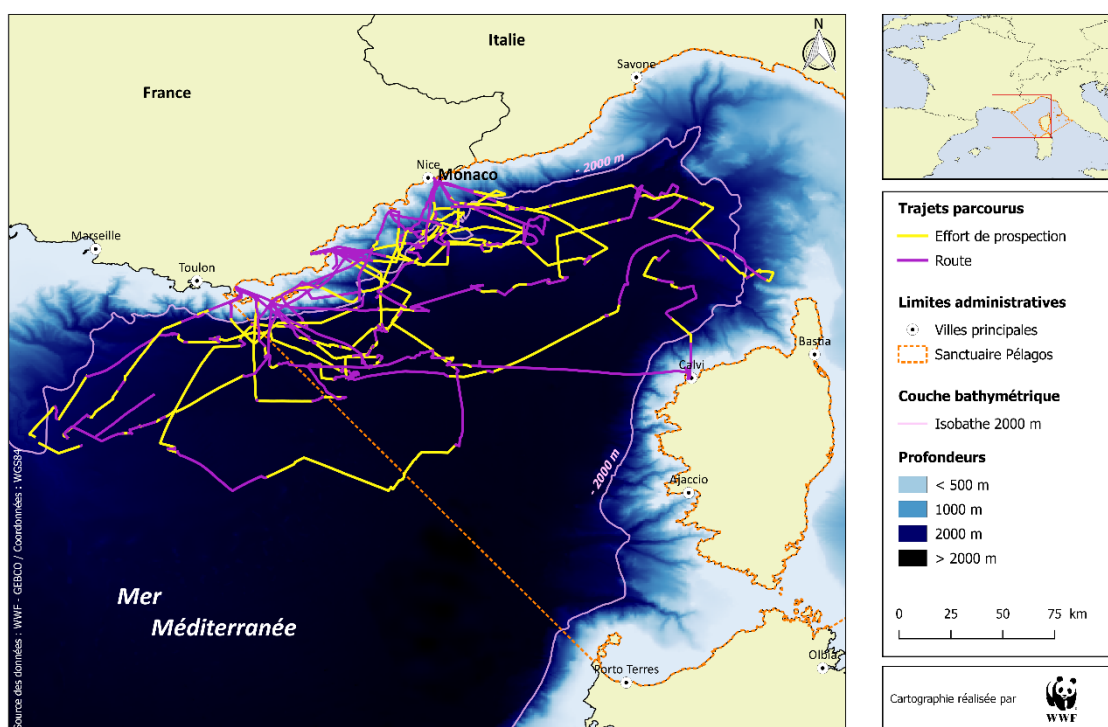
Les échantillons ont été collectés au cours de campagnes en mer de 2016 à 2019 pour une durée allant de 3 à 6 semaines par an. Pour chaque campagne, l'équipage réunit 6 observateurs, un skipper et un second. L'équipe minimum d'observateurs est de trois personnes qui surveillent la mer durant des quarts de 2h. La méthodologie est similaire à celle du transect de ligne, mais les itinéraires sont définis de manière à éviter les conditions météo défavorables et en cherchant à maximiser les chances de rencontre. Nous utilisons pour cela l'expérience des années précédentes et, pour les Rorquals communs, les cartes d'habitats favorables fournies par Jean-Noël DRUON (EC Joint Research Center).

Si un rorqual commun, un cachalot ou un globicéphale noir est repéré, tous les observateurs sont mobilisés : trois personnes embarquent à bord d'un pneumatique (utilisée pour l'approche des animaux), les trois autres restent à bord du navire pour orienter par VHF le pneumatique vers les animaux.

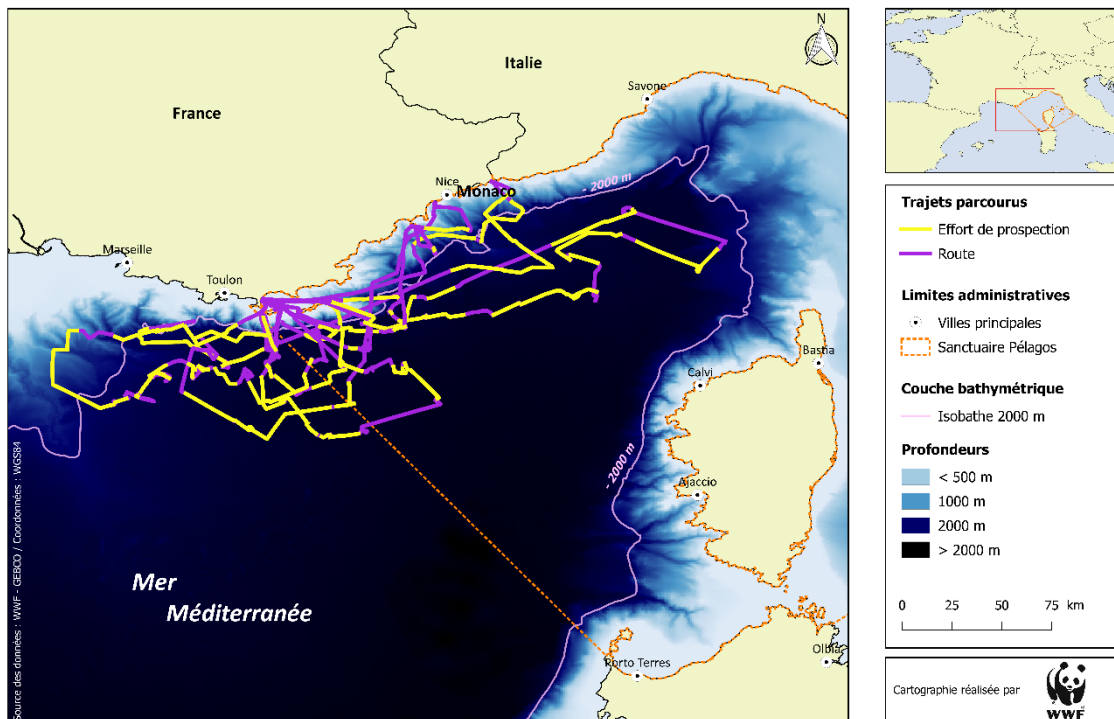
Au total 6063 km et 627h de prospection ont été réalisés (Tableau 1, Cartes 1 à 4). Les efforts de prospection sont présentés par année pour éviter de surcharger les cartes.

Tableau 1 : Bilan chiffré des efforts de prospection.

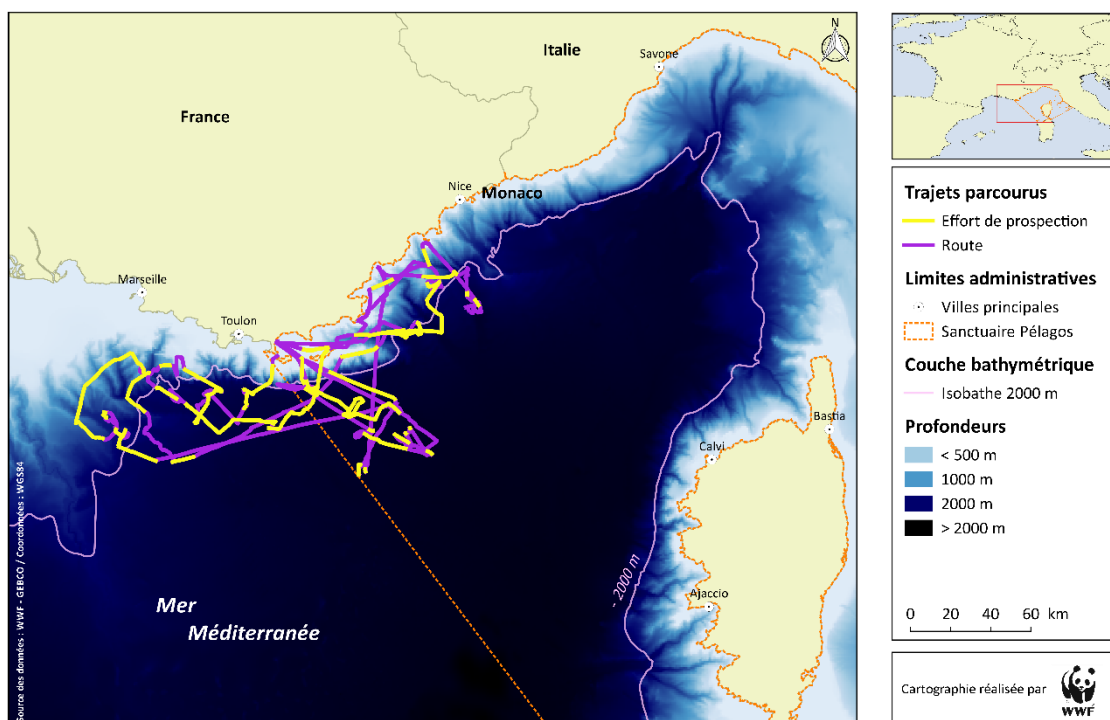
Année	Nombre de jours en mer	Effort de prospection (km)	Nombre d'heures de prospection	Nombre de km par jour
2016	33	1975	224h44	59,8
2017	24	1407	133h50	58,6
2018	18	731	81h54	40,6
2019	29	1950	186h57	67,2
Totaux	104	6063	627h25	58.3



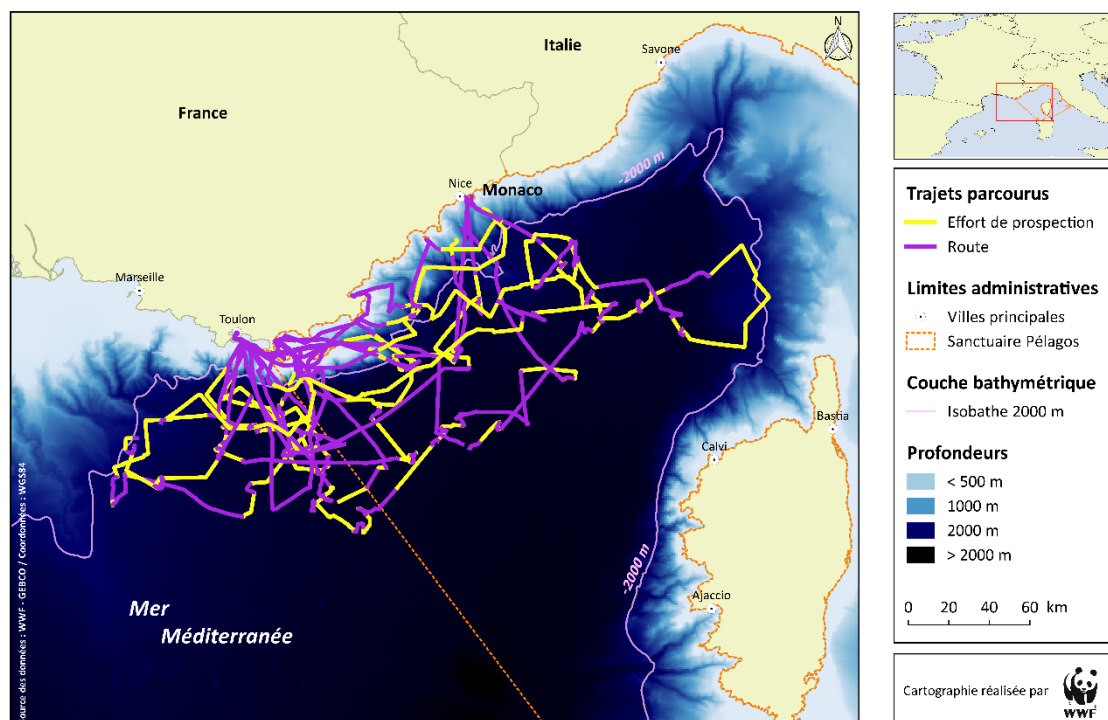
Carte 1 : Effort de prospection et transits parcourus lors de la campagne Cap Cétacés 2016.



Carte 2 : Effort de prospection et transits parcourus lors de la campagne Cap Cétacés 2017.



Carte 3 : Effort de prospection et transits parcourus lors de la campagne Cap Cétacés 2018.



Carte 4 : Effort de prospection et transits parcourus lors de la campagne Cap Cétacés 2019.

2.1.2 Observations et biopsies

Les échantillons sont prélevés sur des animaux vivants (biopsies) à l'aide d'une flèche d'arbalète. L'échantillon contient de la peau et du lard et permet des analyses génétiques, de mesurer la contamination par les polluants et de connaître le statut hormonal des animaux (femelles gestantes ou non, mâles actifs ou juvéniles). La biopsie est complétée par une photo-identification afin de cataloguer et identifier l'individu à partir de marques naturelles (caudale pour le cachalot, chevron et dorsale pour le rorqual commun, dorsales gauche et droite pour le globicéphale noir).

La biopsie est divisée en 3 sous échantillons, avec séparation de la peau et du lard tout d'abord, puis à nouveau division en 2 morceaux pour le lard uniquement. Le conditionnement des sous échantillons se fera dans un tube Eppendorf avec de l'éthanol pour la peau et dans des tubes à scintillation en verre pour le lard. Ils seront ensuite congelés à bord.

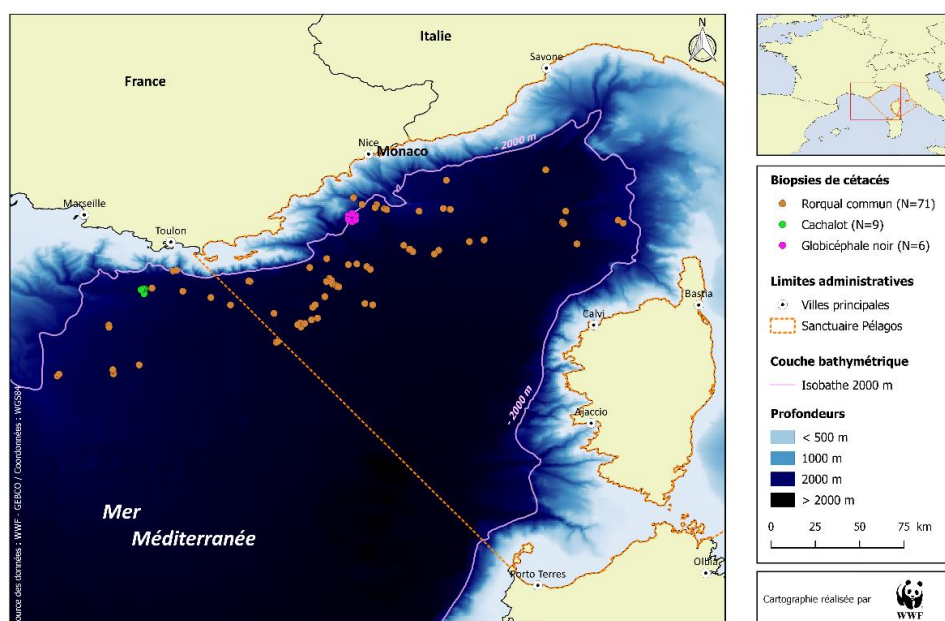
Au total nous avons réalisé 205 observations de Rorqual commun pour 382 individus estimés et 210 biopsies collectées, 19 observations de Cachalots pour 73 individus estimés et 21 biopsies collectées, 8 observations de Globicéphales pour 169 individus estimés et 11 biopsies collectées (Tableau 2).

Les premiers résultats sur le Cachalot et le Globicéphale noir n'apportant aucune information supplémentaire sur la nature et l'ampleur de la contamination des cétacés par les phtalates, nous avons préféré ne pas prélever de biopsies en 2019.

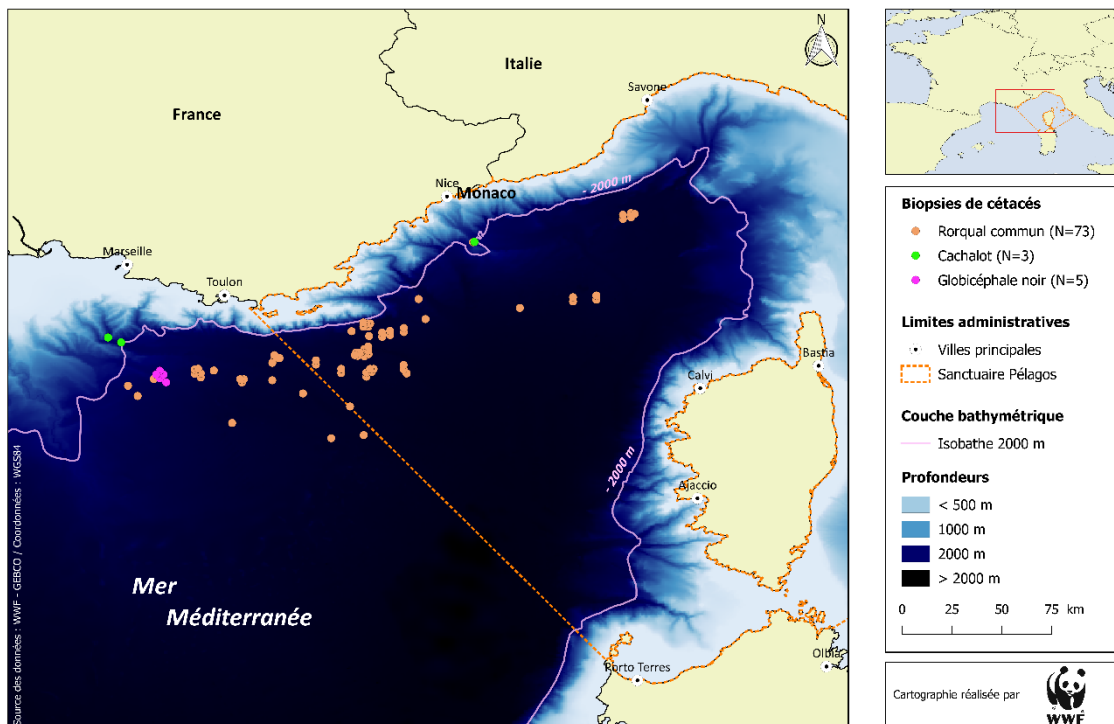
Tableau 2 : Synthèse du nombre d'observations et de biopsies réalisées de 2016 à 2019 pour les 3 espèces étudiées.

Années	Biopsies Nb	Nombre d'observations	Nombre d'individus estimés	Taux de contact Obs/km	Abondance relative Nb ind/km
Rorqual commun					
2016	70	79	123	0.040	0.062
2017	61	56	114	0.040	0.081
2018	23	20	47	0.027	0.064
2019	56	50	98	0.026	0.050
Totaux/moy	210	205	382	0.033	0.064
Cachalot					
2016	9	5	40	0.003	0.020
2017	3	3	5	0.002	0.004
2018	9	4	15	0.005	0.021
2019	-	7	13	0.004	0.007
Totaux/moy	21	19	73	0.004	0.013
Globicéphale					
2016	6	1	35	0.001	0.018
2017	5	3	37	0.002	0.026
2018	-	1	35	0.001	0.048
2019	-	3	62	0.002	0.032
Totaux/moy	11	8	169	0.002	0.031

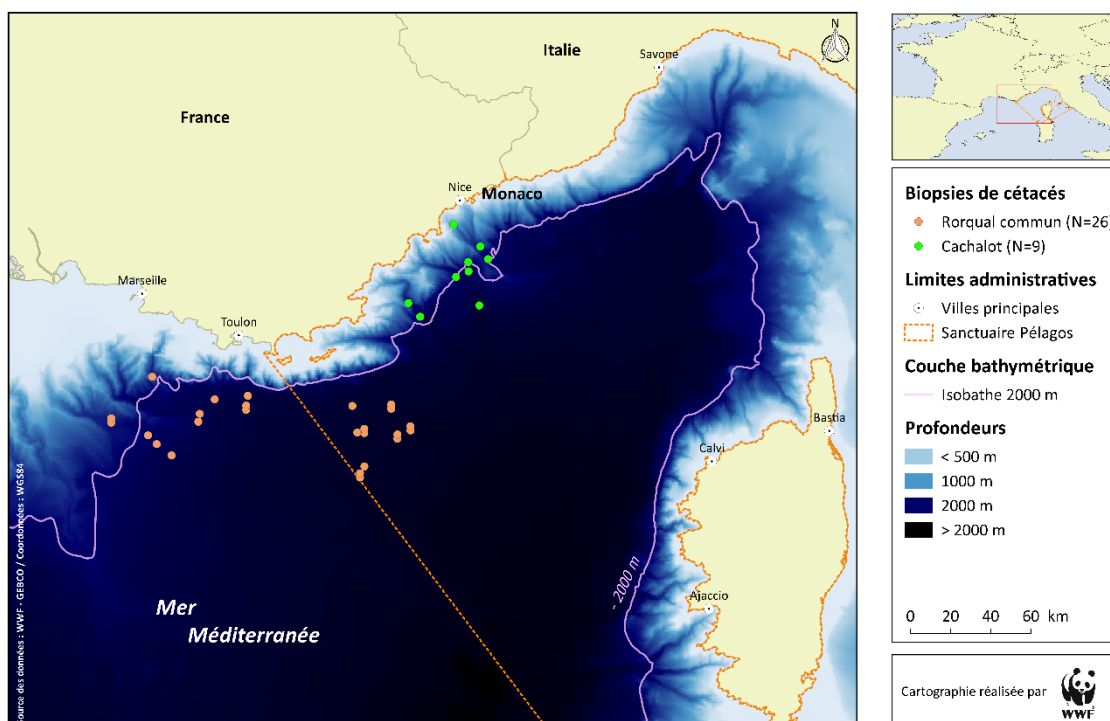
Les biopsies sont localisées dans le sanctuaire Pelagos et dans la zone adjacente du Golfe du Lion (cartes 5 à 8).



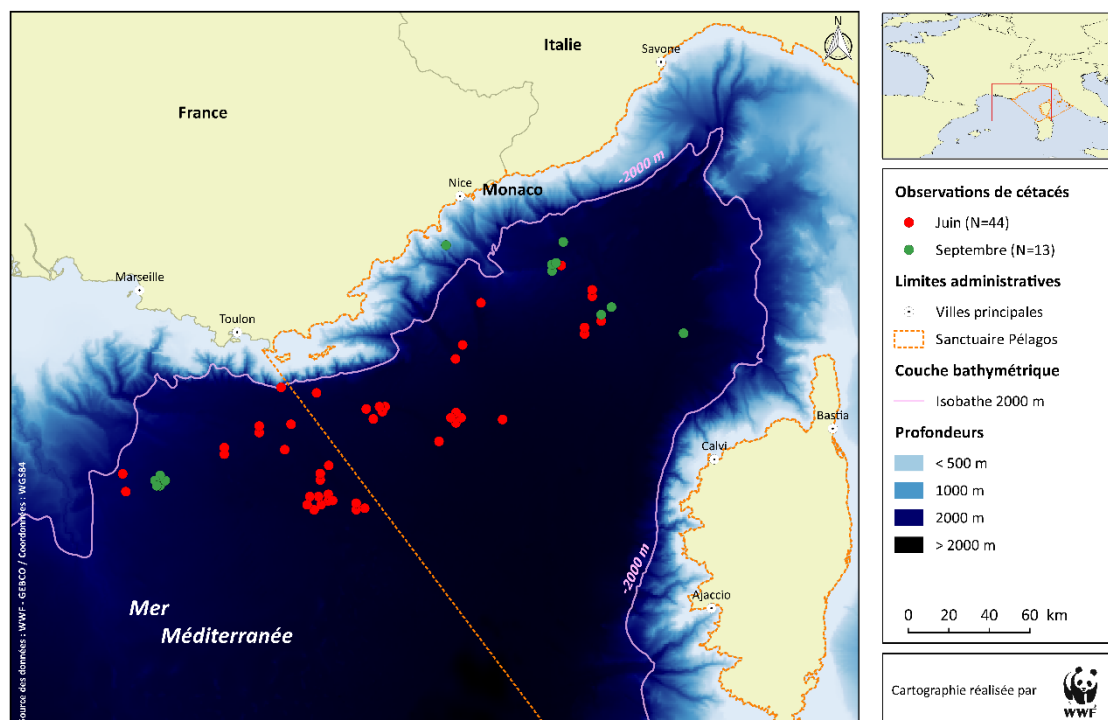
Carte 5 : Localisation des biopsies de Rorqual commun, de Globicéphale noir et de Cachalot prélevées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.



Carte 6 : Localisation des biopsies de Rorqual commun, de Globicéphale noir et de Cachalot prélevées lors de la campagne Cap Cétacés 2017.



Carte 7 : Localisation des biopsies de Rorqual commun, de Globicéphale noir et de Cachalot prélevées lors de la campagne Cap Cétacés 2018.



Carte 8 : Localisation des biopsies de Rorqual commun prélevées au cours de la campagne Cap Cétacés 2019.

En 2018, nous avons complété nos biopsies par des échantillons issus du Réseau national d'Échouage : 21 échantillons de Rorqual commun et 8 de Cachalot de Méditerranée et d'Atlantique.

2.2 CHOIX DES PHTALATES

L'ensemble des phtalates envisagés au cours de cette étude sont présentés dans le Tableau 3. Ils ont été initialement sélectionnés en croisant des critères de présence dans la littérature scientifique (Fossi et al. 2012, 2014, 2016), de toxicité, des critères juridiques (listes d'interdiction internationales EU et US, liste ECHA EU), de la possibilité de les analyser en GC-MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse).

Les phtalates ont différents effets néfastes, notamment sur la reproduction et le développement, mais aussi sur l'environnement. C'est pourquoi certains ont été déclarés comme étant des priorités internationales.

La sélection des composés a enfin été réalisée en prenant en considération la stabilité thermique des composés lors de leur analyse en GC-MS et l'obtention de spectres de masse exploitables aussi bien qualitativement que quantitativement.

Parmi ces composés, 3 d'entre eux ont finalement été écartés car se transformant en anhydride phtalique lors de l'analyse par GC-MS (MBP, MBZP et MEHP) et trois autres conduisent à l'obtention de massifs complexes non résolus en chromatographie (UCMs) du fait de leur composition semblable à celle d'un mélange technique (DIOIP, DINP, DIDP). De ce fait, pour la suite de l'étude, 10 phtalates ont été retenus : DMP, DEP, DiBP, DBP, DMEP, DNHP, BBP, DEHP, DNOP et DNDP (en gras dans le Tableau 3). Suite à l'absence de DEHP dans nos échantillons en 2017, nous avons rajouté son métabolite principal le MEHP en 2018 mais sans succès (Cf chapitre Résultats).

Tableau 3 : Liste des phtalates envisagés avec en gras ceux retenus pour les analyses, utilisation principale et toxicologie.

Composés	Abréviation	Utilisation principale	Toxicologie connue
Mono-Butyl phthalate	MBP		
Mono-Benzyl phthalate	MBZP		
Mono(2-ethylhexyl) phthalate	MEHP	Dégradation du DEHP	Reprotoxique, perturbateur endocrinien
Di methyl Phtalate	DMP	Cosmétiques, déodorants	Nul ou faible
Di Ethyl Phtalate	DEP	Cosmétiques	Nul ou faible
Diisobutyl phtalate	DiBP	Plastiques à usage unique, alimentation	Reprotoxique, perturbateur endocrinien
Dibutyl phthalate	DBP	Plastiques	Reprotoxique, perturbateur endocrinien
Bis(2-methoxyethyl) phthalate	DMEP	-	Reprotoxique
4-4' dibromobiphényle	4,4'DiBr	-	-
Di- n-Hexylphthalate	DNHP	Associé avec le BBP	Idem BBP
Benzylbutyl phthalate	BBP	Parfums, cosmétiques et plastiques	Reprotoxique, perturbateur endocrinien
Bis(2-ethylhexyl) phthalate	DEHP	Plastiques alimentaires et médicaux. Très utilisé mais en phase de remplacement	Reprotoxique, perturbateur endocrinien
Diisooctylisophthalate	DIOIP		
Di-n-octyl phthalate	DNOP	Plastiques flexibles	Reprotoxique probable
Diisononyl phthalate	DINP	-	-
Diisodecyl phthalate	DIDP	-	-
Di-n-decyl phthalate	DNDP	Plastiques	Inconnu

2.3 METHODE D'ANALYSE DES PHTALATES

Afin de ne pas alourdir la lecture de ce rapport la méthode d'analyse des phtalates a été reporté en annexe (Protocole d'analyse des phtalates 7.1).

3 RESULTATS

3.1 TENEUR EN EAU DES ECHANTILLONS

La teneur en eau moyenne des échantillons de Rorqual commun, après lyophilisation, est reportée dans le Tableau 4. Les teneurs en eau étaient significativement supérieures aux autres années et 2017 et 2019 pour le Rorqual commun.

Tableau 4 : Teneur en eau (%) moyenne et écart-type sur les 4 années d'études.

Année	RNE	2016	2017	2018	2019
Rorqual commun	31 ± 22	34 ± 11	40 ± 12	32 ± 10	42 ± 8
Cachalot	26 ± 15	56 ± 5	52 ± 11	59 ± 4	-
Globicéphale noir	-	24 ± 17	51 ± 16	-	-

3.2 TENEUR EN LIPIDES DES ECHANTILLONS

Les teneurs en lipides sont significativement supérieures aux autres années en 2019 et 2018, et en 2017 par rapport à 2016. Il est possible que ce taux de lipide reflète un niveau d'accès à la ressource spécifique à chaque année. Une piste à explorer pour l'avenir, nous avons un nombre d'échantillons suffisant pour cela.

Tableau 5 : Teneur en lipides (%) moyenne et écart-type sur les 4 années d'études.

Année	RNE	2016	2017	2018	2019
Rorqual commun	57 ± 25 (21)	44 ± 15 (68)	57 ± 12 (61)	70 ± 10 (23)	68 ± 11 (56)
Cachalot	69 ± 20 (8)	29 ± 11 (9)	28 ± 18 (3)	21 ± 12 (9)	-
Globicéphale noir	-	-	39 ± 12 (4)	-	-

3.3 TENEUR EN PHTALATES DES ECHANTILLONS

Les tableaux de résultats des analyses pour tous les échantillons, par année et par espèce ont été reportés en annexe 2 (Tableau 12 à Tableau 22).

La totalité des échantillons sur les 4 années sont contaminés par au moins un phtalate, avec des teneurs significatives pour certains d'entre eux (Tableau 6 et Tableau 7).

3.3.1 Comparaison des teneurs en phtalates entre les trois espèces

Cette comparaison ne porte que sur les trois premières années.

La comparaison des taux de phtalates obtenus pour les trois espèces (Tableau 23) ne montre pas l'accroissement selon le niveau trophique (Rorqual < Cachalot < Globicéphale) caractéristique des

composés bioaccumulables, tel que nous l'avons mis en évidence lors de nos études sur les PCBS, PBDEs, OCP. En 2018, les Rorquals communs sont plus contaminés que les cachalots, notamment pour le DiBP, le DEP et le DMP et les phtalates totaux (4993 contre 2046 ng/g). Mais c'était l'inverse en 2017 (2711 et 4125 ng/g). Dans les deux cas, ce sont essentiellement les concentrations en DiBP qui créent les différences (Tableau 7) avec des écarts types qui les rendent cependant peu significatives. Les Globicéphales apparaissent les plus contaminés en 2016 et 2017, mais cela repose sur un très petit nombre d'échantillons, sur le seul DEP en 2016, et si les valeurs du DiBP sont importantes en 2017 elles étaient similaires aux deux autres espèces en 2016.

La sur-contamination du Rorqual commun à laquelle on aurait pu s'attendre étant donné son mode de nutrition qui permet l'ingestion directe de micro-plastique, n'est pas avérée non plus.

Rien de concluant donc. Ces résultats ont fourni la première confirmation de la non bioaccumulation des phtalates. Ils ne se concentrent donc pas au long de la chaîne alimentaire, ce qui rend la comparaison entre espèces de différents niveaux trophiques peu informative. Il est par ailleurs toujours plus compliqué d'obtenir un échantillon représentatif pour les Cachalots et les Globicéphales. Nous avons donc choisi de nous concentrer sur une seule espèce, le Rorqual commun, en 2019.

Pour les échantillons issus du RNE, Rorqual commun et Cachalot confondus, la concentration moyenne est similaire environ 740 ng/g ps (Tableau 6). Les 3 phtalates majoritairement détectés sont identiques mais en proportions différentes. En ce qui concerne le métabolite MEHP, il n'a été détecté que dans un seul échantillon RNE_Bp15. Dans tous les cas les teneurs sont nettement inférieures à celles des échantillons récoltés sur des animaux vivants. Il est probable que ces différences proviennent de la dégradation rapide des phtalates dans les carcasses, mais nos résultats sont insuffisants pour aller plus loin dans l'interprétation.

Tableau 6 : Synthèse des résultats obtenus pour les concentrations en phtalates, pour les trois premières années, et pour les échantillons du RNE. Le MEHP, métabolite du DEHP, n'a été recherché qu'en 2018.

	Rorquals				Cachalots				Globicéphales		
	2016	2017	2018	Échouage	2016	2017	2018	Échouage	2016	2017	2018
Nombre d'individus	70	62	23	21	9	3	9	8	6	4	0
Masses sèches		60% ± 11%	68% ± 10%	69% ± 22%		48% ± 11%	41% ± 4%	69% ± 22%		49% ± 16%	
Lipides		57% ± 12%	70% ± 10%	57% ± 25%		28% ± 18%	21% ± 12%	69% ± 20%		39% ± 12%	
Prise d'essai (mg)		262 ± 143	211 ± 118	393 ± 126		138 ± 63	97 ± 41	424 ± 84		34 ± 20	
MEHP (ng/g)	-	-	0	15 ± 0	-	-	0	0	-	-	
DEHP (ng/g)	979 ± 879	52 ± 268	0	0	1956 ± 3516	155 ± 0	0	24 ± 51	666 ± 545	0	
DMP (ng/g)	183 ± 235	0	159 ± 101	10 ± 26	314 ± 284	0	54 ± 45	0	1172 ± 438	0	
DEP (ng/g)	15800 ± 15697	124 ± 79	778 ± 479	87 ± 66	4168 ± 1682	131 ± 39	232 ± 185	105 ± 58	17040 ± 5047	374 ± 169	
DiBP (ng/g)	267 ± 315	1067 ± 1016	2521 ± 1968	274 ± 215	738 ± 369	2606 ± 1514	1307 ± 526	346 ± 199	1582 ± 654	7663 ± 2003	
DBP (ng/g)	402 ± 600	491 ± 701	777 ± 567	48 ± 68	1289 ± 702	922 ± 578	452 ± 225	96 ± 87	2293 ± 918	2620 ± 844	
DMEP (ng/g)	132 ± 320	0	0	0	709 ± 1083	0	0	0	0	0	
DNHP+BBP (ng/g)	215 ± 266	0	83 ± 274	29 ± 72	633 ± 254	0	0	0	1323 ± 499	0	
DNDP (ng/g)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
DNOP (ng/g)	6 ± 16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
TOTAL	17983 ± 16254	2711 ± 2548	4993 ± 3661	751 ± 453	9807 ± 5657	4125 ± 2130	2046 ± 981	739 ± 335	24076 ± 6026	10657 ± 3016	

Tableau 7 : Synthèse des résultats obtenus pour les concentrations en phtalates des échantillons de *Rorqual commun* par année en ng/g de poids sec. LD : limite de détection. LQ : limite de quantification.

Campagnes	2016			2017			2018			2019		
Nombre d'individus	70			61			23			56		
Masses sèches		+/-		60%	+/-	11%	68%	+/-	10%	58%	+/-	8%
Lipides	44%	+/-	15%	57%	+/-	12%	70%	+/-	10%	68%	+/-	11%
Prise d'essai (mg)	134	+/-	65	262	+/-	143	211	+/-	118	208	+/-	93
Campagnes	2016			2017			2018			2019		
	Moyenne	+/-	ET	Moyenne	+/-	ET	Moyenne	+/-	ET	Moyenne	+/-	ET
DMP (ng/g)	183	+/-	235	<LD/LQ	+/-	ND	159	+/-	101	<LD/LQ	+/-	ND
Valeur minimum (ng/g)	8,2			ND			14			ND		
Valeur maximum (ng/g)	1015,8			ND			276			ND		
Nb d'individus détectés	51/70			0/61			tous			0/56		
LD (ng/mL) vial				3			2			23		
LQ (ng/mL) vial				10			7			69		
Blancs (ng/mL) vial				<LD			<LD			<LD		
DEP (ng/g)	15.800	+/-	15.697	125	+/-	79	778	+/-	479	565	+/-	149
Valeur minimum (ng/g)	65,2			26			126			184		
Valeur maximum (ng/g)	74049,3			397			1686			1185		
Nb d'individus détectés	tous			tous			tous			tous		
LD (ng/mL) vial				8			7			4		
LQ (ng/mL) vial				10			10			11		
Blancs (ng/mL) vial				4			4			<LD		
DiBP (ng/g)	267	+/-	315	1.067	+/-	1.016	2.521	+/-	1.968	9.681	+/-	2.398
Valeur minimum (ng/g)	6,4			131			697			3934		
Valeur maximum (ng/g)	2033,7			5538			9306			20462		
Nb d'individus détectés	68/70			53/61			tous			tous		
LD (ng/mL) vial				39			74			8		
LQ (ng/mL) vial				39			74			10		
Blancs (ng/mL) vial				36			71			8		
DBP (ng/g)	402	+/-	600	491	+/-	701	777	+/-	567	mg/g		
Valeur minimum (ng/g)	11,4			70			192			4898		
Valeur maximum (ng/g)	3515,1			3313			2207			1691379		
Nb d'individus détectés	63/70			37/61			tous			tous		
LD (ng/mL) vial				149			61			1584		
LQ (ng/mL) vial				149			61			1584		
Blancs (ng/mL) vial				146			57			1582		
DMEP (ng/g)	132	+/-	320	<LD/LQ	+/-	ND	<LD/LQ	+/-	ND	<LD/LQ	+/-	ND
Valeur minimum (ng/g)	92,8			ND			ND			ND		
Valeur maximum (ng/g)	2198,7			ND			ND			ND		
Nb d'individus détectés	22/70			0/61			0/23			0/56		
LD (ng/mL) vial				19			4			117		
LQ (ng/mL) vial				19			11			117		
Blancs (ng/mL) vial				16			<LD			<LD		
DNHP+BBP (ng/g)	215	+/-	266	<LD/LQ	+/-	ND	83	+/-	274	<LD/LQ	+/-	ND
Valeur minimum (ng/g)	14,3			ND			ND			ND		
Valeur maximum (ng/g)	1853,5			ND			1250			ND		
Nb d'individus détectés	66/70			0/61			3/23			0/56		
LD (ng/mL) vial				7			13			7		
LQ (ng/mL) vial				20			40			20		
Blancs (ng/mL) vial				<LD			<LD			<LD		
DEHP (ng/g)	979	+/-	879	52	+/-	268	<LD/LQ	+/-	ND	893	+/-	514
Valeur minimum (ng/g)	10,6			0,2			0,0			205,4		
Valeur maximum (ng/g)	5114,9			2031,5			0,0			2382,1		
Nb d'individus détectés	64/70			7/61			3/23			tous		
LD (ng/mL) vial				124			212			54		
LQ (ng/mL) vial				124			212			54		
Blancs (ng/mL) vial				121			207			54		
DNDP (ng/g)	<LD/LQ	+/-	ND	<LD/LQ	+/-	ND	<LD/LQ	+/-	ND	<LD/LQ	+/-	ND
Valeur minimum (ng/g)	ND			ND			ND			ND		
Valeur maximum (ng/g)	ND			ND			ND			ND		
Nb d'individus détectés	0			0			0/23			0/56		
LD (ng/mL) vial				3			39			5		
LQ (ng/mL) vial				9			117			15		
Blancs (ng/mL) vial				<LD			<LD			<LD		
DNOP (ng/g)	6	+/-	16	1	+/-	12	5	+/-	22	<LD/LQ	+/-	ND
Valeur minimum (ng/g)	4,0			ND			5			ND		
Valeur maximum (ng/g)	91,2			91			105			ND		
Nb d'individus détectés	12/70			1/61			1/23			0/56		
LD (ng/mL) vial				17			42			6		
LQ (ng/mL) vial				17			125			17		
Blancs (ng/mL) vial				14			<LD			<LD		

3.3.2 Comparaison des teneurs en phtalates entre les différentes années d'études pour le Rorqual commun

Sur les 9 phtalates analysés (DNHP et BBP sont analysés ensembles), 8 étaient présents en 2016, 5 en 2017, 6 en 2018 et seulement 4 en 2019. Quatre phtalates montrent des concentrations significatives au cours des 4 années : DEP, DiBP, DBP et DEHP avec des valeurs moyennes situées entre 1000 et 10000 ng/g de poids sec. Les 5 autres phtalates sont plus rares avec des concentrations assez faibles. Mais l'évolution temporelle de la contamination par les 9 phtalates analysés au cours des 4 années d'étude ne montre aucune tendance claire. Seul le DiBP semble présenter une croissance régulière au cours du temps et assez marquée en 2019. Le DBP augmente également de 2016 à 2017, mais seulement à partir de 2018 de façon significative (Tableau 7). Pour les autres, tous les cas de figures sont représentés : présence sur une seule année et absence ou valeur très faible les autres (DEP, DMEP, DNHP+BBP), absence ou valeur faible sur les 4 ans (DNDB, DNOP), alternance une année sur deux (DMP) et alternance première et dernière année (DEHP). L'absence de DEHP en 2017 (7 sur 61 seulement), après une année 2016 où la quasi-totalité des échantillons étaient contaminés (64 sur 70), nous a incité à rechercher son métabolite principal le MEHP en 2018, mais sans succès. Son absence n'était donc par le résultat d'une métabolisation rapide. En 2019 le DEHP retrouve des valeurs proches de celles de 2016 avec tous les échantillons contaminés et une moyenne à 893 ng/g-1 (+/- 514).

Pour ce qui concerne le DBP, les résultats de 2019, plus d'un million de fois supérieurs aux années précédentes ont allumé une alerte rouge et entraîné une enquête approfondie qui a mis en évidence un problème de contamination par un lyophilisateur. La série d'analyses réalisées au cours de cette enquête a permis de vérifier qu'il n'y avait pas d'autres contaminations significatives. Les quantités restantes d'échantillons étant insuffisantes il n'a pas été possible de refaire ces analyses et les valeurs de contamination en DBP de 2019 sont donc invalidées.

Quand la comparaison est possible d'une année sur l'autre le Tableau 8 indique quand ces différences de teneurs d'une année à l'autre sont significatives ou non.

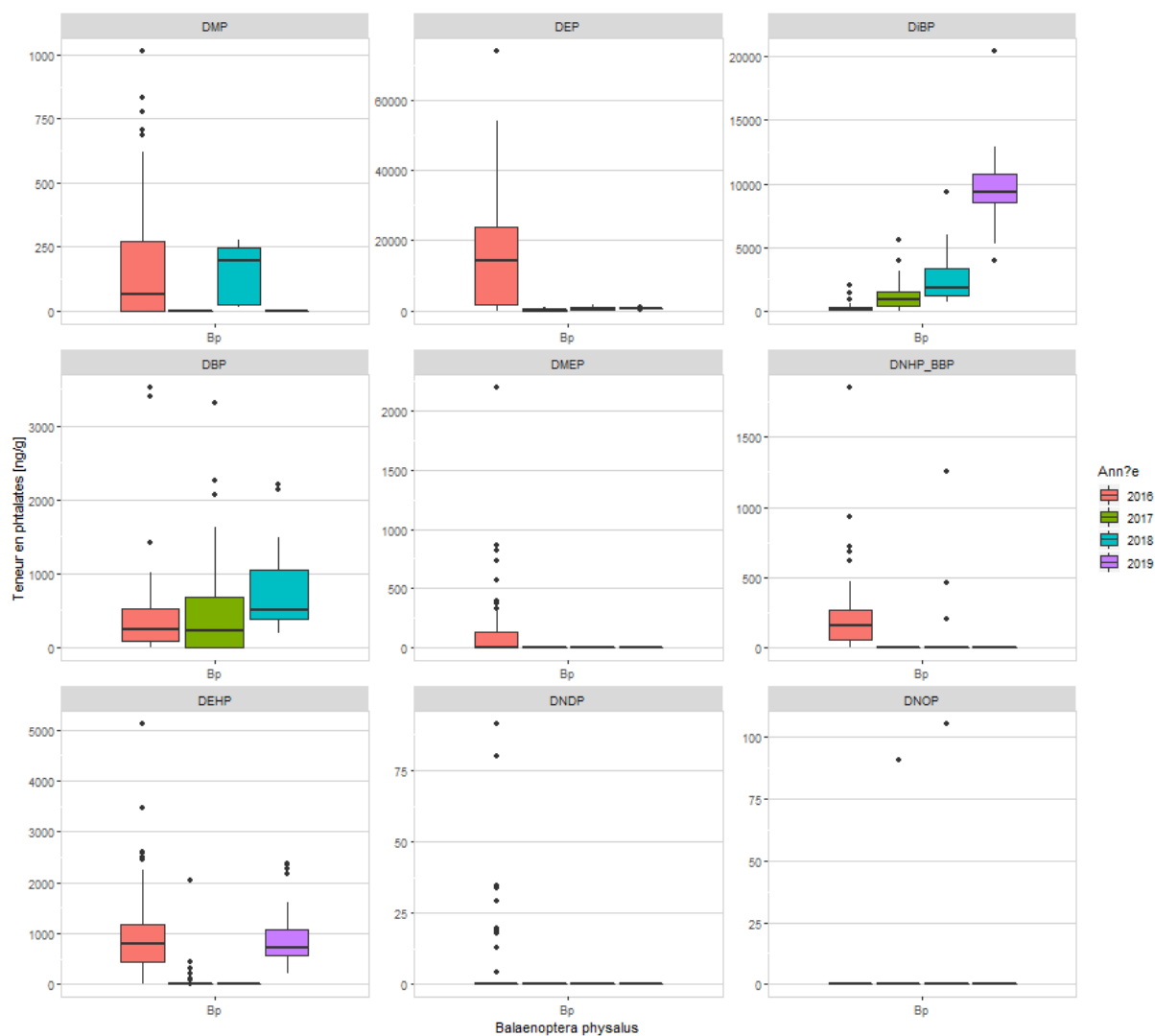


Figure 1 : comparaison interannuelle de 2016 à 2019 des teneurs des 9 phtalates analysés dans les biopsies de Rorqual commun. Les valeurs 2019 pour le DBP, biaisées par une contamination au laboratoire, ne sont pas prises en compte.

Tableau 8 : comparaison des valeurs de contamination pour les 4 années (2017-2019) et pour les 9 phtalates analysés. Test Pairwise wilcoxon test : $P < 0.05$ = différence entre les années ; $P > 0.05$ = pas de différence entre les années. $p < 0.001$ = *** ; $p < 0.01$ = ** ; $p < 0.1$ = * . ND : Non Détecté, pas de comparaison dans ce cas.

DMP	2016	2017	2018
2017	ND	-	-
2018	2018 ⇔ 2016	-	-
2019	ND	-	-
DEP	2016	2017	2018
2017	2017 < 2016***	-	-
2018	2018 < 2016***	2018 > 2017***	-
2019	2019 < 2016***	2019 > 2017***	2019 ⇔ 2018
DiBP	2016	2017	2018
2017	2017 > 2016***	-	-
2018	2018 > 2016***	2018 > 2017***	-
2019	2019 > 2016***	2019 > 2017***	2019 > 2018***
DBP	2016	2017	2018
2017	2017 ⇔ 2016	-	-
2018	2018 > 2016***	2018 > 2017**	-
2019	2019 > 2016***	2019 > 2017***	2019 > 2018***
DMEP	2016	2017	2018
2017	ND	-	-
2018	ND	-	-
2019	ND	-	-
DNHP + BBP	2016	2017	2018
2017	ND	-	-
2018	2018 < 2016***	-	-
2019	ND	-	-
DEHP	2016	2017	2018
2017	2017 < 2016***	-	-
2018	ND	-	-
2019	2019 ⇔ 2016	2019 > 2017***	-
DNDP	2016	2017	2018
2017	ND	-	-
2018	ND	-	-
2019	ND	-	-
DNOP	2016	2017	2018
2017	2017 ⇔ 2016	-	-
2018	ND	-	-
2019	ND	-	-

4 DISCUSSION

Les phtalates sont utilisés pour accroître la flexibilité et la souplesse des plastiques ainsi qu'en tant qu'agents fixateurs dans les cosmétiques. Ils sont présents dans de nombreux produits de consommations courantes (emballages, déodorants, encres, cuirs synthétiques, vernis à ongles, etc.). Depuis février 2017, 4 phtalates (DEHP, DiBP, DBP et BBP) sont reconnus par la réglementation européenne REACH dans la liste de substances préoccupantes. Certains de ces phtalates sont soumis à autorisation avec une limite de concentration mais ne sont pas forcément interdits. Les normes sont définies sur la base des données individuelles de chaque phtalate. Or, les phtalates agissent de façon concomitante. Cela a déjà été démontré chez l'animal et chez l'humain. Le DEP par exemple est autorisé suite à des essais individuels, alors que dans la réalité il y a co-exposition avec les autres phtalates et les effets se conjuguent.

En revanche, contrairement aux PCBs, PBDEs et autres organochlorés que nous avons étudiés précédemment dans le gras des baleines, il y a un consensus sur le fait que les phtalates ne sont pas bio-accumulés au long des chaînes alimentaires (Gobas et al, 2003 ; Sopheak, 2015). Chez les mammifères les phtalates sont éliminés en quelques jours en général. Chez les humains, 63% des phtalates et métabolites associés sont éliminés après 24h (Defranceschi et al., 2015). Nos résultats suggèrent que c'est probablement similaire chez les cétacés. Les niveaux de phtalates que nous mesurons dans nos biopsies résultent donc d'une contamination récente et chronique.

Parmi les 4 phtalates détectés cette année, 3 sont reconnus comme toxiques par la réglementation REACH, 2 sont majoritaires dans nos échantillons depuis 2 ans. Les utilisations de ces phtalates étant variées, la contamination des cétacés est très probablement multi sources : déchets plastiques en mer, unités de traitement des eaux usées littorales, rivières et activités côtières.

Cette année 2019 est la quatrième campagne d'analyse des phtalates (56 échantillons), après 2016 (70 échantillons), 2017 (62 échantillons) et 2018 (23 échantillons).

Les résultats obtenus au cours de ces 4 années montrent une grande variabilité interannuelle ainsi qu'entre individus au sein d'une même année, avec des écarts types qui sont souvent égaux ou supérieurs aux moyennes (Tableau 11), ce qui rend leur interprétation difficile.

Ainsi qu'il a été indiqué dans les résultats, aucune tendance ne se dégage de façon évidente des résultats de ces 4 années. Afin d'essayer d'identifier les causes possibles des variations des niveaux de contamination, nous avons réalisé une Analyse Factorielle des Données Mixtes qui permet, comme son nom l'indique, de mélanger données quantitatives et qualitatives (Figure 2).

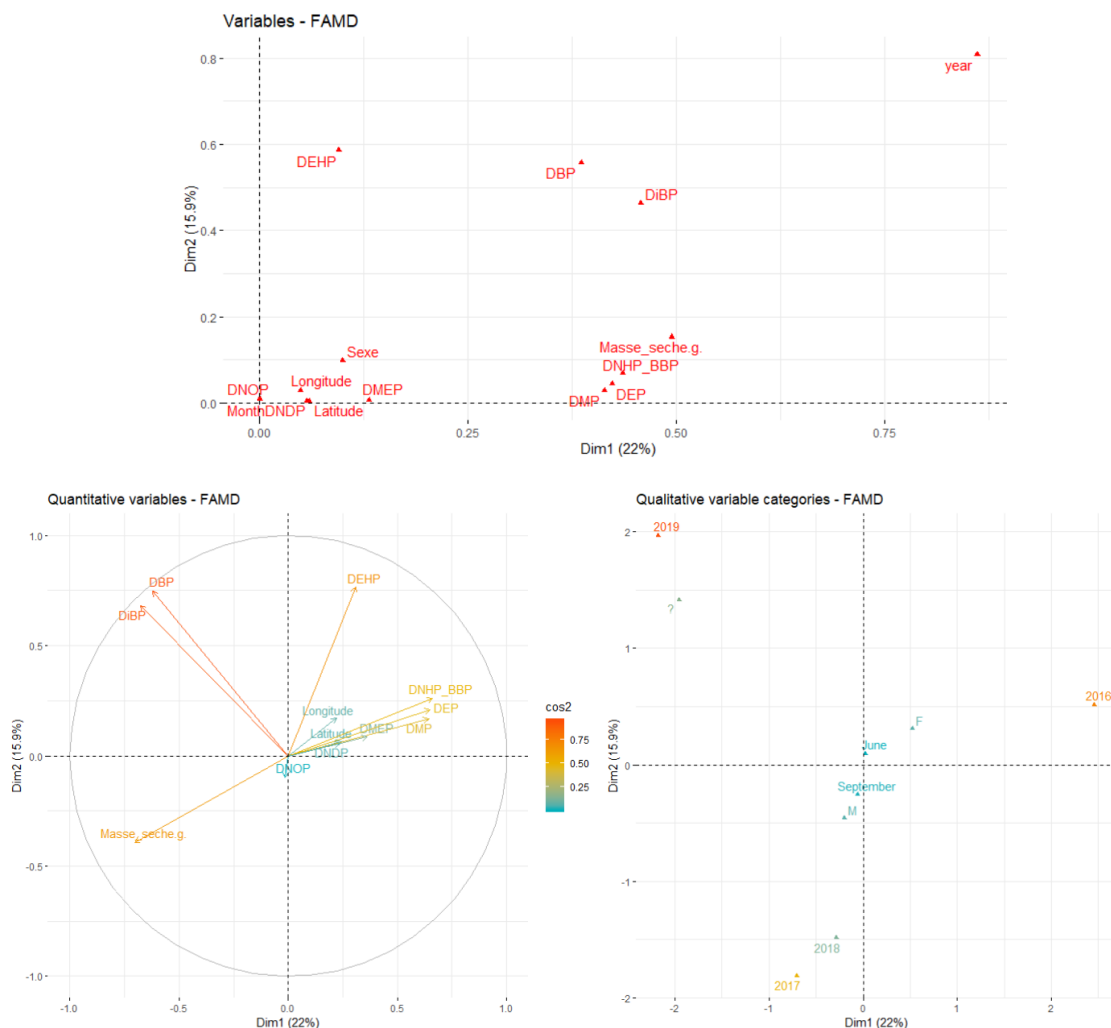


Figure 2 : Résultat de l'Analyse Factorielle des données mixtes. Le premier graphique représente les variables qui expliquent le plus la variance selon deux axes. Le graphique en bas à gauche exprime le poids en terme de variance des données quantitatives, du rouge pour les données qui expliquent le plus, au bleu pour celles qui expliquent le moins. Le graphique en bas à droite fait la même chose pour les données qualitatives.

Le premier graphique confirme l'année comme la principale explication de la variance. Il isole également les phtalates dont les concentrations sont les plus significatives (DEHP, DBP, DiBP), et un peu moins significatives (DNHP-BBP, DEP, DMP). Il montre enfin que le sexe des individus, la position géographique ou le mois de l'année ne sont pas des facteurs de variations. Les phtalates regroupés aux origines n'expliquent rien non plus puisqu'ils sont très rares ou absents.

Le second graphique indique avec quel poids et dans quel sens ces variables – quantitatives à gauche et qualitatives à droite - expliquent la variance. On retrouve les mêmes groupes de phtalates selon leur valeur de contamination moyenne. Par rapport au premier graphique, l'axe 2 (Dim2) sépare le DiBP et le DBP dont les concentrations augmentent au cours des 4 années, du DEHP qui est beaucoup moins présent en 2017 et 2018. Le groupe de phtalates intermédiaires regroupent ceux qui sont plutôt présents en 2016. Il est confirmé que la position géographique n'est pas un facteur explicatif de la variance, ainsi que le montre la série de cartes réalisées par ailleurs (Figure 3). Il est intéressant de noter que la valeur de la prise d'essai (le poids sec des échantillons) est opposée à celles des principaux phtalates. Le poids des échantillons est donc suffisant et n'influence pas les valeurs des concentrations obtenues.

À droite, le graphique regroupe les années 2017 et 2018 qui présentent des résultats similaires. A l'inverse 2016 et 2019 s'opposent, comme le révèle déjà le tableau de résultats (Tableau 7). Ni le mois de l'année, juin ou septembre en l'occurrence, ni le sexe des animaux n'expliquent les variations des teneurs en phtalates de nos échantillons.

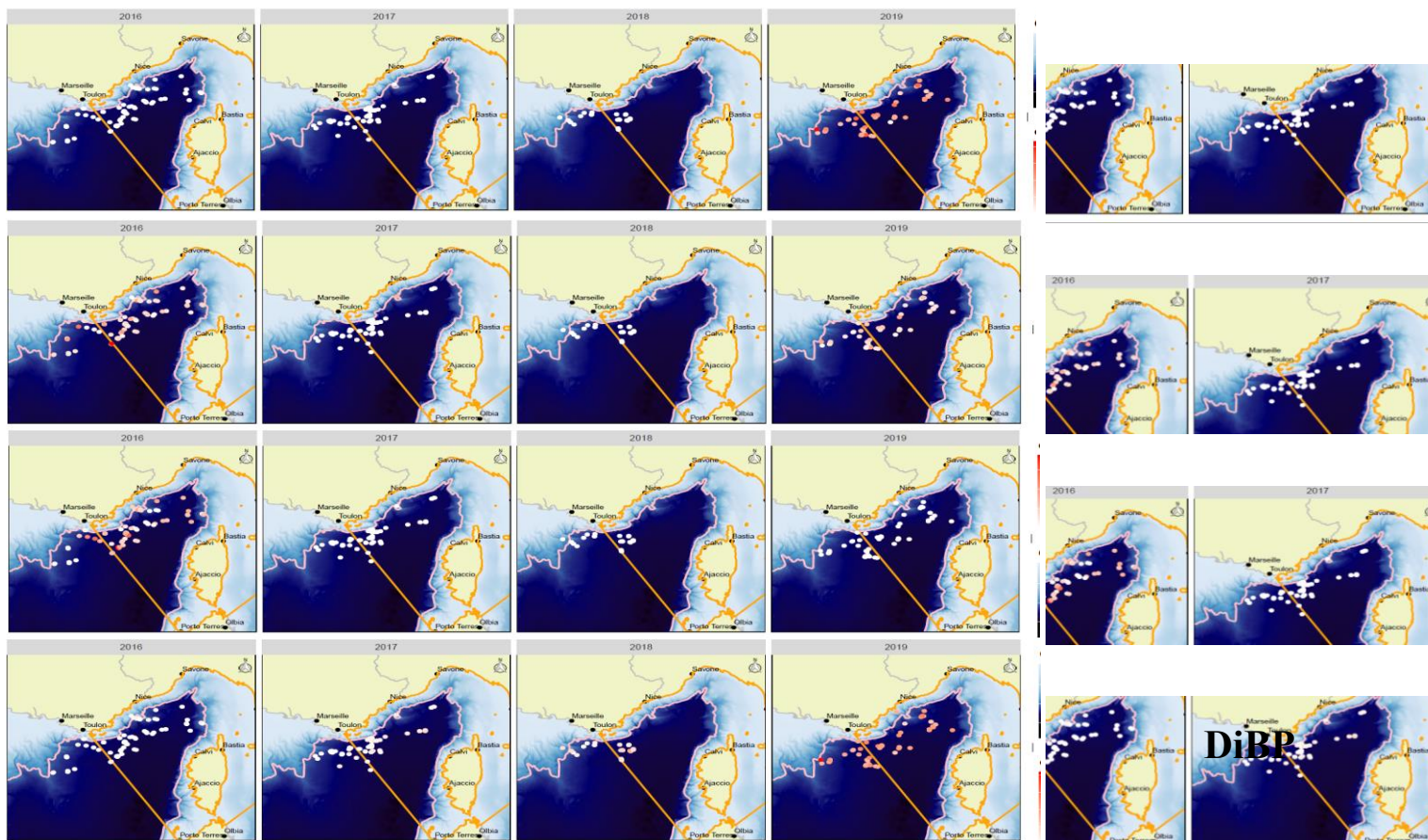


Figure 3 : Cartographie des niveaux de contamination pour les phtalates les plus représentés.

La cartographie des niveaux de contamination pour les 4 phtalates ayant des valeurs significatives confirme la non corrélation avec la localisation géographique (Figure 3). Les biopsies avec des niveaux de contamination élevés ou faibles sont assez également distribués sur toute notre zone de travail. Il n'y aurait donc pas dans le sanctuaire Pelagos des zones particulièrement « contaminantes » pour les phtalates.

Si les années apparaissent comme le principal facteur de variance, avec des années fortes et faibles pour chacun des phtalates, ces différences, dont certaines statistiquement significatives (Tableau 8), s'expriment en prenant le dessus sur une variabilité intra-annuelle également importante. A l'intérieur d'une même année les niveaux de contamination sont assez hétérogènes selon les individus, y compris entre individus appartenant à un même groupe pour lesquels on peut faire l'hypothèse qu'ils ont fréquenté, au moins un temps, les mêmes zones. L'exemple de la mère et de sa fille est de ce point de vue assez illustratif (Tableau 9) où l'on constate des teneurs assez éloignées, la plus jeune étant la plus contaminée.

Tableau 9 : Comparaison des teneurs en phtalates d'une mère et sa fille échantillonnées en 2016.

Date	ID	Sexe	DMP	DEP	DiBP	DBP	DMEP	DNHP+BBP	DEHP	DNOP	DNDP	Somme
13/06/16	KR (mère)	F	39.5	16737.9	537.4	778.0	0.0	23.9	0.0	0.0	0.0	18116.7
	KR11 (petit)	F	708.1	36352.1	2033.7	3515.1	0.0	929.7	2491.6	0.0	0.0	46030.3

On retrouve également cette hétérogénéité au sein d'un même individu d'une année sur l'autre, et même pour certains doublons quand les deux biopsies ont été réalisées la même journée. Le Tableau 10 en illustre quelques cas. Les différences sont assez marquées pour MR08-10 par exemple avec des facteurs 3 à 5 entre deux valeurs (le facteur 15 pour le DMP est moins significatif car les valeurs sont très faibles), plus cohérentes dans d'autres cas (MR18-19 ; NR16-19 et NR23-24) avec des valeurs proches. Les différences sont plus marquées avec des facteurs dépassant 100 quand un même individu est analysé d'une année à l'autre. Ces différences intra individus pour des doublons réalisés consécutivement au cours d'une même période avaient déjà été remarquées pour les analyses des PCBs et Organochlorées et s'expliquent par un certain degré de stratification et d'hétérogénéité de la couche de gras des baleines en terme d'irrigation et de contenu lipidique (Aguilar, 1991).

Cette variabilité des teneurs résulte au moins pour partie de la non bioaccumulation de ces composés qui sont assez rapidement métabolisés et éliminés, ce que ces résultats confirment. Ils suggèrent une cinétique rapide alternant phase de contamination et de décontamination.

Tableau 10 : Comparaison des teneurs pour les phtalates les plus représentés d'un même individu au cours d'une même année (Inter-annuel) ou d'une année sur l'autre (Pluri-annuel).

Inter-annuel		DMP (ng/g sec)	DEP (ng/g sec)	DiBP (ng/g sec)	DBP (ng/g sec)	DMEP (ng/g sec)	DNHP+BBP (ng/g sec)	DEHP (ng/g sec)
2017	LR68	0	105	1300	688	0	0	0
	LR71	0	51	927	258	0	0	0
	Facteur	Nd	2	1	3	Nd	Nd	Nd
2018	MR08	17	269	1231	265	0	0	0
	MR10	251	1319	3703	1176	0	0	0
	Facteur	15	5	3	4	Nd	Nd	Nd
2019	NR16	0	527	10712	Nr	0	0	2162
	NR19	0	609	9572	Nr	0	0	884
	Facteur	Nd	1	1	Nd	Nd	Nd	2
2019	NR23	0	505	7901	Nr	0	0	2162
	NR24	0	516	11821	Nr	0	0	1103
	Facteur	Nd	1	1	Nd	Nd	Nd	3
Pluri-annuel		DMP (ng/g sec)	DEP (ng/g sec)	DiBP (ng/g sec)	DBP (ng/g sec)	DMEP (ng/g sec)	DNHP+BBP (ng/g sec)	DEHP (ng/g sec)
2016	KR51	149	12937	424	547	256	242	826
2019	NR36	0	463	11104	Nr	0	0	2338
	Facteur	Nd	28	262	Nd	Nd	Nd	3
2016	KR09	0	17840	403	709	0	18	0
2018	MR06	14	164	781	192	0	0	0

	Facteur	Nd	109	2	4	Nd	Nd	Nd
2016	KR42	81	1886	197	297	0	317	639
2017	LR32	0	135	1051	70	0	0	0
	Facteur	Nd	14	5	4	Nd	Nd	Nd
2016	KR44	618	312	343	565	818	679	634
2017	LR24	0	111	754	367	0	0	0
	Facteur	Nd	3	2	2	Nd	Nd	Nd
2017	LR35	0	63	450	0	0	0	0
2018	MR01	24	152	961	504	0	0	0
	Facteur	Nd	2	2	Nd	Nd	Nd	Nd
2017	LR36	0	142	770	0	0	0	0
2019	NR13	0	685	11672	Nr	0	0	1408
	Facteur	Nd	5	15	Nd	Nd	Nd	Nd

Les données toxicologiques dans la littérature scientifique sont difficilement adaptables à notre contexte. La plupart des travaux faisant référence à des niveaux d'exposition dans le domaine professionnel ou à des analyses dans l'urine (principal vecteur d'élimination), et non pas dans des tissus comme le gras. Nous n'avons pas trouvé de données sur les niveaux de contamination des tissus à partir desquels ces composés exerceraient leur effets reprotoxiques ou de perturbateurs endocriniens. Dans le rapport RECORD (2015) on peut trouver des PNEC (Predicted No Effect Concentration) pour «l'empoisonnement secondaire par voie orale en mg/kg de nourriture» (Defranceschi et al., 2015). Chez les mammifères il est de 3.3 mg/kg pour le DEHP, 33.3 pour le BBP et 33.3 pour le DBP. La comparaison entre des données concernant un seuil d'empoisonnement dans la nourriture et des taux de contamination dans des tissus vivants est un peu hasardeuse d'autant plus que nous avons d'un côté des ng/g de poids sec de lipides et de l'autre des mg/kg de poids humide. On peut dire qu'avec un ratio poids sec/poids humide de 5, il faudrait des niveaux de contamination de nos Rorquals de l'ordre 170000 ng/g pour les BBP et DBP et de 16500 ng/g pour les DEHP pour qu'ils soient considérés comme une nourriture déconseillée pour les mammifères. On en est loin pour les BBP et les DBP qui sont autour de 400-800 ng/g en moyenne et 3700 ng/g en valeur max (un globicéphale en 2016). Pour le DEHP, les valeurs moyennes en 2016 et 2019 autour de 1000 et 2000 ng/g (Rorqual et cachalot respectivement) en sont loin également, mais la valeur max de 10217 ng/g (un Cachalot en 2016) s'en rapproche. Rappelons que ces données ont une valeur purement indicatrice pour tenter d'évaluer l'intensité de la contamination des cétacés par les phtalates mais qu'elles n'ont pas de valeurs écotoxicologiques.

5 CONCLUSION

Cette quatrième saison en 2019 vient conclure la série sur les phtalates. Nous avons un échantillon assez robuste et l'augmenter encore n'apporterait rien de significatif. L'analyse de cette famille de composés chimiques ubiquistes et très contaminants est assez exigeante en terme de protocole et de précautions, à bord comme au laboratoire. La contamination de 2019 au laboratoire lié à un remplacement de fluide dans un lyophilisateur l'a rappelé si besoin était. Son identification et l'enquête qui a suivi confortent néanmoins notre confiance dans la fiabilité de ces résultats.

La grande variabilité de ces niveaux de contamination par les phtalates obtenus sur un échantillon assez représentatif de 210 individus et sur 4 années est assez déroutante par comparaison avec notre étude précédente sur les polluants dit « historiques » bioaccumulables. Elle est néanmoins cohérente avec les

caractéristiques de cette famille de composés qui se dégradent rapidement dans les organismes. Si les niveaux sont variables, la contamination est constante. Cent pourcents de nos échantillons présentent une contamination par au moins un phtalate. Etant donné la cinétique métabolique de cette famille de composés chimiques, cela signifie que les cétacés du sanctuaire Pelagos évoluent dans un milieu qui les contamine de façon chronique, au quotidien.

Certains de ces composés, et notamment les plus présents sont des reprotoxiques et des perturbateurs endocriniens, mais la mise en évidence de l'impact de cette contamination sur l'état de santé des individus et des populations n'est pas dans nos moyens. Il faut cependant insister sur l'importance des effets cumulés puisque cet impact s'ajoute à tous les autres, réchauffement, autres polluants, bruit, collisions, sans oublier les virus et parasites naturels.

6 BIBLIOGRAPHIE

Agler BA, Schooley RL, Frohock SE, et al (1993) Reproduction of photographically identified fin whales, *Balaenoptera physalus*, from the Gulf of Maine. *J Mammal* 74:577–587. <https://doi.org/10.2307/1382276>

Alves F, Quéroil S, Dinis A, et al (2013) Population structure of short-finned pilot whales in the oceanic archipelago of Madeira based on photo-identification and genetic analyses: Implications for conservation. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 23:758–776. <https://doi.org/10.1002/aqc.2332>

Aguilar A, Borrell A (1991) Heterogeneous distribution of organochlorine contaminants in the blubber of baleen whales: implications for sampling procedures. *Marine Environmental Research* Volume 31, Issue 4, 1991, Pages 275-286.

Bérubé M, Aguilar A, Dendanto D, et al (1998) Population genetic structure of North Atlantic, Mediterranean Sea and Sea of Cortez fin whales, *Balaenoptera physalus* (Linnaeus 1758): Analysis of mitochondrial and nuclear loci. *Mol Ecol* 7:585–599. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00359.x>

Bérubé M, Palsbøll PJ (1996) Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Mol Ecol* 5:1–6

Buckland ST, Anderson DR, Burnham KP, et al (2001) *Introduction to Distance Sampling: Estimating Abundance of Biological Populations*. Oxford University Press

Caballero A, Garcia-Dorado A (2013) Allelic Diversity and Its Implications for the Rate of Adaptation. *Genetics* 195:1373–1384. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.158410>

Croll DA, Clark CW, Acevedo A, et al (2002) Only male fin whales sing loud songs. *Nature* 417:809–809. <https://doi.org/10.1038/417809a>

Defranceschi, M., Ribera, D., & Doly, L. (2015). Substances émergentes, polluants émergents dans les déchets: Le cas des phtalates.

Fossi MC, Coppola D, Bainsi M, et al (2014) Large filter feeding marine organisms as indicators of microplastic in the pelagic environment: The case studies of the Mediterranean basking shark (*Cetorhinus maximus*) and fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Mar Environ Res* 100:17–24. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.02.002>

Fossi MC, Marsili L, Bainsi M, et al (2016) Fin whales and microplastics: The Mediterranean Sea and the Sea of Cortez scenarios. *Environ Pollut* 209:68–78. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.022>

Fossi MC, Panti C, Guerranti C, et al (2012) Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Mar Pollut Bull* 64:2374–2379. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.08.013>

Fruet PF, Secchi ER, Daura-Jorge F, et al (2014) Remarkably low genetic diversity and strong population structure in common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from coastal waters of the Southwestern Atlantic Ocean. *Conserv Genet* 15:879–895. <https://doi.org/10.1007/s10592-014-0586-z>

Galov A, Kocijan I, Lauc G, et al (2011) High genetic diversity and possible evidence of a recent bottleneck in Adriatic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Mamm Biol - Zeitschrift für Säugetierkd* 76:339–344. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2010.07.002>

Gobas FAPC, Mackintosh CE, Webster G, et al (2003) Bioaccumulation of Phthalate Esters in Aquatic Food-Webs. In: Handbook of Environmental Chemistry. pp 201–225

Jones OR, Wang J (2010) COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol Ecol Resour* 10:551–555. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02787.x>

Net S, Sempéré R, Delmont A, et al (2015) Occurrence, Fate, Behavior and Ecotoxicological State of Phthalates in Different Environmental Matrices. *Environ Sci Technol* 49:4019–4035. <https://doi.org/10.1021/es505233b>

Palsbøll PJ, Bérubé M, Larsen AH, Jørgensen H (1997) Primers for the amplification of tri- and tetramer microsatellite loci in baleen whales. *Mol Ecol* 6:893–895. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1997.tb00146.x>

Valsecchi E, Amos W (1996) Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Mol Ecol* 5:151–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1996.tb00301.x>

Zanardelli M, Panigada S, Airoidi S, et al (1999) Site fidelity, seasonal residence and sex ratio of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the Ligurian Sea feeding grounds. *Eur Res Cetaceans* 12:124

7 ANNEXE

PROCOLE D'ANALYSE DES PHTALATES

Les analyses phtalates ont été réalisées au sein du laboratoire AKINAO situé à Perpignan (www.akinao-lab.com).

- Préparation de la verrerie

La verrerie utilisée pour les analyses des phtalates a été rincée successivement à l'eau, à l'acétone, au méthanol, au cyclohexane et à l'acétonitrile. La verrerie non jaugée et le papier aluminium ont été chauffés à 400°C pendant 4h avant utilisation. La verrerie pyrolysée a été obturée jusqu'à son utilisation.

Les capillaires calibrés en borosilicate adaptés aux pipettes de précision à déplacement positif ont été rincés à l'acétone puis à l'acétate d'éthyle ou à l'acétonitrile.

- Échantillonnage

Après décongélation, les échantillons ont été coupés au scalpel et/ou ciseaux à dissection sur du papier aluminium. Les morceaux obtenus ont été séparés en 3 afin d'effectuer les analyses suivantes : lipides, phtalates et hormones.

Les sous-échantillons pour analyses des teneurs en phtalates et en lipides ont été récupérés avec une pince dans des tubes en verre tarés et mis à congeler (-20°C). Un blanc d'analyse phtalate a été effectué tous les 10 tubes environ. Les échantillons ont été lyophilisés puis pesés afin de déterminer leur masses sèches.

Les sous-échantillons pour analyse des hormones ont été replacés dans le flacon d'origine et rendus (-80°C).

Les ciseaux et pinces ont été nettoyés à l'acétone entre chaque échantillon.

- Extraction des lipides

Les échantillons ont été lyophilisés afin de déterminer la masse sèche.

Les lipides ont été extraits deux fois successivement à l'aide de 5mL d'une solution DCM/MeOH (2/1) pendant 20 minutes aux ultrasons puis centrifugés pendant 10 minutes à 4000 g. Le surnageant a été récupéré puis transféré dans un tube à fond conique de 50 mL. L'ensemble des surnageants ont été lavés avec 5 mL d'une solution de NaCl 0,9 %, mélangés au vortex pendant 1 minute et centrifugés à 4000 g pendant 10 minutes afin de séparer les phases organique (inférieure) et aqueuse. La phase aqueuse a été éliminée. La phase organique a été séchée avec du sulfate de sodium anhydre puis filtrée sur coton cardé dans un tube hémolyse préalablement taré. L'extrait lipidique obtenu a été séché à l'évaporateur puis au lyophilisateur avant d'être pesé.

- Analyse des phtalates

o Préparation des solutions d'étalon

Les solutions d'étalon d'extraction (BBP-D4) et d'étalon d'injection (DEHP-D4) ont été diluées à 1µg/mL dans l'acétonitrile à partir de solutions mères dans l'acétate d'éthyle à 1 et 10 mg/mL respectivement.

Les étalons de phtalates ont été dilués entre 0,5 et 2000 µg/L dans l'acétonitrile à partir de solutions mères individuelles de chaque phtalates à 1 mg/mL dans l'acétate d'éthyle. Chaque point de gamme contient de l'étalon d'extraction et de l'étalon d'injection à 200 µg/L.

○ Extraction des phtalates

Les phtalates ont été extraits avec 10 ml d'acétonitrile et 100 µl d'étalon d'extraction. Les tubes ont été mélangés au vortex puis extraits au bain à ultrasons à 80°C pendant 1 heure. Après centrifugation 20 minutes à 2000 tr/min à 40 °C, les extraits ont été mis à congeler 12h. Une seconde centrifugation à température ambiante pendant 20 minutes à 2000 tr/min puis une seconde congélation de 4H a été effectuée. Le surnageant a été récupéré dans un tube en verre puis séché sous flux d'azote puis lyophilisé. 100 µL de solution d'étalon d'injection à 200µg/mL et 400µL d'acétonitrile ont été ajoutés dans le tube qui a été mis à congeler 10 minutes puis centrifugé 10 minutes à 4 000 tr/min à 10°C avant d'être transféré dans un vial pour analyse.

○ Analyse des phtalates

Les analyses ont été effectuées par CPG/SM en mode SIM sur une colonne de type DB-5MS. Les paramètres chromatographiques sont les suivants :

Injecteur

- Volume d'injection : 1µL
- Température d'injection : 280 °C
- Type de liner : Splitless
- Mode d'injection: Splitless (splitless time : 1 minute)

Four

- Colonne : DB-5MS 30m*0,25mm*0,25µm (PN: 122-5532 / SN:USR124665H)
- Gaz vecteur : Helium
- Débit : 1mL/minute
- Température : Pallier 1 : 50°C/5minutes – Rampe 1 : 40 °C/minute – Pallier 2 : 150 °C/3 minutes – Rampe 2 : 3°C/minute – Pallier 3 : 200 °C/3minutes – Rampe 3 : 30°C/minute – Pallier 4 : 270 °C/15 minutes

Détecteur :

- Ligne de transfert : 280 °C
- Type d'impact : Impact électronique – 70 eV
- Volume d'ion : 250°C

Au moins deux ions ont été sélectionnés pour quantifier chaque phtalates. Ceux-ci sont détaillés dans le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** Lorsqu'il a été calculé plus de 30% de différence entre les teneurs quantifiées pour chacun des deux ions, l'identification a été invalidée et le pic a été écarté de la quantification. Afin de diminuer au maximum les limites de détection, la quantification reportée est celle effectuée sur la somme des ions spécifiques.

Tableau 11 : Ions qualifiants et quantifiants.

Abréviation	Ions qualifiants et quantifiants (m/z)	Temps de rétention
DMP	163 ; 194	12,0
DEP	149 ; 177	14,8
DiBP	149 ; 223	22,3
DBP	149 ; 223	25,1
DMEP	59 ; 104 ; 149	26,3
DNHP + BBP	149 ; 206 ; 251	33,0
BBP-D4	153 ; 210	33,1
DEHP-D4	153 ; 171	34,6
DEHP	149 ; 167	34,6
DNOP	149 ; 279	36,8
DNDP	149 ; 150 ; 307	44,8

○ Analyse du métabolite MEHP

Les analyses ont été effectuées par LC-MS en mode SIM sur une colonne de type C18. L'élution a été effectuée en mode gradient avec des solvants eau et de l'acétonitrile qualité LC-MS contenant 0.1% d'acide formique. L'ionisation a été effectuée par électronébuliseur. Le MEHP a été détecté et quantifié en mode négatif : m/z=277,144 (6,2 minutes). L'étalon d'injection (DEHP-d4) a été détecté en mode positif : m/z=395,308 (8,9 minutes).

Annexe 5 : Rapport scientifique du WWF de 2016 sur l'analyse d'hormones sexuelles chez le Rorqual commun et le Cachalot

PROGRAMME D'ETUDES SUR L'ETAT DES POPULATIONS DE CETACES DE MEDITERRANEE

Programme Cap Cétacés du WWF-France 2016



**Réseau de suivi de contamination de la chaîne trophique 2016
Analyse des microplastiques**



Convention n° 2016 1117

Rapport Final

N° Opération 711 2016 006

Convention de partenariat

Entre

L'agence de l'eau

Délégation régionale PACA et Corse

Le Noailles

62, La Canebière

13001 Marseille

Représenté par son Directeur,

Et

Le WWF-France

35-37 rue Baudin

93310 Le Pré-Saint-Gervais

Représenté par son Directeur

Partenaires de l'étude

Coordinateur scientifique :

WWF-France : D. Ody, T. Jacob et C. Tardy



Partenaires Institutionnels :

GIS3M : Groupement d'intérêt scientifique pour les mammifères marins de Méditerranée



Ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie



Secrétariat Exécutif du Sanctuaire Pelagos



Partenaires scientifiques : analyses toxicologiques

Université d'Aix-Marseille, Laboratoire de Chimie de l'Environnement : P. Doumenq, L. Asia, C. Valat, A. Piram, P. Wong Wah Chung

Partenaires scientifiques : analyses hormonales

LDHVET Analyses biologiques spécialisées USP 99025305 Nutrition-Endocrinologie- ONIRIS École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique : B. Siliart et C. Berder

Partenaires scientifiques : analyses génétiques

Université de Perpignan, Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de l'Environnement : S. Planes et C. Tardy



Table des matières

1.	Introduction	211
2.	Moyens et méthodes	211
3.	Traitement des données	211
4.	Résultats	212
4.1.	Effort	212
4.2.	Observations	213
4.2.1.	Cétacés	213
4.2.2.	Observation opportuniste de déchets	224
4.2.3.	Autres observations	225
4.3.	Évolution temporelle du sexe-ratio	227
4.3.1.	Rorqual commun	227
4.3.2.	Cachalot	227
4.3.3.	Globicéphale noir	227
4.4.	Identification des statuts reproducteurs des individus	227
4.4.1.	Rorqual commun	227
4.4.1.1.	Dosages hormonaux et évaluation du statut reproducteur chez les femelles Rorquals communs en 2016	228
4.4.1.2.	Dosages hormonaux et évaluation du statut reproducteur chez les mâles Rorquals communs en 2016	229
4.4.1.3.	Évolution de la gestation en fonction des années de 2010 à 2016	230
4.4.1.4.	Évolution du taux de mâles reproducteurs en fonction des années de 2010 à 2016	232
4.4.2.	Cachalot	233
4.4.2.1.	Dosages hormonaux et évaluation du statut reproducteur chez les Cachalots en 2016	233
4.4.2.2.	Évolution des statuts reproducteurs chez le Cachalot depuis 2012	234
4.5.	Analyse des microplastiques	234
4.5.1.	Choix des phtalates	234
4.5.2.	Teneur en eau des échantillons	235
4.5.3.	Teneur en lipides des échantillons	235
4.5.4.	Teneur en phtalates des échantillons	236
4.6.	Analyse génétique du Rorqual commun	237
4.6.1.	Caractéristiques générales de la population	237

4.6.2. Lien de parenté.....	238
5. Discussion	240
5.1. Effort de prospection	240
5.2. Observations	240
5.3. Évolution temporelle du sex-ratio	240
5.4. Évaluation des statuts reproducteurs	241
5.4.1. Rorqual commun	241
5.4.2. Cachalot	241
5.5. Microplastiques	242
5.6. Caractérisation génétique des individus Rorquals communs	243
5.6.1. Caractéristiques générales de la population	243
5.6.2. Lien de parenté.....	243
6. Conclusion	244
Bibliographie	246
Annexes	286
Annexe 1 : Moyens techniques et méthodologies	286
Annexe 2 : Analyses hormonales	287
Annexe 3 : Analyses des microplastiques	291
Annexe 4 : Sexage et analyses génétiques	294

Liste des figures

Figure 1 : Répartition des observations de chaque espèce lors de la campagne Cap Cétacés 2016. .	214
Figure 2 : Répartition des individus estimés pour chaque espèce lors de la campagne Cap Cétacés 2016.	215
Figure 3 : Représentation graphique de l'évolution des réussites de biopsies entre 2006 et 2016. .	224
Figure 4 : Représentation graphique des taux d'œstradiol et de progestérone chez les femelles Rorquals communs entre 2010 et 2016.	231
Figure 5 : Représentation graphique des taux d'œstradiol et de progestérone chez les femelles gestantes Rorquals communs échantillonnées entre 2010 et 2016 et répartis par saison.	231
Figure 6 : Représentation graphique des taux de testostérone et d'androstènedione chez les mâles entre 2010 et 2016, répartis par activité gonadique.	232
Figure 7 : Représentation graphique des taux de testostérone et d'androstènedione chez les mâles actifs Rorquals communs échantillonnés entre 2010 et 2016, répartis par saison.	233
Figure 8 : Boxplots des lipides de Rorqual commun et de Cachalot.	236
Figure 9 : Mesures du taux de stéroïdes dans la graisse sous-cutanée.	288
Figure 10 : Formule chimique de la Progestérone.	289
Figure 11 : Formule chimique de l'Œstradiol.	289
Figure 12 : Formule chimique de la Testostérone.	290
Figure 13 : Formule chimique de l'Androstènedione.	290
Figure 14 : Évolution des taux de progestérone et d'estrogène chez une femelle en gestation.	291
Figure 15 : Chromatogramme d'une solution standard des 10 phtalates (SIR) par GC-MS.	293
Figure 16 : Protocole d'extraction de l'ADN via un kit Qiagen.	295

Liste des tableaux

Tableau 1 : Synthèse des distances parcourues en effort, en transit et lors du suivi des animaux pendant la campagne Cap Cétacés 2016	212
Tableau 2 : Comparaison entre le nombre de jours en mer et l'effort de recherche par année.....	213
Tableau 3 : Synthèse du nombre d'observations et du nombre d'individus estimés en 2016.....	214
Tableau 4 : Synthèse du nombre d'observations et d'individus estimés au cours de la campagne Cap Cétacés 2016.....	218
Tableau 5 : Synthèse des taux de contact par mois et par année pour chaque espèce observée.....	219
Tableau 6 : Synthèse du nombre d'observations et d'individus rencontrés de toutes les espèces de cétacés au cours des campagnes de biopsies de 2006 à 2016.....	220
Tableau 7 : Synthèse du nombre d'observations et d'individus Rorquals communs rencontrés au cours des campagnes Cap cétacés de 2006 à 2016.....	221
Tableau 8 : Synthèse du nombre d'observations et d'individus Cachalots rencontrés au cours des campagnes Cap cétacés de 2006 à 2016.....	221
Tableau 9 : Synthèse du nombre d'observations et d'individus Globicéphales noirs rencontrés au cours des campagnes Cap cétacés de 2006 à 2016.....	222
Tableau 10 : Synthèse du nombre d'observations et d'individus Dauphins bleus et blancs rencontrés au cours des campagnes Cap cétacés de 2006 à 2016.....	222
Tableau 11 : Nombre de biopsies réalisées par mois et par espèce au cours de la campagne Cap Cétacés 2016.....	223
Tableau 12 : Synthèse des déchets dénombrés lors de la campagne Cap Cétacés 2016.....	224
Tableau 13 : Synthèse du nombre d'observations (et du nombre d'individus) de tortues, de raies Mobula et de poissons lunes rencontrés au cours de la campagne Cap cétacés 2016.....	225
Tableau 14 : Nombre de Rorquals communs mâles et femelles par année entre 2006 et 2016.....	227
Tableau 15 : Nombre de Cachalots mâles et femelles par année entre 2010 et 2016.....	227

Tableau 16 : Dosages des principaux stéroïdes sexuels des Rorquals communs femelles biopsiées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.....	228
Tableau 17 : Dosages des principaux stéroïdes sexuels des Rorquals communs mâles biopsiés lors de la campagne Cap Cétacés 2016.....	229
Tableau 18 : Évolution de la gestation des Rorquals communs en fonction des années de 2010 à 2016.....	230
Tableau 19 : Évolution des mâles reproducteurs en fonction des années de 2010 à 2016.....	232
Tableau 20 : Dosages des principaux stéroïdes sexuels des Cachalots biopsiés lors de la campagne Cap Cétacés 2016.....	233
Tableau 21 : Évolution des statuts reproducteurs en fonction des années de 2012 à 2016.....	234
Tableau 22 : Liste des phtalates envisagés.....	234
Tableau 23 : Teneur en eau (%) moyenne et écart-type.....	235
Tableau 24 : Teneurs en lipides (%) moyennes et écarts-types, coefficients de variation des échantillons de Rorqual commun et de Cachalot.....	236
Tableau 25 : Valeurs moyennes observées des différents phtalates analysés en ng/g de matière sèche.....	237
Tableau 26 : Valeurs moyennes de contamination totale (tous les phtalates confondus) en µg/kg de matière sèche.....	237
Tableau 27 : Synthèse des microsattellites de Rorqual commun avec leur distribution allélique.....	238
Tableau 28 : Nombre d'enfants par parents hypothétiques identifiés.....	239
Tableau 29 : Individus apparentés en tant que demi-frères/demi-sœurs avec les probabilités associées.....	239
Tableau 29 : Liste du matériel embarqué au cours de la campagne Cap Cétacés 2016.....	286
Tableau 30 : Coefficient de corrélation, limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) des phtalates sélectionnés par GC-MS.....	293
Tableau 31 : Protocole et synthèse des microsattellites.....	296

Liste des cartes

Carte 1 : Effort de prospection et transits parcourus lors de la campagne Cap Cétacés 2016.....	213
Carte 2 : Distribution des observations de cétacés réalisées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.....	215
Carte 3 : Distribution des observations de Rorqual commun réalisées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.....	216
Carte 4 : Distribution des observations de Cachalot réalisées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.....	216
Carte 5 : Distribution des observations de Globicéphale noir réalisées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.....	217
Carte 6 : Distribution des observations de Dauphin de risso réalisées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.....	217
Carte 7 : Distribution des observations de Dauphin bleu et blanc réalisées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.....	218
Carte 8 : Localisation des biopsies de Rorqual commun, de Globicéphale noir et de Cachalot prélevées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.....	223
Carte 9 : Distribution des observations de tortues au cours de la campagne Cap Cétacés 2016.....	225
Carte 10 : Distribution des observations de raies Mobula au cours de la campagne Cap Cétacés 2016.....	226
Carte 11 : Distribution des observations de poissons lunes au cours de la campagne Cap Cétacés 2016.....	226

1. Introduction

La campagne Cap Cétacés s’inscrit dans une démarche d’acquisition de connaissance sur les cétacés de Méditerranée Nord Occidentale dans le cadre d’un partenariat scientifique avec le Groupement d’Intérêt Scientifique pour les Mammifères Marins de Méditerranée (GIS3M). Cette campagne a lieu tous les ans depuis 2010. L’étude porte sur l’évaluation du niveau de contamination, sur l’évaluation de la reproduction d’espèces odontocètes et mysticètes, de même que la structure génétique des populations de mysticètes présentes dans la zone. La campagne a été financée par le WWF, l’Agence de l’eau, le Sanctuaire Pélagos et le groupe Carrefour.

La campagne 2016 aura duré au total 40 jours : une mission du 9 au 28 juin et une mission du 4 au 23 septembre. 33 jours d’observation ont été possibles sur la durée totale de la campagne.

La campagne 2016 comprend deux grands volets :

- Distribution des cétacés présents en Méditerranée
- Photo-identification et biopsie de trois espèces ciblées :
 - Le Rorqual commun, *Balaenoptera physalus*
 - Le Cachalot : *Physeter macrocephalus*
 - Le Globicéphale noir : *Globicephala melas*

Les biopsies réalisées au cours de cette campagne 2016, ont fait l’objet d’analyses génétiques et d’analyses des stéroïdes gonadiques. De plus, pour cette campagne, des analyses des contaminants environnementaux ont été effectuées. La quantité de matériel obtenu ne permettant pas la réalisation de toutes les analyses, celles-ci ont été hiérarchisées, priorité a été donnée au sexage et aux analyses de contaminants. C’est pour cette raison que l’analyse des stéroïdes n’a pu être faite sur toutes les biopsies.

En plus des données récoltées sur les cétacés, les observateurs ont noté toutes les informations de navigation (météo, changement de cap) et les observations opportunistes comme les déchets, poissons et tortues.

2. Moyens et méthodes

L’équipage Cap Cétacés 2016 était constitué de Denis Ody, WWF-France, responsable du pôle mer Méditerranée, Théa Jacob, WWF-France, chargée du programme Cap Cétacés, Frédérique Bassemayousse, Mi-Air Mi-Eau, expert indépendant et photographe, Nathalie Ille, Expé2M, skipper professionnel, ainsi que de nombreux bénévoles expérimentés qui se sont relayés tout au long de la campagne : Claire Bonneville, Céline Tardy, Julie Jourdan, Véronique Sarano, Susan Gallon, Hélène Labach, Pascal Mayol, Aurore Aubail, Marion Peirache, Anouck Ody, Jean-Noël Druon, Sébastien Personnic, Giuseppe di-Carlo, Isabelle Tinarage, Jean-Baptiste Languille, Arnaud Joly, Cécile Régnier, Prune Brenguier, Célia Bénisty, Bruno Méola, Emmanuelle Bily.

Pour chaque mission, l’équipage réunit 6 observateurs, un skipper et un second. L’équipe minimum d’observateurs est de trois personnes qui surveillent la mer durant des quarts de 2h. Toutes les deux heures, l’équipe est relayée par trois autres observateurs.

Les moyens à la mer et les méthodes utilisées pour la détection des animaux et la collecte des biopsies sont identiques aux années précédentes (Annexe 1).

3. Traitement des données

L’étude de la distribution a été réalisée en se basant sur la méthode du transect linéaire (Buckland et al. 2001), c’est-à-dire selon une route définie.

Les analyses hormonales ont été réalisées au sein du laboratoire LDHVet Oniris à Nantes (<http://ldhvet.oniris-nantes.fr/>). La méthodologie utilisée est identique depuis le début de l'étude hormonale en 2010. De plus, la description des composés analysés est présentée en annexe 2.

Les analyses des dosages microplastiques ont été réalisées au sein du laboratoire Chimie de l'Environnement situé à l'Université Aix-Marseille (<http://lce.univ-amu.fr/>). La méthodologie est expliquée en annexe 3.

Les analyses génétiques (sexage et lien de parenté) ont été réalisées au sein du laboratoire CRIOBE à Perpignan (<http://www.criobe.pf/>). La méthodologie est présentée en annexe 4.

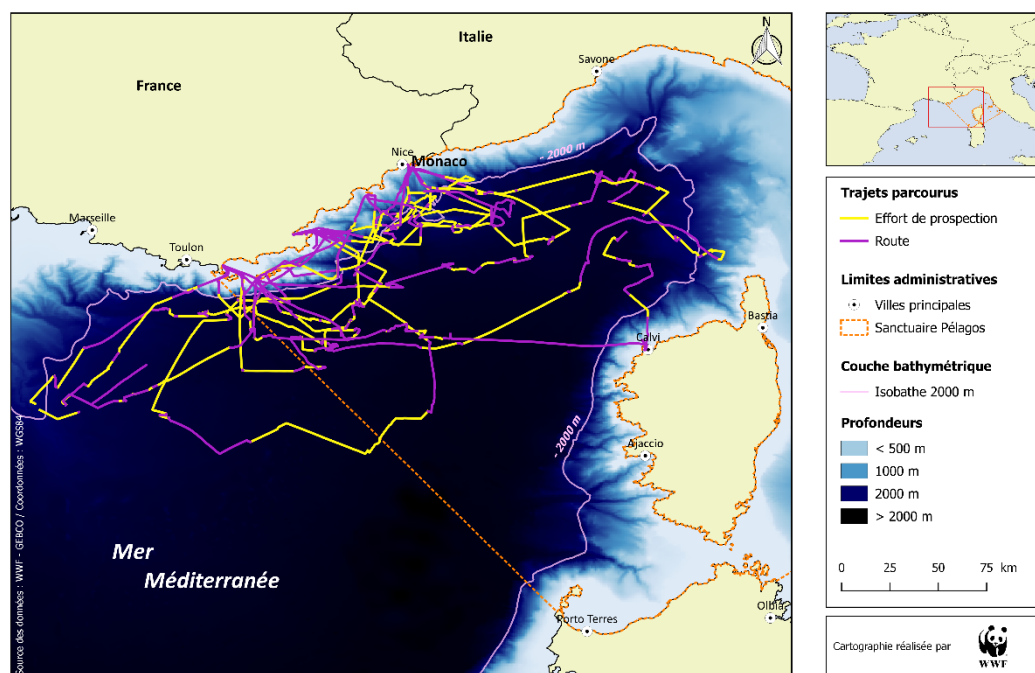
4. Résultats

4.1. Effort

Au cours des 33 jours en mer, 6832 km ont été parcourus dont 1975 km en effort de prospection (Tableau 1). Le nombre de kilomètres sillonné a été plus important en juin, notamment lors des transits (hors effort). Les directions prises ont été dictées par les zones où sont habituellement rencontrés les animaux mais surtout par les aléas météorologiques (Carte 1).

Tableau 1 : Synthèse des distances parcourues en effort, en transit et lors du suivi des animaux pendant la campagne Cap Cétacés 2016.

	Distance (km)	Distance (MN)
Effort juin 2016	1072	579
Effort septembre 2016	903	487
Total effort de prospection	1975	1066
Transit juin 2016	2966	1601
Transit septembre 2016	1891	1021
Total transit	4857	2622
Total distance parcourue	6832	3688



Carte 1 : Effort de prospection et transits parcourus lors de la campagne Cap Cétacés 2016.

On note que le nombre de jours en mer ainsi que l'effort de prospection tout au long de ces années sont assez hétérogènes (Tableau 2). Sur les 3 dernières années d'étude (2013, 2014 et 2016) où le nombre de jours en mer est identique, on constate que l'effort de prospection est nettement inférieur en 2016. Cette différence s'explique par un nombre d'observations de Rorqual commun supérieur en 2016, donc un temps passé avec les animaux supérieur à 2013 et 2014 (Tableau 7).

Tableau 2 : Comparaison entre le nombre de jours en mer et l'effort de recherche par année.

Année	Nombre de jours en mer	Effort de prospection (km)
2006	45	2 221
2007	39	2 158
2008	47	2 274
2009	32	2 389
2010	30	2 963
2011	48	4 411
2012	29	3 046
2013	33	2 946
2014	34	3 281
2016	33	1 975

4.2. Observations

4.2.1 Cétacés

Sur 33 jours d'observation, 5 espèces différentes de cétacés ont été observées (Tableau 3 ; Figure 1) : 79 observations (123 individus estimés) de Rorqual commun (*Balaenoptera physalus*), 5 observations (40 individus estimés) de Cachalot (*Physeter macrocephalus*), 1 observation (35 individus estimés) de Globicéphale noir (*Globicephala melas*), 77 observations (1085 individus estimés) de Dauphin bleu et blanc (*Stenella coeruleoalba*), 2 observations (30 individus estimés) de Dauphin de

Risso (*Grampus griseus*) et 2 observations (3 individus estimés) de delphinidés trop éloignés de l'embarcation pour être identifiés.

Tableau 3 : Synthèse du nombre d'observations et du nombre d'individus estimés en 2016.

Espèce	Juin	Septembre	Total
<i>Balaenoptera physalus</i>	59 (95)	20 (28)	79 (123)
<i>Physeter macrocephalus</i>	1 (2)	4 (38)	5 (40)
<i>Globicephala melas</i>	0 (0)	1 (35)	1 (35)
<i>Grampus griseus</i>	0 (0)	2 (30)	2 (30)
<i>Stenella coeruleoalba</i>	39 (414)	38 (671)	77 (1085)
Petit cétacé indéterminé	2 (3)	0 (0)	2 (3)
Total	101 (514)	65 (802)	166 (1316)
Jours d'observation	18	15	33

Si l'on considère les effectifs, les Dauphins bleu et blanc représentent la grande majorité des individus croisés (83% ; Figure 2). Ensuite, la seconde espèce la plus abondante est le Rorqual commun.

Cependant, si l'on considère le nombre d'observation, les Rorquals communs sont prédominants sur les Dauphins bleu et blanc.

Ces résultats coïncident avec les années précédentes.

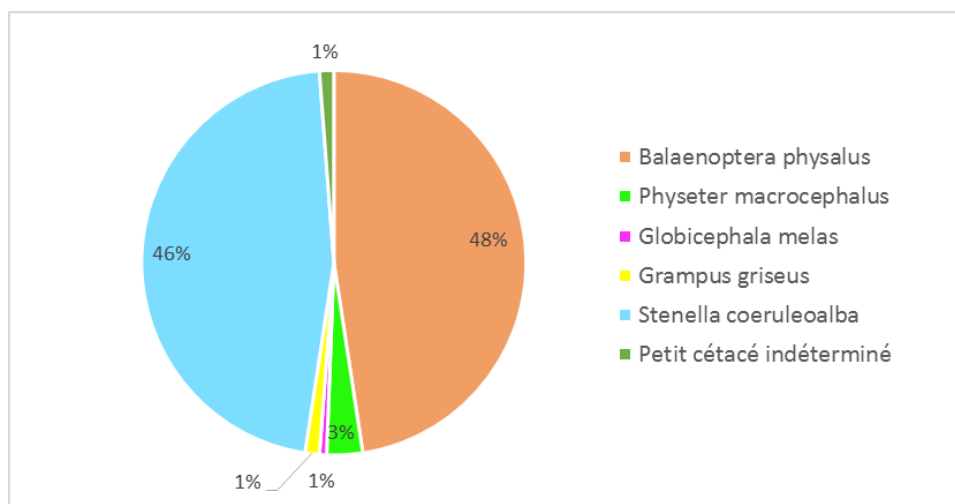


Figure 1 : Répartition des observations de chaque espèce lors de la campagne Cap Cétacés 2016.

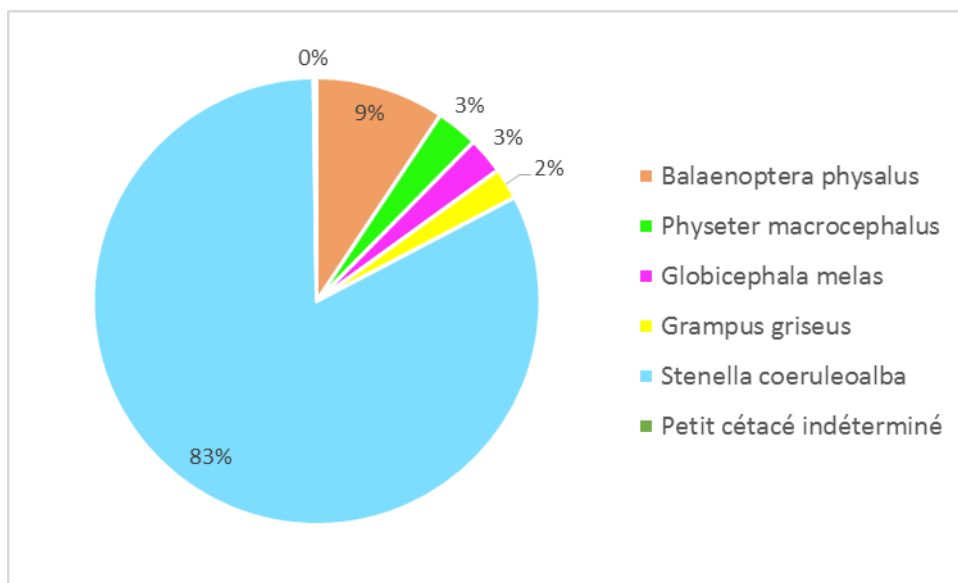
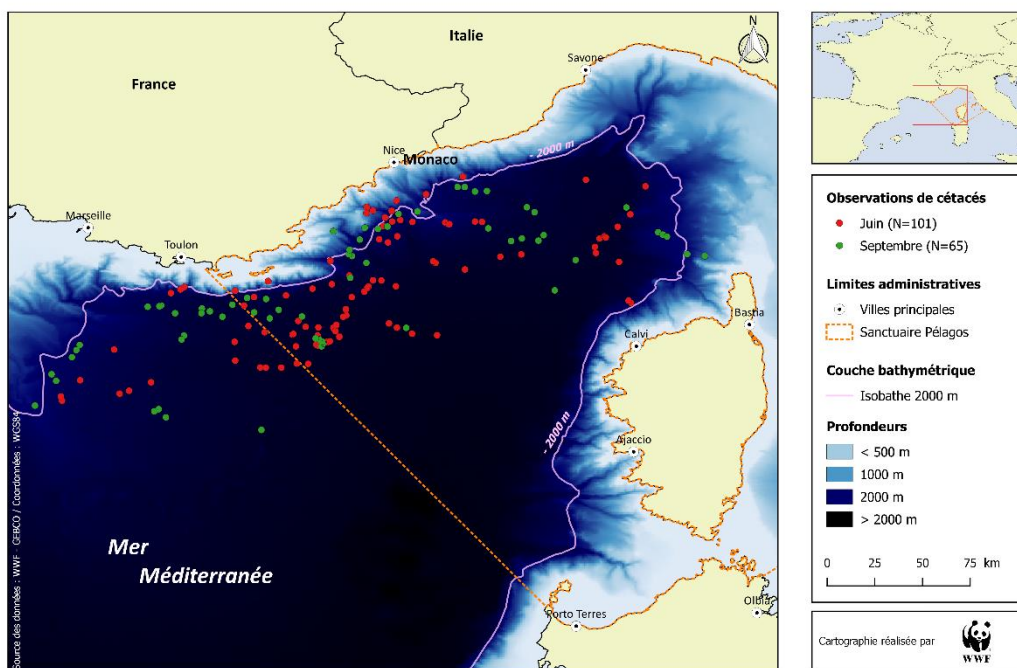


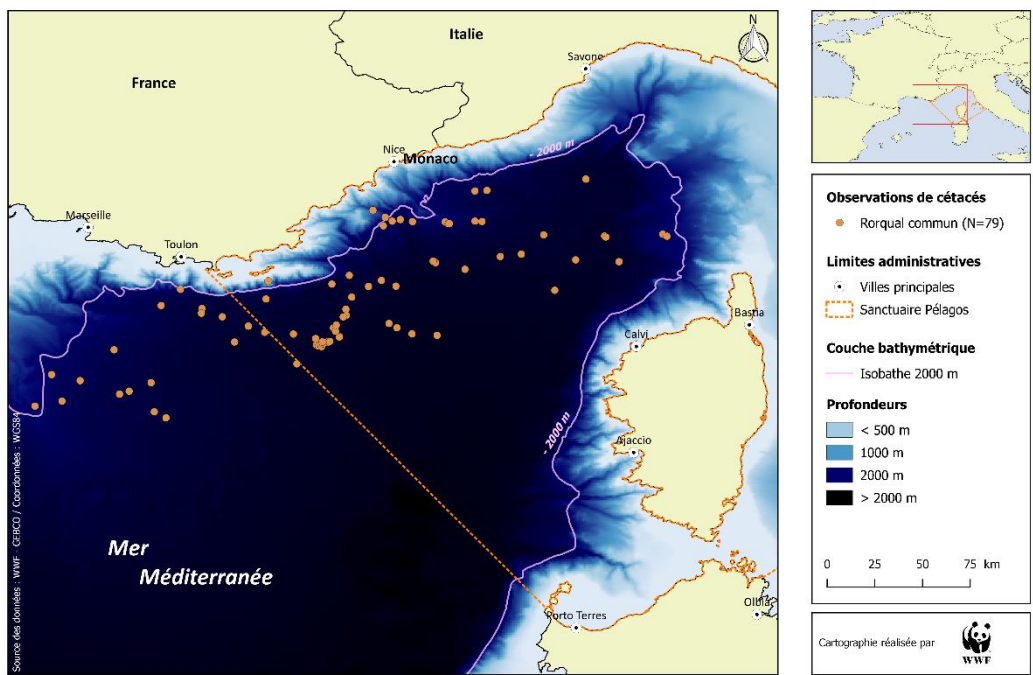
Figure 2 : Répartition des individus estimés pour chaque espèce lors de la campagne Cap Cétacés 2016.

Toutes les observations de cétacés ont été cartographiées (Carte 2). 101 observations de cétacés ont eu lieu en juin, contre 65 observations en septembre.



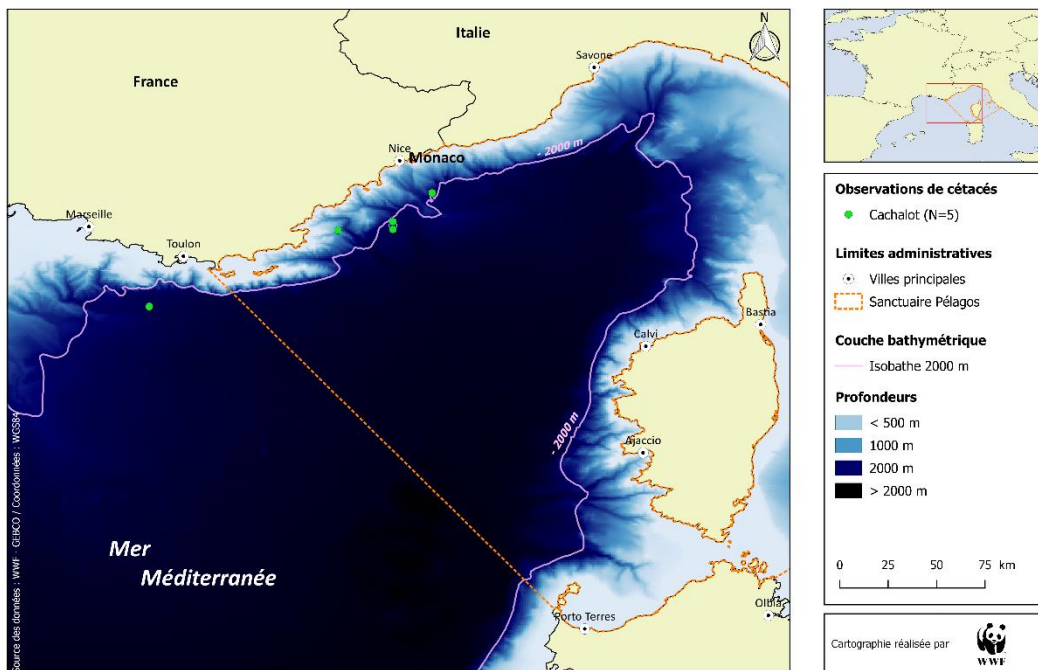
Carte 2 : Distribution des observations de cétacés réalisées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.

Soixante-dix-neuf observations de Rorqual commun (*Balaenoptera physalus*) ont été faites en 2016, ce qui correspond à 123 individus estimés. Les trois-quarts des observations ont eu lieu en juin. Les Rorquals communs ont été observés à 95% au-delà de l’isobathe des 2000 m (Carte 3).



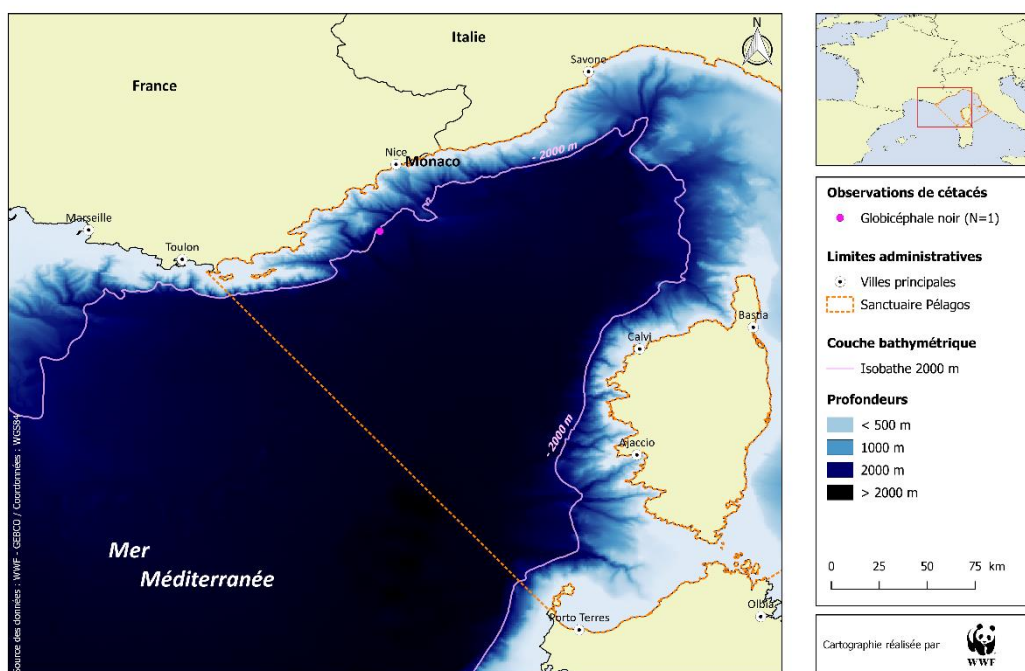
Carte 3 : Distribution des observations de Rorqual commun réalisées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.

Cinq observations de Cachalot (*Physeter macrocephalus*) ont été possibles cette année pour 40 individus estimés. La majorité des individus a été observée en septembre, notamment avec un groupe estimé à 35 individus le 12 septembre au large de Toulon (Carte 4).



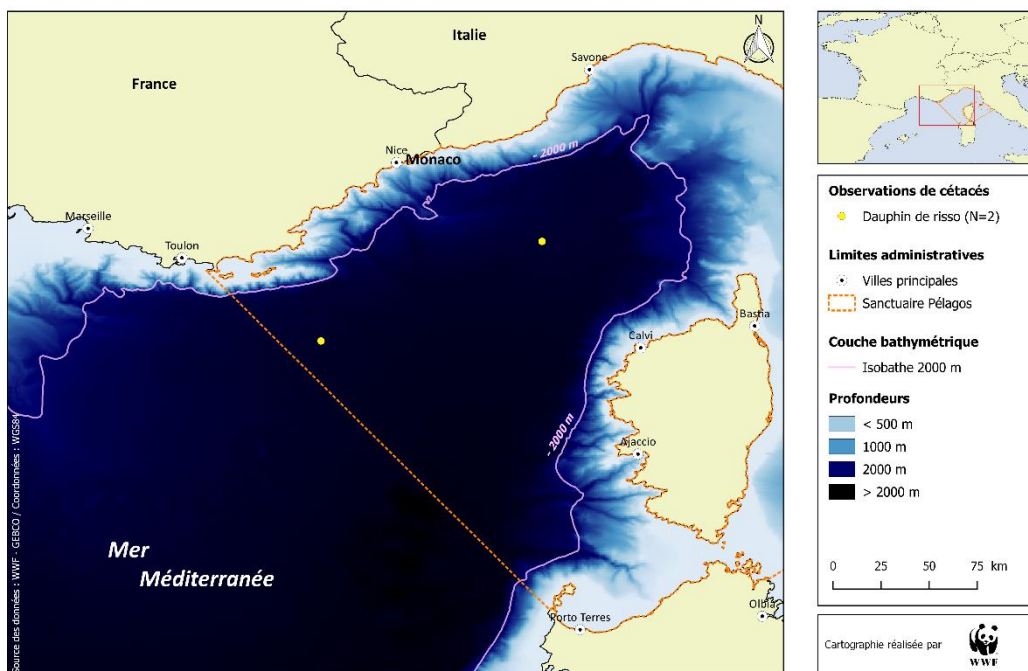
Carte 4 : Distribution des observations de Cachalot réalisées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.

En septembre, il y a eu 1 observation d'un groupe de Globicéphale noir (*Globicephala melas*), estimé à 35 individus. Cette observation a eu lieu à la limite de la zone des 2000 m de profondeur (Carte 5).



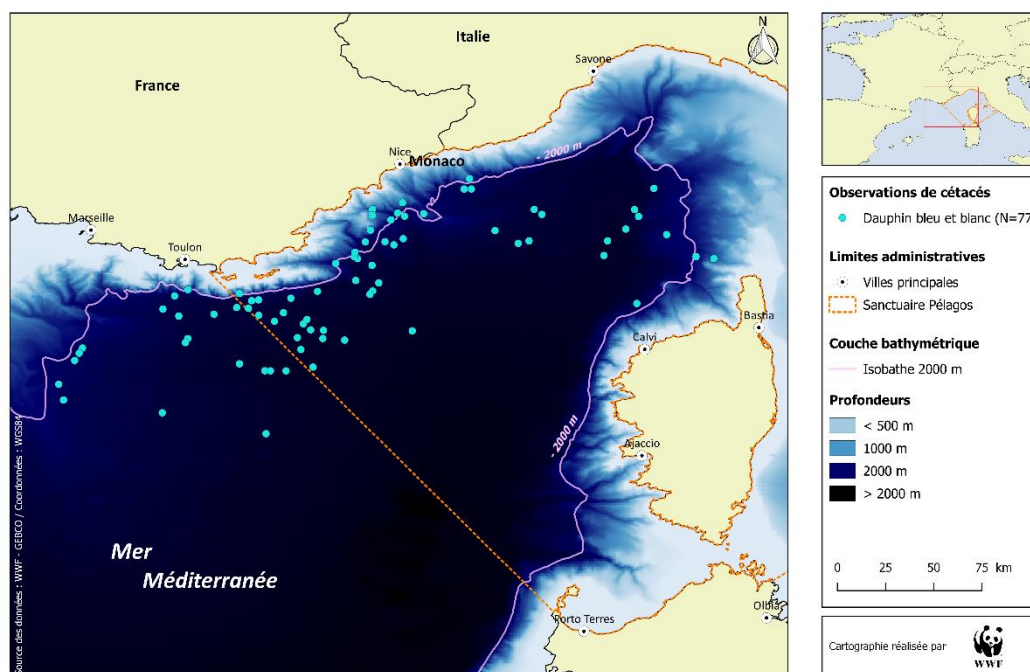
Carte 5 : Distribution des observations de Globicéphale noir réalisées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.

Deux observations de Dauphin de risso (*Grampus griseus*) ont été faites cette année, soit 30 individus estimés. Ces observations ont eu lieu dans la zone pélagique où les fonds sont supérieurs à 2000 m (Carte 6). Des photos ont été prises et seront transmises au GECEM qui suit cette espèce et les ajoutera à son catalogue de photo-identification.



Carte 6 : Distribution des observations de Dauphin de risso réalisées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.

Soixante-dix-sept observations de Dauphin bleu et blanc (*Stenella coeruleoalba*) ont été réalisées durant cette campagne, pour un total de 1085 individus estimés. Leur présence a été constante sur tous les transects et durant les 2 mois de mission (Carte 7).



Carte 7 : Distribution des observations de Dauphin bleu et blanc réalisées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.

Au cours de ces 1975 km parcourus, 166 observations de cétacés ont été faites, pour 1316 individus estimés. En moyenne, le taux d'observation de cétacés (nombre d'observations/nombre de kilomètres parcourus en effort de prospection) pour l'ensemble de la campagne 2016 est de 0,084 obs/km² (Tableau 4). Ce taux est plus élevé en juin (0,094) qu'en septembre (0,072). Les Rorquals communs et les Dauphins bleus et blancs sont les plus observés. Le taux de contact des Rorquals communs est deux fois plus important en juin qu'en septembre, contrairement aux autres espèces de cétacés.

Tableau 4 : Synthèse du nombre d'observations et d'individus estimés au cours de la campagne Cap Cétacés 2016.

Espèce	Mois	Effort (km)	Nombre d'observations	Nombre d'individus estimés	Taux de contact	Abondance relative
<i>Balaenoptera physalus</i>	Juin	1072	59	95	0,055	0,089
	Septembre	903	20	28	0,022	0,031
Total		1975	79	123	0,040	0,062
<i>Physeter macrocephalus</i>	Juin	1072	1	2	0,001	0,002
	Septembre	903	4	38	0,004	0,042
Total		1975	5	40	0,003	0,020
<i>Globicephala melas</i>	Juin	1072	0	0	0,000	0,000
	Septembre	903	1	35	0,001	0,039

Total		1975	1	35	0,001	0,018
<i>Stenella coeruleoalba</i>	Juin	1072	39	414	0,036	0,386
	Septembre	903	38	671	0,042	0,743
Total		1975	77	1085	0,039	0,549
<i>Grampus griseus</i>	Juin	1072	0	0	0,000	0,000
	Septembre	903	2	30	0,002	0,033
Total		1975	2	30	0,001	0,015
Petit cétacé indéterminé	Juin	1072	2	3	0,002	0,003
	Septembre	903	0	0	0,000	0,000
Total		1975	2	3	0,001	0,002
Toutes espèces confondues	Juin	1072	101	514	0,094	0,479
	Septembre	903	65	802	0,072	0,888
Totaux		1975	166	1316	0,084	0,666

En ce qui concerne le taux de contact par mois pour chaque espèce, il varie d'une année à l'autre (Tableau 5). Cependant, pour les Cachalots, les Globicéphales noirs et les Dauphins bleus et blancs on constate que le taux de contact est plus élevé en septembre qu'en juin, ce qui montre une saisonnalité de ces espèces. A contrario, pour le Rorqual commun, cela dépend des années, il ne semble pas y avoir une présence préférentielle pour le début ou la fin de saison estivale.

Tableau 5 : Synthèse des taux de contact par mois et par année pour chaque espèce observée.

Espèce	Mois	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2016
<i>Balaenoptera physalus</i>	Mai	0,006	0,018	0,007	-	-	-	-	-	-	-
	Juin	0,051	0,005	0,009	0,020	0,023	0,023	0,012	0,012	0,017	0,055
	Juillet	-	-	-	0,000	0,036	0,021	-	-	-	-
	Aout	-	0,026	0,030	0,012	0,015		-	0,030	0,018	-
	Septembre	0,010	0,021	0,019	0,015	0,023	0,003	0,021		0,027	0,022
	Octobre	0,011	-	0,018	-	-	0,014	-	-	-	-
	Décembre	-	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Physeter macrocephalus</i>	Mai	0,000	0,000	0,004	-	-	-	-	-	-	-
	Juin	0,000	0,003	0,002	0,004	0,001	0,001	0,006	0,003	0,003	0,001
	Juillet	-	-	-	0,000	0,004	0,003	-	-	-	-
	Aout	-	0,026	0,008	0,005	0,005		-	0,010	0,005	-
	Septembre	0,000	0,007	0,007	0,003	0,005	0,010	0,003		0,008	0,004
	Octobre	0,000	-	0,004	-	-	0,010	-	-	-	-
	Décembre	-	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Globicephala melas</i>	Mai	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-
	Juin	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Juillet	-	-	-	0,000	0,002	0,001	-	-	-	-
	Aout	-	0,000	0,000	0,000	0,001		-	0,002	0,000	-
	Septembre	0,002	0,003	0,004	0,000	0,000	0,001	0,000		0,005	0,001
	Octobre	0,000	-	0,000	-	-	0,002	-	-	-	-
	Décembre	-	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stenella coeruleoalba</i>	Mai	0,006	0,062	0,039	-	-	-	-	-	-	

	Juin	0,044	0,050	0,031	0,045	0,039	0,035	0,051	0,035	0,027	0,036
	Juillet	-	-	-	0,044	0,057	0,039	-	-	-	-
	Aout	-	0,070	0,050	0,046	0,038		-	0,034	0,031	-
	Septembre	0,030	0,086	0,097	0,071	0,026	0,046	0,030		0,027	0,042
	Octobre	0,057	-	0,049	-	-	0,048	-	-	-	-
	Décembre	-	0,059	-	-	-	-	-	-	-	-
Grampus griseus	Mai	0,003	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-
	Juin	0,000	0,001	0,000	0,001	0,003	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
	Juillet	-	-	-	0,000	0,006	0,000	-	-	-	-
	Aout	-	0,017	0,000	0,000	0,000		-	0,000	0,000	-
	Septembre	0,000	0,001	0,001	0,009	0,000	0,001	0,001		0,002	0,002
		Octobre	0,002	-	0,004	-	-	0,002	-	-	-
	Décembre	-	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-
Tursiops truncatus	Mai	0,009	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-
	Juin	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Juillet	-	-	-	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-
	Aout	-	0,000	0,003	0,000	0,000		-	0,000	0,000	-
	Septembre	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001		0,000	0,000
		Octobre	0,000	-	0,000	-	-	0,000	-	-	-
	Décembre	-	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-
Petits cétacés indéterminés	Mai	0,009	0,000	0,004	-	-	-	-	-	-	-
	Juin	0,000	0,004	0,002	0,000	0,000	0,003	0,000	0,001	0,001	0,002
	Juillet	-	-	-	0,000	0,000	0,002	-	-	-	-
	Aout	-	0,000	0,008	0,000	0,000		-	0,003	0,006	-
	Septembre	0,007	0,010	0,000	0,000	0,000	0,001	0,002		0,002	0,000
		Octobre	0,009	-	0,004	-	-	0,008	-	-	-
	Décembre	-	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-

Bien que le nombre de kilomètres parcourus en effort soit inférieur en 2016 par rapport aux autres années, le nombre d'observations et le nombre d'individus estimés restent cohérents avec ceux des autres années (Tableau 6). L'année 2016 reste une année favorable, puisque le taux de contact et l'abondance relative sont supérieurs à la moyenne depuis 2006. Ces résultats sont liés à la présence de toutes les espèces de cétacés, car en se focalisant sur le détail des observations par espèces, en 2016, l'abondance relative des 4 espèces étudiées est supérieure à la moyenne (Tableau 7, Tableau 8, Tableau 9, Tableau 10).

Tableau 6 : Synthèse du nombre d'observations et d'individus rencontrés de toutes les espèces de cétacés au cours des campagnes de biopsies de 2006 à 2016.

Année	Effort (km)	Nombre d'observations	Nombre d'individus estimés	Taux de contact	Abondance relative
2006	2221	140	874	0,063	0,394
2007	2158	201	1105	0,093	0,512
2008	2274	197	1010	0,087	0,444
2009	2389	159	828	0,067	0,347
2010	2963	203	1028	0,069	0,347
2011	4411	296	2048	0,067	0,464
2012	3046	195	1753	0,064	0,576
2013	2946	183	3394	0,062	1,152
2014	3281	181	2195	0,055	0,669
2016	1975	166	1316	0,084	0,666
Moyenne	2766	192	1555	0,071	0,557

Tableau 7 : Synthèse du nombre d'observations et d'individus Rorquals communs rencontrés au cours des campagnes Cap cétacés de 2006 à 2016.

Année	Effort (km)	Nombre d'observations Bp	Nombre d'individus estimés	Taux de contact	Abondance relative
2006	2221	34	92	0,015	0,041
2007	2158	28	44	0,013	0,020
2008	2274	37	45	0,016	0,020
2009	2389	32	52	0,013	0,022
2010	2963	65	140	0,022	0,047
2011	4411	80	160	0,018	0,036
2012	3046	47	88	0,015	0,029
2013	2946	56	116	0,019	0,039
2014	3281	62	89	0,019	0,027
2016	1975	79	123	0,040	0,062
Moyenne	2766	52	94,9	0,019	0,034

Tableau 8 : Synthèse du nombre d'observations et d'individus Cachalots rencontrés au cours des campagnes Cap cétacés de 2006 à 2016.

Année	Effort (km)	Nombre d'observations Pm	Nombre d'individus estimés	Taux de contact	Abondance relative
2006	2221	0	0	0,000	0,000
2007	2158	11	29	0,005	0,013
2008	2274	12	20	0,005	0,009
2009	2389	7	10	0,003	0,004
2010	2963	12	37	0,004	0,012
2011	4411	19	56	0,004	0,013
2012	3046	14	26	0,005	0,009
2013	2946	18	65	0,006	0,022
2014	3281	14	45	0,004	0,014
2016	1975	5	40	0,003	0,020
Moyenne	2766	11,2	32,8	0,004	0,012

Tableau 9 : Synthèse du nombre d'observations et d'individus Globicéphales noirs rencontrés au cours des campagnes Cap cétacés de 2006 à 2016.

Année	Effort (km)	Nombre d'observations Gm	Nombre d'individus estimés	Taux de contact	Abondance relative
2006	2221	2	62	0,001	0,028
2007	2158	2	16	0,001	0,007
2008	2274	3	59	0,001	0,026
2009	2389	0	0	0,000	0,000
2010	2963	2	40	0,001	0,013
2011	4411	5	125	0,001	0,028
2012	3046	0	0	0,000	0,000
2013	2946	2	65	0,001	0,022
2014	3281	3	62	0,001	0,019
2016	1975	1	35	0,001	0,018
Moyenne	2766	2	46,4	0,001	0,016

Tableau 10 : Synthèse du nombre d'observations et d'individus Dauphins bleus et blancs rencontrés au cours des campagnes Cap cétacés de 2006 à 2016.

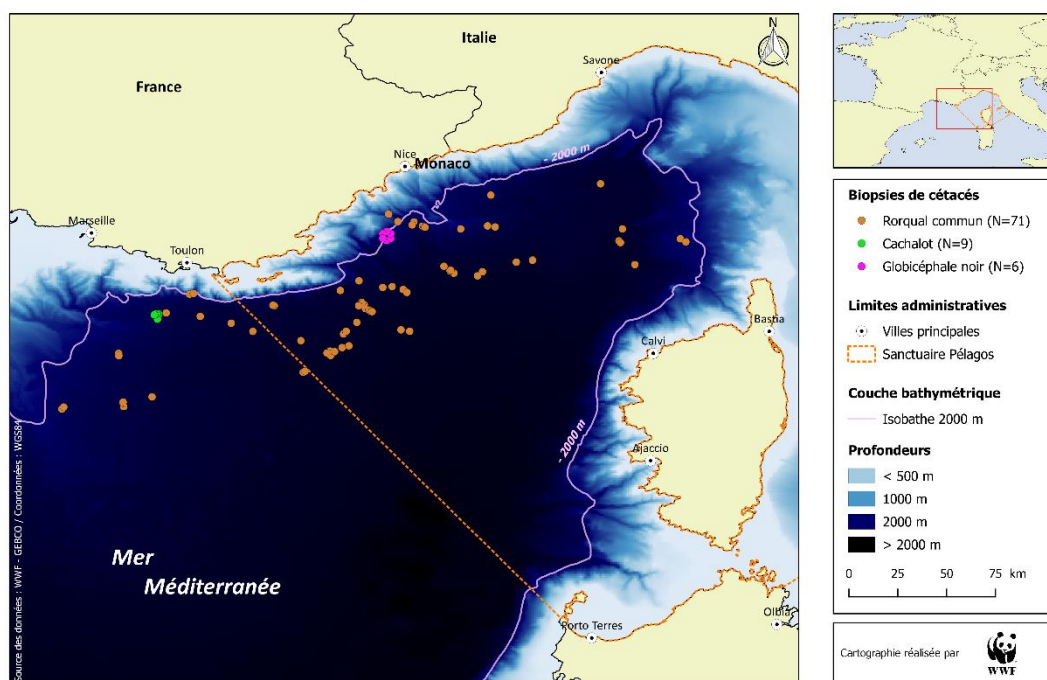
Année	Effort (km)	Nombre d'observations Sc	Nombre d'individus estimés	Taux de contact	Abondance relative
2006	2221	79	650	0,036	0,293
2007	2158	142	929	0,066	0,430
2008	2274	133	839	0,058	0,369
2009	2389	116	747	0,049	0,313
2010	2963	115	771	0,039	0,260
2011	4411	175	1590	0,040	0,360
2012	3046	129	1592	0,042	0,523
2013	2946	101	2905	0,034	0,986
2014	3281	93	1928	0,028	0,588
2016	1975	77	1085	0,039	0,549
Moyenne	2766	104,5	1303,6	0,043	0,467

Sur les 33 jours en mer, 86 biopsies ont été réalisées : 71 sur des Rorquals communs, 9 sur des Cachalots et 6 sur des Globicéphales noirs (Tableau 11). Plus de la moitié des Rorquals communs rencontrés a été biopsiée (71 biopsies pour 123 individus observés). Les biopsies ont été majoritairement prélevées au sein du sanctuaire Pélagos (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) pendant le mois de juin (60 biopsies en juin, 26 en septembre).

Les biopsies de Globicéphale noir ont été prélevées sur des individus appartenant au même groupe rencontré en septembre. Il en est de même pour 8 des 9 biopsies de Cachalot, elles ont été prélevées sur des individus d'un même groupe.

Tableau 11 : Nombre de biopsies réalisées par mois et par espèce au cours de la campagne Cap Cétacés 2016.

Espèce	Informations	Juin	Septembre	Total année 2016
<i>Balaenoptera physalus</i>	Nombre d'observations	59	20	79
	Nombre d'individus estimés	95	28	123
	Nombre de biopsies	60	11	71
	% biopsie	63%	39%	58%
<i>Physeter macrocephalus</i>	Nombre d'observations	1	4	5
	Nombre d'individus estimés	2	38	40
	Nombre de biopsies	0	9	9
	% biopsie	0%	24%	23%
<i>Globicephala melas</i>	Nombre d'observations	0	1	1
	Nombre d'individus estimés	0	35	35
	Nombre de biopsies	0	6	6
	% biopsie	0%	17%	17%
Total	Nombre d'observations	60	25	85
	Nombre d'individus estimés	97	101	198
	Nombre de biopsies	60	26	86
	% biopsie	62%	26%	43%



Carte 8 : Localisation des biopsies de Rorqual commun, de Globicéphale noir et de Cachalot prélevées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.

Les biopsies sur cétacés sont prélevées depuis 2006. La Figure 3 permet de visualiser l'évolution de la réussite des prélèvements, soit le nombre de biopsies réussies par rapport au nombre d'individus observés par année, pour chacune des trois espèces cibles. Chacune des trois courbes est

en croissance ce qui montre la nette amélioration des performances de prélèvements depuis 2006. Cependant, le taux de réussite de biopsies en 2016 est légèrement en baisse pour le Cachalot et le Globicéphale noir. Ceci s'explique par le fait que les individus rencontrés et biopsiés appartenaient à des grands groupes, il est donc difficile de biopsier tous les individus présents au sein de ces groupes.

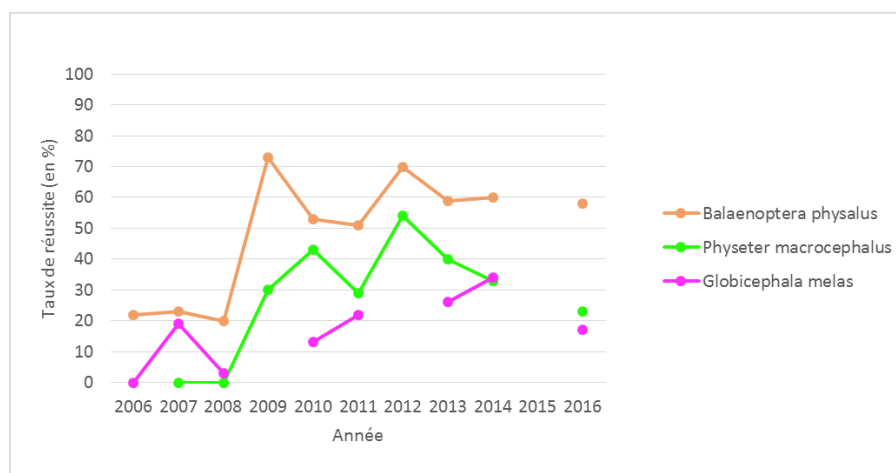


Figure 3 : Représentation graphique de l'évolution des réussites de biopsies entre 2006 et 2016.

4.2.2. Observation opportuniste de déchets

Lors de la mission 2016, 554 déchets ont été dénombrés flottant à la surface. Ces déchets d'origine anthropique sont de tailles diverses : de quelques millimètres à plusieurs dizaines de centimètres. Afin de faciliter la saisie des observations de ces déchets, ceux-ci ont été répartis en différentes catégories (Tableau 12).

La catégorie la plus fréquemment observée est celle des petits plastiques (41,88%) dont la taille est inférieure à celle de la main, suivi par les plastiques de taille moyenne (24,19%) dont la taille est inférieure à celle d'un avant-bras.

Tableau 12 : Synthèse des déchets dénombrés lors de la campagne Cap Cétacés 2016.

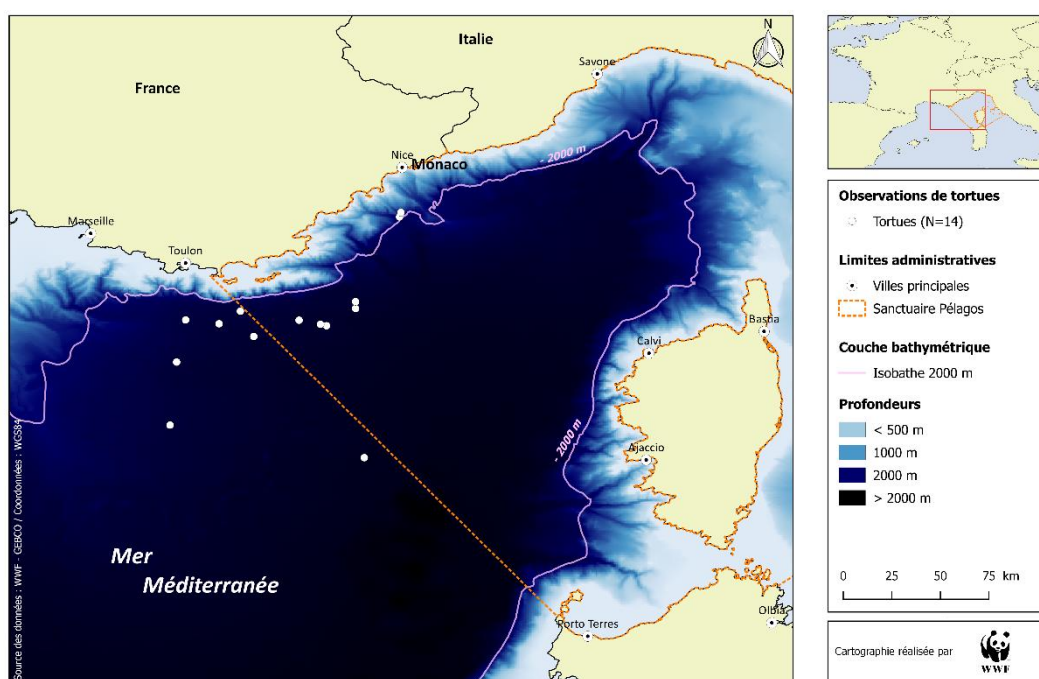
Catégorie de déchet	Total	Pourcentage
Petit plastique	232	41,88%
Moyen plastique	134	24,19%
Bouteille	37	6,68%
Baudruche	31	5,60%
Polystyrène	30	5,42%
Grand plastique	29	5,23%
Ballon	18	3,25%
Caisse polystyrène	10	1,81%
Engin de pêche	9	1,62%
Autre déchet	8	1,44%
Pare-battage	7	1,26%
Bidon	5	0,90%
Engin de plage	3	0,54%
Canette	1	0,18%
Total	554	100%

4.2.3. Autres observations

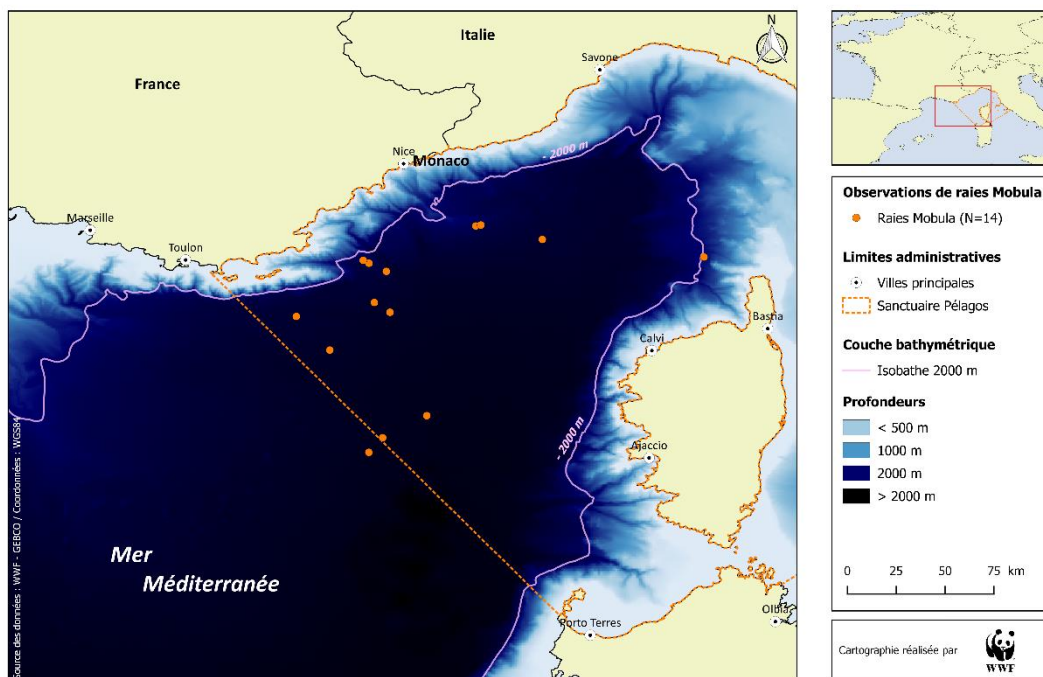
De nombreuses observations ont été faites en plus des observations de cétacés (Tableau 13), comme les tortues (N=14 ; principalement des tortues caouannes *Caretta caretta* ; Carte 9), les raies Mobula (*Mobula mobular* ; N=14 ; Carte 10) et les poissons lunes (*Mola mola* ; N=77 ; Carte 11).

Tableau 13 : Synthèse du nombre d'observations (et du nombre d'individus) de tortues, de raies Mobula et de poissons lunes rencontrés au cours de la campagne Cap cétacés 2016.

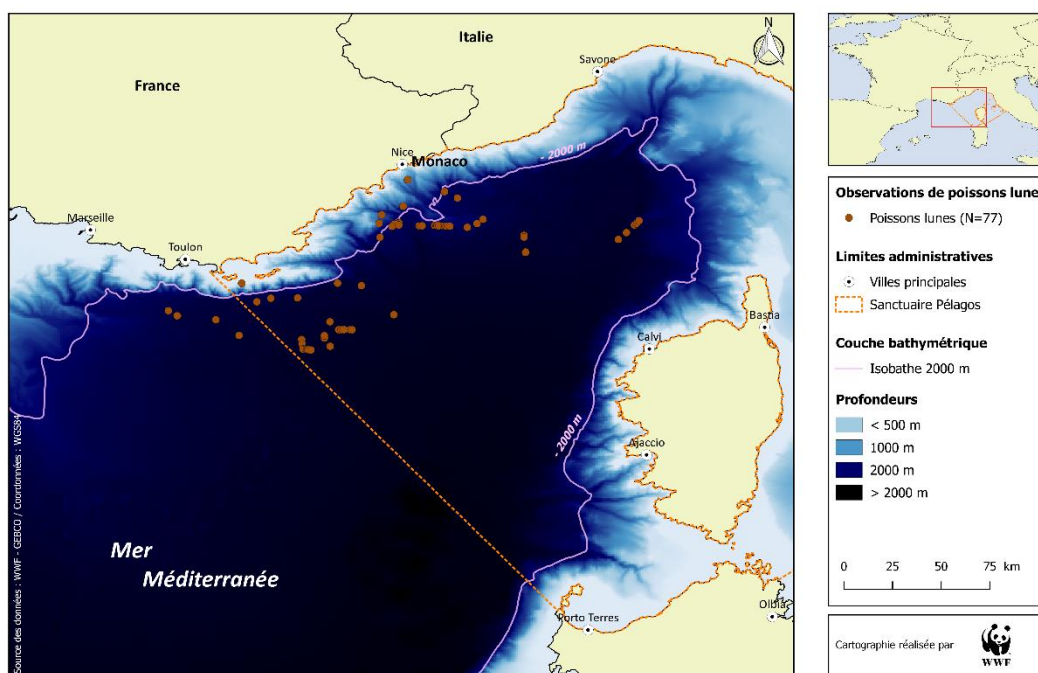
Espèce	Juin	Septembre	Total
Tortues			14 (14)
Raies Mobula	2 (2)	12 (13)	14 (15)
Poissons lunes	70 (75)	7 (7)	77 (82)



Carte 9 : Distribution des observations de tortues au cours de la campagne Cap Cétacés 2016.



Carte 10 : Distribution des observations de raies Mobula au cours de la campagne Cap Cétacés 2016.



Carte 11 : Distribution des observations de poissons lunes au cours de la campagne Cap Cétacés 2016.

L’observation des poissons lune est fréquente en juin et plus rare en septembre (Tableau 13). La présence de cette espèce est en corrélation avec la présence de Vélelles (*Vellella vellela*), présentent en très grande quantité en cette période et composant le régime alimentaire du poisson lune.

4.3. Évolution temporelle du sexe-ratio

4.3.1. Rorqual commun

Sur les 71 biopsies prélevées en 2016, toutes ont fait l'objet d'analyses génétiques afin de sexer les individus biopsiés. Cependant, 1 biopsie n'a pas permis l'identification du sexe de l'individu (KR17) dû à une qualité de l'échantillon insuffisante.

31 mâles et 39 femelles ont ainsi pu être identifiés en 2016. On constate que le sexe-ratio est équilibré et stable pour les Rorquals communs quelle que soit l'année ciblée (Tableau 14). Depuis 2006, 449 biopsies ont été prélevées et analysées, et le nombre de biopsies récoltées chaque année est constant depuis 2010.

Tableau 14 : Nombre de Rorquals communs mâles et femelles par année entre 2006 et 2016.

Année	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2016	Total
Mâle	10	2	5	18	36	46	30	32	26	31	236
Femelle	8	6	4	15	29	28	28	31	25	39	213
Total	18	8	9	33	65	74	58	63	51	70	449

4.3.2. Cachalot

Les 9 biopsies prélevées en 2016 ont fait l'objet d'analyses génétiques afin de sexer les individus. 8 femelles et 1 mâle ont pu être identifiés (Tableau 15).

Depuis 2010, les biopsies réalisées sur les Cachalots ont mis en évidence une faible proportion de femelle présente dans la zone étudiée (entre 10 et 25% des individus biopsiés). Or en 2016, les individus biopsiés sont à 89% des femelles, et elles appartenaient à un même groupe observé.

Tableau 15 : Nombre de Cachalots mâles et femelles par année entre 2010 et 2016.

Année	2010	2011	2012	2013	2014	2016	Total
Mâle	2	9	6	12	14	1	44
Femelle	0	1	2	3	0	8	14
Total	2	10	8	15	14	9	58

4.3.3. Globicéphale noir

En 2016, 6 biopsies ont été prélevées au sein d'un groupe de globicéphale noir. Ces biopsies ont fait l'objet d'analyses génétiques afin de sexer les individus.

5 mâles et 1 femelle ont ainsi pu être identifiés au sein de ce groupe.

4.4. Identification des statuts reproducteurs des individus

4.4.1. Rorqual commun

Sur les 71 échantillons de Rorqual commun prélevés en 2016, seuls 60 ont pu être analysés en raison de quantité insuffisante pour certains prélèvements.

En l'absence de données de référence déjà publiées pour la mesure des stéroïdes de la graisse sous cutanée, on constate que l'on obtient des valeurs du même ordre de grandeur que celles obtenues précédemment pour cette espèce (campagnes 2010, 2011, 2012, 2013, 2014).

4.4.1.1. Dosages hormonaux et évaluation du statut reproducteur chez les femelles Rorquals communs en 2016

En raison de leur taux élevé de progestérone, on peut en déduire que sur les 33 femelles analysées (Tableau 16**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), au moins 16 sont très probablement gestantes. 2 femelles présentent un taux de progestérone moins élevé, mais qui pourrait être le signe d'une gestation. 3 femelles sont apparemment cyclées, en raison de leur production notable de progestérone. 12 femelles ne semblent pas avoir d'activité gonadique notable puisque l'on ne détecte pratiquement pas de stéroïdes sexuels dans la graisse.

Tableau 16 : Dosages des principaux stéroïdes sexuels des Rorquals communs femelles biopsiées lors de la campagne Cap Cétacés 2016.

Code Biopsie	Œstradiol en pg/g	Progestérone en ng/g	Testostérone en ng/g	Androstènedione en ng/g	Statut reproducteur
KR1	165	>375	0	2	Gestante
KR2	487	>375	0	0	Gestante
KR4	285	363	0	3	Gestante
KR13	150	252	0	0	Gestante
KR23	206	>375	0	1	Gestante
KR27	252	236	0	0	Gestante
KR28	233	>375	0	1	Gestante
KR36	253	211	0	0	Gestante
KR37	249	293	0	1	Gestante
KR41	258	268	0	2	Gestante
KR48	477	203	0	0	Gestante
KR54	258	183	0	0	Gestante
KR55	344	143	0	0	Gestante
KR56	275	164	0	0	Gestante
KR63	>1500	360	0	1	Gestante
KR65	>1500	264	0	3	Gestante
KR29	210	40	0	0	Gestante ?
KR66	559	37	0	0	Gestante ?
KR45	273	16	0	0	Cyclée
KR58	165	8	0	0	Cyclée
KR59	283	12	0	0	Cyclée
KR3	327	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR6	264	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR9	198	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR10	291	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR12	219	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR16	217	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR19	264	0	0	1	Pas d'activité gonadique
KR33	219	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR42	279	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR47	257	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR70	216	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR71	151	0	0	0	Pas d'activité gonadique

4.4.1.2. Dosages hormonaux et évaluation du statut reproducteur chez les mâles Rorquals communs en 2016

Sur les 27 individus mâles analysés (Tableau 17), 3 animaux ont une activité gonadique d'étalon, que l'on peut apprécier par leur nette production d'androgènes (testostérone et androstènedione) et d'œstradiol (responsable de la libido chez les mammifères mâles). 4 mâles présentent des taux d'androgènes moins élevés qui pourraient correspondre à une activité sexuelle moins marquée. Les 20 autres ont une faible production de stéroïdes, probablement insuffisante à une activité reproductrice correcte.

Tableau 17 : Dosages des principaux stéroïdes sexuels des Rorquals communs mâles biopsiés lors de la campagne Cap Cétacés 2016.

Code Biopsie	Œstradiol en pg/g	Progestérone en ng/g	Testostérone en ng/g	Androstènedione en ng/g	Statut reproducteur
KR62	292	0	3	23	Actif
KR64	296	0	8	57	Actif
KR69	213	0	2	18	Actif
KR43	222	0	0	2	Peu actif
KR46	263	0	0	2	Peu actif
KR50	133	0	0	4	Peu actif
KR53	428	0	0	2	Peu actif
KR7	258	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR8	256	0	0	1	Pas d'activité gonadique
KR20	247	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR21	293	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR22	160	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR24	143	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR25	198	0	0	1	Pas d'activité gonadique
KR26	239	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR30	224	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR31	706	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR32	238	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR35	286	0	0	1	Pas d'activité gonadique
KR38	191	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR40	156	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR44	200	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR49	195	0	0	1	Pas d'activité gonadique
KR51	238	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR52	220	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR57	197	0	0	0	Pas d'activité gonadique
KR60	206	0	0	0	Pas d'activité gonadique

4.4.1.3. Évolution de la gestation en fonction des années de 2010 à 2016

Le pourcentage de femelles gestantes en 2016 s'élève à 55% ce qui est similaire à la valeur obtenue en 2014. Hormis en 2012 où le pourcentage de femelles gestantes est plus faible, il est relativement constant pour les autres années (Tableau 18).

Tableau 18 : Évolution de la gestation des Rorquals communs en fonction des années de 2010 à 2016.

Année	2010	2011	2012	2013	2014	2016
%	46	38	11	47	56	55
Nombre de femelles gestantes	13	11	3	15	14	18
Nombre total de femelles échantillonnées	29	28	28	31	25	33

Les taux de progestérone et d'œstradiol des femelles échantillonnées depuis 2010 sont représentés dans la Figure 4. Les femelles gestantes se distinguent très nettement des autres femelles de par leur taux de progestérone nettement plus élevé, puisque chez les femelles sans activité gonadique quasi aucun stéroïde sexuel n'est détecté dans la graisse. On constate que les taux d'œstradiol des femelles gestantes échantillonnées en 2016 sont plus élevés que pour les autres années. A contrario les taux de progestérone des échantillons de 2016 sont similaires à ceux des années précédentes.

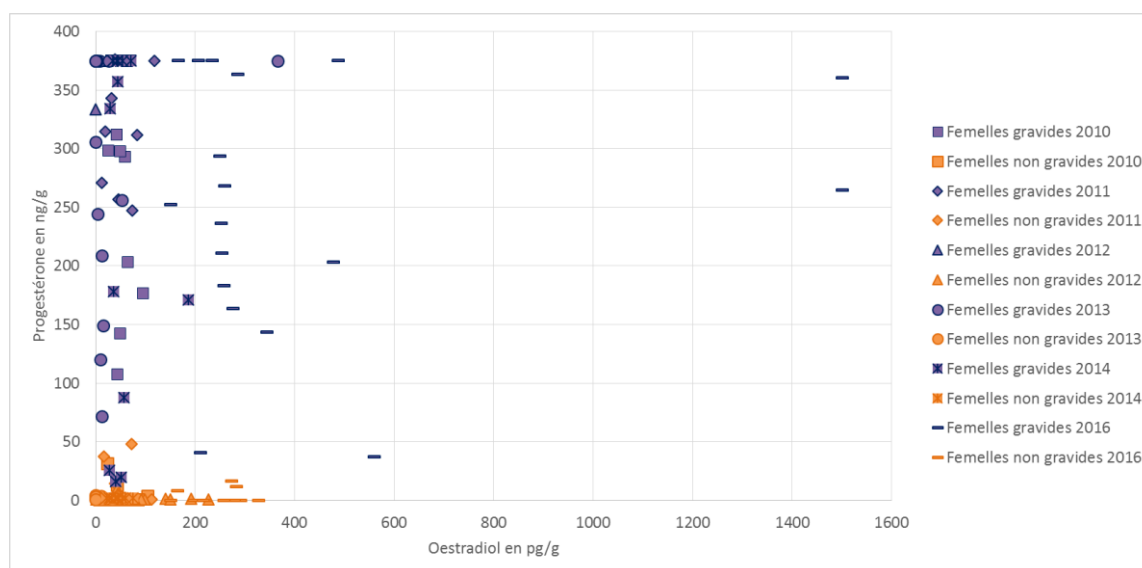


Figure 4 : Représentation graphique des taux d'œstradiol et de progestérone chez les femelles Rorquals communs entre 2010 et 2016.

Lorsque l'on regroupe les échantillons prélevés toutes années d'étude confondus afin de constater une éventuelle saisonnalité, on remarque que les femelles gestantes échantillonnées ne présentent pas de variations hormonales dans les taux de progestérone en fonction de la saison (Figure 5). Cependant, on constate que les femelles gestantes en juin sont en moyenne plus dosées en œstradiol que les femelles gestantes échantillonnées lors des autres saisons. Il semblerait donc que les femelles échantillonnées en juin sont pour la majorité à un stade plus avancé de la gestation, étant donné que les taux d'œstradiol augmentent progressivement tout au long de la gestation (Annexe 2).

Néanmoins, les 2 individus ayant les taux d'œstradiol les plus élevés ont été échantillonnés en septembre 2016. Ces 2 individus sembleraient être en fin de gestation.

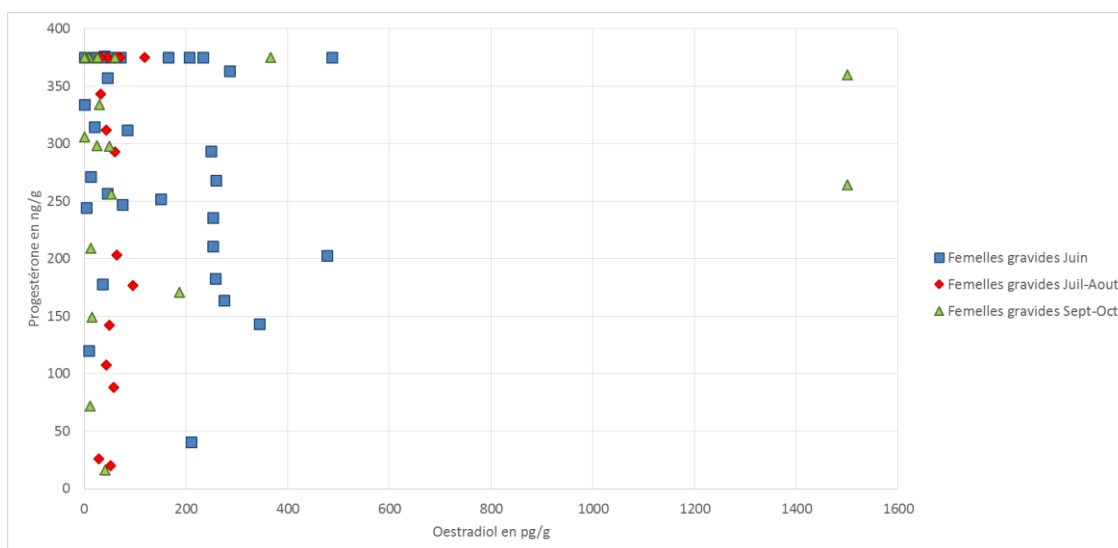


Figure 5 : Représentation graphique des taux d'œstradiol et de progestérone chez les femelles gestantes Rorquals communs échantillonnées entre 2010 et 2016 et réparties par saison.

4.4.1.4. Évolution du taux de mâles reproducteurs en fonction des années de 2010 à 2016

Le pourcentage de mâles actifs en 2016 est nettement plus faible que ceux observés les années passées puisqu'il représente 11% de l'échantillonnage (Tableau 19). En 2014, une diminution du nombre de mâles actifs avait déjà été observée, celle-ci s'est donc accrue en 2016.

Tableau 19 : Évolution des mâles reproducteurs en fonction des années de 2010 à 2016.

Année	2010	2011	2012	2013	2014	2016
%	79	63	87	87	54	11
Nombre de mâles actifs	27	29	26	27	14	3
Nombre total de mâles échantillonnés	34	46	30	31	26	27

Les mâles actifs échantillonnés en 2016 ont des taux hormonaux similaires à ceux des autres années (Figure 6).

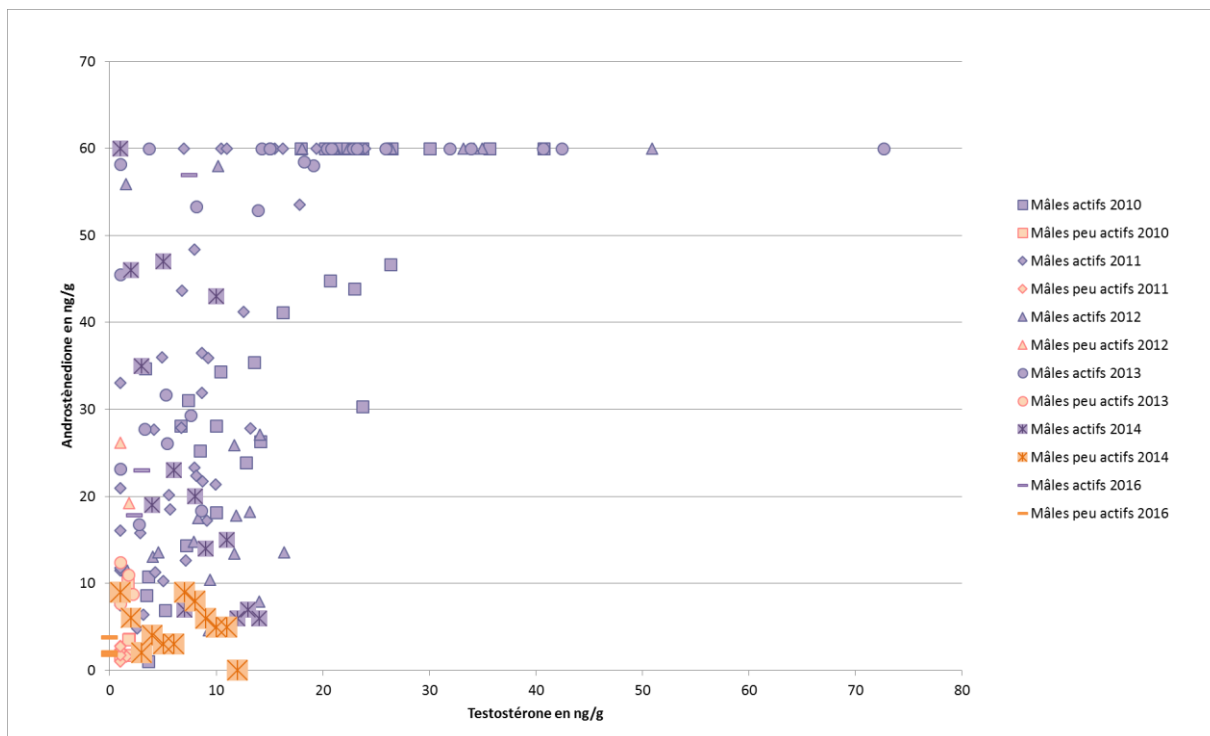


Figure 6 : Représentation graphique des taux de testostérone et d'androstènedione chez les mâles entre 2010 et 2016, répartis par activité gonadique.

Par ailleurs, les mâles actifs échantillonnés présentent des variations hormonales selon la saison. Les mâles actifs échantillonnés en juin présentent des taux d'androstènedione et de testostérone plus faibles que ceux échantillonnés en juillet-août, eux-mêmes plus faible que ceux échantillonnés en septembre-octobre (Figure 7). Ces résultats sont vérifiés pour chacune des années depuis 2010 avec une graduation progressive de juin à octobre.

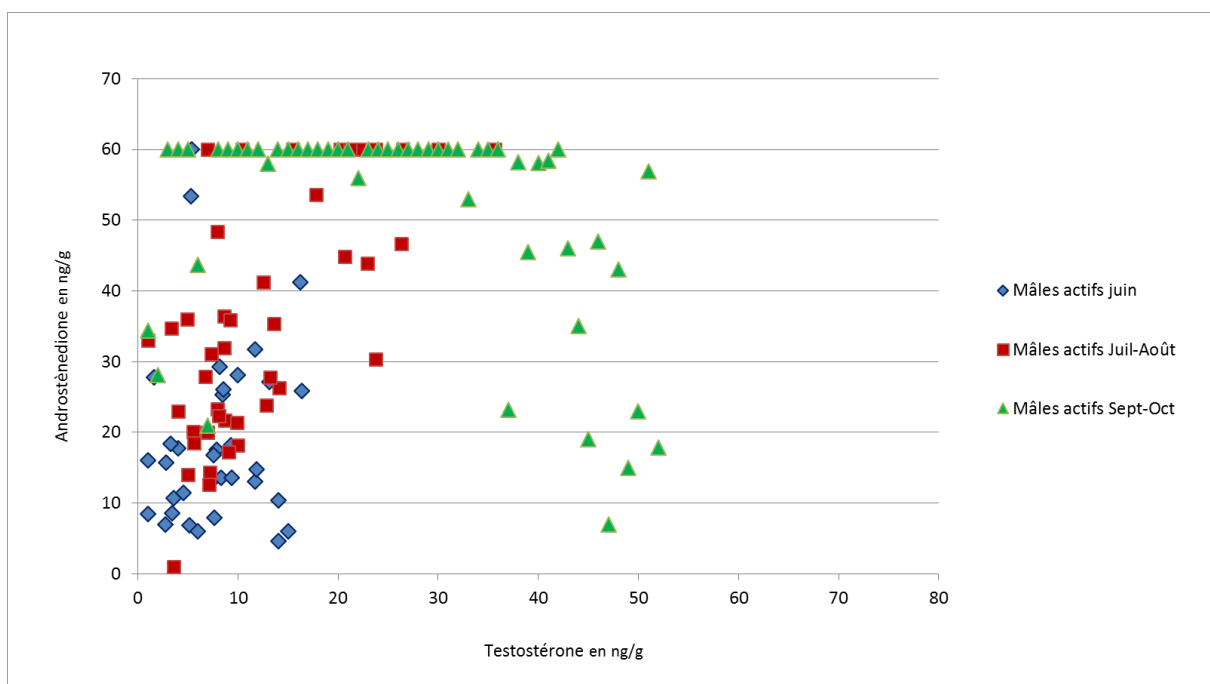


Figure 7 : Représentation graphique des taux de testostérone et d'androstènedione chez les mâles actifs Rorquals communs échantillonnés entre 2010 et 2016, répartis par saison.

4.4.2. Cachalot

4.4.2.1. Dosages hormonaux et évaluation du statut reproducteur chez les Cachalots en 2016

9 échantillons ont été prélevés au cours de la campagne 2016 (Tableau 20). Les prélèvements étaient de qualité moyenne et la faible quantité d'huile obtenue pour 3 prélèvements (KC3, KC7, KC8) introduit une grande imprécision sur les valeurs des taux hormonaux et les interprétations qui en sont faites ci-après doivent donc être considérées avec prudence. Le prélèvement KC2 n'a pas permis de réaliser les analyses.

En absence de valeurs de référence pour cette espèce pour la mesure des stéroïdes de la graisse sous cutanée, mais en égard aux données comparables établies, on peut supposer que le prélèvement KC9 proviendrait d'une femelle présentant un taux de progestérone compatible avec une gestation. Le prélèvement KC4 indique qu'il s'agirait d'une femelle cyclée en raison de la production notable d'œstradiol et de progestérone. Le taux d'androstènedione du prélèvement KC3 pourrait provenir d'un mâle à faible activité gonadique. Les 2 autres prélèvements (KC1 et KC5), ne présentent pas de taux hormonaux représentatifs d'une activité gonadique et ne permettent pas de caractériser les individus.

Tableau 20 : Dosages des principaux stéroïdes sexuels des Cachalots biopsiés lors de la campagne Cap Cétacés 2016.

Code Biopsie	Œstradiol en pg/g	Progestérone en ng/g	Testostérone en ng/g	Androstènedione en ng/g	Sexe	Statut reproducteur
KC9	179	212	0	0	F	Gestante
KC4	671	11	0	2	F	Cyclée
KC6	250	0	0	3	M	Peu actif
KC5	284	0	0	0	F	Pas d'activité gonadique
KC1	240	0	0	0	F	Pas d'activité gonadique
KC3	515	102	0	0	F	Gestante ?
KC7	1226	0	0	0	F	Cyclée ?
KC8	460	0	0	0	F	Pas d'activité gonadique ?

4.4.2.2. Évolution des statuts reproducteurs chez le Cachalot depuis 2012

Depuis 2012, 32 biopsies de Cachalot ont été analysées afin de connaître les statuts reproducteurs des individus biopsiés (Tableau 21).

On constate que les individus biopsiés sont majoritairement des mâles et notamment des mâles actifs. Le nombre de femelles cyclées reste lui inchangé au fil des années, contrairement aux femelles inactives qui n'ont été mises en évidence qu'en 2016.

Tableau 21 : Évolution des statuts reproducteurs en fonction des années de 2012 à 2016.

Statut reproducteur	F			M			Total
	Cyclée	Gestante	Inactive	Actif	Peu actif	Inactif	
2012	2	0	0	4	5	3	14
2013	1	1	0	4	3	1	10
2016	2	2	3	0	1	0	8
Total	5	3	3	8	9	4	32

4.5. Analyse des microplastiques

4.5.1. Choix des phtalates

L'ensemble des phtalates envisagés au cours de cette étude sont présentés dans le Tableau 22 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** Ils ont été initialement sélectionnés en croisant des critères de présence dans les travaux de la littérature dont les travaux et rapports de (Fossi et al. 2012, 2014, 2016), de toxicité, de présence sur des listes d'interdiction internationales (listes d'interdiction EU et US), de présence sur la liste ECHA EU, de la possibilité de les analyser en GC-MS, de disponibilité chez les fournisseurs.

Certains ont été associés à des effets sur la reproduction et le développement, certains se retrouvent dans des applications destinées aux consommateurs; certains sont associés à des effets potentiellement néfastes sur l'environnement et certains ont été déclarés comme étant des priorités internationales.

Tableau 22 : Liste des phtalates envisagés.

Composés	Abréviation	n°CAS	Masse molaire en g/mol
Mono-Butyl phthalate	MBP	131-70-4	222,24
Mono-Benzyl phthalate	MBZP	2528-16-7	256,25
Mono(2-ethylhexyl) phthalate	MEHP	4376-20-9	278,34
Di methyl Phtalate	DMP	131-11-3	194,18
Di Ethyl Phtalate	DEP	84-66-2	222,24
Diisobutyl phtalate	DiBP	84-69-5	278,34
Dibutyl phthalate	DBP	84-74-2	278,34
Bis(2-methoxyethyl) phthalate	DMEP	117-82-8	282,29
4-4' dibromobiphényle	4,4'DiBr	92-86-4	312,00
Di- n-Hexylphthalate	DNHP	84-75-3	334,45
Benzylbutyl phthalate	BBP	85-68-7	312,36
Bis(2-ethylhexyl) phthalate	DEHP	117-81-7	390,56
Diisooctylisophthalate	DIOIP	27554-26-3	390,6
Di-n-octyl phthalate	DNOP	117-84-0	390,56
Diisononyl phthalate	DINP	68515-48-0	418,61
Diisodecyl phthalate	DIDP	26761-40-0	446,66
Di-n-decyl phthalate	DNDP	84-77-5	446,66

La sélection des composés a enfin été réalisée en prenant en considération la stabilité thermique des composés lors de leur analyse en GC-MS et l'obtention de spectres de masse exploitables aussi bien qualitativement que quantitativement.

Parmi ces composés, 3 d'entre eux ont finalement été écartés car se transformant en anhydride phtalique lors de l'analyse par GC-MS (MBP, MBZP et MEHP) et trois autres conduisent à l'obtention de massifs complexes non résolus en chromatographie (UCMs) du fait de leur composition semblable à celle d'un mélange technique (DIOIP, DINP, DIDP). De ce fait, pour la suite de l'étude, 10 phtalates ont été retenus : DMP, DEP, DiBP, DBP, DMEP, DNHP, BBP, DEHP, DNOP et DNDP (en gras dans le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**Erreur ! Source du renvoi introuvable.).

4.5.2. Teneur en eau des échantillons

La teneur en eau moyenne des trois espèces de mammifères marins, après lyophilisation des échantillons, est reportée dans le Tableau 23. Les Globicéphales noirs et les Rorquals communs semblent assez proches alors que les Cachalots montrent une teneur en eau plus élevée. À noter cependant des teneurs assez variables avec des écarts-types significatifs pour les Rorquals communs et surtout les Globicéphales noirs pouvant s'expliquer en partie par certains échantillons traités de très faible masse.

Tableau 23 : Teneur en eau (%) moyenne et écart-type.

	Rorqual commun	Cachalot	Globicéphale noir
Nombre d'échantillons	70	9	6
Moyenne	33,8	56,4	23,9
Écart-type	10,9	5,4	16,6

4.5.3. Teneur en lipides des échantillons

Il n'a pas été possible de déterminer les taux de lipides des Globicéphales noirs car les échantillons avaient des masses trop faibles (ils ont été utilisés totalement pour la détermination des phtalates).

Les résultats obtenus pour les Rorquals communs et les Cachalots montrent une grande variabilité au niveau des taux de lipides (Tableau 24, Figure 8). Cette variabilité importante a entraîné des variabilités sur les teneurs en phtalates trop importantes, ce qui nous a conduit à ne pas rapporter les teneurs en phtalates en fonction des taux de lipides mais à les rapporter au poids sec.

Tableau 24 : Teneurs en lipides (%) moyennes et écarts-types, coefficients de variation des échantillons de Rorqual commun et de Cachalot.

	Rorqual commun	Cachalot
Nombre d'échantillons	68	9
Moyenne (%)	43,53	29,07
Écart-type (%)	14,58	10,94
Coefficient de variation (%)	33,5	37,6

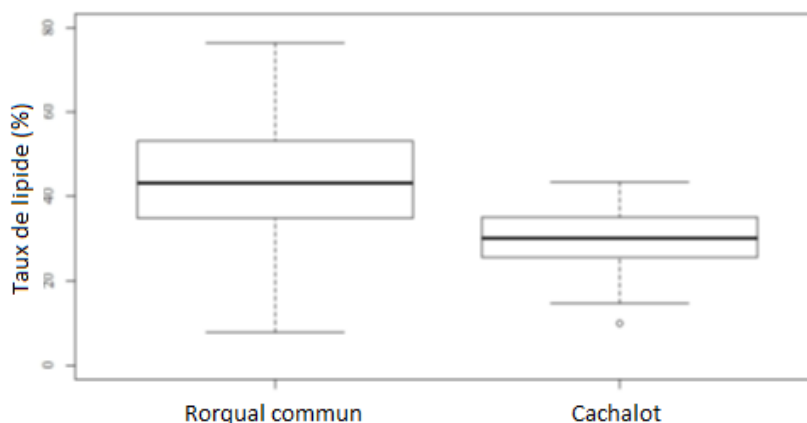


Figure 8 : Boxplots des lipides de Rorqual commun et de Cachalot.

Le taux de lipide moyen mesuré chez les Rorquals communs est significativement différent de celui retrouvé chez les Cachalots (test t de Student, $p = 0,0038$).

4.5.4. Teneur en phtalates des échantillons

L'ensemble des échantillons analysés montre des concentrations significatives en phtalates. Les trois espèces, Rorqual commun, Cachalot et Globicéphale noirs sont contaminées. Toutes espèces et sexes confondus, on retrouve une valeur moyenne de 17547 ng/g ps. Néanmoins les niveaux de contamination sont très variables (cf. l'écart-type de 15227 ng/g qui est de l'ordre de grandeur de la valeur moyenne). Il ne semble pas y avoir d'influence du sexe sur les niveaux de contamination (pas de différence significative).

De façon générale, toutes espèces et sexes confondus, et par ordre d'abondance décroissant, on trouve les phtalates suivants :

DEP > DEHP > DBP > DiBP > DNHP+BBP > DMP > DMEP > DNOP

Le DNOP reste à l'état de trace et n'est détecté que sur 14% des individus et uniquement des Rorquals communs (8 femelles et 4 mâles). En revanche, le DNHP n'a jamais été détecté dans les échantillons analysés. Pour le plus dangereux d'entre eux, le DEHP, la valeur médiane est de l'ordre de 740 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de matière sèche et une valeur moyenne de l'ordre de 1060 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de matière sèche (Tableau 25).

Tableau 25 : Valeurs moyennes observées des différents phtalates analysés en ng/g de matière sèche.

	DEP	DEHP	DBP	DIBP	DNHP + BBP	DMP	DMEP	DNOP	DNDP	Total
Ordre d'abondance	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Moyenne	14656	1060	629	409	337	267	184	5	0	17547
Ecart type	14747	1390	825	497	413	359	480	15	0	15227

L'analyse statistique des résultats reprenant l'ensemble des phtalates analysés (Tableau 26) montre sans ambiguïté qu'il existe des différences significatives entre les différentes espèces, et que les Rorquals communs semblent plus contaminés que les Cachalots.

Tableau 26 : Valeurs moyennes de contamination totale (tous les phtalates confondus) en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de matière sèche.

	Rorqual commun	Cachalot	Globicéphale noir
Nombre d'échantillons	70	9	6
Moyenne	17983	9807	24076
Ecart type	16254	5657	6026

Pour le DEHP, les médianes obtenues pour chaque espèce ne sont pas significativement différentes : Rorqual commun = 799 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Cachalot = 631 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Globicéphale noir = 739 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

4.6. Analyse génétique du Rorqual commun

4.6.1. Caractéristiques générales de la population

Les liens de parenté ont pu être mis en évidence via des analyses génétiques et notamment l'analyse de microsatellites. Les microsatellites correspondent à des courtes séquences d'ADN répétées, très polymorphes, codominantes et abondantes dans (presque) tous les génomes, présentes en un locus donné (position spécifique du génome).

Sur les 32 microsatellites retenus et utilisés, seuls 23 ont permis une lecture correcte via le logiciel GenMapper. La lecture de ces microsatellites permet d'obtenir un génotype pour chaque individu échantillonné, soit la composition allélique de cet individu pour une série de loci spécifiques.

L'analyse des génotypes via MicroChecker a mis en évidence la présence de 3 allèles nuls : Bp747752, Bp779455 et Bp989588. Les allèles nuls sont le résultat d'une mutation dans la séquence ADN au niveau de l'accroche de l'amorce, ce qui empêche la bonne amplification de cet allèle. Cela provoque des déficits en hétérozygotes inexplicables biologiquement.

De plus, Bp1413051 et Bp745808 correspondent à des microsatellites monomorphes. Les loci monomorphes et ceux comportant des allèles nuls ont été supprimés du jeu de données. Il reste donc 18 microsatellites pour la suite des analyses.

L'analyse de ces microsatellites a permis de mettre en évidence quelques caractéristiques générales sur la population de Rorqual commun de Méditerranée nord-occidentale ainsi que sur sa diversité génétique.

Plusieurs échantillons ont montré des génotypes similaires indiquant des individus identiques :

- KR01 / KR02
- KR10 / KR15
- KR17 / KR18
- KR36 / KR37
- KR55 / KR56 / KR 59
- KR61 / KR65

La diversité génétique de la population de Rorqual commun s'exprime entre autres via sa richesse allélique et son polymorphisme.

La distribution des allèles ainsi que la richesse allélique varient en fonction du microsatellite et de la population. La richesse allélique d'une population, définie comme le nombre d'allèles présents à un locus donné, est connue pour dépendre de la taille de l'échantillon, puisque les chances de découvrir un nouvel allèle augmentent chaque fois qu'un nouvel individu est observé. Dans cette étude, le nombre moyen d'allèles par locus est de 7,83, et le nombre d'allèle par microsatellite varie de 3 à 14 (Tableau 27).

Tableau 27 : Synthèse des microsatellites de Rorqual commun avec leur distribution allélique.

Microsatellites	Type de répétition	Nb allèles	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°
Bp1043662	Tétra	7	126	130	134	138	142	146	150							
Bp1125752	Di	7	120	122	124	128	130	132	134							
Bp1178841	Di	13	242	248	250	252	254	260	262	264	266	270	272	276	278	
Bp1229316	Tri	4	153	159	162	165										
Bp1311471	Tri	3	263	269	272											
Bp1430262	Di	9	270	272	274	276	278	280	282	284	286					
Bp1446664	Di	5	224	226	228	230	232									
Bp279777	Di	6	209	211	213	217	219	221								
Bp311392	Di	6	211	213	215	217	219	221								
Bp359300	Tétra	7	247	263	267	271	275	279	283							
Bp451306	Di	8	244	246	252	254	256	258	262	264						
Bp673257	Tétra	7	173	177	181	185	189	193	197							
Bp740180	Di	13	162	168	170	172	174	176	178	182	184	186	188	190	192	
EV37	Di	13	191	193	195	197	199	203	205	207	209	211	213	223	229	
GATA028	Tétra	14	185	189	193	197	201	205	209	213	217	221	225	229	233	237
GATA098	Tétra	6	088	092	096	100	104	108								
GT011	Di	7	113	115	119	121	123	125	127							
TAA023	Tri	6	081	087	090	093	096	099								

Tous les loci se sont révélés polymorphes à 100% au seuil de 99% dans la population de Rorqual commun échantillonné. La signification biologique et adaptative du polymorphisme d'une population est encore un sujet de controverse scientifique. Il pourrait servir pour l'explication des facultés d'adaptation des populations à des milieux hétérogènes, dans le temps et dans l'espace. Le polymorphisme peut être entretenu par des transferts génétiques récurrents entre populations. Ce résultat indique l'efficacité des loci microsatellites utilisés pour l'analyse de la diversité génétique des populations étudiées.

4.6.2. Lien de parenté

L'analyse des liens de parenté se fait par comparaison des génotypes des individus échantillonnés, puisque le génotype d'un individu provient du génotype de la mère ainsi que celui du père à parts égales. Dans cette étude, elle met en évidence une seule relation parent/enfant entre une femelle KR05 et un mâle KR57 au sein des individus Rorqual commun biopsiés en 2016. Ces individus ont été observés respectivement le 10 juin et le 28 juin, ce qui ne laissait pas présager une quelconque relation entre eux.

L'analyse des génotypes des individus biopsiés en 2016 a permis, via un logiciel de statistique, de reconstituer les potentiels génotypes de leurs parents. Les parents hypothétiques ainsi obtenus permettent de mettre en évidence des relations frère/sœur, demi-frère/demi-sœur entre les individus biopsiés en 2016. Il est estimé au total que 27 mères et 27 pères sont à l'origine de ces individus. En moyenne, les pères et mères hypothétiques ont entre 2 et 3 enfants (Tableau 28).

Tableau 28 : Nombre d'enfants par parents hypothétiques identifiés.

Nombre d'enfants par parents	1	2	3	4	5	Moyenne
Père	5	11	8	2	1	2,37
Mère	8	7	10	3		2,37

Une relation entre 2 frères a été mise en évidence (KR31/KR40 ; $p = 32\%$) et plusieurs liens demi-frères/demi-sœurs ont aussi été déterminés avec une probabilité d'apparement supérieure à 70% (Tableau 29).

Tableau 29 : Individus apparentés en tant que demi-frères/demi-sœurs avec les probabilités associées.

Individu 1	Individu 2	Probabilité
KR11	KR15	94%
KR36	KR52	93%
KR16	KR42	92%
KR06	KR27	92%
KR31	KR49	91%
KR09	KR60	89%
KR25	KR46	89%
KR19	KR67	87%
KR55	KR67	87%
KR12	KR19	87%
KR58	KR52	86%
KR03	KR57	85%
KR36	KR58	85%
KR30	KR50	84%
KR71	KR07	82%
KR40	KR49	82%
KR04	KR05	81%
KR15	KR66	81%
KR27	KR64	81%
KR09	KR36	80%
KR04	KR44	80%
KR48	KR21	79%
KR45	KR61	78%
KR63	KR64	78%
KR14	KR32	77%
KR33	KR20	77%
KR06	KR64	76%
KR47	KR20	76%
KR22	KR60	76%
KR06	KR32	75%
KR09	KR39	71%
KR29	KR42	71%
KR28	KR55	71%
KR28	KR60	71%

5. Discussion

5.1. Effort de prospection

Les kilomètres parcourus au cours de la campagne Cap Cétacés 2016 sont conséquents, au même titre que les années précédentes. Cependant, il est nécessaire de noter que le nombre de kilomètres parcourus en effort est nettement plus faible en 2016 par rapport aux autres années. Cette différence s'explique par un grand nombre d'observations de Rorqual commun, donc un temps passé avec les animaux plus important diminuant ainsi l'effort de prospection.

5.2. Observations

Lors de la campagne 2016, 5 espèces de cétacés ont été observées. Ces 5 espèces sont rencontrées chaque année dans des proportions similaires en termes de nombre d'observations ou d'abondance.

Cependant en 2016, on constate un nombre d'observation supérieur en juin qu'en septembre toutes espèces confondues, puisque 101 observations ont eu lieu en juin contre 65 en septembre. Cette différence provient des observations de Rorqual commun, qui ont eu un comportement plus craintif et furtif en septembre par rapport à juin, ce qui les a rendus plus difficilement observable.

Le taux de réussite des biopsies est constant et important pour le Rorqual commun, bien que peu de biopsies ont été prélevées en septembre. Il est plus faible pour le Cachalot et le Globicéphale noir, car ils ont majoritairement été observés au sein de grands groupes, ce qui ne facilite pas l'approche des individus pour les biopsier.

5.3. Évolution temporelle du sex-ratio

En ce qui concerne le Rorqual commun, le sex-ratio est constant et à l'équilibre sur l'ensemble des campagnes de prélèvement de 2006 à 2016. La parité est donc respectée dans la zone du bassin Méditerranéen nord-occidental et pour toutes les années. Cela a également été montré dans de nombreuses autres zones (Bérubé et al. 1998; Zanardelli et al. 1999).

Seules 9 biopsies ont été prélevées sur des Cachalots au sein d'un même grand groupe au mois de septembre. Elles correspondent à 8 femelles, ce qui diffère des années passées où la majorité des individus biopsiés étaient des mâles. La présence de ces femelles ensembles peut s'expliquer par le fait qu'une naissance venait tout juste de se produire au moment de l'observation de ces Cachalots.

Le sexage des Globicéphales noirs a eu lieu pour la première fois sur les échantillons de 2016. La méthode de sexage utilisée est la même que pour les Rorquals communs et les Cachalots. Les biopsies analysées proviennent d'individus appartenant à un même groupe. On constate que ce groupe était composé d'au moins 5 mâles et 1 femelle. Cependant, aucune conclusion ne peut être émise puisque 2016 correspond à la première année où les échantillons de Globicéphales noirs ont pu être sexés.

5.4. Évaluation des statuts reproducteurs

5.4.2. Rorqual commun

Chez les femelles, dans la mesure où les variations hormonales au cours du cycle sexuel et de la gestation, ne sont pas connues avec précision, les interprétations se fondent comme pour les

campagnes précédentes sur les connaissances physiologiques établies chez les autres espèces de mammifères (Thibault & Levasseur, 2001) et sur les données des années précédentes. Pour les femelles on sait que la gestation s'accompagne d'une forte augmentation de la progestérone dans la première phase de la gestation (Kjeld et al. 1992; Siliart et al. 2012), mais qu'en fin de gestation, la progestérone s'abaisse au profit d'une augmentation des estrogènes. Il est vraisemblable qu'au moment des prélèvements de juin les Rorquals communs soient dans leur première partie de gestation, donc une forte élévation de la progestérone est un bon témoin de la gestation. 3 femelles, prélevées en septembre ont des taux d'estrogènes qui correspondent à des taux de deuxième partie de gestation. Cela concorde avec les résultats obtenus certaines années passées ainsi que pour d'autres populations de l'hémisphère sud ou de l'Atlantique nord (Evans & Raga, 2012; Kjeld et al., 2006; Lockyer, 1984). Il y aurait donc une forte proportion de femelles en gestation au printemps, ce qui concorde avec une saison d'accouplements et de naissances en automne-hiver.

Pour quelques individus, les sécrétions notables d'œstradiol et de progestérone sont les témoins d'une activité gonadique, sans que l'on puisse préciser la phase du cycle. Cependant, environ un tiers des animaux a une faible production de stéroïdes, qui laisse à penser qu'il s'agit d'animaux en dehors de leur saison sexuelle.

Chez les mâles la sécrétion d'androgènes (androstènedione et testostérone) révèle une bonne activité gonadique pour 7 individus. De plus, on constate chaque année une variation saisonnière de la sécrétion d'androgènes. Ceci est en accord avec la littérature où il est indiqué qu'une augmentation de la sécrétion de ces hormones a lieu de juin à novembre pour atteindre un pic en décembre au moment de la période de reproduction (Lockyer 1984; Kjeld et al. 2006). Néanmoins, trois-quarts des animaux biopsiés en 2016 présentent de faibles taux de stéroïdes, correspondant probablement à des animaux impubères. C'est la première fois que l'on observe une telle proportion de mâles sexuellement inactifs.

5.4.3. Cachalot

Le nombre de prélèvements analysés est insuffisant pour être discuté. On peut cependant constater qu'il a de nouveau été possible de mesurer un taux de progestérone supérieur au seuil de détection : la méthode d'analyse est donc confirmée et ne remet pas en cause les résultats des campagnes précédentes. Cependant, la qualité de la graisse prélevée rend difficile l'analyse (faible quantité d'huile obtenue).

5.5. Microplastiques

Les deux phtalates majoritaires sont le DEP et le DEHP. Le DEHP est un additif classique des plastiques. Par contre le DEP, d'ailleurs rarement mesuré car considéré comme non-dangereux et utilisé principalement au niveau des produits de soin corporel et cosmétiques, est majoritaire. Ceci semblerait démontrer une contamination multisource avec du DEHP provenant potentiellement des plastiques alors que le DEP proviendrait plutôt des unités de traitement des eaux usées.

Les niveaux de contamination pour chacun des phtalates sont très variables allant, en valeur moyenne et tous mammifères confondus, de 4,6 à 14656 ng/g ps. Il y a très peu de données dans la littérature pour avoir des niveaux de référence. Le seul point de comparaison est le rapport WWF de Fossi et ses collaborateurs (2016) sur les Rorquals communs de méditerranée avec deux molécules : le BBP et le DEHP. Concernant le BBP, nos valeurs ne sont pas dissociables du DNHP qui est coélué. Les valeurs trouvées restent de l'ordre de grandeur de celles présentes dans la littérature (Fossi et al. 2016).

Concernant le DEHP, qui est considéré comme le plus dangereux de phtalates, nous le trouvons au 2e rang avec une valeur moyenne sur l'ensemble des échantillons de près de 1060 ng/g ps. Cependant, Fossi et ses collaborateurs (2016) ont trouvé sur le Rorqual commun une valeur moyenne de 5952 ng/g matière sèche sur 22 individus. Cette grande différence peut notamment s'expliquer par l'utilisation de protocoles différents entre les 2 études, avec de probables sources de contamination des échantillons pour l'étude de Fossi et ses collaborateurs (2016), qui a utilisé des tubes en plastique pour stocker les échantillons. Nos résultats sont inférieurs mais de l'ordre de grandeur et finalement proches de ceux de Morin (2003) qui rapporte des concentrations de l'ordre de 1000 ng/g dans le Beluga arctique canadien (en relation avec la contamination de la morue qui fait partie de son régime alimentaire) qui est au même niveau de chaîne alimentaire.

Si l'on compare avec d'autres espèces marines, les résultats sont plus élevés que ceux obtenus par des chercheurs dans le delta du Yang Tse sur un certain nombre d'espèces (poissons, crevettes) mais sont du même ordre de grandeur de ceux des mollusques, organismes filtreurs connus pour concentrer la pollution (Hu et al. 2016). À contrario, lorsque l'on compare avec des espèces aquatiques d'eau douce, telles que les poissons liés au sédiment, les valeurs de contamination sont beaucoup plus élevées que celles relevées au niveau des mammifères marins (Huang et al. 2008).

Si on se réfère à l'alimentation humaine, on considère qu'une source alimentaire a une concentration élevée lorsqu'elle atteint ou dépasse, en moyenne, la limite de migration spécifique depuis les plastiques de 300 µg/kg. À l'opposé, une concentration moyenne inférieure à 50 µg/kg est considérée comme faible. Parmi les aliments considérés comme contaminés : les volailles. Une étude récente a montré que la concentration de DEHP dépassait 300 µg/kg dans plus de la moitié des échantillons de volaille (Serrano et al. 2014). Concernant nos échantillons, la valeur moyenne est de l'ordre de 1000 µg/kg. Si l'on prend comme exemple les Rorquals communs, la médiane sur 70 individus (sexes confondus) est d'environ 800 µg/kg.

Contrairement aux polluants comme les PCBs, les phtalates sont rapidement métabolisés chez les mammifères supérieurs (ainsi, le DEHP va rapidement se dégrader en son métabolite le MEHP, etc ...) avec des durées variant de quelques heures à quelques jours (Kluwe 1982; Rhodes et al. 1986; Frederiksen et al. 2007). Les teneurs mesurées dans cette étude sont donc les résultantes de l'exposition et de la détoxification. Ceci pose des questions sur la métabolisation de ces composés par les mammifères marins mais surtout sur l'intensité et la chronicité de leur exposition.

Les Rorquals communs semblent plus contaminés que les Cachalots. Ce résultat, qui va à l'inverse des mécanismes d'amplification au long de la chaîne alimentaire, suggère que le mode de nutrition du Rorqual commun, qui filtre de très grands volumes d'eau pour en extraire ses proies, favorise sa contamination. Néanmoins, cela suppose que les composés se bio-accumulent et présentent une bonne stabilité dans le temps. Or pour le cas où le composé étudié est rapidement métabolisé comme ceux étudiés, ce raisonnement ne tient plus.

Le niveau de phtalate seul ne doit pas être considéré comme un indicateur suffisant de la contamination des mammifères marins du fait de leur métabolisme probablement rapide. C'est très probablement un phénomène dynamique et ce que l'on mesure à un instant t n'est probablement qu'une résultante de l'état physiologique, du lieu de nourrissage et d'un facteur temps. À défaut d'évaluer *in vitro* le métabolisme de ces animaux, les métabolites primaires (esters de phtalates monoalkylés) devraient donc être également un indicateur fondamental (Hu et al. 2016). Ce point sera développé dans une étude ultérieure.

5.6. Caractérisation génétique des individus Rorquals communs

5.6.1. Caractéristiques générales de la population

Sur les 32 microsatellites testés, 9 d'entre eux n'ont pas fonctionné dont 7 proviennent de la littérature (Bérubé et al., 2005, 2000; Palsbøll et al., 1997; Valsecchi & Amos, 1996). Six des 7 microsatellites publiés ont été créés à partir d'échantillons de Baleine à bosse (*Megaptera novaeangliae*). Ces microsatellites n'étant pas spécifiques du Rorqual commun, cela peut expliquer le fait qu'ils n'aient pas fonctionné correctement sur nos échantillons. Il paraît donc important d'utiliser des microsatellites spécifiques afin d'optimiser l'étude.

Au cours de cette étude, 18 loci polymorphes ont pu être analysés afin de mettre en évidence les liens de parenté entre les individus biopsiés. Le nombre d'allèles détecté pour ces locus correspond à ce qui a déjà été trouvé dans de nombreuses autres populations de cétacés pour ces mêmes locus (Bérubé et al., 1998; Palsbøll et al., 1997; Valsecchi & Amos, 1996). La diversité allélique est assez importante puisqu'elle varie de 3 à 14 allèles par locus, avec une moyenne de 7,83. Elle est supérieure à celle observée chez d'autres espèces de cétacés, telles que chez les grands dauphins (6,83 ; Galov et al., 2011) et les globicéphales (6,5 ; Alves et al., 2013). La diversité allélique peut refléter entre autres la taille de la population, notamment les petites populations locales de dauphins du sud-ouest de l'Atlantique (moins de 100 individus) possèdent des diversités alléliques très faibles (inférieures à 3 ; Fruet et al., 2014)). Il semblerait donc que la taille de la population de Rorqual commun de Méditerranée nord-occidentale soit robuste afin de maintenir une certaine stabilité génétique de la population.

Les analyses génétiques ont permis d'identifier des doublons au sein des individus biopsiés, les 71 biopsies correspondent à 64 individus différents.

5.6.2. Lien de parenté

Cette étude de parenté correspond à la première de ce genre sur les données appartenant au WWF et elle ne concerne que les données 2016. Elle est basée sur l'analyse de microsatellites, car les gènes sont les meilleurs marqueurs pour estimer les relations de parenté ou de proximité génétique entre individus. Elle a permis de mettre en évidence sur un jeu de données restreint différents liens de parenté, tels que parents/enfants, frères/sœurs et demi-frères/demi-sœurs.

L'identification de parents hypothétiques pour les individus biopsiés en 2016 permet de mettre en évidence que les Rorquals communs auraient en moyenne entre 2 et 3 enfants. De même, un nombre important de demi-frères/demi-sœurs a été mis en évidence, ce qui induirait le fait que c'est une espèce polygame. Pour les analyses, il a été considéré que les mâles et les femelles étaient polygames, comme cela a déjà été démontré chez la baleine à bosse (Clapham & Palsbøll, 1997). De plus, on considère les cétacés comme polygames car seules les femelles semblent apporter les soins nécessaires aux petits. La monogamie semble donc improbable chez les cétacés (Schaeff 2007). Cependant, cette étude est préliminaire et différentes analyses restent à faire sur un jeu de données plus conséquent.

La méthode et les résultats semblent être concluants, il paraît donc nécessaire d'approfondir cette étude sur toutes les années d'échantillonnage du WWF, afin d'obtenir de nouvelles informations et améliorer la robustesse de ces résultats. De plus, l'analyse sur plusieurs années va permettre de mettre en évidence de nouvelles relations familiales entre les individus présents en Méditerranée nord-occidentale.

6. Conclusion

Le travail effectué au cours de cette étude a permis d'augmenter la base de données existante du WWF qui s'élève aujourd'hui à 1921 observations de cétacés toutes espèces confondues. Les données hormonales ont permis d'améliorer et de confirmer certaines connaissances sur la reproduction des cétacés. L'activité reproductrice des Rorquals communs est confirmée par le taux de gestation. En effet, la proportion de femelles gestantes (environ la moitié des femelles) est la même que les années précédentes. De plus, il a été observé chez les mâles de très faibles taux hormonaux et la proportion de mâles actifs est bien en deçà des campagnes précédentes. En ce qui concerne les Cachalots, il est nécessaire de poursuivre cette étude afin d'améliorer nos connaissances sur leur reproduction.

Les résultats sur les phtalates démontrent une contamination des trois espèces étudiées, une forte variabilité de la contamination en fonction de l'espèce mais également au sein d'une même espèce. Néanmoins, les différents types de phtalates détectés montrent qu'ils ne proviennent pas seulement de la dégradation programmée ou non d'objets plastiques mais aussi directement de l'industrie notamment cosmétique. Il semblerait donc que cette contamination soit généralisée et multi source. De plus, les prélèvements fournis sont à la limite du raisonnablement quantifiable. Il faudrait avoir des prises d'essai plus importantes et améliorer le protocole d'extraction. Il est aussi nécessaire d'augmenter le nombre d'échantillons pour les cachalots et les globicéphales noirs, ainsi que d'échantillonner d'autres zones afin de comparer des zones contaminées à des zones moins impactées par les micro-plastiques et les rejets urbains. L'extension à l'ensemble de la méditerranée permettrait de déterminer un niveau de « fond » de la contamination pour le suivi à long terme de l'exposition des populations de mammifères marins.

Les analyses génétiques ont permis la création de nombreux microsatellites de Rorqual commun. Leur analyse a mis en évidence une diversité allélique importante pour cette population. Différents liens de parenté entre certains individus biopsiés ont été déterminés. Cependant, afin d'augmenter la robustesse de ces liens, il est nécessaire d'augmenter l'échantillonnage ainsi que la zone. De plus, des données sur plusieurs années permettraient des analyses complémentaires au lien de parenté, aboutissant à une évaluation de l'état de santé de ces populations de cétacés. Toutefois, l'analyse de la totalité des échantillons du WWF va permettre d'avoir une vision plus globale des populations de cétacés présentes en Méditerranée occidentale.

Bibliographie

- Alves, F., Qu erouil, S., Dinis, A., Nicolau, C., Ribeiro, C., Freitas, L., Kaufmann, M., Fortuna, C., 2013. Population structure of short-finned pilot whales in the oceanic archipelago of Madeira based on photo-identification and genetic analyses: Implications for conservation. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 23, 758–776. doi:10.1002/aqc.2332
- Ametaj, B.N., Bobe, G., Lu, Y., Young, J.W., Beitz, D.C., 2003. Effect of sample preparation, length of time, and sample size on quantification of total lipids from bovine liver. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2105–2110. doi:10.1021/jf0259011
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 2004. GENETIX:Windows TM software for population genetics. *Lab. G enome, Popul. Interact. CNRS Umr 5000, Univ. Montpellier II, Montpellier (France).*
- B erub e, M., Aguilar, A., Dendanto, D., Larsen, F., Notarbartolo Di Sciara, G., Sears, R., Sigurjonsson, J., Urban-R., J., Palsb oll, P.J., 1998. Population genetic structure of North Atlantic, Mediterranean Sea and Sea of Cortez fin whales, *Balaenoptera physalus* (Linnaeus 1758): Analysis of mitochondrial and nuclear loci. *Mol. Ecol.* 7, 585–599. doi:10.1046/j.1365-294x.1998.00359.x
- B erub e, M., J orgensen, H., McEwing, R., Palsb oll, P.J., 2000. Polymorphic di-nucleotide microsatellite loci isolated from the humpback whale, *Megaptera novaeangliae*. *Mol. Ecol.* 9, 2181–2183. doi:10.1046/j.1365-294X.2000.105315.x
- B erub e, M., Palsb oll, P., 1996. Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Mol. Ecol.* 5, 1–6.
- B erub e, M., Rew, M.B., Skaug, H., J orgensen, H., Robbins, J., Best, P., Sears, R., Palsb oll, P.J., 2005. Polymorphic microsatellite loci isolated from humpback whale, *Megaptera novaeangliae* and fin whale, *balaenoptera physalus*. *Conserv. Genet.* 6, 631–636. doi:10.1007/s10592-005-9017-5
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Buckland, S., Anderson, D., Burnham, K., Laake, J., Borchers, D., Thomas, L., 2001. *Introduction to Distance Sampling: Estimating Abundance of Biological Populations.* Oxford University Press.
- Cariou, R., Larvor, F., Monteau, F., Marchand, P., Bichon, E., Dervilly-Pinel, G., Antignac, J.P., Le Bizec, B., 2016. Measurement of phthalates diesters in food using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 196, 211–219. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.045
- Clapham, P.J., Palsb oll, P.J., 1997. Molecular analysis of paternity shows promiscuous mating in female humpback whales (*Megaptera novaeangliae*, Borowski). *Proc. Biol. Sci.* 264, 95–98. doi:10.1098/rspb.1997.0014
- Evans, P.G., Raga, J.A., 2012. *Marine mammals: Biology and conservation.*
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* doi:10.1007/s10858-011-9570-9
- Fossi, M.C., Coppola, D., Bainsi, M., Giannetti, M., Guerranti, C., Marsili, L., Panti, C., de Sabata, E., CI??, S., 2014. Large filter feeding marine organisms as indicators of microplastic in the pelagic environment:

The case studies of the Mediterranean basking shark (*Cetorhinus maximus*) and fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Mar. Environ. Res.* 100, 17–24. doi:10.1016/j.marenvres.2014.02.002

Fossi, M.C., Marsili, L., Baini, M., Giannetti, M., Coppola, D., Guerranti, C., Caliani, I., Minutoli, R., Lauriano, G., Finoia, M.G., 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. doi:10.1016/j.envpol.2015.11.022

Fossi, M.C., Panti, C., Guerranti, C., Coppola, D., Giannetti, M., Marsili, L., Minutoli, R., 2012. Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2374–2379. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.08.013

Frederiksen, H., Skakkebaek, N.E., Andersson, A.M., 2007. Metabolism of phthalates in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 899–911. doi:10.1002/mnfr.200600243

Fruet, P.F., Secchi, E.R., Daura-Jorge, F., Vermeulen, E., Flores, P.A.C., Simões-Lopes, P.C., Genoves, R.C., Laporta, P., Di Tullio, J.C., Freitas, T.R.O., Rosa, L.D., Valiati, V.H., Beheregaray, L.B., Möller, L.M., 2014. Remarkably low genetic diversity and strong population structure in common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from coastal waters of the Southwestern Atlantic Ocean. *Conserv. Genet.* 15, 879–895. doi:10.1007/s10592-014-0586-z

Galov, A., Kocijan, I., Lauc, G., Gomerčić, M.Đ., Gomerčić, T., Arbanasić, H., Šatović, Z., Šeol, B., Vuković, S., Gomerčić, H., 2011. High genetic diversity and possible evidence of a recent bottleneck in Adriatic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Mamm. Biol. - Zeitschrift für Säugetierkd.* 76, 339–344. doi:10.1016/j.mambio.2010.07.002

Hu, X., Gu, Y., Huang, W., Yin, D., 2016. Phthalate monoesters as markers of phthalate contamination in wild marine organisms. *Environ. Pollut.* 218, 410–418. doi:10.1016/j.envpol.2016.07.020

Huang, P.C., Tien, C.J., Sun, Y.M., Hsieh, C.Y., Lee, C.C., 2008. Occurrence of phthalates in sediment and biota: Relationship to aquatic factors and the biota-sediment accumulation factor. *Chemosphere* 73, 539–544. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.019

Jones, O.R., Wang, J., 2010. COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 551–555. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02787.x

Kjeld, J.M., Sigurjónsson, J., Arnason, A., 1992. Sex hormone concentrations in blood serum from the North Atlantic fin whale (*Balaenoptera physalus*). *J. Endocrinol.* 134, 405–413. doi:10.1677/joe.0.1340405

Kjeld, M., Ólafsson, Ö., Víkingsson, G.A., Sigurjónsson, J., 2006. Sex Hormones and Reproductive Status of the North Atlantic Fin Whales (*Balaenoptera physalus*) During the Feeding Season. *Aquat. Mamm.* 32, 75–84. doi:10.1578/AM.32.1.2006.75

Kluwe, W.M., 1982. Overview of phthalate ester pharmacokinetics in mammalian species. *Environ. Health Perspect.* doi:10.2307/3429377

Lockyer, C., 1984. Review of Baleen Whale (Mysticeti) Reproduction and Implications for Management. *Rep. Int. Whal. Comission* 27–50.

Morin, A., 2003. Distribution of phthalate esters in a marine mammal food chain from Canada's eastern Arctic.

- Palsbøll, P.J., Bérubé, M., Larsen, a H., Jørgensen, H., 1997. Primers for the amplification of tri- and tetramer microsatellite loci in baleen whales. *Mol. Ecol.* 6, 893–895. doi:10.1111/j.1365-294X.1997.tb00146.x
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2012. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537–2539. doi:10.1093/bioinformatics/bts460
- Rhodes, C., Orton, T.C., Pratt, I.S., 1986. Comparative pharmacokinetics and subacute toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in rats and marmosets: Extrapolation of effects in rodents to man. *Environ. Health Perspect.* doi:10.1289/ehp.8665299
- Schaeff, C., 2007. Courtship and mating behavior, in: *Reproductive Biology and Phylogeny of Cetacea: Whales, Porpoises and Dolphins.* p. 349.
- Serrano, S.E., Braun, J., Trasande, L., Dills, R., Sathyanarayana, S., 2014. Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data. *Environ. Heal.* 13, 43. doi:10.1186/1476-069X-13-43
- Siliart, B., Berder, C., Legavre, T., Rivallan, R., Risterucci, A., Ody, D., Tasciotti, A., 2012. Étude préliminaire à l' évaluation de l' activité reproductrice du rorqual commun en Méditerranée. *Sci. Rep. Port-Cros natl. Park* 26, 207–215.
- Thibault, C., Levasseur, M.-C., 2001. La reproduction chez les mammifères et l'homme, Quae. ed. INRA.
- Valsecchi, E., Amos, W., 1996. Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Mol. Ecol.* 5, 151–6. doi:10.1111/j.1365-294X.1996.tb00301.x
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
- Zanardelli, M., Panigada, S., Airoidi, S., Borsani, J.F., Jahoda, M., Notarbartolo-di-Sciara, G., 1999. Site fidelity, seasonal residence and sex ratio of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the Ligurian Sea feeding grounds - Google Scholar. *Eur. Res. Cetaceans* 12, 124.

Annexes

Annexe 1 : Moyens techniques et méthodologies

Un catamaran de 44 pieds (Lagoon 440) a été loué par le WWF France ainsi qu'un pneumatique utilisé pour l'approche des animaux lors des biopsies.

Pour l'observation en transect, c'est-à-dire selon une route définie, le matériel nécessaire est une paire de jumelles, des feuilles de saisies ainsi qu'un PAD (ordinateur de poche) pour noter toutes les observations et les conditions d'observations (Tableau 29). L'étude de la distribution a été réalisée en se basant sur la méthode du transect linéaire (Buckland et al. 2001).

Lors d'une rencontre avec un Rorqual commun, un Cachalot ou un Globicéphale noir, tout le matériel de biopsie est embarqué à bord du pneumatique ainsi que les appareils photos pour la photo-identification des individus. Pour les Cachalots, qui passent 80% de leur temps sous la surface, le repérage et le suivi sont facilités par la mise en place d'un hydrophone. Il permet de signaler leur présence sous la surface (émission de clics) et d'identifier le moment de la remontée (arrêt des clics). Depuis 2011, un hydrophone directionnel assez rustique utilisé à bord du pneumatique a permis de diminuer considérablement la distance avec les animaux lorsqu'ils font surface et d'améliorer ainsi les conditions de prélèvements.

Tableau 29 : Liste du matériel embarqué au cours de la campagne Cap Cétacés 2016.

Utilisation	Matériel
Biopsie – Tir	Arbalète Flèches Emporte-pièces 40 mm Emporte-pièces 25 mm
Biopsie – Échantillons	Congélateur Matériel de dissection Tubes en plastique
Acoustique	2 hydrophones mono (10m et 30m) 2 lecteur/enregistreur DAT
Visuel	Jumelles réticulées Fiches de saisie GIS3M Feuille de route PAD avec Cybertracker Appareils photos Caméra GoPro
Autre	Logiciel de navigation (Fugawi) Logiciel de traitement des données (Cybertracker) Logiciel de photographie (Lightroom)

Le mode de vie des cétacés, qui ne passent que quelques fractions de leur vie en surface, et les contraintes du travail en mer au large, limitent fortement les options pour prélever des tissus sur des animaux vivants. Le prélèvement est effectué « à la volée » au moment où les animaux sont accessibles en surface à l'aide d'une flèche arbalète. La biopsie est complétée par une photo-identification afin de cataloguer et identifier les individus à partir de leurs marques naturelles (caudale et dorsale pour le Cachalot, chevron et dorsale pour le Rorqual commun, dorsales droite et gauche pour le Globicéphale noir).

L'échantillon prélevé contient de la peau et du lard, il permet des analyses fines sur l'animal (génétique, polluants, hormones et isotopes stables). C'est pourquoi il est divisé en 3 sous-échantillons, avec séparation de la peau et du lard puis division en 2 morceaux du lard.

Annexe 2 : Analyses hormonales

- **Extraction des stéroïdes**

Après décongélation, un échantillon exactement pesé, d'au moins 200 mg de graisse (Figure 9), est mis à fondre à 80°C dans une seringue Eppendorf de 2,5 mL sans piston placée dans un tube de 5 mL. 50 µL du résidu huileux obtenu est ensuite pesé et extrait dans un mélange eau/méthanol (1:4) chauffé à 80 °C pendant 35 minutes. Après centrifugation et séparation des phases, le surnageant (méthanol) est évaporé sous courant d'azote. Le résidu sec est repris avec 300 µL de Free Steroid Serum dilué. C'est à partir de cette solution, qui contient les stéroïdes présents dans la graisse sous-cutanée et qui possède des caractéristiques physico-chimiques proches du sérum sanguin, que sont mesurées les concentrations de stéroïdes.

Dosages des stéroïdes par radio immunologie :

Les concentrations de progestérone, testostérone, androstènedione et œstradiol sont mesurées par immunodosages sur les solutions de reprise post extraction, à l'aide de kits validés pour dosage à partir de produits sanguins.

Les dosages de la progestérone, de la testostérone et de l'androstènedione font appel à des techniques de compétition entre le stéroïde dosé et un analogue marqué à l'iode 125 par rapport à leur anticorps spécifique commun. Après élimination des stéroïdes marqués non fixés aux anticorps, le marquage radioactif est mesuré à l'aide d'un compteur gamma, il est inversement proportionnel au stéroïde naturel présent dans le prélèvement.

Le dosage de l'œstradiol fait appel également à une technique de compétition entre le stéroïde dosé et un analogue conjugué à la HRP (HorseRadish Peroxydase) par rapport à leur anticorps spécifique commun. Après élimination des éléments non fixés aux anticorps, un substrat est oxydé par la peroxydase ce qui colore et l'intensité de la coloration est mesurée par spectrophotométrie. Cette mesure est inversement proportionnelle au stéroïde naturel présent dans le prélèvement.

La progestérone est dosée grâce au Kit RIA IM1188 Beckman Coulter (le coefficient de variation intra-essai est 5,5 % et inter-essai de 6 %).

La testostérone est dosée grâce au Kit RIA Spectria OD68628 IDS (le coefficient de variation intra-essai est 5 % et inter-essai de 5 %).

L'androstènedione est dosé grâce au Kit RIA IM1322 Beckman Coulter (le coefficient de variation intra-essai est 5 % et inter-essai de 7 %).

L'œstradiol est dosé grâce au Kit Demeditec DE4399 (le coefficient de variation intra-essai est 6 % et inter-essai de 8 %).

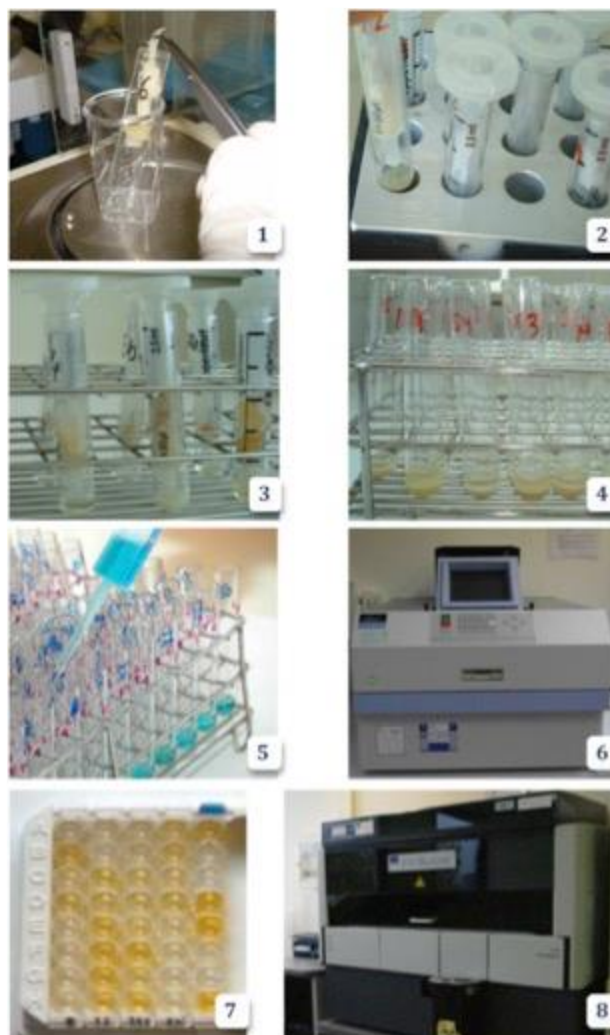


Figure 9 : Mesures du taux de stéroïdes dans la graisse sous-cutanée. Après pesée de la graisse (1), l'huile est obtenue par chauffage à 80°C (2/3), puis est extraite dans un mélange eau : méthanol (4). Après séparation et évaporation du surnageant (méthanol), le résidu sec obtenu est repris avec du tampon sur lequel sont réalisés les immunodosages de stéroïdes par compétition avec des analogues marqués, soit par méthode RIA (5) couplé avec un compteur gamma (6), soit par méthode EIA (7) couplé avec un spectrophotomètre (8).

- **Présentation des composés analysés**

La Progestérone

La progestérone est une hormone stéroïde à partir de laquelle sont synthétisées les autres hormones sexuelles (Figure 10). Cette dernière a plus spécifiquement un effet lutéal.

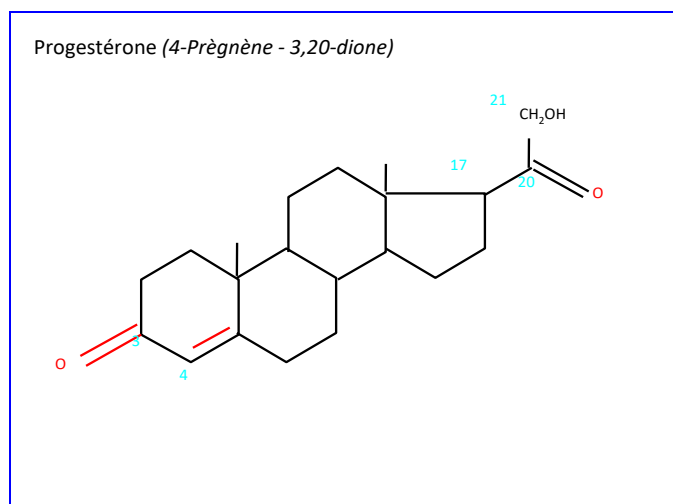


Figure 10 : Formule chimique de la Progestérone.

L'Œstradiol

L'Œstradiol est un estrogène sécrété au moment des chaleurs en fin de gestation et pendant la lactation chez les femelles (Figure 11). Cette hormone joue un rôle majeur sur la libido chez les deux sexes.

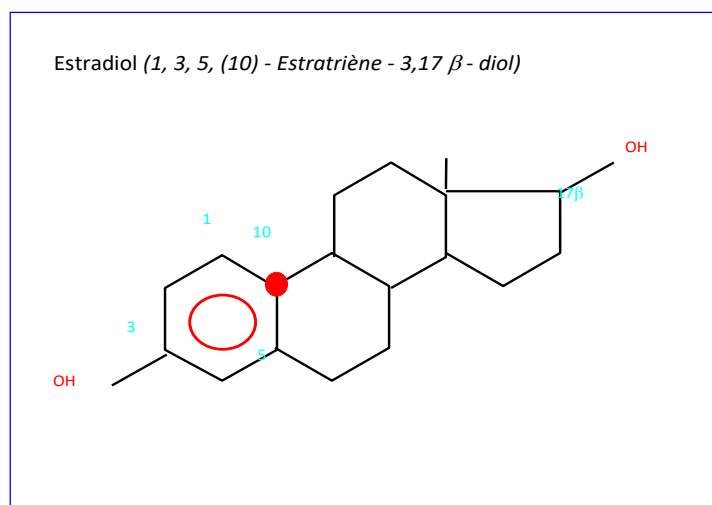


Figure 11 : Formule chimique de l'Œstradiol.

La Testostérone

La Testostérone est une hormone androgène stimulant la spermatogénèse et le développement des organes génitaux mâles (Figure 12).

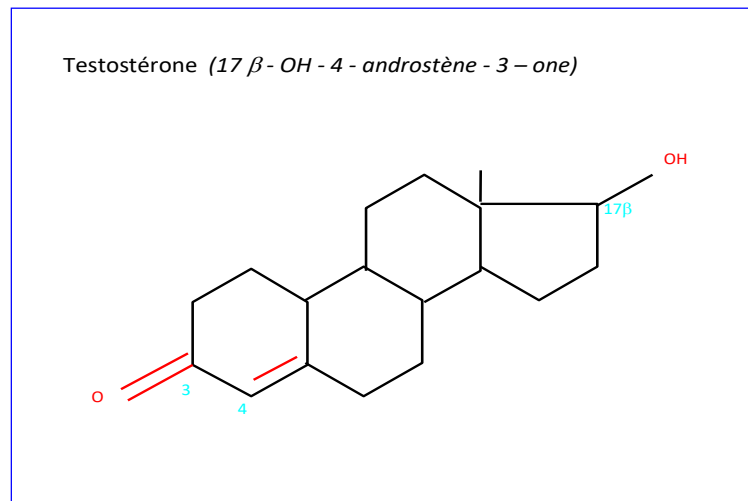


Figure 12 : Formule chimique de la Testostérone.

L'Androstènedione

L'androstènedione est une hormone androgène pouvant aussi être sécrétée par des gonades femelles (Figure 13).

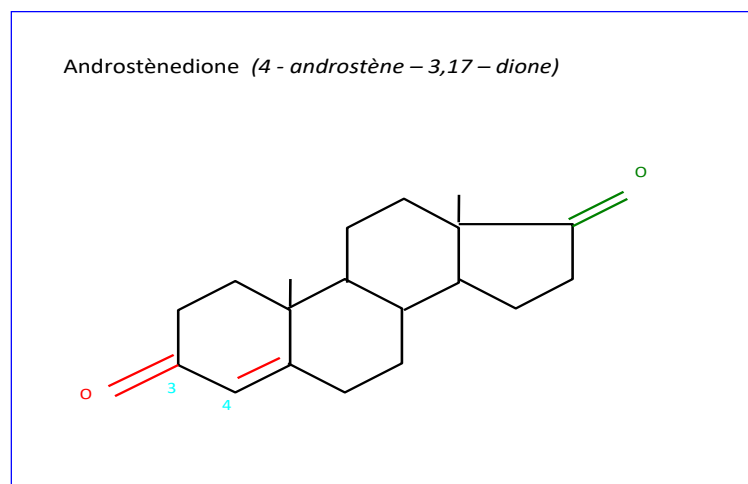


Figure 13 : Formule chimique de l'Androstènedione.

- Description hormonale de la gestation

Les interprétations se fondent sur les connaissances physiologiques établies pour les autres espèces de mammifères (Thibault & Levasseur, 2001), en l'absence de données sur les cétacés. Pour les femelles, la gestation s'accompagne d'une forte augmentation de la progestérone dans la première phase de la gestation (qui correspond à une période équivalente aux deux premiers tiers de la gestation), mais qu'en fin de gestation, la progestérone s'abaisse au profit d'une augmentation des œstrogènes (Figure 14). Il est vraisemblable qu'au moment des prélèvements à forte dose de progestérone, les rorquals communs soient dans leur première phase de gestation.

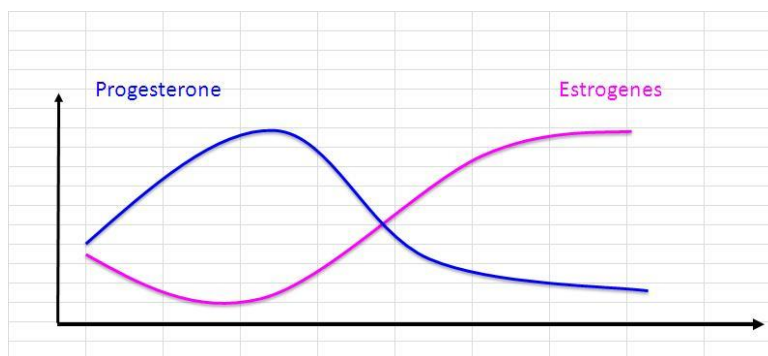


Figure 14 : Évolution des taux de progestérone et d'estrogène chez une femelle en gestation.

Ainsi, les femelles définies et retenues comme gestantes sont des femelles à forte hyperprogestéronémie qui sont dans leur première phase de gestation. Pour les femelles cyclées, les sécrétions notables d'œstradiol et de progestérone sont les témoins d'une activité gonadique sans que l'on puisse préciser la phase du cycle ; hormis pour les femelles en chaleurs pour lesquelles l'activité hormonale est liée à une augmentation modérée de l'œstradiol et de l'androstènedione et un niveau bas de progestérone. Les femelles avec une hyperœstradiolémie modérée peuvent être cyclées, jeunes, adultes mais en phase de repos sexuel après coït(s) sans fécondation ou bien trop vieilles. Il est donc possible de déterminer le statut reproducteur des femelles rorquals communs, c'est-à-dire d'identifier les femelles gestantes en première phase de cycle, mais il est en revanche très complexe de définir tous les cycles.

Annexe 3 : Analyses des microplastiques

- Détermination du poids sec

L'échantillon frais est coupé au scalpel sur aluminium préalablement pyrolysé puis finement haché à l'aide d'un ciseau à dissection inox dans un tube à centrifuger prépesé tous deux préalablement nettoyés (3 rinçages successifs eau ultrapure HPLC, Acétone, MeOH, Hexane et Acétonitrile).

Les morceaux résultants sont ensuite broyés avec une tige inox nettoyée avec la même procédure.

La masse finale à lyophiliser est ensuite déterminée par pesée.

Le tube est mis à congeler puis disposé dans le manifold du lyophilisateur (≈ 24 H). La perte de masse permet de déterminer la teneur en eau (%).

- Détermination du taux de lipides

Le protocole choisi, utilisant un mélange ternaire DCM/MeOH/H₂O (H₂O provient des tissus) dérive de celui de Folch et ses collaborateurs (1957) qui est mieux adapté que le classique (Bligh & Dyer, 1959) aux extractions de tissus à forte teneur en lipides. Ce protocole nécessite un séchage soigneux afin d'obtenir des données fiables (Ametaj et al. 2003).

Les tissus sont disposés dans un flacon taré puis hachés finement avec des ciseaux à dissection. Les ciseaux sont rincés avec 5 mL d'une solution DCM/MeOH (2/1) qui correspond au volume de solvant d'extraction. Ensuite, ils sont placés aux ultrasons pendant 20 minutes, puis centrifugés pendant 10 minutes à 4000 g. La phase liquide est récupérée dans un flacon, le solide est rincé avec 5

mL du mélange DCM/MeOH (2/1). Une deuxième extraction du solide est alors réalisée dans les mêmes conditions et l'ensemble des phases liquides réunies.

La phase liquide résultante est lavée avec 5 mL d'une solution de NaCl 0,9 %, vortexée 1 minute et centrifugée à 4000 g pendant 10 minutes pour séparer les phases organique (inférieure) et aqueuse. La phase aqueuse est éliminée ; la phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée sur laine de verre et évaporée sous flux d'air à 40°C. La masse obtenue est rapportée à la masse initiale pour avoir la teneur en lipides.

• Extraction des phtalates

La méthode d'extraction utilisée est décrite étape par étape et est directement dérivée de celle proposée par Cariou et ses collaborateurs (2016).

L'échantillon frais est coupé au scalpel sur aluminium préalablement pyrolysé puis finement haché à l'aide d'un ciseau pointu dans un flacon à scintillation 20 mL. L'échantillon est congelé pendant 7h à -20°C puis lyophilisé pendant 24h.

Le gras ainsi lyophilisé est transféré dans un tube en verre à centrifuger puis ajout de 15ml d'acétonitrile (ACN qualité HPLC 99.9%) et de 500µL de traceur d'extraction deutéré (BBP-d4).

L'échantillon est vortexé puis placé dans un bain à ultrasons à 80°C pendant 1 heure, le centrifuger à 40°C pendant 10 minutes à 4000 tr/min.

Le flacon est ensuite placé 12h au congélateur (-20°C), puis centrifugé à température ambiante pendant 10 minutes à 4000 tr/min et remis 4h au congélateur (-20°C).

Douze millilitres de produit extrait sont récupérés dans un flacon prépesé.

L'extrait est évaporé sous flux d'azote à 45°C jusqu'à 500µl, le transférer dans un vial de 1mL ambré contenant 20µl d'étalon interne deutéré (DEHP d4) puis l'analyser par CPG/SM.

• Analyse GC-MS et étalonnages

Le chromatographe (Perkin Elmer, Clarus 600) est équipé d'une colonne capillaire Perkin Elmer Elite-5 MS et d'un injecteur PSS à programmation de température afin de diminuer les pics du solvant. La phase de la colonne capillaire est apolaire et constituée de 5% de phényle/95% de diméthylpolysiloxane. Les échantillons sont injectés en mode splitless.

Le débit du gaz vecteur (hélium qualité certifiée 5.6) est maintenu à 1 mL.min⁻¹. Le volume d'injection est fixé à 1µL. L'injection se fait grâce à un passeur d'échantillons (Perkin Elmer, Autosystem XL GC). Les composés sont ionisés par impact électronique (IE) avec une énergie classique de 70 eV, séparés en appliquant un programme de température puis « analysés » et détectés à l'aide du spectromètre de masse quadripolaire (TurboMass, Perkin Elmer).

L'identification des phtalates a été réalisée par injection de solutions standards en mode Full Scan (FS), ce qui nous a permis de déterminer leur temps de rétention et leur spectre de masse.

Un exemple de chromatogramme obtenu en mode SIR est donné sur la Figure 15.

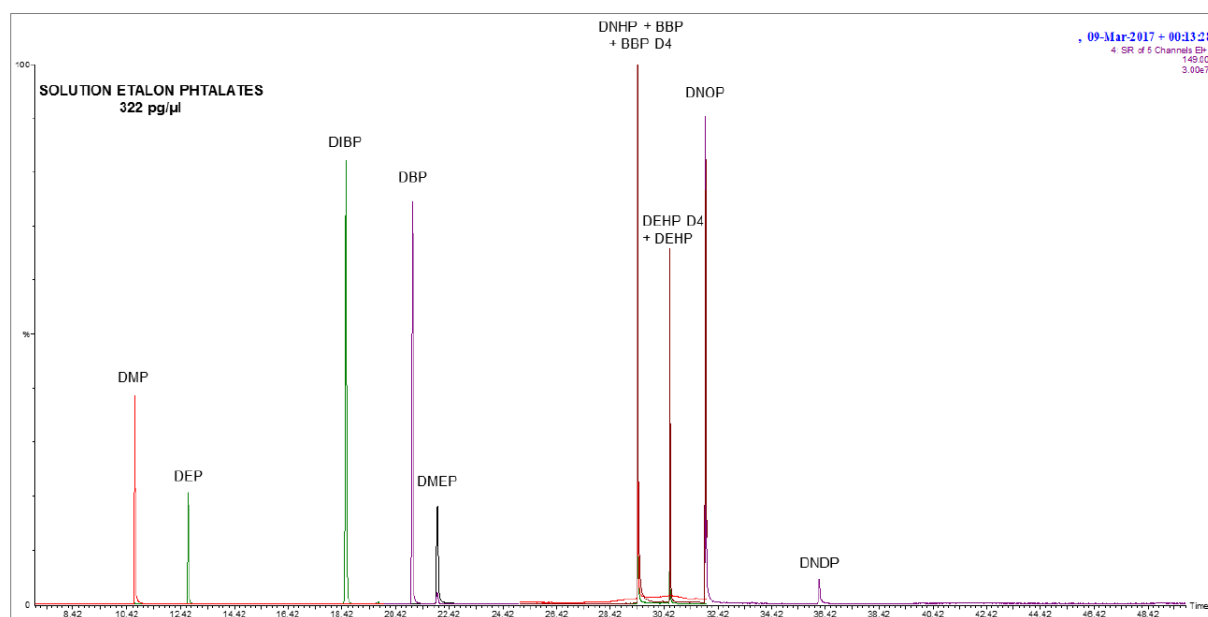


Figure 15 : Chromatogramme d'une solution standard des 10 phtalates (SIR) par GC-MS.

- Étalonnages, LOD/LOQ, performance de la méthode

À l'aide de 8 solutions étalons contenant les 10 phtalates (à des concentrations comprises entre 6 et 1000 µg/L, les étalons d'extraction et interne ([BBP d4] = 10 et 1500 µg/L et [DEHP d4] = 196 µg/L), les courbes d'étalonnage des phtalates ont été tracées.

À partir des injections des solutions étalons, le tracé de l'ensemble des droites d'étalonnage nous a permis de déterminer les équations des droites, leur coefficient de corrélation et les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ ; Tableau 30).

Tableau 30 : Coefficient de corrélation, limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) des phtalates sélectionnés par GC-MS.

PHTHALATES	Coefficient de corrélation R_2	LOD en ppb	LOQ en ppb
DMP	0,9993	0,24	0,81
DEP	0,9986	0,46	1,52
DIBP	0,9995	0,07	0,22
DBP	0,9995	0,22	0,73
DMEP	0,9999	2,09	6,96
DNHP	0,8868	0,25	0,83
BBP	0,9924	1,62	5,41
DEHP	0,9977	1,05	3,50
DNOP	0,9993	1,02	3,41
DNBP	0,9992	16,91	56,38
BBP d4	0,9996	17,22	57,41

Ces valeurs montrent que les droites d'étalonnage sont toutes très satisfaisantes avec des coefficients de corrélation majoritairement supérieurs à 0,99. De plus, ce protocole analytique permet de déterminer des concentrations de phtalates comprises entre 0,8 et 58 ppb (ou µg/L) soit encore entre 0,8 et 58 ng par gramme de graisse en considérant i) une extraction réalisée sur 0,5 g

d'échantillon de graisse et ii) une redissolution de l'extrait sec dans 500 µL de solvant et enfin iii) une minimisation des effets de matrice.

- **Assurance qualité**

- Blanc d'injection

Entre chaque échantillon, après la procédure de lavage spécifique, une injection d'hexane propre permet de valider l'état de propreté du système. Toute réponse anormale au niveau du spectrochromatogramme entraîne une nouvelle injection d'hexane.

- Blanc solvant

Chaque lot de solvant utilisé est testé avec un facteur de concentration 500 pour quantifier les contaminations éventuelles (près d'une dizaine de solvants et plusieurs lots ont été testés).

- Blancs procéduraux

Pour chaque série d'extraction (de l'ordre de 10-12 échantillons), un blanc reprenant l'intégralité du protocole d'extraction/purification/concentration a été réalisé afin de quantifier les contaminations. Les valeurs éventuellement obtenues pour chacun des analytes ciblés obtenues sur le blanc sont soustraites des échantillons correspondant.

Annexe 4 : Sexage et analyses génétiques

Les analyses génétiques ont été réalisées au sein du laboratoire CRIOBE situé à Perpignan (<http://www.criobe.pf/>).

- **Extraction d'ADN**

Les échantillons de peau sont conservés dans de l'alcool à 70%. L'extraction d'ADN est réalisée manuellement via le kit PUREGENE DNA Purification Kit (QIAGEN), et le protocole « DNA Purification from 5-10mg Fresh or Frozen Solid Tissue ». Ce protocole est constitué de 4 étapes (Figure 16) :

- Lyse des parois cellulaires et nucléaires : Les tissus sont digérés pendant 3h dans un bain-marie à 55°C avec 20 µL de protéinase K à 20mg/mL et 300 µL de « Cell Lysis Solution ».
- Précipitation des protéines : 100 µL de « Protein Precipitation Solution » sont ajoutés, avant centrifugation pendant 5 min à 13000 rpm.
- Précipitation de l'ADN : Le surnageant est récupéré et ajouté dans un tube contenant 300 µL d'Isopropanol 100%. Les tubes sont retournés doucement 50 fois puis centrifugés pendant 5 min à 13000 rpm. Ensuite, le surnageant est jeté et 300 µL d'Ethanol 70% sont ajoutés dans les tubes. Les tubes sont retournés doucement plusieurs fois afin de nettoyer le culot d'ADN, avant centrifugation pendant 5 min à 13000 rpm. Les tubes sont vidés et retournés sur un papier absorbant à l'air libre pendant 10 à 15 min.
- Hydratation de l'ADN : 50 µL de « DNA Hydration Solution » sont ajoutés dans les tubes.

Une fois l'ADN extrait, celui-ci est testé sur gel d'agarose 0,5X.

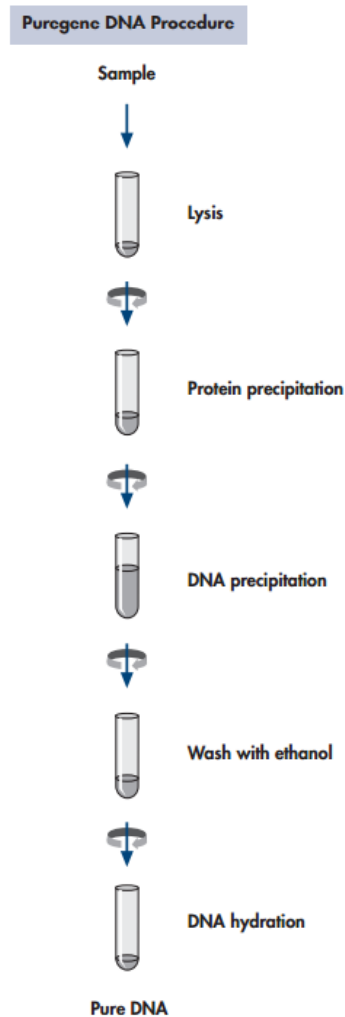


Figure 16 : Protocole d'extraction de l'ADN via un kit Qiagen.

• Identification du sexe

L'identification du sexe repose sur l'amplification des fragments d'ADN spécifiques du gène ZF-X (porté par le chromosome X) et du gène ZF-Y (porté par le chromosome Y) selon Bérubé et Palsbøll (1996). L'amplification de ces fragments d'ADN se fait par PCR asymétrique (Réaction de Polymérisation en Chaîne). Une amplification symétrique initiale a lieu dans un volume de 10 μ L. Les conditions de cette première PCR sont les suivantes : une première dénaturation de 2 minutes à 94°C suivie de 40 cycles d'une seconde de dénaturation à 94°C, 1 seconde d'appariement à 55°C et 20 secondes d'élongation à 72°C, puis une élongation finale d'une minute à 72°C. L'amplification asymétrique qui suit, est réalisée dans des conditions similaires à la première avec une concentration de l'amorce limitante diminuée. Les conditions de cette seconde PCR sont les suivantes : 2 minutes à 94°C, 40 cycles de 1 minute à 94°C, 1 minute à 56°C et 1 minute à 72°C puis 1 minute à 72°C.

Les amorces utilisées (Bérubé & Palsbøll, 1996) pour le sexage des cétacés biopsiés sont :

- ZFYX0582F (5'-ataggtctgcagactcttcta-3')
- ZFY0767R (5'-tttgtgtgaactgaaatt-3')
- ZFX0923R (5'-agaatatggcgacttagaacg-3')

Les fragments amplifiés à l'aide de ces amorces ont des tailles différentes, ce qui permet de les distinguer visuellement sur un gel d'agarose. Les femelles présentent une unique bande (puisqu'elles possèdent 2 copies du chromosome X) tandis que les mâles ont 2 bandes de tailles différentes puisqu'ils possèdent un exemplaire de chaque chromosome.

• Identification des liens de parenté

L'identification des liens de parenté repose sur l'amplification de microsatellites. Un microsatellite correspond à une séquence d'ADN, dont la longueur varie selon l'espèce, mais aussi d'un individu à l'autre. La localisation de ces séquences dans le génome est relativement conservée entre espèces phylogénétiquement proches. Le « polymorphisme » des microsatellites peut être utilisé comme marqueur génétique.

De nombreux microsatellites ont été testés, 14 issus de publications et 24 issus de banque de microsatellites créés pour cette étude au sein du laboratoire Genoscreen à Lille. Après les tests, 32 microsatellites ont été retenus et utilisés dans 5 mix différents (Tableau 31). L'amplification a été réalisée avec le kit Giagen TYPE IT Microsatellite, selon les conditions suivantes : une première dénaturation de 5 minutes à 95°C suivie de 40 cycles de 30 secondes de dénaturation à 95°C, 1 minute et 30 secondes d'appariement à une température variant en fonction du mix et 30 secondes d'élongation à 72°C. Une dernière phase d'élongation de 30 minutes à 60°C termine ce protocole.

Tableau 31 : Protocole et synthèse des microsatellites.

Nom du microsatellite	Source du microsatellite	Taille attendue	Type de répétition	MIX 1 53°C 40 cycles	MIX 2 55°C 40 cycles	MIX 3 57°C 40 cycles	MIX 4 60°C 40 cycles	MIX 5 63°C 40 cycles
Bp451306		261	di	X				
Bp673257		195	tetra	X				
GATA098	Palsbøll <i>et al.</i> , 1997	104-132	tetra	X				
GT011	Bérubé <i>et al.</i> , 1998	120-140	di	X				
Bp1125752		135	di	X				
Bp1178841		246	di	X				
Bp1430262		274	di		X			
Bp311392		214	di		X			
Bp1229316		163	tri		X			
Bp989588		269	tri		X			
GATA028	Palsbøll <i>et al.</i> , 1997	184-236	tetra		X			
EV37	Valsecchi & Amos, 1996	178-224	di		X			
Bp740180		175	di			X		
Bp1446664		230	di			X		
Bp745808		190	tri			X		

Bp1043662		148	tetra			X		
Bp1311471		270	tri			X		
GATA417	Palsbøll <i>et al.</i> , 1997	251-271	tetra			X		
GT122	Bérubé <i>et al.</i> , 2005	151-167	di			X		
Bp747752		196	tetra				X	
TAA023	Palsbøll <i>et al.</i> , 1997	82-100	tri				X	
EV94	Valsecchi & Amos, 1996	198-261	di				X	
GT211	Berube <i>et al.</i> , 2000	193-213	di				X	
GT271	Berube <i>et al.</i> , 2000	112-128	di				X	
EV01	Valsecchi & Amos, 1996	115-197	di				X	
Bp1418059		300	di					X
Bp779455		187	di					X
Bp220878		290	di					X
Bp359300		274	tetra					X
Bp279777		206	di					X
Bp1413051		271	tri					X
GT575	Berube <i>et al.</i> , 2000	140-154	di					X

Les produits PCR sont ensuite envoyés à la société Genoscreen à Lille. Les fragments ont été passés sur un séquenceur automate (Applied Biosystems Inc modèle 3730 XL) qui permet de visualiser des différences de tailles de fragments d'une paire de bases. Un marqueur de taille interne (GeneScan 500 LIZ, Applied Biosystems) a été utilisé pour vérifier la taille des fragments et les allèles ont été nommés et corrigés manuellement via GENEMAPPER v4.1 (Applied Biosystems). Pour chaque marqueur et chaque individu, le génotype est donc enregistré sous la forme de 2 nombres rendant compte de la taille (en nombre de nucléotides) de chaque allèle présent.

- **Vérification de la qualité des données génétiques**

La présence d'allèles nuls ou de potentiels artefacts a été testée avec Microchecker v2.2 (Van Oosterhout et al. 2004) et la présence de potentiels duplicats parmi les individus biopsiés a été examinée en comparant les génotypes multilocus des individus dans GenAlex v6.5 (Peakall & Smouse, 2012).

Le nombre total d'allèles et la fréquence allélique ont été calculés pour chaque marqueur en utilisant GENETIX v4.05 (Belkhir et al. 2004). Cependant, les différents indices de Wright (1969) n'ont pu être calculés, car cette étude ne concerne qu'une seule population et aucun découpage scientifiquement correct n'a été possible.

- **Analyse de parenté**

Les analyses de parenté ont été réalisées sur COLONY v2.0 (Jones & Wang, 2010) afin de définir des fratries et des parentés entre les individus biopsiés. Les relations parents-enfants ont été réalisées avec le génotype de tous les individus puisqu'aucune taille d'individus n'est connue et ne permet de bien différencier les jeunes des adultes. Seuls les mâles et les femelles ont été différenciés via les résultats de sexage génétique afin de définir les relations paternelles et maternelles. COLONY permet notamment de déterminer quels individus sont frères et sœurs dans une population dont le génotype des parents est inconnu. Il a été lancé avec les paramètres suivants : les deux sexes sont polygames, les organismes sont dioïques, il y a de la consanguinité. Chaque permutation inclut un taux d'erreur pour les marqueurs, une fréquence allélique. Les analyses sont lancées avec une probabilité de 80% de potentiels parents biopsiés.

RÉSUMÉ

Le Rorqual commun, *Balaenoptera physalus*, est le plus grand mysticète présent en Méditerranée. Sa population Méditerranéenne est considérée comme résidente et distincte de celle présente dans l'Atlantique. Cette espèce est largement menacée par les activités anthropiques et les connaissances sur cette population sont limitées. Ce travail de thèse a permis d'augmenter les connaissances (taille réelle et efficace, structure de la population, liens de parenté, histoire démographique) afin de pouvoir protéger au mieux l'espèce. Les différentes analyses réalisées sur des marqueurs microsatellites nouvellement développés ainsi que sur des données de photo-identification ont permis d'estimer la taille réelle de la population à 1 300 individus et la taille efficace entre 400 et 500 individus. De plus, nous avons identifié une forte diminution (par un facteur de 3.6) de la taille de la population depuis 260 000 ans. Au cours de cette thèse, d'autres éléments importants ont été mis en évidence, la population Méditerranéenne ne présente pas de structure génétique et est composée de quelques grandes familles. Au sein de ces familles, des pleins frères et sœurs ont été découverts, ce qui est une première chez les cétacés. L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse augmente les connaissances que l'on a sur cette espèce et sur cette population. Ils seront utiles dans la mise en place de futures mesures de conservation dans le but de protéger cette espèce vulnérable mais aussi les autres cétacés présents dans la zone.

MOTS-CLÉS

Balaenoptera physalus, Rorqual commun, Méditerranée, abondance, histoire démographique, liens de parenté

ABSTRACT

The fin whale, *Balaenoptera physalus*, is the largest mysticete in the Mediterranean Sea. Its Mediterranean population is considered as resident and distinct from that of the Atlantic. This species is threatened by human activities and scientific knowledge on this species is limited. This thesis has improved our collective understanding of fin whale demographics and life history traits (current and effective size, population structure, parentage links, demographic history) and will help to protect the species. Using newly developed microsatellite markers and photo-identification data, we estimated the population size at 1,300 individuals and the effective size between 400 and 500 individuals. Furthermore, we identified a decrease (by 3.6) in effective size which began 260,000 years ago. Over the course of this thesis, other important discoveries were made, including the finding that the Mediterranean population lacks a genetic structure, and is a population composed of large families. Further, and for the first time ever in whales, full-siblings were discovered within these families. The results of this thesis not only contribute to enhancing our general knowledge for the fin whale, but will be used to define further conservation measures to protect this vulnerable species and other cetaceans present in the Mediterranean and beyond.

KEYWORDS

Balaenoptera physalus, fin whale, Mediterranean Sea, abundance, demographic history, parentage links