



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>  
Eprints ID : 9233

**To cite this version :**

Bourret, Vincent. *Microsatellites en génétique des cétacés : application à l'étude des populations de dauphins bleu-et-blanc (Stenella caeruleoalba) de Méditerranée occidentale et de la zone Atlantique proche*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2006, 121 p. .

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

---

# MICROSATELLITES EN GÉNÉTIQUE DES CÉTACÉS : APPLICATION À L'ÉTUDE DES POPULATIONS DE DAUPHINS BLEU-ET-BLANC (*Stenella coeruleoalba*) DE MÉDITERRANÉE OCCIDENTALE ET DE LA ZONE ATLANTIQUE PROCHE

---

THÈSE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLÔME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2006  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Vincent, Jacques, Richard BOURRET**  
Né le 7 septembre 1981 à AVIGNON (Vaucluse)

---

Directeur de thèse : **Monsieur le Professeur Jacques DUCOS de LAHITTE**

---

## JURY

PRÉSIDENT :

**M. Jean-François MAGNAVAL**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**M. Jacques DUCOS de LAHITTE**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**M. Claude PETIT**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITÉS :

**M<sup>me</sup> Brigitte CROUAU-ROY**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

**M. Matthias MACÉ**

Docteur vétérinaire







À Monsieur le Professeur Jean-François MAGNAVAL  
Professeur des Universités  
Praticien hospitalier  
*Parasitologie*

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.  
Hommage respectueux.

À Monsieur le Professeur Jacques DUCOS de LAHITTE  
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Parasitologie et maladies parasitaires*

Qui a eu la bienveillance d'accepter notre sujet de thèse et nous a appuyé lors de la réalisation de ce projet.  
Qu'il trouve ici le témoignage de notre reconnaissance.

À Monsieur le Professeur Claude PETIT  
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Pharmacie et toxicologie*

Qui a accepté de faire partie de notre jury de thèse.  
Sincères remerciements.



À Madame le Professeur Brigitte CROUAU-ROY  
Professeur des Universités  
Directrice de l'UMR UPS/CNRS 5174 "Évolution et Diversité Biologique"  
*Génétique des populations et évolution moléculaire*

Qui nous a accueilli au sein de son équipe de recherche et nous a guidé tout au long de la réalisation de ce projet.

Qu'elle trouve ici le témoignage sincère de notre gratitude.

À Monsieur le Docteur Vétérinaire Matthias MACÉ  
Doctorant en Sciences de l'Écologie, Évolution et Populations au sein de l'UMR  
UPS/CNRS 5174 "Évolution et Diversité Biologique"

Qui a encadré notre travail.

Qu'il trouve ici l'expression de nos remerciements chaleureux et de notre profonde sympathie.

À Anna Rozzi, Maxime Bonhomme, Frédéric Magné, et toute l'équipe de l'UMR UPS/CNRS 5174 "Evolution et Diversité Biologique", pour leur accueil amical et leur aide précieuse.





À Messieurs André BOURRET et Albert NACARLO.



À mes parents  
À mon frère et à ma sœur

À mes grand-parents  
À mes oncles et tantes  
À mes cousines et cousins  
À toute ma famille

*Pour votre amour sans réserve et votre confiance sans faille.*

À tous mes amis et camarades, à Sonia, qui avez fait de ce passage à Toulouse un souvenir si doux. Soyez remerciés du fond du coeur.

À Guilhem, Ludovic, et Fabrice, pour des instants de convivialité qui n'ont pas de prix.



## Table des matières

Introduction générale.....	17
<b>Le dauphin bleu-et-blanc</b> .....	17
<b>Conservation du dauphin bleu-et-blanc</b> .....	19
<b>Thèmes de notre étude</b> .....	20
Première partie. Microsatellites en génétique des cétacés: recherche et amplification de marqueurs polymorphes.....	21
Introduction.....	22
<b>Intérêt des microsatellites</b> .....	22
<b>Identification des microsatellites par PCR</b> .....	23
<b>Obtention de microsatellites utilisables et polymorphes</b> .....	23
<b>Objectifs de cette première partie</b> .....	24
Matériel et Méthodes.....	25
<b><u>I. Constitution du tableau de données d'amplification</u></b> .....	25
<b><u>II. Manipulations de laboratoire</u></b> .....	25
<b>A. Echantillons</b> .....	26
1) Espèces étudiées.....	26
2) Nature des échantillons ; leur obtention.....	26
3) Conservation des échantillons.....	26
<b>B. Extraction d'ADN</b> .....	26
1) Les réactifs et leur conservation.....	26
2) Description des principales étapes.....	27
3) Constitution d'aliqots directement utilisables pour la PCR.....	27
<b>C. Choix des microsatellites</b> .....	28
1) Polymorphisme.....	28
2) Type de motif répété.....	28
3) Amplification préalable chez <i>Stenella cæruleoalba</i> .....	28
4) Bilan des six microsatellites choisis.....	28
<b>D. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)</b> .....	28
1) Amorces et « multiplex ».....	29
2) Thermocycleur et programmation.....	29
3) Mode opératoire.....	29
4) Exemple de feuille de manipulation.....	30
<b>E. Electrophorèse en gel d'acrylamide</b> .....	30
1) Principe de l'électrophorèse.....	30
2) Détermination des génotypes.....	31
<b>F. Clonage et réaction de séquence</b> .....	32
1) Principales étapes du clonage.....	32
2) Séquençage.....	33
3) Alignement de séquences.....	33
Résultats.....	34
<b><u>I. Banque de données d'amplifications</u></b> .....	34
<b>A. Bilan des amplifications</b> .....	34
<b>B. Nature des motifs répétés</b> .....	64
<b>C. Essais d'amplification de GATA053 chez quelques espèces</b> .....	65
<b><u>II. Proposition de multiplex chez <i>Stenella cæruleoalba</i></u></b> .....	65
<b>A. Succès des amplifications</b> .....	65
<b>B. Constitution de multiplex</b> .....	65

C. Probabilités d'identité.....	65
<b>III. Séquence des marqueurs chez <i>Stenella coeruleoalba</i></b> .....	66
Discussion.....	69
<b>I. Bilan des amplifications de microsatellites chez les cétacés</b> .....	69
A. Rappel : les microsatellites sont des marqueurs très utilisés en génétique des populations.....	69
B. Conservation des séquences flanquantes au sein de l'Ordre des cétacés.....	69
C. Utilité du tableau récapitulatif.....	70
1) En génétique des populations.....	70
2) Pour l'identification d'espèces.....	70
<b>II. Utilité des multiplex</b> .....	71
A. En génétique des populations.....	71
B. Différenciation entre les individus : probabilités d'identité.....	71
1) $P_{ID\ sib}$ .....	71
2) $P_{ID}$ et $P_{ID\ unbiased}$ .....	71
C. Association de cinq marqueurs en un multiplex.....	72
<b>III. Séquence de <i>GATA053</i> et évolution des cétacés</b> .....	73
A. Séquence « propre à <i>Stenella</i> » : hypothèses phylogénétiques.....	73
B. Apports du bilan d'amplifications et perspectives d'études futures.....	73
Seconde partie. Structure génétique des populations de <i>Stenella coeruleoalba</i> en Méditerranée occidentale et zone atlantique proche.....	75
Introduction.....	76
Objectifs de cette étude.....	76
Résultats d'études antérieures.....	76
Matériel et Méthodes.....	78
<b>I. Les échantillons utilisés</b> .....	78
A. Description de l'échantillonnage.....	78
B. Obtention des échantillons.....	79
<b>II. Expérimentations : extraction d'ADN, PCR et électrophorèse</b> .....	79
<b>III. Analyse des données</b> .....	79
A. Vérifications.....	79
1) Exactitude des données.....	79
2) Déséquilibre de liaison.....	80
B. Fréquences alléliques par population.....	80
C. Paramètres de diversité génétique.....	80
D. Paramètres de structuration génétique.....	80
1) Structure génétique d'une population.....	80
2) Différenciation génétique entre populations.....	80
E. Significativité des valeurs : tests sur permutations.....	81
Résultats.....	83
<b>I. Vérifications</b> .....	83
A. Cohérence des données.....	83
B. Déséquilibre de liaison.....	83
<b>II. Fréquences alléliques</b> .....	84
<b>III. Diversité génétique</b> .....	85
A. Nombre d'allèles par locus.....	85
B. Hétérozygotie attendue.....	86
<b>IV. Différenciation génétique</b> .....	87
A. Structuration au sein de chaque bassin.....	87

<b>B. Allèles nuls : calculs sur quatre locus</b> .....	87
<b>C. Différenciation entre les bassins</b> .....	89
1) Distance de Nei (1978).....	89
2) $F_{ST}$ de Wright (1969).....	89
Discussion.....	91
<b><u>I. Vérifications</u></b> .....	91
<b>A. Cohérence des données et erreurs de lecture</b> .....	91
<b>B. Déséquilibre de liaison</b> .....	91
<b><u>II. La population méditerranéenne serait a priori plus fragile</u></b> .....	91
<b>A. Une population moins variable</b> .....	91
1) Une variabilité nucléaire.....	91
2) Une variabilité mitochondriale également réduite.....	91
3) Bilan des comparaisons de variabilité.....	92
<b>B. Une population plus réduite ?</b> .....	92
<b>C. Variabilité et viabilité à long terme</b> .....	93
<b><u>III. Différenciation génétique entre les populations des trois bassins</u></b> .....	93
<b>A. Dans son ensemble, la population méditerranéenne est génétiquement différenciée de celle des autres bassins</b> .....	93
1) Divergences nucléaires.....	93
2) Divergences mitochondriales.....	94
3) Des femelles philopatrices ?.....	94
4) Des résultats concordants avec les études morphologiques et épidémiologiques.....	95
<b>B. Quels sont les liens entre les populations atlantique et pacifique ?</b> .....	95
<b><u>IV. Structuration interne de la population méditerranéenne</u></b> .....	96
<b>A. L'échantillon méditerranéen présente un excès d'homozygotes</b> .....	96
1) Un possible effet Wahlund.....	96
2) Une structuration géographique ?.....	96
3) Une autre interprétation du défaut d'hétérozygotes.....	96
<b>B. Deux lignées mitochondriales en Méditerranée</b> .....	97
1) Mise en évidence.....	97
2) Variabilité génétique au sein de ces deux lignées.....	97
3) Interprétation de l'excès d'homozygotes observé avec les marqueurs nucléaires.....	97
<b>C. Origine de la structuration génétique au sein de la population méditerranéenne</b> .....	98
<b><u>V. Préserver la population méditerranéenne</u></b> .....	98
Conclusions générales.....	99
Références citées.....	101
Annexe 1 : noms latins et vernaculaires des espèces de cétacés citées.....	109
Annexe 2 : poster présenté en 2005 lors de la 19 <sup>ème</sup> conférence annuelle de l'ECS.....	110
Annexe 3 : poster présenté en 2006 lors de la 20 <sup>ème</sup> conférence annuelle de l'ECS.....	111
Annexe 4 : épreuve d'un article à paraître au <i>JMBA</i> .....	113
Table des illustrations.....	119





## Introduction générale

Du fait notamment de facteurs anthropiques, nombre de populations et d'espèces au sein de l'Ordre des cétacés ont subi une importante diminution de leurs effectifs au cours des siècles derniers. L'une des principales raisons à ce phénomène est la chasse parfois intensive qui leur a été menée. Aujourd'hui, l'effort global de chasse est moindre, mais d'autres menaces existent dont les effets sont difficiles à évaluer. Les pollutions chimique et sonore, les captures accidentelles par divers engins de pêche, les collisions avec les embarcations en sont des exemples.

La connaissance du statut actuel des populations et de leur histoire démographique est importante pour la mise en place de politiques de gestion pertinentes et efficaces pour toutes les populations de cétacés, qu'elles semblent ou non menacées à court terme. En effet, il est généralement moins difficile et plus efficace de préserver des populations lorsque leur effectif est encore suffisant, que de les restaurer lorsqu'elles sont au bord de l'extinction (Beebee et Rowe, 2004). En particulier, dans le cas des cétacés, la mise en pratique de mesures de restauration est souvent très difficile (par exemple, le transport d'individus vivants est extrêmement compliqué).

### Le dauphin bleu-et-blanc

Le dauphin bleu-et-blanc (*Stenella caeruleoalba*) (figure 1) est un animal mesurant autour de deux mètres de long à l'âge adulte, pour un poids pouvant excéder 100 kg. Il peut généralement être identifié du fait d'un motif clair « en écharpe » remontant vers la dorsale, et d'une ligne noire partant de l'œil et lui valant son nom vernaculaire dans plusieurs pays.

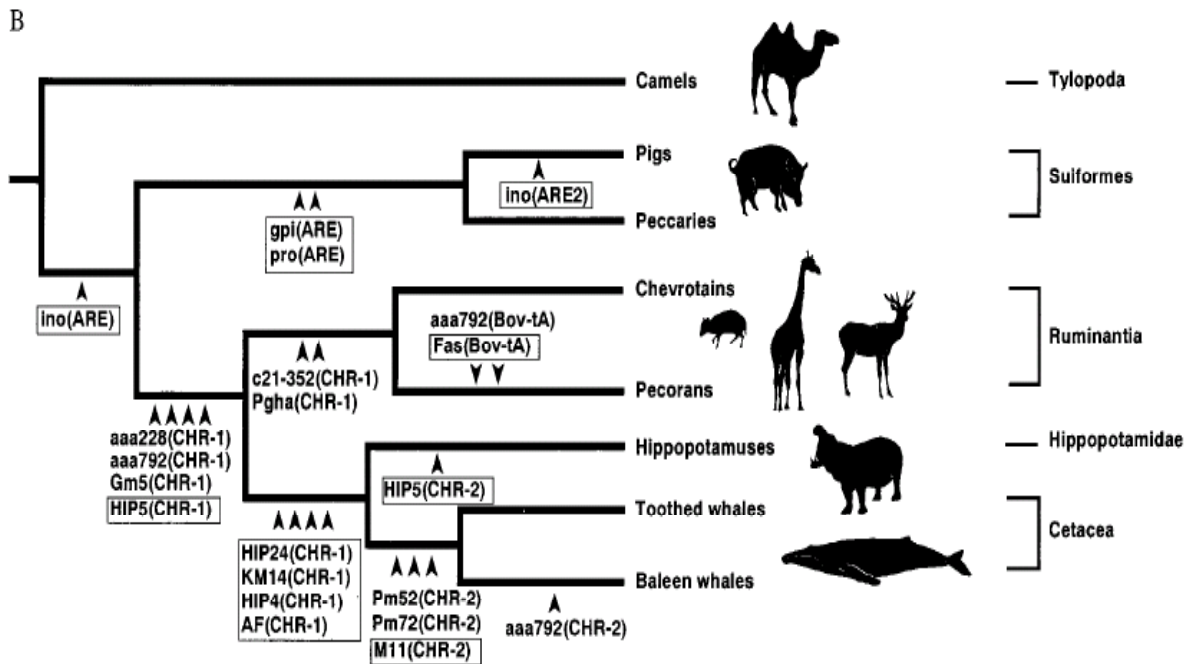


**Fig. 1.** Le dauphin bleu-et-blanc *Stenella caeruleoalba* (Meyen 1833). Photographie : A. Gannier.

La position taxonomique du dauphin bleu-et-blanc (d'après Berta *et al.*, 2006) est la suivante :

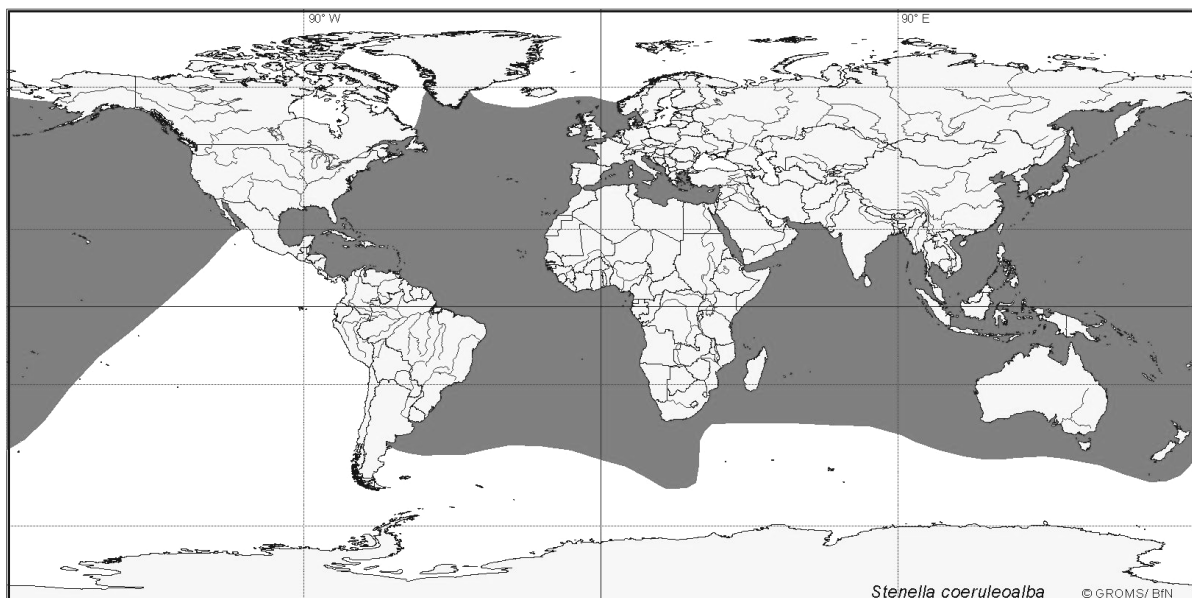
Classe : Mammalia, Sous-classe : Eutheria, Ordre : Cetacea, Sous-ordre : Odontoceti, Famille : Delphinidæ, Genre : *Stenella*, Espèce : *S. caeruleoalba*.

Le dauphin bleu-et-blanc est donc un **cétacé** (Cetacea, Brisson 1762) appartenant au groupe des cétartiodactyles (figure 2). Le tableau 1 présente plus précisément la place du dauphin bleu-et-blanc au sein de l'ordre des cétacés.



**Fig. 2.** Arbre phylogénétique des cétartiodactyles, d'après Nikaido *et al.* (1999). (Les données sur les branches de l'arbre concernent les marqueurs génétiques ayant permis de définir les groupes phylogénétiques correspondants).

Le dauphin bleu-et-blanc est un animal essentiellement pélagique, et se retrouve surtout dans les eaux productives en biomasse situées au large, au-delà du plateau continental (Aguilar, 2000). On peut retrouver cette espèce cosmopolite dans une grande partie des mers et océans tropicaux et tempérés du Globe, comme indiqué sur la figure 3. En Méditerranée occidentale, le dauphin bleu-et-blanc est le cétacé le plus abondant (Aguilar, 2000).



**Fig. 3.** Distribution du dauphin bleu-et-blanc (Global Register Of Migratory Species, [http://131.220.109.5/groms/Species\\_HTMLs/Scoerule.html](http://131.220.109.5/groms/Species_HTMLs/Scoerule.html)).

En Méditerranée, la maturité sexuelle est atteinte chez les femelles vers 12 ans d'âge (187 cm de longueur) (Calzada *et al.*, 1996) et chez les mâles vers 11,3 ans (190 cm). Ces valeurs sont supérieures aux valeurs observées dans la population japonaise (Kasuya, 1972 ;

1985), et également aux valeurs observées pour d'autres espèces du genre *Stenella* (Perrin et Reilly, 1984).

En Méditerranée nord-occidentale, les mises bas ont lieu de la fin de l'été à l'automne (Aguilar, 2000), ce qui correspond à la période de l'année où les eaux sont les plus chaudes et précède un pic de productivité (Estrada *et al.*, 1985). Les nouveaux-nés sont en principe rencontrés dans les plus grands troupeaux, généralement ceux de plus de 30 individus (Forcada *et al.*, 1994) ; un phénomène analogue est observé dans les eaux du Japon (Miyazaki et Nishiwaki, 1978). On suppose que le pic d'accouplements se produit en août (Aguilar, 2000), la durée de la gestation étant ainsi estimée à quelque 12 mois ou un peu plus.

Ordre	Sous-ordres	Familles	Genres	Espèces
<b>Cetacea</b>	Mysticeti (baleines à fanons)	Pyseteridæ (cachalots)	<i>Delphinus</i>	<i>S. clymene</i> <i>S. attenuata</i> <b><i>S. cæruleoalba</i></b> <i>S. frontalis</i> <i>S. longirostris</i>
		Odontoceti (cétacés à dents)	Kogiidæ (petits cachalots)	
	Ziphiidæ (baleines à bec)		<b><i>Stenella</i></b>	
	Platanistidæ (dauphins des bassins du Gange et de l'Indus)		<i>Globicephala</i>	
	<b>Delphinidæ</b>		<i>Grampus</i>	
			Iniidæ (dauphins des bassins de l'Amazone et de l'Orénoque)	<i>Lagenodelphis</i>
	Lipotidæ (dauphins du bassin du Yang-Tze-Kiang)		<i>Lagenorhynchus</i>	
	Pontoporiidæ (dauphins de La Plata)		<i>Lissodelphis</i>	
	Monodontidæ (bélougas et narvals)		<i>Orcella</i>	
			Phocœnidæ (marsouins)	<i>Orcinus</i>
			<i>Peponocephala</i>	
			<i>Pseudorca</i>	
			<i>Sotalia</i>	
		<i>Sousa</i>		
	<i>Cephalorhynchus</i>			
	<i>Steno</i>			
	<i>Tursiops</i>			

**Tab. 1.** Position taxonomique de *Stenella cæruleoalba* au sein de l'Ordre des cétacés. D'après Berta *et al.* (2006).

### Conservation du dauphin bleu-et-blanc

Quelques populations de dauphin bleu-et-blanc sont plus ou moins gravement menacées, notamment dans le Pacifique nord-ouest et en Méditerranée.

*Pacifique Nord-ouest* (Cetacean specialist group, 1996). Les captures de dauphins bleu-et-blanc au Japon se sont réduites de façon spectaculaire depuis les années 1950,

principalement suite à une chasse excessive (et à un changement des méthodes halieutiques, car les captures accidentelles étaient nombreuses). Les estimations d'abondance dans les eaux japonaises, dans les années 1980, ont donné des valeurs supérieures au demi-million d'individus. Cependant plusieurs populations continuent d'être pêchées, et les dauphins bleu-et-blanc ont été complètement ou presque éliminés de certaines zones autrefois fréquentées. La forte demande de viande de dauphin sur les marchés japonais rend l'accomplissement des mesures de conservation problématique.

*Méditerranée.* Les menaces sont différentes dans ce bassin. Une épizootie de morbillivirose a probablement provoqué la mort de milliers d'individus (Aguilar et Raga, 1993), en Méditerranée centrale et occidentale, de 1990 à 1992. La population de Méditerranée occidentale, en 1991, a été estimée à 117 880 individus (intervalle de confiance à 95 % : 68 379 à 214 800 individus ; Forcada *et al.*, 1994). La pollution et la réduction de la disponibilité des proies pourraient avoir aggravé les effets de l'épizootie, et persistent aujourd'hui.

Des dauphins bleu-et-blanc sont capturés volontairement ou accidentellement dans de nombreuses autres parties du Monde, mais les stocks ne semblent pas beaucoup s'y réduire (rappelons cependant que l'estimation de l'abondance des cétacés est un travail délicat). Le dauphin bleu-et-blanc est considéré depuis 1996 comme présentant un faible risque d'extinction (« lower risk ») mais dépendant de mesures de conservation (« conservation dependant ») (Union Internationale pour la Conservation de la Nature, IUCN, [www.redlist.org](http://www.redlist.org)).

L'étude de la **biologie des populations** de *Stenella caeruleoalba* est une étape préliminaire à la conception de politiques de conservation pertinentes et efficaces. En particulier, l'analyse de la **structure génétique des populations** apportera des indications concernant leur niveau de diversité génétique, leur stratégie de reproduction, ou encore leur histoire démographique récente ou plus ancienne.

## **Thèmes de notre étude**

Ce projet a consisté en l'étude de la variabilité génétique intraspécifique chez le dauphin bleu-et-blanc, dans les eaux de Méditerranée occidentale et de la zone atlantique proche.

*La première partie* de ce travail a d'abord consisté en une recherche bibliographique des marqueurs polymorphes de type « microsatellite » trouvés et testés chez les différentes espèces de cétacés. Puis l'amplification de cinq de ces marqueurs (trois di- et deux tétra-nucléotides), développés chez diverses espèces plus ou moins éloignées phylogénétiquement du dauphin bleu-et-blanc, a été mise au point chez ce dernier. Ces cinq marqueurs ont finalement été séquencés afin de vérifier la présence des répétitions et d'identifier les différences de séquence nucléotidique existant entre les espèces.

*La seconde partie* de ce projet a été consacrée à l'étude de la variabilité de ces cinq marqueurs parmi diverses populations de dauphins bleu-et-blanc d'Europe sud occidentale, dans le cadre de l'étude de leur structuration génétique.

Première partie

Microsatellites en génétique des cétacés :  
recherche et amplification de marqueurs  
polymorphes

## Introduction

### Intérêt de l'analyse de microsatellites (revu dans Beebee et Rowe, 2004)

Dans le cadre de l'étude d'espèces menacées, les microsatellites (voir encadré 1) se révèlent utiles dans de nombreux cas.

#### Encadré 1. Rappel : microsatellites.

Un microsatellite est une séquence d'ADN correspondant à une courte répétition « en tandem » d'un motif de 2, 3, ou 4 paires de bases généralement. Le motif répété peut être pur, par exemple :  $(TA)_x$ , composé, par exemple :  $(TA)_x(CA)_y$ , ou présenter une substitution à l'intérieur de la répétition, par exemple :  $(TA)_xGA(TA)_y$ .

Ce type de séquence présente un fort polymorphisme consistant en la variation du nombre de répétitions. Par conséquent, les différents allèles sont définis par leur taille dépendant du nombre de répétitions du motif élémentaire (il s'agit de marqueurs codominants) après amplification par PCR.

Exemple Allèle 1 : GTCACATATATATATATATATATATATTTG.  
Allèle 2 : GTCACATATATATATATATATATTTG.

Ce sont des séquences que l'on retrouve chez la plupart des eucaryotes, aussi bien sur les autosomes que les chromosomes sexuels. Principalement non codants, ils se trouvent dans les introns et parfois dans les exons. Dans ce dernier cas, le motif répété est un triplet et il peut être à l'origine de maladies neurodégénératives.

1) De façon générale, le maintien de la variabilité génétique intraspécifique est important pour la préservation à long terme d'une espèce. Il existe probablement une relation entre la diversité génétique et la viabilité des populations. La nature exacte de cette relation est complexe, mais on admet généralement que le potentiel évolutif d'une espèce ou d'une population dépend de sa diversité génétique (Beebee et Rowe, 2004). Les microsatellites, lorsqu'ils sont polymorphes au sein d'une espèce, peuvent constituer de bons **estimateurs de la variabilité génétique**.

2) Certains événements de l'**histoire démographique** des populations, par exemple les « goulets d'étranglement » (fortes réductions momentanées du nombre d'individus reproducteurs) peuvent être détectés à l'aide de microsatellites.

3) Les microsatellites peuvent de plus présenter des **applications légales** intéressantes. Par exemple, on peut dans certains cas formuler une hypothèse quant à l'espèce voire au stock d'origine d'un individu, du fait de la présence, chez cet individu, de certains allèles caractéristiques (cependant ce critère n'est pas absolu). Cette méthode peut être utile dans le cas d'espèces de cétacés dont la pêche est soit totalement interdite, soit interdite dans certaines régions.

4) Dans des populations de taille réduite, la **consanguinité** peut être un problème préoccupant lorsqu'elle conduit à l'accumulation d'allèles désavantageux. Les microsatellites, normalement autosomiaux et codominants (les deux allèles de chaque locus sont détectables chez un individu), peuvent être utiles à l'évaluation de l'importance de l'endogamie (croisement d'individus apparentés) dans un groupe d'individus.

## Identification des microsatellites par PCR

### Encadré 2. Rappels : PCR (Mullis et Faloona, 1987).

La PCR permet d'**amplifier** des séquences cibles (par exemple des microsatellites), afin de pouvoir identifier les allèles de l'individu. La spécificité de l'amplification est déterminée par les **amorces** qui sont spécifiques d'une séquence précise et unique du génome.

Les *réactifs élémentaires* nécessaires à la PCR sont les suivants :

- ADN (acide désoxyribonucléique)
- paire d'amorce s'hybridant de part et d'autre de la séquence à amplifier, une amorce s'hybridant sur chaque brin d'ADN
- ADN polymérase thermorésistante provenant de l'organisme *Thermophilus aquaticus*, en abrégé « Taq »
- tampon pour l'enzyme
- désoxynucléotides libres : désoxy adénosine tri-phosphate notée dATP, désoxy cytidine tri-phosphate notée dCTP, désoxy guanine tri-phosphate notée dGTP, désoxy thymidine tri-phosphate notée dTTP. L'ensemble de ces quatre désoxynucléotides est noté dNTP.
- chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>), servant à augmenter la spécificité de l'hybridation des amorces (augmentation de la « stringence des conditions »). En effet, les amorces pourraient s'hybrider sur des séquences de l'ADN génomique donc la complémentarité n'est pas parfaite.

Cette réaction nécessite une *succession déterminée de températures*, maintenues chacune pendant un certain temps. Typiquement on peut utiliser :

- une phase initiale de dénaturation (séparation des deux brins) de l'ADN ; par exemple : 15 min à 95 °C
- un certain nombre de cycles d'amplification (par exemple 30 cycles), chacun constitué :
  - d'une période de **dénaturation** (par exemple à 94 °C)
  - d'une période d'**hybridation** des amorces (par exemple 51 °C)
  - d'une période d'**élongation** (par exemple 72 °C)

Chacune de ces périodes dure typiquement entre 30 s et 90 s. Au maximum, le nombre de copies de la séquence-cible peut être multiplié par deux à chaque cycle.

- une phase finale d'élongation (par exemple 72 °C pendant 10 min).

Les allèles des différents microsatellites sont identifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR, voir encadré 2).

Le génotypage des microsatellites par PCR requiert une petite quantité de tissus, il est ainsi compatible avec des techniques de prélèvement peu invasives (biopsie, prise de sang) sur des animaux morts ou vivants. Cette caractéristique est particulièrement intéressante dans la perspective de l'étude d'espèces menacés.

### Obtention de microsatellites utilisables et polymorphes

Les microsatellites utilisables et polymorphes dans une espèce peuvent être obtenus de plusieurs façons.

Ils peuvent être directement recherchés en « criblant » le génome d'un individu de l'espèce, à l'aide de sondes (fragment d'ADN) constituées d'un motif complémentaire du motif recherché (Rassmann *et al.*, 1991). Ces sondes sont marquées de façon à permettre de repérer les sites sur lesquels elles s'hybrident. Ce processus est long et coûteux, car il faut notamment séquencer chaque microsatellite et la zone adjacente afin de concevoir des amorces convenables, et vérifier le polymorphisme du marqueur en génotypant plusieurs individus.

Alternativement, on peut tester l'amplification, et le cas échéant le polymorphisme, de microsatellites préalablement connus dans des espèces proches. Dans le cas des cétacés, il



semble que ces « amplifications croisées » soient souvent réussies entre diverses espèces au sein de l'Ordre (voir Schlötterer *et al.*, 1991).

### **Objet de cette première partie**

Nous avons réalisé une **base de données** concernant les microsatellites polymorphes décrits et utilisés chez diverses espèces de cétacés (environ 150 marqueurs, avec leurs caractéristiques et leur diversité chez chaque espèce). Cette base de données inclut également nos résultats chez le dauphin bleu-et-blanc *Stenella caeruleoalba* et le dauphin commun *Delphinus delphis*. Cet outil pourra se révéler utile à toute équipe souhaitant entreprendre une étude en génétique des populations de cétacés à l'aide de microsatellites.

Nous avons par ailleurs déterminé la **séquence** nucléotidique de cinq de ces marqueurs chez le dauphin bleu-et-blanc (*Stenella caeruleoalba*) pour vérifier la présence de répétitions et leur nature.

Enfin, nous détaillons les conditions de mise au point de **multiplex** (plusieurs microsatellites amplifiés au cours de la même PCR) permettant une identification rapide des individus et des populations.

# Matériel et Méthodes

## **I. Constitution du tableau de données d'amplification**

Nous avons inclus les données de toute la littérature à laquelle nous avons pu accéder concernant l'amplification de microsatellites chez des cétacés, sur une période de 15 ans (1991 – 2005). Pour chaque locus, lorsque nous avons eu accès à l'information, nous proposons :

- Le nom du locus.
- Le type de motif répété.
- Le code d'accès dans GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).
- La séquence des amorces.

Pour chaque espèce chez laquelle le locus a été testé, nous indiquons :

- Le nombre d'individus testés  $n$ .
- Le nombre d'allèles différents  $N_A$ .
- La proportion d'individus hétérozygotes (hétérozygotie observée)  $H_o$ .
- L'hétérozygotie attendue  $H_e$ . Ce paramètre représente, étant donnée la fréquence observée de chaque allèle, la proportion d'individus qui seraient hétérozygotes dans une population théorique idéale (voir l'encadré 6, seconde partie de ce document). Il ne dépend que des fréquences alléliques, et est d'autant plus élevé que les locus présentent des allèles nombreux et en proportions équilibrées. Les paramètres  $N_A$  et  $H_e$  sont des indicateurs du polymorphisme du marqueur.
- La fourchette de tailles des produits de PCR, utile à la constitution de multiplex.
- La référence de l'étude.

Lorsque plusieurs références mentionnent l'amplification d'un même locus dans une même espèce, et décrivent les mêmes paramètres ( $n$ ,  $N_A$ ,  $H_e$ ,  $H_o$ ...), seuls les résultats de l'étude ayant porté sur le plus grand nombre d'individus apparaissent dans le tableau.

## **II. Manipulations de laboratoire**

### **Rappel : principe général des manipulations de laboratoire**

- L'**extraction d'ADN** permet d'obtenir de l'ADN génomique total à partir d'un échantillon.
- La **PCR** sur ADN génomique permet d'obtenir un grand nombre de copies de la séquence-cible (microsatellite).
- L'**électrophorèse** du produit de PCR permet d'identifier les allèles du microsatellite.
- Le **clonage** et le **séquençage** du produit d'amplification permettent de connaître la séquence de ce produit.

## A. Echantillons

### 1) Espèces étudiées

L'espèce pour laquelle ont été mis au point les multiplex et chez laquelle ont été réalisés les séquençages est le dauphin bleu-et-blanc (*Stenella coeruleoalba*, Meyen 1833). Cent trente-sept individus de cette espèce ont été génotypés pour plusieurs microsatellites, les résultats étant ensuite utilisés pour une étude de génétique des populations présentée en seconde partie de ce document.

Par ailleurs, nous avons testé l'amplification d'un marqueur (GATA053) chez les espèces suivantes :

- le dauphin commun *Delphinus delphis* (Linnæus, 1758) (8 individus)
- le grand dauphin *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) (3 individus)
- le dauphin de Risso *Grampus griseus* (Cuvier, 1812) (2 individus)
- le globicéphale noir *Globicephala melas* (Traill, 1809) (4 individus)
- la baleine à bec de Cuvier *Ziphius cavirostris* (Cuvier, 1823) (1 individu)
- le cachalot nain *Kogia simus* (Owen, 1866) (1 individu)
- le cachalot pygmée *Kogia breviceps* (Blainville, 1838) (2 individus)
- le rorqual museau-pointu *Balænoptera acutorostrata* (Lacépède, 1804) (2 individus)
- la baleine grise *Eschrichtius robustus* (Lilljeborg, 1861) (6 individus).

### 2) Nature des échantillons ; leur obtention

Pour l'analyse génétique, n'importe quel tissu contenant des cellules nucléées peut en principe être utilisé. Cependant, les meilleurs résultats sont observés lorsqu'on utilise du foie, du rein, du muscle, ou à défaut de la peau.

Les échantillons proviennent d'animaux morts échoués. Lors d'échouages, divers organismes et particuliers recueillent des échantillons utilisables pour des études de génétique. De nombreux échantillons nous ont ainsi gracieusement été fournis.

### 3) Conservation des échantillons

La conservation idéale est la congélation ; cependant, des échantillons conservés dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO), ou bien déshydratés, peuvent en général facilement être utilisés. La conservation dans l'alcool demande un rinçage à l'eau préalable à l'extraction d'ADN. La conservation dans le formol n'est pas conseillée à cause des interactions entre ce dernier et l'ADN (en revanche, le formol permet une conservation à très long terme).

Au laboratoire, les échantillons sont conservés congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## B. Extraction d'ADN

L'extraction est réalisée en utilisant le phénol :chloroforme, suivant le protocole édité par Sambrook *et al.* (2000), modifié d'après M. Macé et F. Magné (communication personnelle).

### 1) Les réactifs et leur conservation

- Ethanol, isopropanol ; sous une hotte aspirante.
- Solution de phénol\* :chloroforme\* :alcool isoamyl\* aux proportions volumiques 25 :24 :1 ; à  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Tampon de lyse (20 mM de Tris-Cl à pH 8 ; 5 mM d'éthylène di-amine tétra acétate – EDTA - à pH 8 ; 400 mM de chlorure de sodium ; 1 gramme de sodium dodécyl sulfate\* dans 100 mL de solution) stérilisé par microfiltration puis conservé à température ambiante.

- Tampon d'éluion (100 mM de Tris-Cl et 10 mM d'éthylène di-amine tétra acétate, EDTA, à pH 8) autoclavé puis conservé à température ambiante.
- Protéinase K (solution à 20 mg/mL dans du Tris-Cl – 50 mM et pH 8 – et acétate de calcium – 1,5 mM) ; à –20 °C.

\*Les produits signalés par un astérisque sont très **toxiques**, il faut les manipuler sous une hotte aspirante, avec gants, masque, et lunettes de protection.

## 2) Les principales étapes

1. La protéinase K est ajoutée au tampon de lyse, pour une concentration finale au moins égale à 400 µg/mL, et un volume final d'un mL par échantillon. Environ 0,1 g d'échantillon est coupé en morceaux et mis en présence d'un mL de la solution de protéinase K. L'ensemble est laissé à incuber toute une nuit à 55 °C, avec une agitation modérée.
2. Une fois la digestion complète, 1 mL de phénol :chloroforme :alcool isoamyl est ajouté, et l'ensemble est agité à température ambiante pendant 30 min au moins.
3. La solution est centrifugée à 13 000 tours par minute (tpm) pendant 5 min. La phase aqueuse (supérieure) est transférée dans un nouveau tube, et la phase organique est éliminée.
4. Si on le souhaite, un lavage de la phase aqueuse avec 1 mL d'éther peut être réalisé, pour éliminer les traces de phénol. Le tube est tourné et retourné, puis centrifugé 5 min. L'éther (phase supérieure) est éliminé.
5. L'ADN est précipité avec 1 mL d'isopropanol, et l'ensemble centrifugé 15 min à 13 000 tpm à 4 °C.
6. La phase liquide est soigneusement retirée. Le culot d'ADN est rincé avec 1 mL d'éthanol à 70 %. La solution est centrifugée 5 min. L'éthanol est soigneusement retiré, et le culot est laissé à sécher à l'air libre pendant 15 min environ.
7. Le culot est dissous par agitation dans 0,2 mL de tampon d'éluion pendant une nuit à 4 °C.

L'ADN peut être conservé à 4 °C pendant plusieurs jours ; pour des durées supérieures, il peut être congelé.

## 3) Constitution d'aliqots directement utilisables pour la PCR

La concentration de la solution d'ADN est estimée *via* la mesure de sa densité optique. Les concentrations obtenues peuvent varier par exemple de 10 à plus de 1000 ng/µL.

La pureté de la solution est estimée *via* le ratio : absorbance<sub>260 nm</sub> / absorbance<sub>280 nm</sub>. Un ratio inférieur à 1,8 indique une contamination par des protéines ou des substances aromatiques (par exemple : phénol). Un ratio supérieur à 2 indique une possible contamination par l'acide ribonucléique (ARN). En pratique, les PCR ont par la suite bien fonctionné lorsque ces ratios étaient compris entre 1,6 et 2,2.

NB : cette mesure ne donne pas d'information sur l'état de dégradation de l'ADN ; cependant, des fragments de petite taille comme les microsatellites étudiés ici (< 350 paires de bases, pb) peuvent être amplifiés lorsque l'ADN est partiellement dégradé.

Après cette mesure, des aliqots à 10 ng/µL sont constitués en diluant de façon appropriée dans de l'eau stérilisée.

### C. Choix des microsatellites

Les microsatellites que nous avons étudiés au laboratoire ont été choisis, suite à une revue bibliographique, dans la perspective d'une étude expérimentale de génétique des populations (décrite en seconde partie de ce document) chez *Stenella cæruleoalba*.

Les critères de choix ont été les suivants.

#### 1) Polymorphisme

Nous avons retenu des marqueurs pour lesquels au moins six allèles différents avaient été identifiés dans une même espèce.

#### 2) Type de motif répété

Il y a moins de résultats ambigus avec des répétitions de tétramères de bases (par exemple (GATA)<sub>n</sub>) qu'avec des répétitions de dimères de bases (par exemple (CA)<sub>n</sub>) lorsqu'on « lit » le résultat de la migration sur gel. En effet, les différents allèles diffèrent entre eux de multiples de quatre paires de bases, donc le résultat brut (décimal) donné par le programme de lecture est plus facile à assigner à un allèle (*cf infra*).

#### 3) Amplification préalable chez *Stenella cæruleoalba*

Les zones adjacentes aux microsatellites, où s'hybrident les amorces de la PCR, sont de façon générale bien conservées au sein de l'Ordre des cétacés (voir Schlötterer *et al.*, 1991). Donc un marqueur isolé chez une autre espèce a des chances d'être amplifié avec succès chez *Stenella cæruleoalba*, sans toutefois que le succès de cette amplification soit certain. Ainsi, par mesure de sécurité, nous avons choisi trois marqueurs qui avaient déjà été amplifiés chez *Stenella cæruleoalba*.

#### 4) Bilan des six microsatellites choisis

<b><u>Locus</u></b>	<b>Motif</b>	<b>Isolé chez... (référence)</b>	<b>Résultats publiés chez <i>Stenella cæruleoalba</i></b>
<b>MK6</b>	(GT) <sub>n</sub>	<i>Tursiops aduncus</i> (1)	22 allèles, Ho=0,78 (2)
<b>MK9</b>	(CA) <sub>n</sub>	<i>Tursiops aduncus</i> (1)	12 allèles, Ho=0,71 (2)
<b>EV92Mn</b>	(GT) <sub>n</sub>	<i>Megaptera novæangliæ</i> (3)	7 allèles (3)
<b>GATA053</b>	(GATA) <sub>n</sub>	<i>Megaptera novæangliæ</i> (4)	non amplifié
<b>GATA098</b>	(GATA) <sub>n</sub>	<i>Megaptera novæangliæ</i> (4)	non amplifié
<b>GATA417</b>	(GATA) <sub>n</sub>	<i>Megaptera novæangliæ</i> (4)	non amplifié

*Tursiops aduncus* : grand dauphin, type aduncus. *Megaptera novæangliæ* (Borowski, 1781) : Baleine à bosse. Ho : hétérozygotie observée, soit : pourcentage d'individus hétérozygotes pour ce marqueur. (1) : Krützen *et al.* (2001) ; (2) : Valsecchi *et al.* (2004) ; (3) : Valsecchi et Amos (1996) ; (4) : Palsbøll *et al.* (1997).

### D. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Pour des rappels sur la PCR et la nature des réactifs utilisés, se reporter à l'encadré 2.

### 1) Amorces et « multiplex »

Plusieurs microsattellites peuvent être amplifiés au cours de la même PCR. On parle de « multiplex » de microsattellites. Dans ce cas, on utilise un mélange commercial appelé « Master Mix », contenant tous les réactifs, à l'exception de l'ADN génomique et des amorces. Ce mélange est fourni par la société Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne, référence catalogue : 206143). On emploie également plusieurs paires d'amorces, chacune s'hybridant de part et d'autre d'un locus à amplifier. Les amorces employées ici sont de la société Proligo (Proligo, France).

Lorsqu'on associe plusieurs marqueurs en un « multiplex », les contraintes sont les suivantes :

- des conditions de PCR identiques (température d'hybridation de l'amorce lors des cycles de PCR, nombre de cycles...) doivent permettre une bonne amplification de tous les marqueurs du multiplex.
- les produits d'amplification des différents marqueurs doivent pouvoir être distingués les uns des autres, soit par leur taille, soit par la couleur du marquage de leurs amorces.

### 2) Thermocycleur et programmation

La succession de températures adéquate est obtenue à l'aide d'un thermocycleur, par exemple le thermocycleur à gradient Eppendorf Mastercycler 5331 (Eppendorf AG, Hambourg, Allemagne). Le programme employé peut différer d'un multiplex à l'autre. En particulier, les paramètres suivants sont susceptibles de varier :

- température d'hybridation des amorces : l'hybridation des amorces est d'autant plus spécifique que cette température est élevée.
- nombre de cycles : l'amplification est plus intense lorsque le nombre de cycles est plus élevé.

Par exemple, nous avons employé le programme suivant :

<b>Etape</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Durée</b>
1	95	15 min
2	94	30 s
3	50,5	90 s
4	72	90 s
5	<i>retour à l'étape 2</i>	<i>33 fois</i>
6	72	10 min

L'utilité de chaque étape a été rappelée dans l'encadré 2 (section « Introduction »).

### 3) Mode opératoire

Voici la description d'une PCR en multiplex typique. Dans chaque tube de réaction (« tube PCR ») de 20 µL sont mis en présence :

- 10 µL de Master Mix,
- 4 µL de mélange d'amorces,
- 4 µL d'eau,
- 2 µL d'ADN génomique.

1. Les réactifs sont éventuellement décongelés.
2. Les réactifs sont placés dans un bac de glace, à l'exception des échantillons d'ADN qui peuvent être placés à 37 °C avec une agitation modérée pour une bonne homogénéisation.

Les étapes 3. à 6. peuvent être réalisées sous une hotte préalablement soumise à l'action de rayons ultra-violet, qui ont pour effet de détruire l'ADN résiduel et de prévenir ainsi les

contaminations. Le mélange d'amorces et la dilution de Master Mix sont préparés pour l'ensemble des tubes PCR, et seront ensuite répartis entre ces derniers.

3. Le mélange d'amorces est préparé. Les amorces correspondant aux microsatellites que l'on veut amplifier sont diluées dans de l'eau très pure, fournie avec le Kit Multiplex (Qiagen). Ce mélange d'amorces est préparé de façon à être cinq fois plus concentré en amorces que la solution finale. On en mettra donc 4 µL par réaction de 20 µL.

4. Le Master Mix est dilué. Pour chaque tube PCR, on emploie 10 µL de Master Mix et 4 µL d'eau.

5. Quatre microlitres de mélange d'amorces et 10 µL de Master Mix sont déposés dans chaque tube.

6. Deux microlitres d'aliquot d'ADN-échantillon à 10 ng/µL sont déposés dans chaque tube.

7. Le programme choisi est lancé, et les tubes PCR sont placés dans le thermocycleur.

#### 4) Exemple de feuille de manipulation

La figure 4 présente une feuille de manipulation typique.

PCR microsat MK9-GATA098-GATA053				PRIMERS dilution				Primer Mix (5X)				
MIX	N=	12		MK9f	5µl/75	CI 319 µM	CF 20µM	6	µl	C.F.2.5µM		
Master Mix		10	120	MK9r	5µl/60	CI 345 µM	CF 20µM	6	µl	C.F.2.5µM		
eau		4	48	GATA098F	5µl/75	CI 304 µM	CF 20µM	3	µl	C.F.1.25µM		
Primer Mix	4 C.F.=0,5µM et 0,25µM et 0,2µM		48	GATA098R	5µl/60	CI 250 µM	CF 20µM	3	µl	C.F.1.25µM		
VF		20	240	VreactTOT	216	GATA053F	5µl/75	CI 319 µM	CF 20µM	2,4	µl	C.F.1.0µM
				GATA053R	5µl/60	CI 345 µM	CF 20µM	2,4	µl	C.F.1.0µM		
								25,2	µl	Eau		
								48	µl	VF		

Programme	MICR51	95°C/15 min	94°C/30 s	51°C/90 s	x34	72°C/10 min

tube numero	1	2	3	4	5	6	7	8
echantillon	R31	R32	R33	R34	R35	R36	R37	R14
tube numero	9	10	11	12	13	14	15	16
echantillon	Sc19311	".."						
tube numero	17	18	19	20	21	22	23	24
echantillon								
tube numero	25	26	27	28	29	30	31	32
echantillon								

Vol ADN/tube	2
Vreact="	18 (doit être égal a 18)
thermocycleur	BIBLOC
Quantite d'ADN utilisee (ng/tube) (DO)	20

**Fig. 4.** Feuille de manipulation correspondant à une PCR en multiplex de trois locus. La feuille présente les informations suivantes :

- nom des locus à amplifier,
- nombre de tubes pour lesquels les solutions (mélange d'amorces...) doivent être préparées (dans cet exemple la PCR compte 10 tubes, cependant on prépare suffisamment de réactifs pour 12 tubes afin de tenir compte des imprécisions de pipetage),
- quantités de réactifs par tube et quantités totales,
- dilution des solutions-mère d'amorces,
- composition du mélange d'amorces,
- nom et caractéristiques du programme, nom du thermocycleur,
- nom des échantillons et numéro du tube dans lequel ils sont placés.

## E. Électrophorèse en gel d'acrylamide

### 1) Principe de l'électrophorèse

L'appareil utilisé est le séquenceur ABI377 Sequence Analyser Perkin-Elmer (Applied Biosystems, Foster City, CA, États-Unis d'Amérique). Il permet d'évaluer la taille des

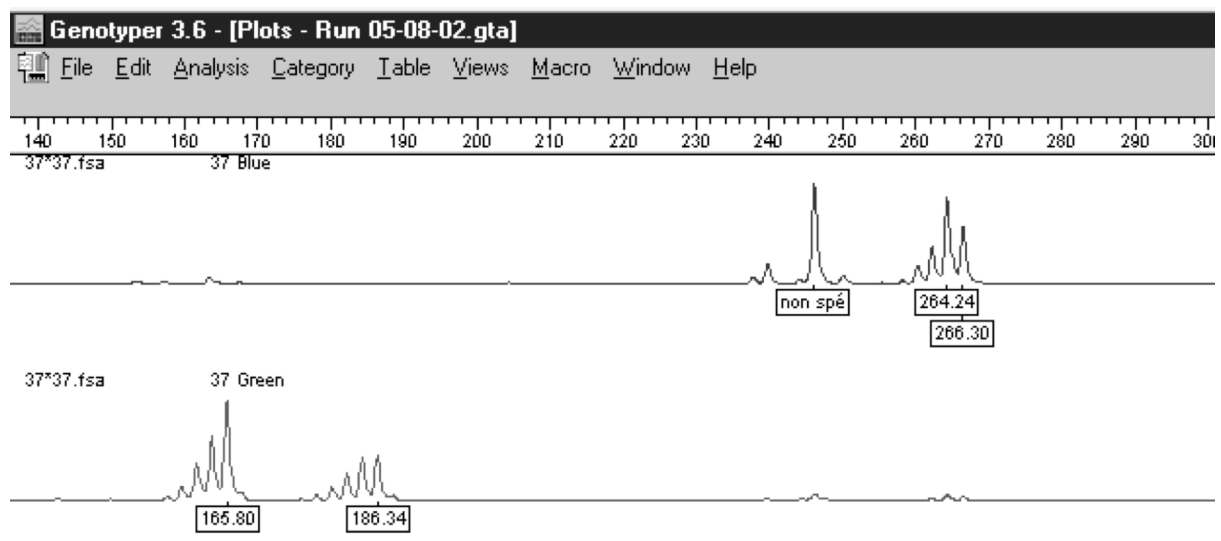
produits d'amplification.

Ces derniers sont déposés à une extrémité d'un gel d'acrylamide. Un champ électrique provoque leur migration, d'autant plus rapide que les produits sont petits. À l'autre extrémité du gel, un laser détecte le passage des produits ; en effet, lors de la PCR, une amorce de chaque paire est marquée par une molécule détectée par le laser. Dans un multiplex, les amorces des différents microsatellites peuvent être marquées par différentes molécules afin de permettre leur discrimination par la couleur.

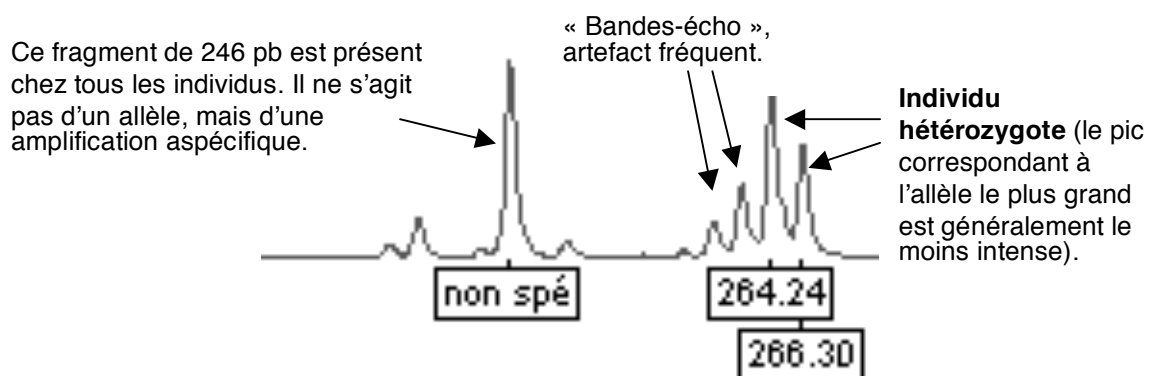
Les produits migrent sur le gel pendant une durée déterminée, et le programme informatique associé au séquenceur estime leur taille selon le temps mis pour migrer d'une extrémité à l'autre du gel.

## 2) Détermination des génotypes

Le génotype des individus est déterminé à l'aide d'un programme associé au séquenceur : ABI Genotyper 3.6 (voir la figure 5).



a)



b)

**Fig. 5.** Images obtenues à partir du programme ABI Genotyper. **a)** La ligne du haut correspond au marqueur EV92Mn, pour lequel une amorce est marquée en bleu. La ligne du bas correspond au marqueur MK6, pour lequel une amorce est marquée en vert.

**b)** Détail de l'analyse de la morphologie des pics pour le marqueur EV92Mn. pb, paires de bases.



## F. Clonage et réaction de séquence

Le clonage bactérien sert à obtenir la séquence-cible « purifiée », *ie* : en grande quantité et exempte de séquences « parasites », en vue de pouvoir réaliser la réaction de séquençage.

### 1) Principales étapes du clonage

(D'après F. Magné, M. Macé et B. Crouau-Roy).

**1<sup>er</sup> jour.** Ligation.

Il s'agit d'**intégrer le fragment amplifié dans un vecteur**, par exemple un plasmide. Cette réaction se réalise en une nuit, à 4 °C, en présence d'une ligase et de son tampon.

**2<sup>nd</sup> jour.** Transformation bactérienne.

Il s'agit d'**intégrer le vecteur** (avec son fragment inséré, appelé « insert ») **dans une bactérie**, puis de favoriser la multiplication des bactéries. Les bactéries compétentes pour cette transformation sont conservées à -80 °C. Elles sont décongelées en 5 min dans de la glace fondante juste avant la transformation, puis mises en présence du plasmide pendant 20 min, toujours dans la glace. Elles incorporent le plasmide du fait d'un choc thermique (45 s à 42 °C, puis 2 min à 37 °C). Puis elles incubent durant 1 h à 37 °C en milieu liquide, avant d'être étalées sur le milieu de culture « LB Agar » sur lequel elles passeront une nuit à 37 °C.

**3<sup>ème</sup> jour.** Sélection des colonies.

a- Le plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline. Sur milieu présentant cet antibiotique, seules se multiplieront les bactéries ayant effectivement incorporé le vecteur.

b- Par ailleurs, le plasmide contient le gène « lacZ », codant pour une  $\beta$ -galactosidase qui provoque l'apparition d'une couleur bleu en présence de X-galactose et d'un isopropyl thiogalactoside (IPTG), présents dans le milieu de culture. Or, l'insertion du produit de PCR a lieu à l'intérieur même de ce gène, ce qui empêche sa traduction. Ainsi, **les colonies de couleur blanche contiennent un plasmide ayant effectivement intégré un insert**, alors que les colonies bleues contiennent un plasmide n'ayant pas intégré cet insert.

Contrôle de la nature des inserts.

En fonction de la spécificité de la PCR, les produits d'amplification peuvent être variés ; des séquences différentes du marqueur peuvent être amplifiées et donc ensuite incorporées dans les plasmides.

Pour vérifier la nature des inserts, on réalise une PCR sur un certain nombre de colonies blanches (suivant la spécificité de la PCR), par exemple huit colonies blanches pour une PCR de spécificité plutôt basse. Cette PCR est réalisée à l'aide des amorces habituelles servant à l'amplification du marqueur, afin de garantir la spécificité de l'amplification.

Le produit d'amplification migre par électrophorèse sur gel d'agarose, et **les clones ayant effectivement incorporé le marqueur** sont reconnus suivant leur taille. La figure 6 montre un tel gel d'agarose.

Culture en milieu liquide.

On prépare un milieu de culture « LB Broth » autoclavé, contenant de l'ampicilline. Chaque colonie bactérienne sélectionnée est placée dans un tube. Les tubes sont agités modérément (environ 200 tpm) à 37 °C durant une nuit. **Ainsi, les bactéries contenant les fragments d'intérêt sont multipliées.**

**4<sup>ème</sup> jour.** Purification des fragments clonés.

**Les vecteurs sont extraits des bactéries et purifiés** grâce au kit de minipréparation « QIAprep spin minipreps kit » (Qiagen). Ce procédé est basé sur une lyse alcaline des cellules bactériennes. L'ADN libéré est ensuite adsorbé sur une membrane de silice contenue dans une mini-colonne. L'ARN, les protéines et les métabolites ne sont pas retenus par cette membrane, celle-ci se chargeant d'ADN au cours d'une étape de centrifugation. La silice chargée d'ADN est lavée avec un tampon particulier afin de purifier le matériel et notamment



# Résultats

## I. Banque de données d'amplification

### A. Bilan des amplifications

Le tableau 2 présente le résultat de la revue bibliographique des résultats d'amplification de microsatellites chez des cétacés.

**Tab. 2.** Microsatellites ayant été amplifiés chez des cétacés.

He : hétérozygotie attendue.

Ho : hétérozygotie observée.

\* : indique l'espèce chez laquelle le locus a d'abord été isolé.

P : le produit d'amplification est polymorphe.

- : l'amplification a échoué.

? : l'amplification ambiguë.

† : nombre d'allèles après génotypage de 103 *Tursiops truncatus*.

¥ : les données de He et Ho font référence au génotypage de 24 *Tursiops truncatus*.

# : la fourchette de tailles fait référence à l'ensemble des espèces testées par Valsecchi et Amos (1996).

∂ : ce marqueur est lié au chromosome X ; donc le nombre total d'allèles identifiés est indiqué au lieu du nombre d'individus ; de même, Ho n'a été calculé que pour les femelles.

Remarque 1 : Dans certaines études, les nombres d'allèles différents et les valeurs de He et Ho ont été calculés par populations au sein de l'espèce. Dans de tels cas, nous présentons ici le nombre minimal d'allèles différents, et nous donnons les deux valeurs extrêmes de Ho et He par population.

Remarque 2 : Dans certaines études, le nombre d'individus pour lesquels l'amplification a échoué n'est pas indiqué. Dans de tels cas, la valeur donnée ici comme « nombre d'individus testés » peut être supérieure au nombre d'individus réellement génotypés.

Information sur le locus	Espèce	Nombre d'individus testés (n)	Nombre d'allèles différents (N <sub>A</sub> )	Taille des produits d'amplification	He	Ho	Référence
<b>GT023</b> , (GT)n GenBank : AF309690 amorces : CATTTCCTACCCACCTGTCAT GTCCAGGCTCTGCACTCTG	<i>Megaptera novaeangliae</i> * <i>Balaenoptera acutorostrata</i> <i>Balaenoptera musculus</i> <i>Balaenoptera physalus</i>	353 91 92 65	8 9 8 7	114-128 100-116 122-136 112-138	0,80 0,81 0,83 0,64	0,82 0,86 0,85 0,66	Bérubé <i>et al.</i> (2000).
<b>GT101</b> , (GT)n GenBank : AF309691 amorces : CTTCTCCTAGTGCTCCCCGC CTGTGCTGGTATATGCTATCC	<i>Megaptera novaeangliae</i> * <i>Balaenoptera musculus</i> <i>Balaenoptera physalus</i>	4 92 4	2 9 5	92-94 85-101 94-112	0,67	0,65	Bérubé <i>et al.</i> (2000).
<b>GT195</b> , (GT)n GenBank : amorces : TGAGAAAGATGACTATGACTC TGAAGTAACAGTTAATATAACC	<i>Megaptera novaeangliae</i> * <i>Balaenoptera acutorostrata</i> <i>Balaenoptera musculus</i> <i>Balaenoptera physalus</i>	353 3 4 65	5 2 2 8	151-163 162-166 146-148 158-176	0,65  0,70	0,65  0,74	Bérubé <i>et al.</i> (2000).
<b>GT211</b> , (GT)n GenBank : AF309693 amorces : CATCTGTGCTTCCACAAGCCC GGCACAAGTCAGTAAGGTAGG	<i>Megaptera novaeangliae</i> * <i>Balaenoptera acutorostrata</i> <i>Balaenoptera physalus</i>	353 21 73	7 7 6	196-208 185-203 193-213	0,82 0,75 0,55	0,80 0,85 0,60	Bérubé <i>et al.</i> (2000).
<b>GT271</b> , (GT)n GenBank : AF309694 amorces : GCTCACACTGGTAATCTGTGG CCCTAGGAAGGATAGACATAG	<i>Megaptera novaeangliae</i> * <i>Balaenoptera acutorostrata</i> <i>Balaenoptera musculus</i> <i>Balaenoptera physalus</i>	353 2 4 65	10 3 3 6	97-123 101-104 101-105 112-128	0,59  0,43	0,57  0,45	Bérubé <i>et al.</i> (2000).
<b>GT307</b> , (GT)n GenBank : AF309695 amorces : ATATAGTTATATCTGTTGCTC TTAGCGAGTCATATTATAAAG	<i>Megaptera novaeangliae</i> * <i>Balaenoptera acutorostrata</i> <i>Balaenoptera musculus</i> <i>Balaenoptera physalus</i>	353 2 4 65	7 3 3 7	127-139 135-141 127-133 121-139	0,68  0,64	0,67  0,70	Bérubé <i>et al.</i> (2000).
<b>GT310</b> , (GT)n GenBank : AF309696 amorces : TAACTTGTGGAAGATGCCAAC GAATACTCCCAGTAGTTTCTC	<i>Megaptera novaeangliae</i> * <i>Balaenoptera acutorostrata</i> <i>Balaenoptera musculus</i> <i>Balaenoptera physalus</i>	4 21 4 65	2 6 3 2	120-106 112-122 110-116 104-130	0,70  0,50	0,60  0,54	Bérubé <i>et al.</i> (2000).
<b>GT509</b> , (GT)n GenBank : AF309697 amorces : CAGCTGCAAAACCTTGACATT GTAAAATGTTTCCAGTGCATC	<i>Megaptera novaeangliae</i> * <i>Balaenoptera acutorostrata</i>	6 169	1 11	195 195-217	0,81	0,81	Bérubé <i>et al.</i> (2000).
<b>GT575</b> , (GT)n GenBank : AF309698 amorces : TATAAGTGAATACAAAGACCC ACCATCAACTGGAAGTCTTTC	<i>Megaptera novaeangliae</i> * <i>Balaenoptera acutorostrata</i> <i>Balaenoptera physalus</i>	5 21 5	6 5 5	140-154 195-211 140-154	0,85	0,80	Bérubé <i>et al.</i> (2000).
<b>GT011</b> , (GT)n	<i>Megaptera novaeangliae</i> *						Bérubé <i>et al.</i> (1998).





	<i>Globicephala melas</i> <i>Pseudorca crassidens</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novæangliæ</i> <i>Eschrichtius robustus</i> <i>Balæna mysticetus</i> <i>Physeter macrocephalus</i> <i>Mesoplodon bidens</i> <i>Eubalæna</i> spp. <i>Phocænoides dalli</i>	1 1 1 1 1 1 1 1 1 119	- 1 2 - 2 - 2 - - -			≥0,5	Waldick <i>et al.</i> (2002). Escorza-Treviño et Dizon (2000).
<b>DirFCB7</b> , (GT)n GenBank : G02110 amorces : GGACTCAGCTCTCCACCTC TTATTTACTTTCAGTGTGTTTTCAC	<i>Delphinapterus leucas</i> * <i>Monodon monoceros</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Phocæna phocæna</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Lagenorhynchus albirostris</i> <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> <i>Orcella brevirostris</i> <i>Globicephala melas</i> <i>Pseudorca crassidens</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novæangliæ</i> <i>Eschrichtius robustus</i> <i>Balæna mysticetus</i> <i>Physeter macrocephalus</i> <i>Mesoplodon bidens</i>	50 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	5 2 - - 1 1 2 - 2 1 1 1 1 - - 1		0,53		Buchanan <i>et al.</i> (1996).
<b>DirFCB8</b> , (TG)n GenBank : G02097 amorces : CACTAAAGATGATATTCTCTAGGTCC AAGTATGGAAGCAACCCAAATGCC	<i>Delphinapterus leucas</i> * <i>Monodon monoceros</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Phocæna phocæna</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Lagenorhynchus albirostris</i> <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> <i>Orcella brevirostris</i> <i>Globicephala melas</i> <i>Pseudorca crassidens</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novæangliæ</i> <i>Eschrichtius robustus</i> <i>Balæna mysticetus</i> <i>Physeter macrocephalus</i> <i>Mesoplodon bidens</i>	50 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	7 2 2 2 2 1 2 - 2 - - - - - 2 -		0,78		Buchanan <i>et al.</i> (1996).
<b>DirFCB10</b> , (CA)n GenBank : G02103 amorces : AAGTGGTTGCCAAGGAAGTCTG ATCAGATGCTGGAAAGGTACAGAG	<i>Delphinapterus leucas</i> * <i>Monodon monoceros</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Phocæna phocæna</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Lagenorhynchus albirostris</i> <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> <i>Orcella brevirostris</i>	50 1 1 1 1 1 1 1	7 1 2 1 1 1 1 -		0,81		Buchanan <i>et al.</i> (1996).

	<i>Globicephala melas</i> <i>Pseudorca crassidens</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novæangliæ</i> <i>Eschrichtius robustus</i> <i>Balæna mysticetus</i> <i>Physeter macrocephalus</i> <i>Mesoplodon bidens</i>	1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 -				
<b>DirFCB11</b> , (CA)n GenBank : G02104 amorces : TTTCCCATGTTGTTCTAACGAAGAC GCCAGCCCAGAGCTGTAGTCC	<i>Delphinapterus leucas</i> * <i>Monodon monoceros</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Phocæna phocæna</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Lagenorhynchus albirostris</i> <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> <i>Orcælla brevirostris</i> <i>Globicephala melas</i> <i>Pseudorca crassidens</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novæangliæ</i> <i>Eschrichtius robustus</i> <i>Balæna mysticetus</i> <i>Physeter macrocephalus</i> <i>Mesoplodon bidens</i>	50 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	8 1 2 1 1 2 2 - - 2 2 1 1 - - 2		0,48		Buchanan <i>et al.</i> (1996).
<b>DirFCB12</b> , (CA)n GenBank : G02105 amorces : CTCAGTTAATATACATGTAATGCATGC CAAAGAGATAGCTAAATAAACAGTAAC	<i>Delphinapterus leucas</i> * <i>Monodon monoceros</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Phocæna phocæna</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Lagenorhynchus albirostris</i> <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> <i>Orcælla brevirostris</i> <i>Globicephala melas</i> <i>Pseudorca crassidens</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novæangliæ</i> <i>Eschrichtius robustus</i> <i>Balæna mysticetus</i> <i>Physeter macrocephalus</i> <i>Mesoplodon bidens</i>	50 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	6 2 2 2 2 1 - 1 1 - 1 2 1 - - 1		0,37		Buchanan <i>et al.</i> (1996).
<b>DirFCB13</b> , (TG)n GenBank : G02106 amorces : ATGGGAAAGGAAGCTGTAGAGAGT CAGATGACGACAGAGCCCAGATG	<i>Delphinapterus leucas</i> * <i>Monodon monoceros</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Phocæna phocæna</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Lagenorhynchus albirostris</i> <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> <i>Orcælla brevirostris</i> <i>Globicephala melas</i> <i>Pseudorca crassidens</i> <i>Balænoptera physalus</i>	50 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	3 1 2 1 1 2 1 1 1 - 1		0,27		Buchanan <i>et al.</i> (1996).



	<i>Megaptera novaeangliae</i> <i>Eschrichtius robustus</i> <i>Balæna mysticetus</i> <i>Physeter macrocephalus</i> <i>Mesoplodon bidens</i> <i>Eubalæna</i> spp.	1 1 1 1 1 -	2 2 1 - 1 -				Waldick <i>et al.</i> (2002).
<b>DirFCB14</b> , (TC)n GenBank : G02107 amorces : CTACATTTGCCTCTTATAGACATAGC AAGTTGTCTTAGTTAGTCTGTGCTC	<i>Delphinapterus leucas</i> * <i>Monodon monoceros</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Phocæna phocæna</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Lagenorhynchus albirostris</i> <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> <i>Orcælla brevirostris</i> <i>Globicephala melas</i> <i>Pseudorca crassidens</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novaeangliæ</i> <i>Eschrichtius robustus</i> <i>Balæna mysticetus</i> <i>Physeter macrocephalus</i> <i>Mesoplodon bidens</i>	50 1	5 1 2 1 1 2 1 - - - 1 1 1 2 2 2 1 1 2 2 1		0,66		Buchanan <i>et al.</i> (1996).
<b>DirFCB16</b> , (CA)n GenBank : G02109 amorces : TCACACCCTATCTTTTCATCATAGC TGATAATTCTGCATGGTATAATCGC	<i>Delphinapterus leucas</i> * <i>Monodon monoceros</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Phocæna phocæna</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Lagenorhynchus albirostris</i> <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> <i>Orcælla brevirostris</i> <i>Globicephala melas</i> <i>Pseudorca crassidens</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novaeangliæ</i> <i>Eschrichtius robustus</i> <i>Balæna mysticetus</i> <i>Physeter macrocephalus</i> <i>Mesoplodon bidens</i> <i>Eubalæna</i> spp.	50 1	9 2 1 1 1 1 2 - 2 2 - - - - 1 - - 1 - - -		0,64		Buchanan <i>et al.</i> (1996).  Waldick <i>et al.</i> (2002).



amores : GAGAAAGCTGCTGCCAAACT CTGCATTAGGAGCACGGAGT	<i>Delphinus delphis</i> <i>Delphinapterus leucas</i> <i>Eschrichtius robustus</i> <i>Globicephala macrorhynchus</i> <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Steno bredanensis</i> <i>Stenella clymene</i>	2 1 1 2 3 3 3 2	H - 1 1 - - 1 -				
<b>Ttru GT<sub>39</sub></b> , (CA)n GenBank : AF416504 amores : GTCCCACCCACCCATACTC CCTTTTCCCTGTCCTCA	<i>Tursiops truncatus*</i> <i>Cephalorhynchus commersonii</i> <i>Delphinus delphis</i> <i>Delphinapterus leucas</i> <i>Eschrichtius robustus</i> <i>Globicephala macrorhynchus</i> <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Steno bredanensis</i> <i>Stenella clymene</i>	24 (103) <sup>†</sup> 3 2 1 1 2 3 3 3 2	3 (7) <sup>†</sup> H - H 1 - H 1 1 H	158	0,65 <sup>y</sup>	0,50 <sup>y</sup>	Caldwell <i>et al.</i> (2002)
<b>Ttru GT<sub>48</sub></b> , (CT)n and (CA)n GenBank : AF416505 amores : GAGAAAAGAAAACCTCTGCCTGAA CCAGGACTTCCCCAATACT	<i>Tursiops truncatus*</i> <i>Cephalorhynchus commersonii</i> <i>Delphinus delphis</i> <i>Delphinapterus leucas</i> <i>Eschrichtius robustus</i> <i>Globicephala macrorhynchus</i> <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Steno bredanensis</i> <i>Stenella clymene</i>	24 (103) <sup>†</sup> 3 2 1 1 2 3 3 3 2	5 (11) <sup>†</sup> H H H H H H H H H	199	0,45 <sup>y</sup>	0,42 <sup>y</sup>	Caldwell <i>et al.</i> (2002).
<b>Ttru GT<sub>51</sub></b> , (GT)n GenBank : AF416506 amores : GTCCAGTTTCCCTCCAATGGT TCGGTATCTGACTGCTGTGG	<i>Tursiops truncatus*</i> <i>Cephalorhynchus commersonii</i> <i>Delphinus delphis</i> <i>Delphinapterus leucas</i> <i>Eschrichtius robustus</i> <i>Globicephala macrorhynchus</i> <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Steno bredanensis</i> <i>Stenella clymene</i>	24 (103) <sup>†</sup> 3 2 1 1 2 3 3 3 2	3 (10) <sup>†</sup> H H H - H H - H H	211	0,58 <sup>y</sup>	0,67 <sup>y</sup>	Caldwell <i>et al.</i> (2002).
<b>Ttru GT<sub>142</sub></b> , (TG)n GenBank : AF416507 amores : CTGGGTCAAAAAGGAAGAGC CCGCTGGGAAGAAACAATAG	<i>Tursiops truncatus*</i> <i>Cephalorhynchus commersonii</i> <i>Delphinus delphis</i> <i>Delphinapterus leucas</i> <i>Eschrichtius robustus</i> <i>Globicephala macrorhynchus</i> <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Steno bredanensis</i> <i>Stenella clymene</i>	24 (103) <sup>†</sup> 3 2 1 1 2 3 3 3 2	5 (10) <sup>†</sup> H H - H H H H H 1	199	0,67 <sup>y</sup>	0,58 <sup>y</sup>	Caldwell <i>et al.</i> (2002).
<b>KWM2a</b> , (CA)n amores : GCTGTGAAAATTAATGT	<i>Orcinus orca*</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Tursiops truncatus</i>	60 83 162	7 7 ≥10	139-163	0,607≤He≤0,837	0,72 0,615≤Ho≤0,762	Hoelzel <i>et al.</i> (1998). Hoelzel <i>et al.</i> (2002). Natoli <i>et al.</i> (2004).

CACTGTGGACAAATGTAA	<i>Tursiops aduncus</i> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Delphinus delphis</i>	107 55 58 102 18	4 14 6 9 10		0,465 0,751≤He≤0,848	0,364 0,778≤He≤0,955	Hoelzel <i>et al.</i> (1998)-2. Parsons <i>et al.</i> (2003). Hoelzel <i>et al.</i> (2002).
<b>KWM12a</b> , (CA)n amorces : CCATACAATCCAGCAGTC CACTGCAGAATGATGACC	<i>Orcinus orca</i> * <i>Orcinus orca</i> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Tursiops aduncus</i> <i>Stenella caeruleoalba</i> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Tursiops spp.</i> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Delphinus delphis</i>	58 87 100 162 107 98 55 305 58 19	7 9 13 ≥13 11 14 11 17 5 8	167-183 161-185	0,515≤He≤0,807 0,770 0,81 0,722≤He≤0,771 0,831	0,69 0,69 0,368≤Ho≤0,710 0,46 0,619≤Ho≤0,689 0,773	Hoelzel <i>et al.</i> (1998). Hoelzel <i>et al.</i> (2002). Natoli <i>et al.</i> (2004). Valsecchi <i>et al.</i> (2004). Hoelzel <i>et al.</i> (1998)-2. Krützen <i>et al.</i> (2004). Parsons <i>et al.</i> (2003). Hoelzel <i>et al.</i> (2002).
<b>BA417</b> amorces : TACAGTATTTGTCTTTCTCT ATCTGTTTGTACATATCAT	<i>Orcinus orca</i>	54	4				Hoelzel <i>et al.</i> 1998.
<b>KWM1b</b> amorces : TAAGAACCTAAATTGGC TGTTGGTCTGATAAATG	<i>Tursiops truncatus</i> <i>Tursiops aduncus</i> <i>Tursiops truncatus</i>  <i>Tursiops truncatus</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Delphinus delphis</i>	162 107 101  55 43 20	≥5 4 5  3 1 3	180-196  192 186-194	0,122≤He≤0,329 0,524  0,084≤He≤0,286	0,067≤Ho≤0,348 0,505 0,13  0,087≤Ho≤0,346 0 0,15	Natoli <i>et al.</i> (2004).  Hoelzel <i>et al.</i> (2002) ; voir aussi Parsons (2001) et Parsons <i>et al.</i> (2003). Hoelzel <i>et al.</i> (1998)-2. Hoelzel <i>et al.</i> (2002).
<b>KWM2b</b> amorces : AGGGTATAAGTGTTAAGG CAACCTTATTTGGATTC	<i>Tursiops truncatus</i> <i>Tursiops aduncus</i> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Delphinus delphis</i>	162 107 55 110 49 11	≥7 2 4 8 1 6	166-182 174 170-180	0,127≤He≤0,480 0,201 0,077≤He≤0,315	0,087≤Ho≤0,480 0,215 0,080≤Ho≤0,318 0,26 0 0,75	Natoli <i>et al.</i> (2004).  Hoelzel <i>et al.</i> (1998)-2. Hoelzel <i>et al.</i> (2002).
<b>KWM9b</b> amorces : TGTCACCAGGCAGGACCC GGGAGGGGCATGTTTCTG	<i>Tursiops truncatus</i> <i>Tursiops aduncus</i> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Delphinus delphis</i>	162 107 55 58 98 36 11	≥6 6 8 3 8 1 9	171-185 171 161-193	0,426≤He≤0,818 0,668≤He≤0,799	0,333≤Ho≤0,8 0,607≤Ho 0,54 0 1,0	Natoli <i>et al.</i> (2004).  Parsons <i>et al.</i> (2003). Hoelzel <i>et al.</i> (2002).
<b>MK3</b> , (GT)n GenBank : AF237889 amorces : TGCATTCATGTAAGGTGCG CTGCAACTAGAGAAAGCCCG	<i>Tursiops aduncus</i> *	336	11	139-171	0,68	0,62	Krützen <i>et al.</i> (2001). Voir aussi Krützen <i>et al.</i> (2004).
<b>MK5</b> , (GT)n GenBank : AF237890 amorces : CTCAGAGGGAAATGAGGCTG TGCTAGAGGTCAAAGCCTTCC	<i>Tursiops aduncus</i> *  <i>Stenella caeruleoalba</i> <i>Pontoporia blainvillei</i>	355  99 13	10  16 4	201-221	0,76	0,79	Krützen <i>et al.</i> (2001). Voir aussi Krützen <i>et al.</i> (2004).

	<i>Stenella caeruleoalba</i>	99	26	199-249	0,88	0,84	Valsecchi <i>et al.</i> (2004).
<b>MK6, (GT)n</b> GenBank : AF237891 amorces : GTCCTCTTTCCAGGTGTAGCC GCCACTAAGTATGTTGCAGC	<i>Tursiops aduncus</i> *	357	23	145-189	0,89	0,87	Krützen <i>et al.</i> (2001). Voir aussi Krützen <i>et al.</i> (2004).
	<i>Stenella caeruleoalba</i>	102	16				
	<i>Pontoporia blainvillei</i>	12	5				
	<i>Stenella caeruleoalba</i>	104	22	135-191	0,85	0,78	Valsecchi <i>et al.</i> (2004).
	<b><i>Stenella caeruleoalba</i></b>	<b>117</b>	<b>25</b>	<b>140-190</b>	<b>0,85≤He≤0,93</b>	<b>0,91≤Ho≤1,00</b>	<b>Notre étude.</b>
<b>MK8, (CA)n</b> GenBank : AF237892 amorces : TCCTGGAGCATCTTATAGTGGC CTCTTGACATGCCCTCACC	<i>Tursiops aduncus</i> *	346	11	87-119	0,71	0,76	Krützen <i>et al.</i> (2001). Voir aussi Krützen <i>et al.</i> (2004).
<b>MK9, (CA)n</b> GenBank : AF237893 amorces : CATAACAAAGTGGGATGACTCC TTATCCTGTTGGCTGCAGTG	<i>Tursiops aduncus</i> *	228	7	168-180	0,75	0,71	Krützen <i>et al.</i> (2001). Voir aussi Krützen <i>et al.</i> (2004).
	<i>Stenella caeruleoalba</i>	101	9				
	<i>Stenella caeruleoalba</i>	97	12	156-182	0,74	0,79	Valsecchi <i>et al.</i> (2004).
	<b><i>Stenella caeruleoalba</i></b>	<b>122</b>	<b>16</b>	<b>152-188</b>	<b>0,75≤He≤0,88</b>	<b>0,75≤Ho≤0,86</b>	<b>Notre étude.</b>
<b>TexVet1, (CA)n</b> GenBank : AF004901 amorces : GAGTGAACATCAGTATCAAGAGGTGA TGTC AAGTTTGAATTTGTGTGAG	<i>Tursiops truncatus</i> *	100	2	165-166	0,032	0,011	Rooney <i>et al.</i> (1999).
	<i>Balena mysticetus</i>	108	2			0,0510	Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.
<b>TexVet2, (CA)n</b> GenBank : AF004902 amorces : GCGTCACCATGATTCTGTAGG CCAAGGTTACTTTCAAGTTAGCCAC	<i>Tursiops truncatus</i> *	100	4	188-192	0,193	0,213	Rooney <i>et al.</i> (1999).
	<i>Balena mysticetus</i>	108	4			0,5028	Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.
<b>TexVet3, (CA)n</b> GenBank : AF004903 amorces : GCCCTCACGTTTCATTGTTGTT CCGTGTTCACTCCAGCATTATTTCCACA	<i>Tursiops truncatus</i> *	68	16	207-267	0,849	0,879	Rooney <i>et al.</i> (1999).
	<i>Balena mysticetus</i>	108	0 or 1				Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.
<b>TexVet4, (CA)n</b> GenBank : AF004904 amorces : CAGACTGTGGACCTCCAGTTTCT GCCGTTTTCCCTTTTGTGTG	<i>Tursiops truncatus</i> *	103	1	164	0,000	0,000	Rooney <i>et al.</i> (1999).
	<i>Balena mysticetus</i>	108	0 or 1				Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.
<b>TexVet5, (CA)n</b> GenBank : AF004905 amorces : GATTGTGCAAAATGGAGACA TTGAGATGACTCCTGTGGG	<i>Tursiops truncatus</i> *	87	9	236-260	0,479	0,405	Rooney <i>et al.</i> (1999).
	<i>Balena mysticetus</i>	108	0 or 1				Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.
	<i>Tursiops truncatus</i>	162	≥10		0,571≤He≤0,871	0,4≤Ho≤0,833	Natoli <i>et al.</i> (2004).
	<i>Tursiops aduncus</i>	107	6		0,696	0,711	
	<i>Tursiops truncatus</i>	58	5				Parsons <i>et al.</i> (2003).
<b>TexVet6, (CA)n</b> GenBank : AF004906 amorces : CGCACAGAAACGAAGACCCAAC AAAAGCTGAAGGCTAGACTGGTC	<i>Tursiops truncatus</i> *	100	2	192-193	0,090	0,093	Rooney <i>et al.</i> (1999).
	<i>Balena mysticetus</i>	108	2			0,3173	Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.
<b>TexVet7, (CA)n</b>	<i>Tursiops truncatus</i> *	101	6	155-163	0,680	0,573	Rooney <i>et al.</i> (1999).

GenBank : AF004907 amorce : TGCACTGTAGGGTGTTCAGCAG CTTAATTGGGGCGATTTCAC	<i>Balena mysticetus</i> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Tursiops aduncus</i> <i>Tursiops truncatus</i>	108 162 107 58	9 ≥11 4 4		0,543≤He≤0,812 0,506	0,6053 0,364≤Ho≤0,762	Rooney <i>et al.</i> (1999)-2. Natoli <i>et al.</i> (2004).  Parsons <i>et al.</i> (2003).
<b>TexVet8</b> , (CA)n GenBank : AF004908 amorce : CCCTTCCTTTAGCCAGAGGTG CGCTGTCACGTACACACCCATG	<i>Tursiops truncatus</i> * <i>Balena mysticetus</i>	101 108	2 0 ou 1	217-218	0,316	0,227	Rooney <i>et al.</i> (1999). Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.
<b>TexVet9</b> , (CA)n GenBank : AF004909 amorce : TTTTCTTAGTACCAGAATCTTGTCAG TCCAGTTGCCTTTCAAGTCTAG	<i>Tursiops truncatus</i> * <i>Balena mysticetus</i>	103 108	1 3	124	0,000	0,000 0,2332	Rooney <i>et al.</i> (1999). Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.
<b>TexVet10</b> , (TG)n amorce : TAACACATCCATCACC GAAACTTGCTAAGAGAGT	<i>Balena mysticetus</i> *	108					Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.
<b>TexVet11</b> , (TG)n amorce : AAACCCATGTCCCCTGCATTGG CATCTGCATTCCTTACGAACAGTG	<i>Balena mysticetus</i> *	108	4			0,6157	Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.
<b>TexVet12</b> , (TG)n amorce : TAACTATGGCATCAGTAGG TCCTGGGTTAGCAGTGTTT	<i>Balena mysticetus</i> *	108	2			0,0185	Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.
<b>TexVet13</b> , (TG)n amorce : CAACTAACACCCGATGCAGCCA GCCCTTTAGCAGTGAAAGTGCAGG	<i>Balena mysticetus</i> *	108	6			0,6142	Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.
<b>TexVet14</b> , (TG)n amorce : GCACTCACAGGACCATAA GCTGACTCTTCTTTGGG	<i>Balena mysticetus</i> *	108	8			0,7631	Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.
<b>TexVet15</b> , (TA)n amorce : GCTGGGGGAAACAGACATTA AAC CAAGGACCTACTGTATAGCACAGGGAAT	<i>Balena mysticetus</i> *	108	5			0,5812	Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.
<b>TexVet16</b> , (CA)n amorce : CACAGCAGTGAAAGAGCCGAGT CGAGCTTCCTGAGAGAACTTTGTT	<i>Balena mysticetus</i> *	108	6			0,4991	Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.
<b>TexVet17</b> , (TG)n amorce : CATGAATCAATTTCTTAAA GGGAGCTTTGTATTGT	<i>Balena mysticetus</i> *	108	11			0,8067	Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.
<b>TexVet18</b> , (CA)n amorce : TCAGATGAGGAGGGA CACGTCATACACAAAA	<i>Balena mysticetus</i> *	108	4			0,5928	Rooney <i>et al.</i> (1999)-2.









<p>amorces : TTCAGGTCTACAGCAAAGTG GACCTACTGTTTGGCACG</p>	<p><i>Monodon monoceros</i> <i>Phocæna phocæna</i> <i>Steno bredanensis</i> <i>Sotalia fluviatilis</i> <i>Grampus griseus</i> <i>Lagenorhynchus albirostris</i> <i>Lagenorhynchus obscurus</i> <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> <i>Lagenorhynchus acutus</i> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Stenella frontalis</i> <i>Stenella cæruleoalba</i> <i>Delphinus delphis</i> <i>Globicephala melas</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Orcella brevirostris</i> <i>Berardius bairdii</i> <i>Mesoplodon bidens</i> <i>Hyperoodon ampullatus</i> <i>Ziphius cavirostris</i> <i>Physeter macrocephalus*</i> <i>Kogia simus</i> <i>Balæna mysticetus</i> <i>Eschrichtius robustus</i> <i>Balænoptera acutorostrata</i> <i>Balænoptera musculus</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novæangliæ</i></p>	<p>1 9 1 2 2 1 3 1 1 8 1 10 7 10 2 1 1 6 3 1 2 1 2 7 1 4 3</p>	<p>1 1 1 - ? 1 ? - 1 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1</p>				
<p><b>EV5Pm</b>, (GC)n GenBank : G09078 amorces : AGCTCCCTTAGACTCAACCTC TATGGCGAGGGTTCCG</p>	<p><i>Pontoporia blainvillei</i> <i>Delphinapterus leucas</i> <i>Monodon monoceros</i> <i>Phocæna phocæna</i> <i>Steno bredanensis</i> <i>Sotalia fluviatilis</i> <i>Grampus griseus</i> <i>Lagenorhynchus albirostris</i> <i>Lagenorhynchus obscurus</i> <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> <i>Lagenorhynchus acutus</i> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Stenella frontalis</i> <i>Stenella cæruleoalba</i> <i>Delphinus delphis</i> <i>Globicephala melas</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Orcella brevirostris</i> <i>Berardius bairdii</i> <i>Mesoplodon bidens</i> <i>Hyperoodon ampullatus</i> <i>Ziphius cavirostris</i> <i>Physeter macrocephalus*</i></p>	<p>1 19 1 10 2 1 2 4 4 1 3 7 1 9 8 10 2 1 1 4 3 1 10</p>	<p>2 1 - 7 2 1 1 6 3 - 3 - 3 1 3 1 - - - - - - ?5</p>	<p>141-169<sup>#</sup></p>			<p>Valsecchi et Amos (1996).</p>

	<i>Kogia simus</i>	1	?				
	<i>Balæna mysticetus</i>	1	1				
	<i>Eschrichtius robustus</i>	1	-				
	<i>Balænoptera acutorostrata</i>	10	2				
	<i>Balænoptera musculus</i>	1	1				
	<i>Balænoptera physalus</i>	8	1				
	<i>Megaptera novæangliæ</i>	10	1				
	<i>Physeter macrocephalus</i>	156	11				Lyrholm <i>et al.</i> (1999).
<b>EV14Pm.</b> (GT)n GenBank : G09079 amorces : TAAACATCAAAGCAGACCCC CCAGAGCCAAGGTCAAGAG	<i>Pontoporia blainvillei</i>	2	2	123-159 <sup>#</sup>			Valsecchi et Amos (1996).
	<i>Delphinapterus leucas</i>	8	4				
	<i>Monodon monoceros</i>	1	1				
	<i>Phocæna phocæna</i>	1	1				
	<i>Steno bredanensis</i>	2	1				
	<i>Sotalia fluviatilis</i>	2	1				
	<i>Grampus griseus</i>	2	1				
	<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	4	4				
	<i>Lagenorhynchus obscurus</i>	6	1				
	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	1	1				
	<i>Lagenorhynchus acutus</i>	5	5				
	<i>Tursiops truncatus</i>	6	5				
	<i>Stenella frontalis</i>	°	2				
	<i>Stenella cæruleoalba</i>	6	3				
	<i>Delphinus delphis</i>	8	8				
	<i>Globicephala melas</i>	10	1				
	<i>Orcinus orca</i>	2	3				
	<i>Orcælla brevirostris</i>	1	1				
	<i>Berardius bairdii</i>	1	1				
	<i>Mesoplodon bidens</i>	2	-				
	<i>Hyperoodon ampullatus</i>	2	1				
	<i>Ziphius cavirostris</i>	1	2				
	<i>Physeter macrocephalus*</i>	6	4				
	<i>Kogia simus</i>	1	?				
	<i>Balæna mysticetus</i>	1	?				
	<i>Eschrichtius robustus</i>	2	1				
	<i>Balænoptera acutorostrata</i>	6	5				
	<i>Balænoptera musculus</i>	1	1				
	<i>Balænoptera physalus</i>	8	4				
	<i>Megaptera novæangliæ</i>	200	5				
	<i>Megaptera novæangliæ</i>	188	8				
	<i>Megaptera novæangliæ</i>	142	10	125-145	0,755	0,800	Valsecchi <i>et al.</i> (1998). Valsecchi <i>et al.</i> (2002).
	<i>Tursiops truncatus</i>	58	7				Parsons <i>et al.</i> (2003).
	<i>Megaptera novæangliæ</i>	77	7	129-141	0,52≤He≤0,65	0,62≤He≤0,63	Baker <i>et al.</i> (1998).
	<i>Megaptera novæangliæ</i>	619	7		0,643	0,672	Cerchio <i>et al.</i> (2005).
<b>EV21Pm.</b> (AC)n GenBank : G09084 amorces : CAATAATTGGACAGTGATTTCC CGCTGAAGGTGTGCC	<i>Pontoporia blainvillei</i>	2	1	109-172 <sup>#</sup>			Valsecchi et Amos (1996).
	<i>Delphinapterus leucas</i>	8	1				
	<i>Monodon monoceros</i>	1	1				
	<i>Phocæna phocæna</i>	8	1				
	<i>Steno bredanensis</i>	2	2				
	<i>Sotalia fluviatilis</i>	1	1				
	<i>Grampus griseus</i>	2	1				
	<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	4	1				

	<i>Lagenorhynchus obscurus</i>	6	2				
	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	1	1				
	<i>Lagenorhynchus acutus</i>	3	1				
	<i>Tursiops truncatus</i>	8	2				
	<i>Stenella frontalis</i>	1	1				
	<i>Stenella caeruleoalba</i>	10	3				
	<i>Delphinus delphis</i>	8	1				
	<i>Globicephala melas</i>	10	1				
	<i>Orcinus orca</i>	2	1				
	<i>Orcælla brevirostris</i>	1	1				
	<i>Berardius bairdii</i>	1	2				
	<i>Mesoplodon bidens</i>	1	1				
	<i>Hyperoodon ampullatus</i>	2	?				
	<i>Ziphius cavirostris</i>	1	2				
	<i>Physeter macrocephalus*</i>	8	1				
	<i>Kogia simus</i>	1	2				
	<i>Balæna mysticetus</i>	1	2				
	<i>Eschrichtius robustus</i>	1	2				
	<i>Balænoptera acutorostrata</i>	2	2				
	<i>Balænoptera musculus</i>	1	1				
	<i>Balænoptera physalus</i>	5	3				
	<i>Megaptera novæangliæ</i>	660	6				
	<i>Megaptera novæangliæ</i>	1438	7				
	<i>Megaptera novæangliæ</i>	142	6	107-117	0,643	0,641	Valsecchi <i>et al.</i> (1998).
	<i>Eubalæna spp.</i>	-	-				Valsecchi <i>et al.</i> (2002).
	<i>Megaptera novæangliæ</i>	618	6		0,698	0,709	Waldick <i>et al.</i> (2002).
	<i>Balænoptera acutorostrata</i>	306	≥5		0,073≤He≤0,120	0,037≤Ho≤0,127	Cerchio <i>et al.</i> (2005).
							Andersen <i>et al.</i> (2003).
<b>EV30Pm</b> , (AC)n GenBank : G09080 amorces : GGAATAGAGGTAGGGGTGG GCTTTTGTGTGGTCATCC	<i>Pontoporia blainvillei</i>	1	1	130-192 <sup>#</sup>			Valsecchi et Amos (1996).
	<i>Delphinapterus leucas</i>	19	?				
	<i>Monodon monoceros</i>	1	1				
	<i>Phocæna phocæna</i>	5	?				
	<i>Steno bredanensis</i>	2	-				
	<i>Sotalia fluviatilis</i>	1	-				
	<i>Grampus griseus</i>	2	1				
	<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	4	?				
	<i>Lagenorhynchus obscurus</i>	4	2				
	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	1	-				
	<i>Lagenorhynchus acutus</i>	3	1				
	<i>Tursiops truncatus</i>	10	?				
	<i>Stenella frontalis</i>	1	-				
	<i>Stenella caeruleoalba</i>	10	?				
	<i>Delphinus delphis</i>	8	-				
	<i>Globicephala melas</i>	10	1				
	<i>Orcinus orca</i>	2	-				
	<i>Orcælla brevirostris</i>	1	1				
	<i>Berardius bairdii</i>	1	1				
	<i>Mesoplodon bidens</i>	6	1				
	<i>Hyperoodon ampullatus</i>	3	3				
	<i>Ziphius cavirostris</i>	1	-				
	<i>Physeter macrocephalus*</i>	10	5				
	<i>Kogia simus</i>	1	2				

	<i>Balæna mysticetus</i>	1	1				
	<i>Eschrichtius robustus</i>	1	2				
	<i>Balænoptera acutorostrata</i>	5	2				
	<i>Balænoptera musculus</i>	1	1				
	<i>Balænoptera physalus</i>	8	3				
	<i>Megaptera novæangliæ</i>	3	1				
	<i>Eubalæna</i> spp.	-	-				
	<i>Balænoptera acutorostrata</i>	306	≥3		0,030≤He≤0,265	0,030≤Ho≤0,217	Waldick <i>et al.</i> (2002). Andersen <i>et al.</i> (2003).
<b>EV37Mn</b> . (AC) GenBank : G09081 amorces : AGCTTGATTTGGAAGTCATGA TAGTAGAGCCGTGATAAAAGTGC	<i>Pontoporia blainvillei</i>	1	2	178-224 <sup>#</sup>			Valsecchi et Amos (1996).
	<i>Delphinapterus leucas</i>	19	8				
	<i>Monodon monoceros</i>	1	2				
	<i>Phocæna phocæna</i>	10	3				
	<i>Steno bredanensis</i>	1	2				
	<i>Sotalia fluviatilis</i>	2	2				
	<i>Grampus griseus</i>	2	4				
	<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	4	3				
	<i>Lagenorhynchus obscurus</i>	20	2				
	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	1	2				
	<i>Lagenorhynchus acutus</i>	3	6				
	<i>Tursiops truncatus</i>	8	8				
	<i>Stenella frontalis</i>	1	1				
	<i>Stenella cæruleoalba</i>	4	5				
	<i>Delphinus delphis</i>	8	6				
	<i>Globicephala melas</i>	400	7				
	<i>Orcinus orca</i>	2	2				
	<i>Orcælla brevirostris</i>	1	2				
	<i>Berardius bairdii</i>	1	-				
	<i>Mesoplodon bidens</i>	7	14				
	<i>Hyperoodon ampullatus</i>	2	4				
	<i>Ziphius cavirostris</i>	1	1				
	<i>Physeter macrocephalus</i>	7	6				
	<i>Kogia simus</i>	1	-				
	<i>Balæna mysticetus</i>	1	2				
	<i>Eschrichtius robustus</i>	1	2				
	<i>Balænoptera acutorostrata</i>	10	10				
	<i>Balænoptera musculus</i>	1	2				
	<i>Balænoptera physalus</i>	8	8				
	<i>Megaptera novæangliæ</i> *	651	19				
	<i>Tursiops truncatus</i>	162	≥25		0,769≤He≤0,947	0,615≤Ho≤0,954	Natoli <i>et al.</i> (2004).
	<i>Tusiops aduncus</i>	107	15		0,811	0,743	
	<i>Megaptera novæangliæ</i>	307	21	186-232	0,777≤He≤0,921		Valsecchi <i>et al.</i> (1997).
	<i>Megaptera novæangliæ</i>	1441	16				Valsecchi <i>et al.</i> (1998).
	<i>Megaptera novæangliæ</i>	142	19	190-228	0,921	0,901	Valsecchi <i>et al.</i> (2002).
	<i>Stenella cæruleoalba</i>	102	21	181-237	0,77	0,71	Valsecchi <i>et al.</i> (2004).
	<i>Eubalæna australis</i>	29	11		0,88	0,52	Waldick <i>et al.</i> (2002).
	<i>Eubalæna glacialis</i>	30	3		0,54	0,90	
	<i>Delphinapterus leucas</i>	640	13				Brown Gladden <i>et al.</i> (1999).
	<i>Tursiops truncatus</i>	97	29	192-252		0,89	Hoelzel <i>et al.</i> (2002) ; voir aussi Parsons (2001) et Parsons <i>et al.</i> (2003).

	<i>Phocænoides dalli</i>	119	$18 \leq n_a \leq 31$			$\geq 0,5$	Escorza-Treviño et Dizon (2000).
	<i>Globicephala melas</i>	529	6		$0,740 \leq He \leq 0,761$		Fullard <i>et al.</i> (2000).
	<i>Balænoptera physalus</i>	64	14		0,28	0,75	Bérubé <i>et al.</i> (2002).
	<i>Megaptera novæangliæ</i>	619	15	200-226	0,885	0,889	Cerchio <i>et al.</i> (2005).
	<i>Orcinus orca</i>	96	9			0,59	Hoelzel <i>et al.</i> (2002).
	<i>Delphinus delphis</i>	19	20	176-240		0,95	
	<i>Balænoptera acutorostrata</i>	306	$\geq 14$		$0,732 \leq He \leq 0,779$	$0,619 \leq Ho \leq 0,783$	Andersen <i>et al.</i> (2003).
<b>EV76Mn.</b> (GT)n GenBank : G09075 amorces : CGGGAAGGTATCTAAATGGG CCTCATCTGGTCTACTCCTGC	<i>Pontoporia blainvillei</i>	2	2	123-195 <sup>#</sup>			Valsecchi et Amos (1996).
	<i>Delphinapterus leucas</i>	19	6				
	<i>Monodon monoceros</i>	1	1				
	<i>Phocæna phocæna</i>	3	?				
	<i>Steno bredanensis</i>	2	1				
	<i>Sotalia fluviatilis</i>	2	1				
	<i>Grampus griseus</i>	2	-				
	<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	3	1				
	<i>Lagenorhynchus obscurus</i>	3	1				
	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	1	1				
	<i>Lagenorhynchus acutus</i>	3	1				
	<i>Tursiops truncatus</i>	10	?				
	<i>Stenella frontalis</i>	1	1				
	<i>Stenella cæruleoalba</i>	10	-				
	<i>Delphinus delphis</i>	5	1				
	<i>Globicephala melas</i>	10	1				
	<i>Orcinus orca</i>	2	1				
	<i>Orcælla brevirostris</i>	2	?				
	<i>Berardius bairdii</i>	1	?				
	<i>Mesoplodon bidens</i>	2	3				
	<i>Hyperoodon ampullatus</i>	3	?				
	<i>Ziphius cavirostris</i>	1	1				
	<i>Physeter macrocephalus</i>	2	-				
	<i>Kogia simus</i>	1	?				
	<i>Balæna mysticetus</i>	1	2				
	<i>Eschrichtius robustus</i>	3	1				
	<i>Balænoptera acutorostrata</i>	2	-				
	<i>Balænoptera musculus</i>	1	-				
	<i>Balænoptera physalus</i>	1	?				
	<i>Megaptera novæangliæ</i> *	10	1				
<b>EV92Mn.</b> (GT)n GenBank : G09082 amorces : GTGTTAGGGGAGGTTACGC ACACAAGAAGACCAGGAGGG	<i>Pontoporia blainvillei</i>	1	1	230-258 <sup>#</sup>			Valsecchi et Amos (1996).
	<i>Delphinapterus leucas</i>	19	1				
	<i>Monodon monoceros</i>	1	-				
	<i>Phocæna phocæna</i>	7	-				
	<i>Steno bredanensis</i>	1	1				
	<i>Sotalia fluviatilis</i>	1	-				
	<i>Grampus griseus</i>	2	2				
	<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	3	1				
	<i>Lagenorhynchus obscurus</i>	1	1				
	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	1	-				
	<i>Lagenorhynchus acutus</i>	2	1				
	<i>Tursiops truncatus</i>	10	-				
	<i>Stenella frontalis</i>	1	-				



	<i>Megaptera novaeangliae</i>	307	11	202-222	0,566≤He≤0,790		Valsecchi <i>et al.</i> (1997).
	<i>Megaptera novaeangliae</i>	1421	7				Valsecchi <i>et al.</i> (1998).
	<i>Megaptera novaeangliae</i>	142	10	202-222	0,803	0,773	Valsecchi <i>et al.</i> (2002).
	<i>Stenella caeruleoalba</i>	103	22	216-262	0,86	0,84	Valsecchi <i>et al.</i> (2004).
	<i>Eubalæna australis</i>	29	3		0,50	0,60	Waldick <i>et al.</i> (2002).
	<i>Eubalæna glacialis</i>	30	1		0	0	
	<i>Delphinapterus leucas</i>	640	9				Brown Gladden <i>et al.</i> (1999).
	<i>Phocænoides dalli</i>	119	32			≥0,5	Escorza-Treviño et Dizon, 2000.
	<i>Globicephala melas</i>	529	7		0,728≤He≤0,839		Fullard <i>et al.</i> (2000).
	<i>Balænoptera physalus</i>	64	9		0,35	0,39	Bérubé <i>et al.</i> (2002).
	<i>Megaptera novaeangliae</i>	619	7		0,693	0,672	Cerchio <i>et al.</i> (2005).
	<i>Balænoptera acutorostrata</i>	306	≥4		0,279≤He≤0,464	0,289≤Ho≤0,435	Andersen <i>et al.</i> (2003).
<b>EV96Mn</b> , (AC)n GenBank : G09076 amorces : AAGATGAGTAGATTCACTACACGAGG CCACTTTTCCTCTCACATAGCC	<i>Pontoporia blainvillei</i>	2	2	187-209 <sup>#</sup>			Valsecchi et Amos (1996).
	<i>Delphinapterus leucas</i>	19	1				
	<i>Monodon monoceros</i>	1	?				
	<i>Phocæna phocæna</i>	7	3				
	<i>Steno bredanensis</i>	1	1				
	<i>Sotalia fluviatilis</i>	1	1				
	<i>Grampus griseus</i>	2	-				
	<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	4	-				
	<i>Lagenorhynchus obscurus</i>	3	-				
	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	1	-				
	<i>Lagenorhynchus acutus</i>	3	-				
	<i>Tursiops truncatus</i>	8	2				
	<i>Stenella frontalis</i>	1	1				
	<i>Stenella caeruleoalba</i>	9	3				
	<i>Delphinus delphis</i>	3	1				
	<i>Globicephala melas</i>	10	1				
	<i>Orcinus orca</i>	2	-				
	<i>Orcælla brevirostris</i>	1	-				
	<i>Berardius bairdii</i>	1	-				
	<i>Mesoplodon bidens</i>	7	1				
	<i>Hyperoodon ampullatus</i>	1	2				
	<i>Ziphius cavirostris</i>	1	1				
	<i>Physeter macrocephalus</i>	9	2				
	<i>Kogia simus</i>	1	1				
	<i>Balæna mysticetus</i>	3	?				
	<i>Eschrichtius robustus</i>	3	-				
	<i>Balænoptera acutorostrata</i>	7	3				
	<i>Balænoptera musculus</i>	1	1				
	<i>Balænoptera physalus</i>	3	1				
	<i>Megaptera novaeangliae*</i>	627	12				
	<i>Megaptera novaeangliae</i>	307	15	185-213	0,747≤He≤0,840		Valsecchi <i>et al.</i> (1997).
	<i>Megaptera novaeangliae</i>	1426	13				Valsecchi <i>et al.</i> (1998).
	<i>Megaptera novaeangliae</i>	142	13	187-213	0,863	0,813	Valsecchi <i>et al.</i> (2002).
	<i>Megaptera novaeangliae</i>	607	13		0,810	0,834	Cerchio <i>et al.</i> (2005).
	<i>Balænoptera acutorostrata</i>	306	≥13		0,790≤He≤0,847	0,667≤Ho≤0,870	Andersen <i>et al.</i> (2003).
<b>EV104Mn</b> , (AC)n GenBank : G09085	<i>Pontoporia blainvillei</i>	2	-	141-166 <sup>#</sup>			Valsecchi et Amos (1996).
	<i>Delphinapterus leucas</i>	19	5				





CTTAACATGGAAGGCTCCC GCCAAGCATTGGGACTTTTG	<i>Eubalæna glacialis</i>	30	1		0	0	
<b>rw2-17</b> , (TG)n GenBank : AFI56297 amorces : ATCTGGCATTGTTTTAAATAATCC CCAGAAAATAATGTAATAAACCC	<i>Eubalæna glacialis*</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Delphinapterus leucas</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Eubalæna glacialis</i>	30 29 6 29 30	1 3 ≥2 3 1	166		0,38 0	0,4 0,47 0
<b>rw2-19</b> , (AC)n GenBank : AFI56298 amorces : AGTCCATAGGGCTGCTCAC TTCCATTTTGGGTTCAATC	<i>Eubalæna glacialis*</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Delphinapterus leucas</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Eubalæna glacialis</i>	30 11 6 29 30	1 5 ≥2 4 1	96		0,65 0	0,7 0,48 0
<b>rw4 -10</b> , (TG)n GenBank : AFI56555 amorces : ATGGCATTACTTCATTCTT GCCAACTTACCAAATTGTG	<i>Eubalæna glacialis*</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Eubalæna glacialis</i>	25 10 29 30	2 9 5 2	177		0,73 0,31	0,3 0,8 0,71 0,31
<b>rw34</b> , (CA)n GenBank : AFI56299 amorces : AGCCCCATAACGGCGCATA GGGAGCCAGAACCTGATAC	<i>Eubalæna glacialis*</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Eubalæna glacialis</i>	184 9 29 30	11 2 9 11	122		0,91 0,72	0,7 0,80 0,68
<b>rw48</b> , (TG)n GenBank : AFI56300 amorces : CCAATGACTTTCCCTGTA GATACCGCAGTGTCTCTG	<i>Eubalæna glacialis*</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Eubalæna glacialis</i>	185 10 29 30	6 6 7 5	112		0,86 0,41	0,4 0,86 0,42
<b>rw2-12</b> , (TG)n GenBank : AFI56301 amorces : TGACACTTTCCGCTTTAGG AAAAGCTTCCATCCTAACCA	<i>Eubalæna glacialis*</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Eubalæna glacialis</i>	30 11 29 30	1 2 2 1	86		0,04 0	0,04 0
<b>sam25</b> , (TG)n GenBank : AFI56302 amorces : CTGCAAATGGCATTACTTC CCAAACTTACCAAATTGTG	<i>Eubalæna glacialis*</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Eubalæna glacialis</i>	10 9 29 30	2 7 8 2	182		0,89 0,46	0,89 0,38
<b>rw4 - 5</b> , (TG)n and (GA)n GenBank : AFI56303 amorces : AGGTCTTTCATTGCTGCC ACGGAAATCAGAAAGCCTTA	<i>Eubalæna glacialis*</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Eubalæna glacialis</i>	9 10 29 30	2 6 5 2	115		0,71 0,10	0,87 0,10
<b>rw4 -17</b> , (TG)n GenBank : AFI56304 amorces : TATCCTGCAACCTTGCTGA R: TCACAGATGACATGACCTTG	<i>Eubalæna glacialis*</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Eubalæna australis</i> <i>Eubalæna glacialis</i>	181 11 29 30	4 9 7 4	104		0,82 0,67	0,7 0,89 0,69
<b>ACCC392</b> , (ACC)n GenBank : U93888 amorces :	<i>Balænoptera acutorostrata</i> <i>Balænoptera musculus</i> <i>Balænoptera physalus</i>	16 92 8	4 8 7	191-247 211-367 235-295			Palsbøll <i>et al.</i> (1997) ; voir aussi Palsbøll <i>et al.</i> (1999).

CTGATGTTTGGTTGATTAC CTTCCCTCCATCCAAGTATTG	<i>Megaptera novæangliæ*</i>	30	3	147-187			
<b>GATA019</b> , (GATA)n GenBank : U93889 amorces : TGATGAAATCGGACACACAGT CTATAAGGGAAAAGAATCTGA	<i>Balænoptera acutorostrata</i> <i>Balænoptera musculus</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novæangliæ*</i>	12	6	203-239			Palsbøll <i>et al.</i> (1997).
<b>GATA028</b> , (GATA)n GenBank : U93890 amorces : AAAGACTGAGATCTATAGTTA CGCTGATAGAATAGTCTAGG	<i>Balænoptera acutorostrata</i> <i>Balænoptera musculus</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novæangliæ*</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Physeter macrocephalus</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novæangliæ</i> <i>Balænoptera acutorostrata</i>	154 92 358 3037 407 165 64 619 306	17 15 19 11 $\geq 15$ 3 10 6 $\geq 17$	158-246 146-202 184-236 147-191 120-132	0,68<He<0,89 0,21 0,351 0,826≤He≤0,832	0,67 0,355 0,794≤Ho≤0,849	Palsbøll <i>et al.</i> (1997) ; voir aussi Palsbøll <i>et al.</i> (1999), et Clapham et Palsbøll (1997). Bérubé <i>et al.</i> (1998). Lyrholm <i>et al.</i> (1999). Bérubé <i>et al.</i> (2002). Cerchio <i>et al.</i> (2005). Andersen <i>et al.</i> (2003).
<b>GATA053</b> , (GATA)n GenBank : U93891 amorces : GACACAGAGATGTAGAAGGAG ATTGGCAGTGGCAGGAGACCC	<i>Balænoptera musculus</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novæangliæ*</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Physeter macrocephalus</i> <b><u>Stenella cæruleoalba</u></b> <b><u>Delphinus delphis</u></b> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novæangliæ</i>	19 358 3037 407 143 <b>117</b> <b>8</b> 64 619	2 14 9 $\geq 11$ 7 <b>10</b> <b>3</b> 9 10	192-196 180-220 178-210 257-279 <b>257-321</b> <b>289-297</b>	0,52<He<0,75 <b>0,50&lt;He&lt;0,67</b> 0,00 0,822	<b>0,32&lt;Ho&lt;0,71</b> 0,22 0,829	Palsbøll <i>et al.</i> (1997) ; voir aussi Palsbøll <i>et al.</i> (1999). Bérubé <i>et al.</i> (1998). Lyrholm <i>et al.</i> (1999). <b>Notre étude.</b> Bérubé <i>et al.</i> (2002). Cerchio <i>et al.</i> (2005); voir aussi Clapham et Palsbøll (1997).
<b>GATA098</b> , (GATA)n GenBank : U93892 amorces : TGTACCCTGGATGGATAGATT TCACCTTATTTGTCTGTCTG	<i>Balænoptera acutorostrata</i> <i>Balænoptera musculus</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novæangliæ*</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Tursiops truncatus</i> <b><u>Stenella cæruleoalba</u></b> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Megaptera novæangliæ</i>  <i>Balænoptera acutorostrata</i>	158 92 358 3037 407 15 <b>129</b> 58 619  306	8 8 8 8 $\geq 8$ 4 <b>11</b> 4 9  $\geq 7$	76-104 100-148 104-132 92-134 71-99 <b>61-101</b>	0,46<He<0,82 <b>0,84&lt;He&lt;0,90</b> 0,818 0,717≤He≤0,737	<b>0,81&lt;Ho&lt;0,86</b> 0,821 0,565≤Ho≤0,717	Palsbøll <i>et al.</i> (1997) ; voir aussi Palsbøll <i>et al.</i> (1999). Bérubé <i>et al.</i> (1998). Parsons (2001). <b>Notre étude.</b> Parsons <i>et al.</i> (2003). Cerchio <i>et al.</i> (2005). Voir aussi Clapham et Palsbøll (1997). Andersen <i>et al.</i> (2003).
<b>GATA417</b> , (GATA)n GenBank : U93893 amorces : CTGAGATAGCAGTTACATGGG TCTGCTCAGGAAATTTTCAAG	<i>Balænoptera acutorostrata</i> <i>Balænoptera musculus</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novæangliæ*</i> <i>Megaptera novæangliæ</i>  <b><u>Stenella cæruleoalba</u></b>	176 92 4 3037 617  -	16 13 3 18 19  -	213-253 181-253 251-271 193-293	0,861	0,870	Palsbøll <i>et al.</i> (1997) ; voir aussi Palsbøll <i>et al.</i> (1999). Cerchio <i>et al.</i> (2005). Voir aussi Clapham et Palsbøll (1997). <b>Notre étude.</b>
<b>GGAT416</b> , (GGAT)n GenBank : U93894 amorces : GAGACCACTGCAGGAACACAG	<i>Balænoptera acutorostrata</i> <i>Balænoptera musculus</i> <i>Balænoptera physalus</i> <i>Megaptera novæangliæ*</i>	4	4	288-312			Palsbøll <i>et al.</i> (1997).

CAGAGGCTGACTTTATACCAC							
<b>GGAA520</b> , (GGAA)n amorces : TAGCAGAYCTGAGTTATTTCC TAGCATTTTAGTCTTGGGTGG	<i>Balaenoptera acutorostrata</i> <i>Balaenoptera musculus</i> <i>Balaenoptera physalus</i> <i>Megaptera novaeangliae</i> * <i>Balaenoptera physalus</i> <i>Megaptera novaeangliae</i>	358 3037 407 601	18 27 ≥14 19	162-226 191-359	0,25<He<0,90 0,898	0,882	Palsbøll <i>et al.</i> (1997) ; voir aussi Palsbøll <i>et al.</i> (1999).  Bérubé <i>et al.</i> (1998). Cerchio <i>et al.</i> (2005); voir aussi Clapham et Palsbøll (1997).
<b>GAAT400</b> , (GAAT)n GenBank : U93895 amorces : GTCTGGAGCCACTACTCAGCC AGAGCCCAGCATCACGGCTGG	<i>Balaenoptera acutorostrata</i> <i>Balaenoptera musculus</i> <i>Balaenoptera physalus</i> <i>Megaptera novaeangliae</i> * <i>Balaenoptera acutorostrata</i>	4 4 306	2 3 ≥2	151-163 167-183	0,036≤He≤0,294	0,019≤Ho≤0,261	Palsbøll <i>et al.</i> (1997).  Andersen <i>et al.</i> (2003).
<b>TAA023</b> , (TAA)n GenBank : U93896 amorces : CTCGCACAGAAATGAAGACCC AGAGCCTGAACCAGAACAAGG	<i>Balaenoptera acutorostrata</i> <i>Balaenoptera musculus</i> <i>Balaenoptera physalus</i> <i>Megaptera novaeangliae</i> * <i>Balaenoptera physalus</i>	358 407	7 ≥7	82-100	0,12<He<0,85		Palsbøll <i>et al.</i> (1997) ; voir aussi Palsbøll <i>et al.</i> (1999).  Bérubé <i>et al.</i> (1998).
<b>TAA031</b> , (TAA)n GenBank : U93897 amorces : AGATCCTGCAAGCCGCATCGG TCACTTCTACTTTGATGAGG	<i>Balaenoptera acutorostrata</i> <i>Balaenoptera musculus</i> <i>Balaenoptera physalus</i> <i>Megaptera novaeangliae</i> * <i>Megaptera novaeangliae</i>	54 3037 472	3 15 15	76-85 85-121	0,835	0,807	Palsbøll <i>et al.</i> (1997) ; voir aussi Palsbøll <i>et al.</i> (1999).  Cerchio <i>et al.</i> (2005). Voir aussi Clapham et Palsbøll (1997).
<b>Dde84</b> , (CA)n GenBank : AM087101	<i>Delphinus delphis</i> *						Coughlan <i>et al.</i> , non publié.
<b>Dde72</b> , (CTAT)n GenBank : AM087100	<i>Delphinus delphis</i> *						Coughlan <i>et al.</i> , non publié.
<b>Dde70</b> , (CA)n GenBank : AM087099	<i>Delphinus delphis</i> *						Coughlan <i>et al.</i> , non publié.
<b>Dde69</b> , (GATA)n GenBank : AM087098	<i>Delphinus delphis</i> *						Coughlan <i>et al.</i> , non publié.
<b>Dde66</b> , (TG)n and (CTAT)n GenBank : AM087097	<i>Delphinus delphis</i> *						Coughlan <i>et al.</i> , non publié.
<b>Dde65</b> , (CTAT)n GenBank : AM087096	<i>Delphinus delphis</i> *						Coughlan <i>et al.</i> , non publié.
<b>Dde61</b> , (CTAT)n GenBank : AM087095	<i>Delphinus delphis</i> *						Coughlan <i>et al.</i> , non publié.
<b>Dde60</b> , (GATA)n GenBank : AM087094	<i>Delphinus delphis</i> *						Coughlan <i>et al.</i> , non publié.
<b>Dde59</b> , (GATA)n GenBank : AM087093	<i>Delphinus delphis</i> *						Coughlan <i>et al.</i> , non publié.
<b>Dde09</b> , (CTAT)n GenBank : AM087092	<i>Delphinus delphis</i> *						Coughlan <i>et al.</i> , non publié.
<b>NCAM</b> , (CA)n GenBank : AF025989 et AF025991 amorces :	<i>Bos taurus</i> * <i>Tursiops truncatus</i> <i>Megaptera novaeangliae</i>	3 4	P P	189 193			Moore <i>et al.</i> (1998).

AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG							
<b>SW2</b> , (AG)n GenBank : U46759 amorces : AGCTGGGTAATTTGTAA GGCCCTTTCTCTCTCT	<i>Physeter macrocephalus*</i> <i>Physeter macrocephalus</i>	80 164	5 6	73-81 73-83		0,55	Richard <i>et al.</i> (1996). Lyrholm <i>et al.</i> (1999).
<b>SW10</b> , (GTGC)n et (GT)n GenBank : U46760 amorces : ACCTAAGGATGGAGATG ATTCCCAGGTCTGCAA	<i>Physeter macrocephalus*</i> <i>Physeter macrocephalus</i>	80 149	12 12	137-159 137-161		0,84	Richard <i>et al.</i> (1996). Lyrholm <i>et al.</i> (1999).
<b>SW13</b> , (GT)n GenBank : U46761 amorces : AGCTGTCTTAATGAAATTCCC ACGTAAATGATGCTGTT	<i>Physeter macrocephalus*</i> <i>Physeter macrocephalus</i>	80 160	11 11	136-175 134-173		0,83	Richard <i>et al.</i> (1996). Lyrholm <i>et al.</i> (1999).
<b>SW15</b> , complexe GenBank : U467562 amorces : GGAAGTCCACGTTTCCA TGCCCTCTGCAATGCAT	<i>Physeter macrocephalus*</i> <i>Physeter macrocephalus</i>	143 <sup>o</sup> 197 <sup>o</sup>	5 8	252-262 253-267		0,76 <sup>o</sup>	Richard <i>et al.</i> (1996). Lyrholm <i>et al.</i> (1999).
<b>SW19</b> , (TG)n GenBank : U46763 amorces : GTAGTTTTCTTTAACAGTAATG AGTTCTGGGCTTTTCACCTA	<i>Physeter macrocephalus*</i> <i>Physeter macrocephalus</i>	58 145	18 21	90-160 90-146		0,95	Richard <i>et al.</i> (1996). Lyrholm <i>et al.</i> (1999).
<b>Lobs_Di7.1</b> , (TG)n GenBank : AY821564 amorces : ATCAGGGAGAGGTTGAGAAGGGC GTTTCTTCCTTGCTTAGTCTTTTGCTACCTTA	<i>Lagenorhynchus obscurus</i>	221	17	118-152			Cassens <i>et al.</i> (2004).
<b>Lobs_Di9</b> , (TG)n GenBank : AY821565 amorces : CAGTGAAGCAATGAAGAG GTTTCTTAGATGACTGACTGAAGGAG	<i>Lagenorhynchus obscurus*</i>	221	13	86-112			Cassens <i>et al.</i> (2004).
<b>Lobs_Di19</b> , (CA)n GenBank : AY821566 amorces : CCCCAAAATAAACTGATGAGCAG GTTTCTTGGTAGAGTCACAGTGTGTGC	<i>Lagenorhynchus obscurus*</i>	221	18	86-128			Cassens <i>et al.</i> (2004).
<b>Lobs_Di21</b> , (TG)n GenBank : AY821567 amorces : CCTGGTGGCTGTCAATTTGTGGAATA GTTTCTTCTGTACTCCCTTGGGGCAAAC	<i>Lagenorhynchus obscurus*</i>	221	16	98-128			Cassens <i>et al.</i> (2004).
<b>Lobs_Di24</b> , (GT)n et (GA)n s GenBank : AY821568 amorces :	<i>Lagenorhynchus obscurus*</i>	221	15	102-130			Cassens <i>et al.</i> (2004).

CCTCACTCAGGGGAAATGGATTTA GTTTCTTGCTACTAAAATTGGACTCCCTGGAG							
<b>Lobs_Di39</b> , (CA)n GenBank : AY821569 amorces : ATTAACAACTGATAACCCCGGACA GTTTCTTAAAAGCTATTTGTGCTGTACCTA	<i>Lagenorhynchus obscurus</i> *	221	9	90-110			Cassens <i>et al.</i> (2004).
<b>Lobs_Di45</b> , (CA)n GenBank : AY821570 amorces : ATTTTGCAAACACAAGTG GTTTCTTCTACTATTTGAATGAAAAGAGAG	<i>Lagenorhynchus obscurus</i> *	221	10	94-112			Cassens <i>et al.</i> (2004).
<b>Lobs_Di47</b> , (TG)n GenBank : AY821571 amorces : TAGGGAGCCTATGTAAGACTTA GTTTCTTCAGGTTTACAGAATAGGACTTATT	<i>Lagenorhynchus obscurus</i> *	221	5	98-105			Cassens <i>et al.</i> (2004).
<b>Lobs_TT6</b> , (AAAT)n GenBank : AY821572 amorces : AAACAAAAGACCCACCACA GTTTCTTCTTAAATCTTAACATATTCATA	<i>Lagenorhynchus obscurus</i> *	221	4	80-92			Cassens <i>et al.</i> (2004).
<b>PS1</b> , (AC)n amorces : GTTTCTTGAGTTTGGCAAATAACCTACC CCAATAAGAAACACTTACAGTTGAA	<i>Phocæna spinipinnis</i> <i>Phocæna sinus</i> <i>Phocæna dioptrica</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Neophocæna phocænoides</i> <i>Phocæna phocæna</i>	118 1 1 1 1 13	10 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1	113-134	0,83	0,77	Rosa <i>et al.</i> (2005).
<b>PS2</b> , (GT)n amorces : GTTTCTTACGTGCCTATTTAGGATAAA CTAATTTCTCTGTGCTGC	<i>Phocæna spinipinnis</i> <i>Phocæna sinus</i> <i>Phocæna dioptrica</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Neophocæna phocænoides</i> <i>Phocæna phocæna</i>	118 1 1 1 1 13	7 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1	85-117	0,74	0,73	Rosa <i>et al.</i> (2005).
<b>PS3</b> , (TG)n amorces : GTTTCTTATCTTCTCAGGCTGTTCTCTACA CAGATGGTGGAAAGAAAAAGAA	<i>Phocæna spinipinnis</i> <i>Phocæna sinus</i> <i>Phocæna dioptrica</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Neophocæna phocænoides</i> <i>Phocæna phocæna</i>	118 1 1 1 1 13	6 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1	99-112	0,64	0,59	Rosa <i>et al.</i> (2005).
<b>PS4</b> , (AC)n amorces : GTTTCTTACAGCTGCTAATAAAGTTATTC TCACTCATCAACTCCATGCAA	<i>Phocæna spinipinnis</i> <i>Phocæna sinus</i> <i>Phocæna dioptrica</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Neophocæna phocænoides</i> <i>Phocæna phocæna</i>	118 1 1 1 1 13	9 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1	99-107	0,78	0,74	Rosa <i>et al.</i> (2005).

<b>PS5</b> , (GT)n amorces : GTTTCTGTTTTCTAATGTGTTACTTTAAGG T ACAAAAGTTATATGAAAAGCATGTGTA	<i>Phocæna spinipinnis</i> <i>Phocæna sinus</i> <i>Phocæna dioptrica</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Neophocæna phocænoides</i> <i>Phocæna phocæna</i>	118 1 1 1 1 13	4 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1	89-101	0,49	0,44	Rosa <i>et al.</i> (2005).
<b>PS6</b> , (AC)n amorces : GTTTCTTCACACGCACATATACTGC GGAAAAGGATAAAAGCAGATAAGA	<i>Phocæna spinipinnis</i> <i>Phocæna sinus</i> <i>Phocæna dioptrica</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Neophocæna phocænoides</i> <i>Phocæna phocæna</i>	118 1 1 1 1 13	8 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1	98-114	0,73	0,68	Rosa <i>et al.</i> (2005).
<b>PS7</b> , (GT)n amorces : GTTTCTTAAAAATAAAGAAGTGAAAAGGATA GG AAGCCTGCTACCAACACA	<i>Phocæna spinipinnis</i> <i>Phocæna sinus</i> <i>Phocæna dioptrica</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Neophocæna phocænoides</i> <i>Phocæna phocæna</i>	118 1 1 1 1 13	8 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1	81-89	0,79	0,69	Rosa <i>et al.</i> (2005).
<b>PS8</b> , (AC)n amorces : GTTTCTTCTCTATTTTTGACTGCTTT ATTAGTTACCCATTTTATCATAA	<i>Phocæna spinipinnis</i> <i>Phocæna sinus</i> <i>Phocæna dioptrica</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Neophocæna phocænoides</i> <i>Phocæna phocæna</i>	118 1 1 1 1 13	10 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1	87-95	0,80	0,73	Rosa <i>et al.</i> (2005).
<b>PS9</b> , (AC)n amorces : GTTTCTTATATGTAGACCTATAGCTATATT T TTCAGGTGGAAATCTCTGT	<i>Phocæna spinipinnis</i> <i>Phocæna sinus</i> <i>Phocæna dioptrica</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Neophocæna phocænoides</i> <i>Phocæna phocæna</i>	118 1 1 1 1 13	7 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1	94-108	0,75	0,69	Rosa <i>et al.</i> (2005).
<b>PS10</b> , (GT)n amorces : GTTTCTTTCAGTGTTTGCTGTATACATTCTT G GATGCAGTCTCCTTAGATACTATG	<i>Phocæna spinipinnis</i> <i>Phocæna sinus</i> <i>Phocæna dioptrica</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Neophocæna phocænoides</i> <i>Phocæna phocæna</i>	118 1 1 1 1 13	6 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1	93-103	0,72	0,58	Rosa <i>et al.</i> (2005).
<b>PS11</b> , (GT)n amorces : GTTTCTTTAGGAATGAGTTTCTCTCTAAT TTTTTTGACTTCATCAACA	<i>Phocæna spinipinnis</i> <i>Phocæna sinus</i> <i>Phocæna dioptrica</i> <i>Phocænoides dalli</i> <i>Neophocæna phocænoides</i> <i>Phocæna phocæna</i>	118 1 1 1 1 13	4 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1 ≥1	97-103	0,68	0,53	Rosa <i>et al.</i> (2005).
<b>PPHO104</b> , (CA)n GenBank : AF151790 amorces : CCTGAGGTGTGTAGTCA GACCACTCCTTATTTATGG	<i>Phocæna phocæna</i>	275	≥17	134-192	0,87≤He≤0,90	0,84≤Ho≤0,92	Rosel <i>et al.</i> (1999).
<b>PPHO110</b> , (CA)n GenBank : AF151785 amorces :	<i>Phocæna phocæna</i>	274	≥12	101-129	0,78≤He≤0,85	0,65≤Ho≤0,94	Rosel <i>et al.</i> (1999).

ATGAGATAAAATTGCATAGA ATCATTAACTGGACTGTAGACCTT							
<b>PPHO130</b> , (CA)n GenBank : AF151786 amorces : CAAGCCCTTACACATATG TATTGAGTAAAAGCAATTTTG	<i>Phocæna phocæna</i>	276	$\geq 15$	166-202	$0,89 \leq He \leq 0,92$	$0,87 \leq Ho \leq 0,98$	Rosel <i>et al.</i> (1999).
<b>PPHO131</b> , (CA)n GenBank : AF151791 amorces : GTTAGGTACCAGCCTCC CTAGTTATCATGCAGGGAGT	<i>Phocæna phocæna</i>	274	$\geq 9$	182-198	$0,81 \leq He \leq 0,84$	$0,79 \leq Ho \leq 0,84$	Rosel <i>et al.</i> (1999).
<b>PPHO133</b> , (CA)n GenBank : AF151792 amorces : AGGGGTTTCTGAAGTGA CCTTAATCACACCTTGG	<i>Phocæna phocæna</i>	271	$\geq 14$	173-203	$0,86 \leq He \leq 0,89$	$0,53 \leq Ho \leq 0,69$	Rosel <i>et al.</i> (1999).
<b>PPHO137</b> , (CA)n GenBank : AF151787 amorces : CAGGGCGGCCATGTACAGTTGAT GAGTTTGGCTCCCTCTCCAG	<i>Phocæna phocæna</i>	274	$\geq 18$	94-140	$0,89 \leq He \leq 0,92$	$0,86 \leq Ho \leq 0,98$	Rosel <i>et al.</i> (1999).
<b>PPHO142</b> , (CA)n GenBank : AF151789 amorces : GAAGGCTCAGGGTATTG CAGTTACTTTCCTCGGG	<i>Phocæna phocæna</i>	275	$\geq 16$	127-161	$0,86 \leq He \leq 0,90$	$0,83 \leq Ho \leq 0,90$	Rosel <i>et al.</i> (1999).



## B. Nature des motifs répétés

Le tableau 3 présente un bilan de la nature des motifs répétés formant les microsatellites présentés dans le tableau 2.

		Locus					Études					Rapports
		nb	/ cat	% cat	/ total	% total	nb	/ cat	% cat	/ total	% total	nb
Dimères	CA	119	0,94	94	0,79	79	10	0,71	71	0,42	42	11,9
	CT	4	0,03	3,2	0,03	2,7	2	0,14	14	0,08	8,3	2
	GC	1	0,01	0,79	0,01	0,67	0	0	0	0	0	
	AT	2	0,02	1,6	0,01	1,3	0	0	0	0	0	
	ND	0	0	0	0	0	2	0,14	14	0,08	8,3	0
	tous dimères	126	1	100	0,84	84	14	1	100	0,58	58	9
Trimères	AAT	5	1	100	0,03	3,3	2	0,4	40	0,08	8,3	2,5
	CAG	0	0	0	0	0	1	0,2	20	0,04	4,2	0
	ND	0	0	0	0	0	2	0,4	40	0,08	8,3	0
	tous trimères	5	1	100	0,03	3,3	5	1	100	0,21	21	1
Tétramères	GATA	8	0,42	42	0,05	5,3	2	0,4	40	0,08	8,3	4
	GAAT	1	0,05	5,3	0,01	0,67	0	0	0	0	0	
	GGAA	1	0,05	5,3	0,01	0,67	0	0	0	0	0	
	GGAT	1	0,05	5,3	0,01	0,67	0	0	0	0	0	
	ACCC	1	0,05	5,3	0,01	0,67	0	0	0	0	0	
	CTAT	4	0,21	21	0,01	2,7	0	0	0	0	0	
	GTCG	1	0,05	5,3	0,01	0,67	0	0	0	0	0	
	TAAA	1	0,05	5,3	0,01	0,67	0	0	0	0	0	
	GAAA	1	0,05	5,3	0,01	0,67	1	0,2	20	0,04	4,2	1
	ND	0	0	0	0	0	2	0,4	40	0,08	8,3	0
	tous tétramères	19	1	100	0,13	13	5	1	100	0,21	21	3,8
<b>Totaux</b>		<b>150</b>			1	100	<b>24</b>			1	100	<b>6,25</b>

**Tab. 3.** Bilan des nombres et proportions de chaque type de répétition constituant les microsatellites amplifiés chez des cétacés. ND : nature du motif non précisée dans l'étude de référence.

*Données « locus ».* Les valeurs font référence au nombre de locus consistant en la répétition d'un certain motif. Par exemple, 119 locus consistent en la répétition du motif CA. / cat : rapport entre le nombre de locus consistant en la répétition d'un certain motif et le nombre total de locus de la même catégorie ; par exemple : les locus en (CA)<sub>n</sub> représentent 0,94 des locus en dimères. / total : rapport entre le nombre de locus consistant en la répétition d'un certain motif et le nombre total de locus ; par exemple : les locus en (CA)<sub>n</sub> représentent 0,79 du total des locus.

*Données « études ».* Les valeurs font référence au nombre d'études d'isolement de microsatellites dans lesquelles le motif a été spécifiquement recherché à l'aide de la sonde complémentaire. Par exemple, le motif CA a été recherché dans 10 études. Les données / cat et / total ont une signification analogue à leur signification dans les données « locus ».

% cat et % total représentent respectivement les données / cat et / total exprimées en pourcentages.

*Données « rapports ».* Cette colonne présente le rapport entre le nombre de locus comportant un certain motif, et le nombre d'études où ce motif a été spécifiquement recherché au moyen de la sonde complémentaire.

On voit que les dimères, et en particulier le motif CA, sont les motifs les plus rencontrés, avec 126 locus, contre cinq trimères et 19 tétramères. Ces motifs sont également les plus fréquemment recherchés (recherchés dans 14 études, contre cinq pour les trimères et

pour les tétramères). Si l'on rapporte le nombre de locus d'un certain type amplifiés au nombre d'études où ce type de locus a été recherché, on voit que les dimères (neuf locus par étude) et en particulier le motif (CA)<sub>n</sub> seraient les motifs les plus abondants dans le génome des cétacés.

### C. Essais d'amplification de GATA053 chez quelques espèces

Les essais d'amplification de GATA053 chez quelques individus de plusieurs espèces (voir la section « Matériel et Méthodes ») n'ont donné de résultats clairs que chez le dauphin commun (*Delphinus delphis*). Chez cette espèce, la taille des produits d'amplification est comparable à la taille des produits d'amplification chez *Stenella cæruleoalba* (voir tableau 2) : de 289 à 297 pb.

Chez les autres espèces, des produits ont été amplifiés, mais nous ne pouvons pas assurer qu'il s'agisse réellement du marqueur GATA053. En effet, les essais ont été réalisés sur un nombre très réduit d'individus, et les produits d'amplification n'ont pas été séquencés.

## II. Proposition de multiplex chez *Stenella cæruleoalba*.

### A. Succès des amplifications

Cinq des six locus testés ont été amplifiés avec succès chez *Stenella cæruleoalba*. L'amplification du marqueur GATA417 a échoué.

### B. Constitution de multiplex

En fonction des contraintes présidant à l'association de marqueurs entre eux de façon à former des multiplex (voir la section « Matériel et Méthodes »), nous proposons les conditions expérimentales suivantes pour deux multiplex (tableau 4).

Multiplex	Marqueurs	Couleur marquage	Tailles (pb)	Concentration amorces	Température d'hybridation	Nombre de cycles
1.	GATA098	bleu	61-101	0,25 µM	51 °C	34
	MK9	bleu	152-188	0,5 µM		
	GATA053	vert	257-321	0,2 µM		
2.	MK6	vert	140-190	0,3 µM	50,5 °C	33
	EV92Mn	bleu	224-272	0,4 µM		

**Tab. 4.** Conditions expérimentales permettant l'amplification de cinq marqueurs en deux multiplex. Le tableau reprend les éléments propres à chaque multiplex. Les conditions expérimentales qui ne sont pas indiquées ici sont identiques pour les deux multiplex, et sont rappelées dans la section « Matériel et Méthodes ».

### C. Probabilités d'identité

Les probabilités d'identité ont été calculées par M. Bonhomme, suivant la méthode précisée par Bonhomme *et al.* (2005). Ces probabilités ont été obtenues à partir du génotype de 47 individus « méditerranéens », 32 individus « atlantiques », et 10 individus « pacifiques ».

La probabilité  $P_{ID}$  est la probabilité que deux individus pris au hasard dans la population aient un génotype identique. La probabilité  $P_{ID\ sib}$  est la probabilité que deux individus frère et sœur aient le même génotype. La probabilité  $P_{ID\ unbiased}$  est calculée à partir de  $P_{ID}$  et corrigée suivant la méthode de Paetkau *et al.* (1998) pour tenir compte de la taille de l'échantillon.

Ces probabilités sont calculées pour chaque locus pris isolément (tableau 5) puis pour l'ensemble de chaque multiplex (tableau 6).

Locus	Origine	Nombre d'individus génotypés	$P_{ID}$	$P_{ID\ unbiased}$	$P_{ID\ sib}$
GATA098	Méditerranée	47	0,05190541	0,04235736	0,3496621
	Atlantique	32	0,03227213	0,02099576	0,3247317
	Pacifique	10	0,04195	-0,001488095	0,3404875
MK9	Méditerranée	47	0,09199505	0,07836488	0,3987163
	Atlantique	32	0,02995722	0,01816641	0,3234135
	Pacifique	10	0,04935	0,006746032	0,3473375
GATA053	Méditerranée	47	0,3304362	0,3121059	0,5975563
	Atlantique	32	0,147306	0,1176182	0,4628495
	Pacifique	10	0,180175	0,08705357	0,4800438
MK6	Méditerranée	47	0,03367113	0,02378958	0,3329823
	Atlantique	32	0,01394125	0,005761566	0,2976787
	Pacifique	10	0,021525	-0,003521825	0,3103813
EV92Mn	Méditerranée	47	0,05913163	0,04945762	0,3569204
	Atlantique	32	0,04291127	0,0292693	0,3403239
	Pacifique	10	0,054375	0,008779762	0,3535938

**Tab. 5.** Probabilités d'identité monolocus, sous l'hypothèse de l'équilibre de Hardy-Weinberg (voir seconde partie). La signification des différentes probabilités est présentée dans le texte.

Multiplex	Origine	$P_{ID}$	$P_{ID\ unbiased}$	$P_{ID\ sib}$
GATA098 MK9 GATA053	Méditerranée	0,001577847	0,001035983	0,08330892
GATA098 MK9 GATA053	Atlantique	0,000142413	0,00004486163	0,04860968
GATA098 MK9 GATA053	Pacifique	0,000373004	-0,0000008739	0,05677193
MK6 EV92Mn	Méditerranée	0,001991029	0,001176576	0,1188482
MK6 EV92Mn	Atlantique	0,000598237	0,000168637	0,1013072
MK6 EV92Mn	Pacifique	0,001170422	-0,00003092079	0,1097489

**Tab. 6.** Probabilités d'identité multilocus (par multiplex), sous les hypothèses d'équilibre de Hardy-Weinberg et d'absence de déséquilibre de liaison (les alleles des différents locus ségrégent indépendamment les uns des autres).

### **III. Séquence des marqueurs chez *Stenella cæruleoalba***

La séquence de chaque marqueur chez *Stenella cæruleoalba* a été comparée à la séquence du même marqueur chez l'espèce chez laquelle il avait été d'abord isolé (*Megaptera novæangliæ* ou *Tursiops truncatus*) (figure 8). La présence des motifs répétés a ainsi été confirmée.





# Discussion

## **I. Bilan de l'amplification de microsatellites chez des cétacés**

### **A. Rappel : les microsatellites sont des marqueurs utiles en génétique des populations**

Les microsatellites sont des marqueurs très employés en génétique des populations. En particulier, leur polymorphisme, associé à leurs supposées codominance et neutralité dans les processus de sélection naturelle (voir cependant l'encadré 3), en font des outils très utilisés pour l'étude de la **variabilité** et la **structuration** génétiques des populations naturelles. L'étude de ces paramètres est considérée comme fondamentale pour l'évaluation de la viabilité à long terme des populations et des espèces.

#### **Encadré 3. Neutralité des microsatellites.**

Un locus « neutre » est un locus ne codant pas pour une protéine d'intérêt adaptatif. Ainsi, *a priori*, l'évolution des fréquences alléliques d'un marqueur polymorphe neutre n'est pas influencée par les processus de sélection naturelle.

Les microsatellites sont supposés non-codants et de ce fait sélectivement neutres. En effet, du fait de leur variabilité, le cadre de lecture (« open reading frame ») serait souvent modifié d'un allèle à l'autre. Ainsi, il paraît peu probable que ces séquences codent pour des protéines de valeur adaptative.

Cependant, on ne peut pas *a priori* exclure le fait qu'un microsatellite se trouve en déséquilibre de liaison avec un gène codant pour un caractère soumis à sélection. Par exemple, si un locus A est lié à un locus B, cela signifie que certains allèles de A sont préférentiellement associés à certains allèles de B (ce phénomène peut indiquer que les deux locus A et B se trouvent sur le même chromosome). Ainsi, de façon indirecte, les allèles d'un microsatellite se trouvant dans cette situation seraient « sélectionnés ».

Par ailleurs, le choix en génétique de la conservation de marqueurs supposés neutres, est discuté dans Beebe et Rowe (2004). En effet, on s'accorde à penser que la variabilité génétique d'une population est corrélée avec sa viabilité à long terme. Or, ce principe repose sur l'hypothèse selon laquelle la variabilité de marqueurs neutres est un indicateur de la variabilité de gènes d'intérêt adaptatif. Cette relation mérite d'être étudiée en détail. Peut-être que, dans l'avenir, les études de génétique de la conservation tiendront compte du polymorphisme de gènes codant pour des protéines d'intérêt adaptatif, ou de marqueurs liés à de tels gènes.

### **B. Conservation des séquences flanquantes au sein de l'Ordre des cétacés**

Des données moléculaires (ADN mitochondrial), en accord avec l'étude de fossiles, suggèrent que les mysticètes (sous-ordre des cétacés à fanons) et les odontocètes (sous-ordre des cétacés à dents) ont divergé voici 35 millions d'années environ (Berta *et al.*, 2006).

Cependant, il semble que, durant cet intervalle de temps, la séquence flanquante de certains microsatellites n'ait pas beaucoup évolué.

En effet, dès 1991, Schlötterer *et al.* mentionnent le fait que les microsatellites et les séquences bordant ces régions (qui contiennent les zones d'hybridation des amorces) semblent bien conservées entre différentes espèces de cétacés. Ils parviennent à amplifier

chez 10 autres espèces (six odontocètes : *Tursiops truncatus*, *Orcinus orca*, *Lagenorhynchus acutus*, *Phocæna phocæna*, *Physeter macrocephalus*, *Hyperoodon ampullatus*, et quatre mysticètes : *Balænoptera borealis*, *Balænoptera physalus*, *Balænoptera acutorostrata*, *Megaptera novæangliæ*) les quatre locus qu'ils ont isolés chez le globicéphale noir *Globicephala melas*.

Lors de notre étude, nous avons pu amplifier chez l'odontocète *Stenella cæruleoalba* deux des trois locus GATAXXX isolés chez un mysticète (*Megaptera novæangliæ*). Peut-être certaines zones d'hybridation des amorces de microsatellites font-elles partie de séquences codantes, donc dans une certaine mesure soumises à sélection. Cette hypothèse expliquerait alors le degré de conservation de certaines de ces séquences.

### C. Utilité du tableau récapitulatif

#### 1) En génétique des populations

Nous espérons que le tableau que nous proposons soit utile à de futures études de variabilité génétique.

Il offre en premier lieu un large aperçu des amplifications déjà réalisées chez de nombreuses espèces de cétacés, ainsi que du résultats de ces amplifications. Ainsi, les équipes souhaitant étudier la variabilité génétique d'une espèce peuvent choisir des microsatellites ayant déjà été amplifiés chez cette espèce, en ayant une idée préalable

- du degré de polymorphisme qu'ils peuvent attendre,
- de la fourchette de tailles des produits d'amplifications, ce qui leur permettra de prévoir la mise au point de multiplex autorisant un génotypage rapide et économique.

Ensuite, lors de l'étude de cétacés pour lesquels l'amplification de microsatellites adéquats n'est pas documentée, on peut espérer parvenir à amplifier certains marqueurs déjà étudiés chez d'autres espèces au sein de l'ordre. Les tentatives d'amplification croisée peuvent parfois aboutir étant donné le degré général de conservation des zones d'hybridation des amorces.

#### 2) Pour l'identification d'espèces

Dans le cas de quelques marqueurs, on peut noter des différences interspécifiques dans les fourchettes de taille des produits d'amplification. Par exemple, pour le marqueur GATA028 :

- le génotypage de 165 cachalots (*Physeter macrocephalus*) a donné des produits dont la taille varie entre 120 et 132 pb, alors que
- le génotypage de plusieurs centaines de mysticètes a donné des produits de taille plus élevée (de 146 à 246 pb pour quatre espèces de Balænopteridæ, voir le tableau 2).

La taille des allèles peut donc dans certains cas servir à identifier une espèce.

Cependant, ce critère n'est pas absolu, car on ne peut exclure le fait qu'un individu puisse présenter des allèles qui n'aient jamais été rencontrés dans son espèce au cours d'études préalables. De façon générale, on peut considérer que ce critère est d'autant plus fiable que les données de fourchettes de tailles proviennent du génotypage d'individus nombreux. Par exemple, la différenciation entre Physeteridæ et Balænopteridæ au moyen du locus GATA028 (plusieurs centaines d'individus génotypés) paraît relativement fiable. En revanche, la différenciation, au moyen du locus GT195, entre la baleine bleue (*Balænoptera musculus*), pour laquelle seulement quatre individus ont été génotypés, et les autres espèces de rorquals, n'est guère fiable.

## **II. Utilité des multiplex**

### **A. En génétique des populations**

Nous proposons des conditions optimisées pour l'amplification, en deux multiplex, de cinq marqueurs polymorphes chez *Stenella cæruleoalba* (cf tableau 4). La possibilité de co-amplifier plusieurs locus dans une seule et même PCR est utile pour connaître rapidement le génotype multilocus de nombreux individus. Les deux multiplex optimisés dans cette étude permettent d'amplifier ensemble des marqueurs polymorphes afin d'étudier la variabilité génétique intraspécifique, l'histoire démographique, et le degré de différenciation entre les populations de *Stenella cæruleoalba*.

### **B. Différenciation entre les individus : probabilités d'identité**

#### 1) $P_{ID\_sib}$

Bonhomme *et al.* (2005) citent l'étude de Woods *et al.* (1999) dans laquelle une valeur de  $P_{ID\_sib}$  inférieure à 0,05 est considérée comme acceptable pour estimer la taille de populations d'ours bruns, suivant une technique de marquage-recapture.

Le tableau 5 montre que dans notre étude, de telles valeurs ne sont jamais atteintes pour un seul locus : la valeur la plus basse de  $P_{ID\_sib}$ , correspondant au marqueur MK6 dans la population atlantique, est égale à 0,30 environ.

En revanche, de telles valeurs sont approchées lorsque l'on associe plusieurs marqueurs en multiplex. Le tableau 6 montre que, d'une population à l'autre, les valeurs de  $P_{ID\_sib}$  varient de 0,049 à 0,083 pour le premier multiplex, et de 0,10 à 0,12 pour le second. Ainsi, suivant les critères cités dans Bonhomme *et al.* (2005), le premier multiplex pourrait peut-être être utilisé dans l'Atlantique à des fins d'estimations démographiques. Cependant, il serait indispensable avant une telle étude de valider cette technique d'estimation chez *Stenella cæruleoalba*.

#### 2) $P_{ID}$ et $P_{ID\_unbiased}$

Bonhomme *et al.* (2005) citent l'étude de Waits *et al.* (2001) dans laquelle il est estimé que, suivant la taille estimée d'une population, une valeur de  $P_{ID}$  inférieure à  $10^{-3}$  ou  $10^{-4}$  est suffisante pour des applications légales chez des animaux sauvages.

Le tableau 5 montre que les valeurs de  $P_{ID}$  ne remplissent pas ces conditions lorsqu'on considère chaque locus séparément, la valeur la plus basse de  $P_{ID}$  étant de 0,014 pour le locus MK6 en Atlantique.

Cependant, l'échantillon pacifique à partir duquel ont été calculées les  $P_{ID}$  ne compte que 10 individus ; dans ce cas, il est utile de considérer la correction de Paetkau *et al.* (1998) (calcul de  $P_{ID\_unbiased}$ ). Effectivement, dans le cas des locus MK6 et GATA098, le calcul de  $P_{ID\_unbiased}$  pour la population pacifique donne des valeurs très basses (le résultat du calcul est négatif). Cette observation est cohérente avec le résultat de la seconde partie du présent document, selon lequel la population pacifique est la plus variable génétiquement. En effet, pour un locus donné, au plus la variabilité au sein d'une population est grande, au plus les probabilités d'identité sont faibles. Ainsi, le calcul de  $P_{ID}$  étant sans doute nettement biaisé à cause de la petite taille de l'échantillon pacifique, il est utile de considérer la valeur de  $P_{ID\_unbiased}$ . Dans cette population, les locus GATA098 et MK6, comptant de nombreux allèles en proportions équilibrées, pourraient être utilisés pour différencier deux individus dans un cadre légal.



Le tableau 6 montre que lorsque les locus sont associés en multiplex, les valeurs de  $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  citées par Bonhomme *et al.* (2005) ne sont pas atteintes en Méditerranée, même après correction. En revanche, ces valeurs sont atteintes :

- dans l'Atlantique, pour les deux multiplex,
- dans le Pacifique, pour le premier multiplex lorsqu'on n'applique pas la correction pour le biais d'échantillonnage, et pour les deux multiplex lorsqu'on applique cette correction.

En Méditerranée, la faible variabilité génétique des populations (voir les résultats de la seconde partie) ne permet pas l'utilisation de l'un ou l'autre multiplex pour différencier deux individus dans un contexte légal.

### C. Association de cinq marqueurs en un multiplex

Nous avons associé les cinq marqueurs en deux multiplex comme décrit dans le tableau 4, afin d'avoir le plus de chances possible de ne pas observer de recoupement entre les fourchettes de tailles de microsatellites marqués de la même couleur. Nous pouvons espérer que pour chaque marqueur, le génotypage de plus d'une centaine d'individus provenant de trois populations différentes nous ait donné des fourchettes de tailles fiables chez *Stenella caeruleoalba*. Ainsi, lors de l'identification des allèles par électrophorèse en gel d'acrylamide, nous pouvons espérer ne pas observer de recouvrement entre les fourchettes de taille des allèles de deux microsatellites marqués de la même couleur.

Par ailleurs, les conditions optimales pour l'amplification par PCR diffèrent peu entre les deux multiplex :

- écart de 0,5 °C entre les températures d'hybridation des amorces, et
- un cycle de PCR supplémentaire pour le premier multiplex.

Ajouter un cycle à la PCR d'amplification du second multiplex ne présenterait très probablement pas d'inconvénient. Il faudrait faire quelques essais pour déterminer la température optimale d'hybridation des amorces.

Le tableau 7 donne les caractéristiques du multiplex théorique résultant.

Marqueur	Couleur marquage	Tailles (pb)	Concentration amorces	Température d'hybridation	Nombre de cycles
GATA098	bleu	61-101	0,25 µM	50,5 °C ou 51 °C	34
MK9	bleu	152-188	0,5 µM		
GATA053	vert	257-321	0,2 µM		
MK6	vert	140-190	0,3 µM		
EV92Mn	bleu	224-272	0,4 µM		

**Tab. 7.** Conditions expérimentales qui permettraient l'amplification de cinq marqueurs en un multiplex. Les conditions qui ne sont pas indiquées ici sont rappelées dans la section « Matériel et Méthodes ». On remarque que, pour une même couleur de marquage (par exemple : bleu), les fourchettes de taille ne se recouvrent pas d'un marqueur à l'autre.

L'association des cinq marqueurs en un multiplex permettrait :

- un génotypage plus rapide de nombreux individus lors d'études en génétique des populations,
- une distinction plus fine entre différents individus (*ie* : des valeurs de  $P_{ID}$ ,  $P_{ID \text{ unbiased}}$ , et  $P_{ID \text{ sib}}$  plus basses).

### III. Séquence de GATA053 et évolution des cétacés

#### A. Séquence « propre à *Stenella* » : hypothèses phylogénétiques

L'alignement de la séquence de GATA053 obtenue chez *Stenella caeruleoalba* avec la séquence du même marqueur connue chez *Megaptera novaeangliae* (voir la figure 8) a permis de déduire la séquence d'un motif de 59 paires de bases « propre à *Stenella* » :

GAT**GATAGATAGATA**GACAGACAGCAGGGATGG**GATACACAGATA**CTAGAAGATGGGT.

Cette séquence est constituée en partie de répétitions du motif GATA.

Nous ne connaissons pas *a priori* l'histoire de l'évolution de la séquence de ce marqueur. Peut-être la séquence « propre à *Stenella* » représente-t-elle une insertion « d'un bloc » dans le génome de *Stenella caeruleoalba* ou une délétion « d'un bloc » dans le génome de *Megaptera novaeangliae*. Dans ce cas, on pourrait considérer que la probabilité que cet événement (insertion ou délétion) se soit produit plusieurs fois indépendamment au cours de l'évolution des cétacés est réduite.

Ainsi :

- si ce motif a été **inséré d'un bloc** au cours de l'évolution des cétacés, on peut supposer que les espèces présentant exactement ce motif à cet endroit forment un groupe **monophylétique** (voir l'encadré 4) caractérisé par la **synapomorphie** « **présence de ce motif** ».
- si, au contraire, ce motif a été **perdu d'un bloc** au cours de l'évolution des cétacés, ce sont les espèces ne présentant pas ce motif qui constitueraient un groupe monophylétique, caractérisé par la **synapomorphie** « **absence de ce motif** ».

#### **Encadré 4. Elements de vocabulaire du domaine de la phylogénie.**

Groupe monophylétique : groupe évolutif comprenant un ancêtre commun et tous ses descendants.

Apomorphe : se dit d'un caractère dérivé, apparu au cours de l'évolution.

Plesiomorphe : se dit d'un caractère ancestral, primitif.

Synapomorphie : caractère apomorphe partagée entre plusieurs groupes.

Synplésiomorphie : caractère plesiomorphe partagée entre plusieurs groupes.

#### B. Apports du bilan d'amplifications et perspectives d'études futures

Voici les fourchettes de tailles des produits d'amplification du marqueur GATA053 (d'après le tableau 2) pour six espèces.

Espèce	Nombre d'individus	Fourchette de tailles
<i>Balænoptera musculus</i>	19	192-196
<i>Balænoptera physalus</i>	358	180-220
<i>Megaptera novaeangliae</i>	3037	178-210
<i>Physeter macrocephalus</i>	143	257-279
<b><i>Stenella caeruleoalba</i></b>	<b>117</b>	<b>257-321</b>
<b><i>Delphinus delphis</i></b>	<b>8</b>	<b>289-297</b>

Les données en **gras** correspondent aux résultats de notre étude.

On voit que, pour l'ensemble des trois espèces de mysticètes étudiés, les tailles varient de 178 à 210 pb, alors qu'elles varient de 256 à 321 pb pour l'ensemble des trois espèces d'odontocètes étudiées.

Ainsi, plusieurs étapes seraient nécessaires pour déterminer l'histoire évolutive de ce marqueur.

1. Séquencer le marqueur chez ces six espèces, puis réaliser des alignements paire à paire afin de voir si les différences de fourchettes de tailles sont bien dues à la présence ou absence du motif étudié.
2. Réaliser cette étude chez d'autres espèces de cétacés et chez une espèce proche de l'ordre des cétacés mais externe à celui-ci, par exemple l'hippopotame (*cf* Nikaido *et al.*, 1999), servant de « groupe externe ». La présence ou absence de ce motif dans le génome du groupe externe permettrait, le cas échéant, de savoir si ce motif a été inséré ou perdu au cours de l'évolution des cétacés.

Suite à cette étude, la caractérisation d'une synapomorphie permettrait peut-être de définir un groupe monophylétique au sein de l'ordre des cétacés (voir le § A. de ce même chapitre), ce qui pourrait représenter un progrès dans la connaissance de leur phylogénie. En effet, Berta *et al.* (2006) citent plusieurs études qui proposent des reconstructions phylogéniques différentes. Par exemple, chez les mysticètes, des données morphologiques (Geisler et Sanders, 2003) suggèrent parfois des reconstructions différentes par rapport aux données moléculaires (Rychel *et al.*, 2004). Il en est de même chez les odontocètes (comparer par exemple Heyning et Mead, 1990, avec Nikaido *et al.* 2001).

## Seconde partie

Structure génétique des populations de *Stenella  
coeruleoalba* en Méditerranée occidentale et zone  
atlantique proche

## Introduction

Nous allons nous attacher à l'étude de la variabilité génétique nucléaire intraspécifique chez le dauphin bleu-et-blanc, dans les eaux de Méditerranée occidentale et de la zone atlantique proche.

### Objectifs de cette étude

Nous évaluerons tout d'abord la **diversité génétique** nucléaire au sein des populations de dauphins bleu-et-blanc de la Méditerranée occidentale et de la zone atlantique adjacente. Nous estimerons ensuite l'importance de la **différenciation génétique** entre Méditerranée et Atlantique. Nous discuterons enfin la mise en évidence d'une **éventuelle structuration génétique** des populations **au sein de la Méditerranée**. (Matthias Macé s'étant consacré à l'étude de l'ADN mitochondrial des mêmes échantillons, nous envisagerons la comparaison des données mitochondriales et nucléaires lors de la discussion.)

### Résultats d'études antérieures

*Données morphologiques.* En moyenne, les dauphins bleu-et-blanc de Méditerranée sont plus petits que leurs congénères des autres régions du Monde, notamment de l'Atlantique (Archer, 1997). La longueur maximale des individus atlantiques est supérieure de 5 à 8 cm à celle des individus méditerranéens (Calzada et Aguilar, 1995). La comparaison des courbes de croissance entre les deux bassins montre une longueur asymptotique en fin de croissance supérieure chez les mâles atlantiques par rapport aux mâles méditerranéens (Di Méglio et Romero-Alvarez, 1996). Les auteurs supposent que la taille de l'échantillon de femelles était trop réduite pour permettre la détection d'une éventuelle différence significative (étude de 18 femelles atlantiques et 22 femelles méditerranéennes). La taille du crâne est supérieure chez les dauphins bleu-et-blanc atlantiques (Archer, 1997) par rapport à leurs congénères méditerranéens.

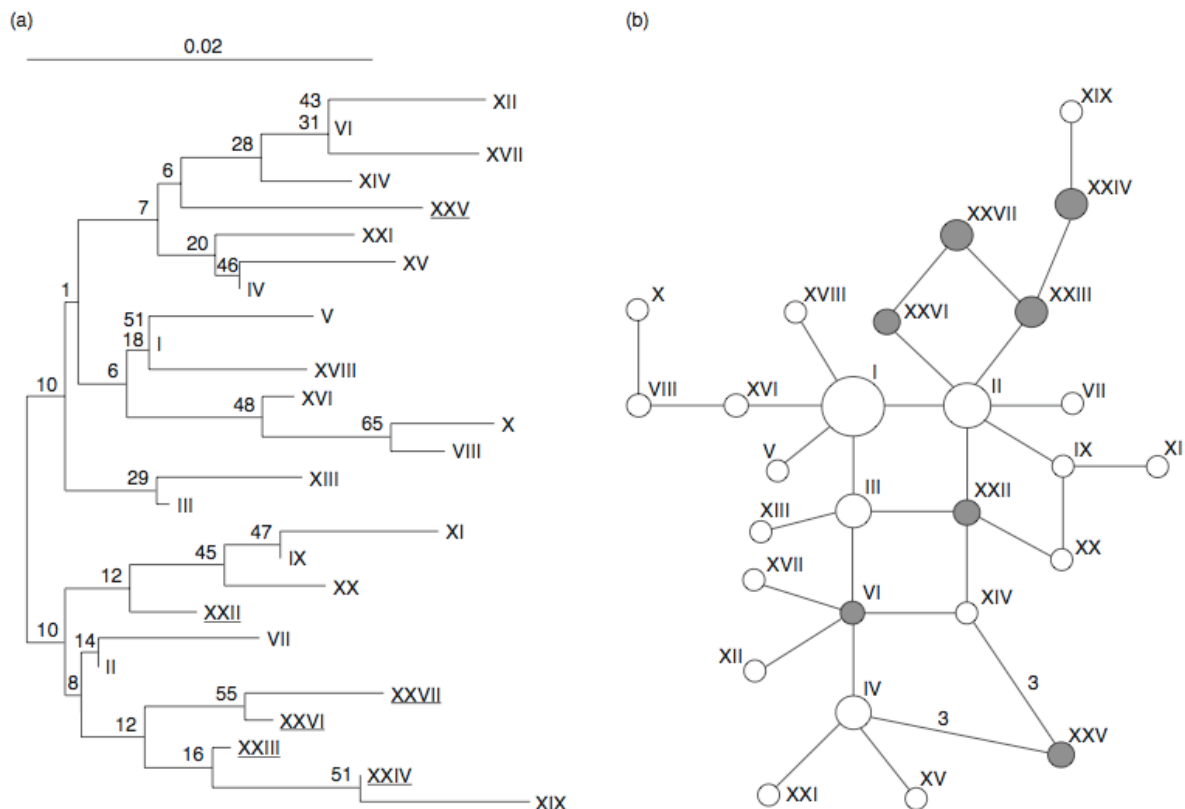
*Données épidémiologiques.* Lorsque l'épizootie de morbilivirose de 1990-1992 affecta la population méditerranéenne, aucun cas ne fut signalé dans la zone atlantique adjacente (Aguilar et Raga, 1993).

*Etude de l'ADN mitochondrial.* García Martínez *et al.* (1999) ont analysé le polymorphisme de restriction de l'ADN mitochondrial de 98 individus des côtes européennes méditerranéennes ( $n = 76$ ) et atlantiques ( $n = 22$ ). L'ADN mitochondrial a été mis en présence de 15 enzymes de restriction. Soixante-trois sites de restriction ont été obtenus, dont 17 polymorphes, donnant un total de 27 haplotypes différents (chaque haplotype étant défini par son patron de sites de restriction pour le jeu d'enzymes de restriction utilisé). L'indice de diversité nucléotidique de l'ADN mitochondrial ( $\pi$ ) suggère une plus grande diversité dans l'échantillon atlantique ( $\pi = 0,00322$ ) que dans l'échantillon méditerranéen ( $\pi = 0,00218$ ). Aucun haplotype n'est partagé entre les deux bassins. Les valeurs des statistiques de différenciation génétique entre les deux populations  $\Phi_{ST}$  et  $G_{ST}$  évoquent une différenciation génétique significative entre les deux bassins. Cependant, ni le « minimum spanning network » ni le « neighbour-joining tree » ne montrent une séparation claire entre le groupe des haplotypes méditerranéens et le groupe des haplotypes atlantiques (figure 9). Les auteurs envisagent plusieurs facteurs qui pourraient être à l'origine de la plus grande diversité nucléotidique observée dans l'échantillon atlantique :

1. origine plus ancienne de la population atlantique,

2. contact reproductif entre population atlantique échantillonnée et autres populations,
3. distance géographique entre échantillons atlantiques supérieure à la distance entre échantillons méditerranéens, ou encore
4. productivité des eaux plus élevée dans l'Atlantique.

Cette étude ne donne pas d'indication sur une éventuelle transmission de gènes par les mâles, entre les deux bassins ; rappelons en effet que l'ADN mitochondrial n'est transmis que par les femelles. Ainsi, chez les espèces au comportement social complexe, il est utile d'étudier la structure génétique des populations en faisant intervenir l'ADN nucléaire. Certaines études sur les cétacés montrent des résultats différents selon que l'on s'intéresse à l'ADN mitochondrial ou à l'ADN nucléaire des mêmes échantillons (Bérubé *et al.*, 1998).



**Fig. 9.** (a) « Neighbour-joining tree » déduit des estimations de divergence nucléotidique. Chaque chiffre romain représente un haplotype. Les haplotypes atlantiques sont soulignés. Les valeurs aux nœuds sont les pourcentages de coïncidence de « bootstrap » après 1000 répétitions. (b) « Minimum spanning network » déduit des différences nucléotidiques estimées pour chaque paire d'haplotype. Les cercles grisés correspondent aux haplotypes atlantiques, les cercles blancs aux haplotypes méditerranéens. L'aire du cercle est proportionnelle à l'abondance de chaque haplotype dans l'échantillon. Les lignes reliant les haplotypes représentent une étape mutationnelle simple, à l'exception des deux plus longues (légendées) qui représentent trois mutations. D'après García Martínez *et al.* (1999).

*Etude de microsatellites.* Valsecchi *et al.* (2004) ont comparé un échantillon de Mer du Nord ( $n = 6$ ) avec un échantillon de Méditerranée centrale et occidentale ( $n = 98$ ), pour neuf microsatellites. Les échantillons de Méditerranée ont montré une différenciation génétique significative d'avec ceux de Mer du Nord, estimée au moyen des statistiques  $F_{ST}$  ( $p = 0,003$ ) et  $R_{ST}$  non biaisé ( $p = 0,041$ ). Cependant, les individus « atlantiques » testés sont peu nombreux, et géographiquement éloignés de la Méditerranée. Il est donc pertinent d'analyser le génome d'individus de l'Atlantique plus nombreux et également plus proches du détroit de Gibraltar.

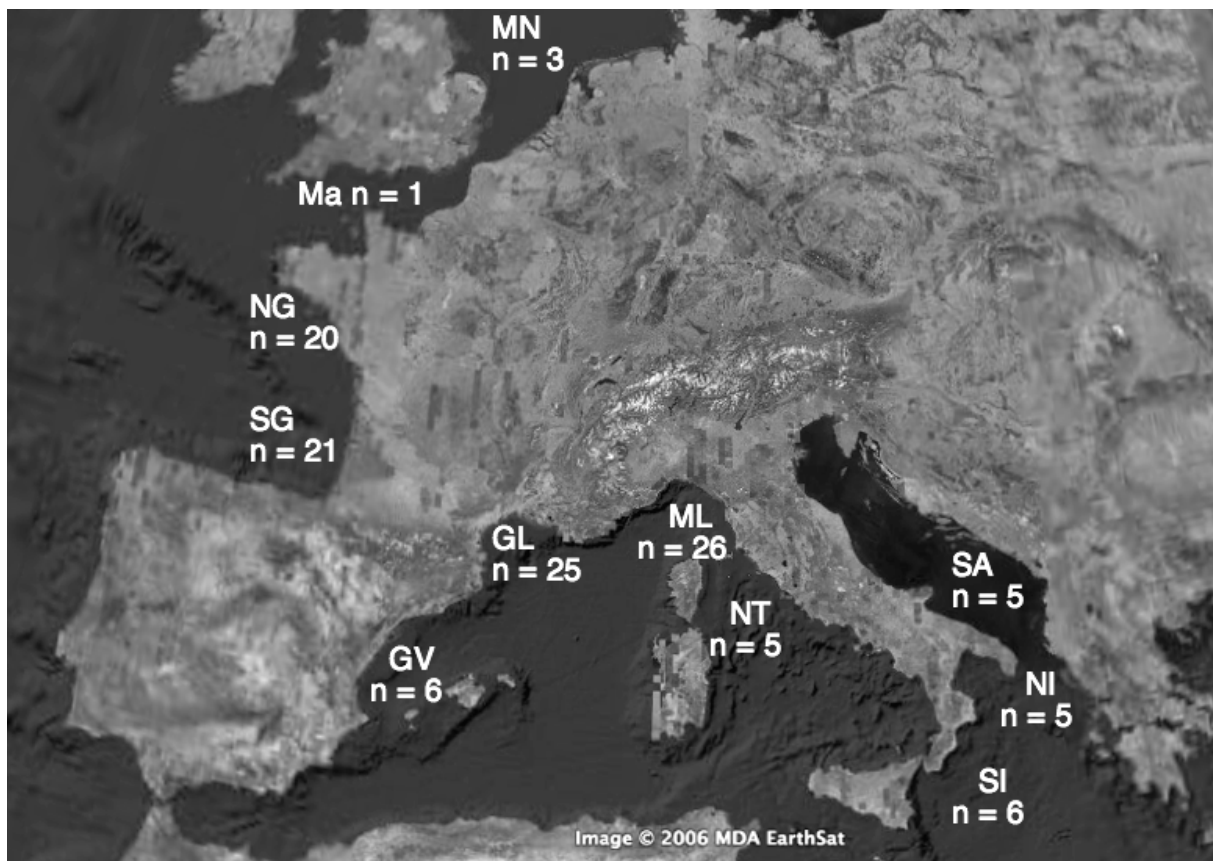
## Matériel et Méthodes

Pour les marqueurs choisis, il s'agit de géotyper les individus des différentes populations afin d'appréhender la structure génétique de ces populations. Les détails concernant le type d'échantillons utilisables ainsi que la mise au point des expérimentations sont rappelés dans la section « Matériel et Méthodes » de la première partie du document.

### I. Les échantillons utilisés

#### A. Description de l'échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé dans les populations de la Méditerranée occidentale et centrale, de l'Atlantique nord oriental, et du Pacifique nord (sud de l'Alaska et nord de l'archipel de Hawaï). Le nombre et l'origine géographique des échantillons européens sont repris sur la figure 10. Les 14 échantillons provenant du Pacifique nord constituent un « groupe externe », utile à l'analyse de la divergence entre Méditerranée et Atlantique.



**Fig. 10.** Origine géographique des échantillons utilisés. Les régions mentionnées correspondent aux régions d'échouage. MN : Mer du Nord, Ma : Manche, GG : Golfe de Gascogne, GV : Golfe de Valence, GL : Golfe du Lion, ML : Mer Ligure, NT : Tyrrhénienne nord, SI : Ionienne sud, NI : Ionienne nord, SA : Adriatique sud. n : nombre d'individus échantillonnés.

## **B. Obtention des échantillons.**

Les échantillons de la côte méditerranéenne française ont été fournis par F. Dhermain, du Groupe d'étude des cétacés en Méditerranée (GECEM), B. Lafitte, de la société Ets FERSO-BIO Agen, A.-S. Lemaire, J.-L. Fabre, et enfin M. Macé. Les échantillons des autres zones méditerranéennes et de Mer du Nord ont été fournis par E. Valsecchi.

Les échantillons des côtes atlantiques françaises et de la Manche ont été fournis par W. Dabin, du Centre de recherche sur les mammifères marins (CRMM), A. Dewez, du Groupe de recherche sur les Cétacés (GREC), et L. Soulier, du Musée de la Mer. Les échantillons du Pacifique nord ont été fournis par l'Université d'Alaska - Museum of the North (courtoisie de B. Jakobsen, conservateur).

Nous tenons à remercier chaleureusement tous ces collaborateurs pour leur aide précieuse.

## **II. Expérimentations : extraction d'ADN, PCR et électrophorèse**

Les conditions de réalisation et la mise en pratique de ces expérimentations sont décrites dans la première partie de ce document, section « Matériel et Méthodes ».

Pour certains individus, le génotype d'un ou plusieurs locus n'a pas pu être déterminé. Les causes de ces échecs ne sont généralement pas identifiées avec précision, mais il est probable que le mauvais état de l'ADN soit fréquemment en cause.

La proportion d'individus, par locus, dont le génotype est resté indéterminé, est : pour GATA098 : 6,52 % ; pour MK9 : 11,6 % ; pour GATA053 : 13,8 % ; pour MK6 : 15,2 % ; pour EV92Mn : 24,6 % ; pour GATA417: 100%.

## **III. Analyse des données**

### **A. Vérifications**

#### **1) Exactitude des données**

Les PCR et électrophorèse sont reproduites pour certains échantillons pris au hasard, afin de vérifier les résultats. Les profils électrophorétiques (voir la figure 5) doivent être attentivement analysés, et certains sont vérifiés par d'autres manipulateurs expérimentés. Les sources majeures d'erreurs de lecture sont i) la présence d'amplifications aspécifiques "parasites", ii) le phénomène de bandes-écho (voir la figure 5), iii) la diminution d'intensité des grands allèles (il s'agit d'un phénomène fréquent : les allèles de grande taille forment des pics moins intenses que les allèles plus petits). De façon secondaire, pour corriger d'éventuelles fautes de frappe, on peut utiliser le programme Microchecker (van Oosterhout *et al.*, 2004) pour vérifier que toutes les tailles d'allèles i) sont des nombres entiers, ii) pour un même locus, sont séparées entre elles par des multiples entiers du nombre de bases constituant le motif répété (par ex. quatre bases pour un marqueur constitué par la répétition d'un motif tétranucléotide). Ce programme propose également des algorithmes statistiques pour détecter des erreurs de lecture dus aux bandes-écho ou à la diminution d'intensité des pics pour les grands allèles.



## 2) Déséquilibre de liaison

Plusieurs locus peuvent être « liés » entre eux, c'est-à-dire « ségréger » ensemble ; dans ce cas, certains allèles de ces locus sont associés plus souvent qu'ils ne le seraient du fait du hasard, si la ségrégation des allèles des locus était indépendante. Ce phénomène peut par exemple indiquer que les deux locus A et B se trouvent sur le même chromosome. Un test statistique de liaison est réalisé à l'aide du programme Genepop (Raymond et Rousset, 1995), plus particulièrement de son interface « Genepop on the Web » à l'adresse <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/>.

## **B. Fréquences alléliques par population**

L'examen visuel des graphiques de fréquences alléliques par locus et par population donne les premières indications, locus par locus, quant à la variabilité génétique des populations. Par exemple, la diversité génétique au sein des différentes populations peut être comparée *via* la comparaison du nombre d'allèles représentés dans chaque population, et de l'équilibre entre les fréquences des différents allèles au sein d'une population. De même, **les profils de fréquences** peuvent être comparés d'une population à l'autre (il est par exemple intéressant d'observer si l'allèle le plus fréquent est le même d'une population à l'autre).

## **C. Paramètres de diversité génétique**

Le **nombre d'allèles différents par locus** est un premier indicateur de la diversité génétique d'une population. Cependant, le nombre d'allèles différents est un paramètre qui dépend de la taille de l'échantillon d'une part, et qui ne tient pas compte de la fréquence des allèles d'autre part (mais seulement de leur présence ou absence). Il est donc utile de calculer l'**hétérozygotie attendue** ( $H_e$ ). Ce paramètre représente, étant donnée la fréquence observée de chaque allèle, la proportion d'individus qui seraient hétérozygotes dans une population panmictique (encadré 6). Il ne dépend que des fréquences alléliques, et est d'autant plus élevé que les locus présentent des allèles nombreux et en proportions équilibrés. Ces paramètres sont calculés à l'aide du programme Genetix (Belkhir *et al.*, 1996-2004).

## **D. Paramètres de structuration génétique**

### 1) Structure génétique d'une population

L'**hétérozygotie observée** ( $H_o$ ) est le pourcentage réel d'individus hétérozygotes dans un échantillon. La population est « à l'équilibre » si  $H_o$  est identique à  $H_e$ . Une valeur de  $H_o$  significativement plus faible que celle de  $H_e$  peut avoir plusieurs significations : i) il existe des pressions évolutives sur les locus étudiés, ii) la consanguinité est significative, iii) l'échantillon testé est formé de deux ou plusieurs populations distinctes reproductivement (c'est l'« effet Wahlund »). La significativité de la différence entre  $H_o$  et  $H_e$  est testée de deux façons : par le « test exact de Hardy-Weinberg » (Guo et Thompson, 1992), et le calcul de l'indice  $F_{IS}$  de Wright (1969) selon Weir et Cockerham (1984).

### 2) Différenciation génétique entre les populations

Divers indices de distance ont été développés afin de quantifier les divergences génétiques à partir des données de fréquences alléliques. Nous calculons ici la **distance génétique corrigée de Nei (1978)** ( $D$ ) et le paramètre  **$F_{ST}$  de Wright (1969)**. Ce dernier est calculé ainsi :  $F_{ST} = 1 - H_S/H_T$ , où  $H_S$  est la moyenne des hétérozygoties attendues dans chacune des

différentes populations étudiées, et  $H_T$  est l'hétérozygotie attendue de l'ensemble des individus des populations étudiées. Ce paramètre rend compte de la part de la variabilité génétique totale qui n'existe pas à l'intérieur de chaque population. En d'autres termes,  $F_{ST}$  donne une estimation de la proportion de la variabilité totale due au facteur « appartenance à une population ». C'est un indicateur de divergence génétique entre populations. En pratique, nous le calculons pour chaque paire de populations, suivant la méthode de Weir et Cockerham (1984), à l'aide de Genetix. Le calcul de  $F_{ST}$  ne fait intervenir que les fréquences alléliques des deux échantillons comparés, alors que le calcul de chaque distance de Nei (1978) tient compte des fréquences alléliques de l'ensemble des échantillons pour chaque calcul.

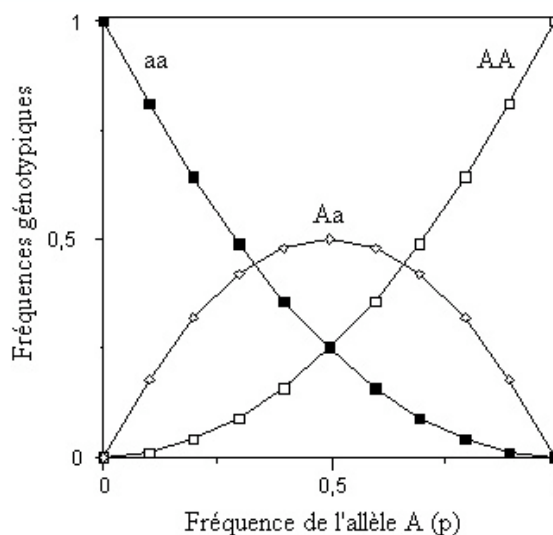
#### Encadré 6. Population théorique idéale, population panmictique (d'après Fleury).

Voici la définition d'une population théorique idéale.

- 1- Population d'organismes **diploïdes** à reproduction **sexuée** où les croisements sont entièrement **aléatoires** et à **générations non chevauchantes** (aucun croisement entre individus de générations différentes).
- 2- Population **d'effectif infini** donc ne souffrant pas de dérive génétique (voir la section « Discussion »).
- 3- Population close génétiquement (**absence de flux migratoires**).
- 4- Tous les individus, quel que soit leur génotype, ont la même capacité à se reproduire et à engendrer une descendance viable : **absence de sélection**.
- 5- **Absence de mutation** et de distorsion de ségrégation méiotique (un individu **Aa** produira toujours 50% de gamètes **A** et 50% de gamètes **a**).

Dans ce cas, la population est « à l'équilibre de Hardy-Weinberg » : les fréquences alléliques et génotypiques sont constantes au fil des générations.

Le croisement au hasard des individus, appelé système de **reproduction panmictique**, est une hypothèse essentielle, car elle permet d'estimer les fréquences génotypiques à partir des fréquences alléliques. Cette hypothèse suppose que les individus ne choisissent pas leur partenaire sexuel en fonction de son génotype, (**panmixie**) et que la rencontre des gamètes se fait au hasard (**pangamie**). Par exemple, dans le cas d'un locus à deux allèles **A** de fréquence  $p$  et **a** de fréquence  $q$ , si la reproduction est panmictique, on a les fréquences génotypiques  $P(AA) = p^2$ ,  $P(Aa) = 2pq$ , et  $P(aa) = q^2$ .



#### E. Significativité des valeurs : tests sur permutations

Pour les paramètres calculés à l'aide de Genetix, l'estimation du risque de première espèce  $\alpha$  est donnée par permutations : les allèles sont permutés entre eux aléatoirement puis le paramètre est recalculé. Cette opération est répétée 1000 fois afin de simuler la distribution du

paramètre sous l'hypothèse nulle. La proportion de permutations conduisant à une valeur du paramètre supérieure à la valeur calculée à partir des données non permutées, constitue un estimateur du risque de première espèce.

## Résultats

NB : sauf mention contraire, le seuil de significativité des tests statistiques est fixé à :  $\alpha$  (risque de première espèce) = 5%.

### I. Vérifications

#### A. Cohérence des données

Les données ont été vérifiées par locus et par population, d'abord (et surtout) visuellement, puis à l'aide de Microchecker. Aucun défaut d'identification des allèles de grande taille n'a été soupçonné. Pour le locus *EV92Mn* en Atlantique, un défaut de lecture dû au phénomène de bandes-écho est suspecté. En effet, Microchecker détecte un défaut significatif d'individus ayant un écart d'une seule répétition (*ie* : deux paires de bases) entre leurs deux allèles.

#### B. Déséquilibres de liaison

Voici les résultats des tests de déséquilibre de liaison par paire de locus sur l'ensemble des populations. L'hypothèse nulle est  $H_0$  : « le génotype au locus#1 et le génotype au locus#2 sont indépendants l'un de l'autre ».

Paire de locus	$\chi^2$	ddl	p-value
GATA098 & MK9	5,416	4	0,247
GATA098 & GATA053	6,543	4	0,162
MK9 & GATA053	7,682	6	0,262
GATA098 & MK6	4,407	4	0,354
MK9 & MK6	0,701	6	0,994
GATA053 & MK6	4,142	6	0,657
GATA098 & EV92Mn	4,078	4	0,396
MK9 & EV92Mn	1,303	4	0,861
GATA053 & EV92Mn	6,440	6	0,376
MK6 & EV92Mn	7,298	6	0,294

Sur l'ensemble des échantillons, aucun déséquilibre de liaison ne semble significatif.

Voici les résultats des tests de déséquilibre de liaison par population et paire de locus.

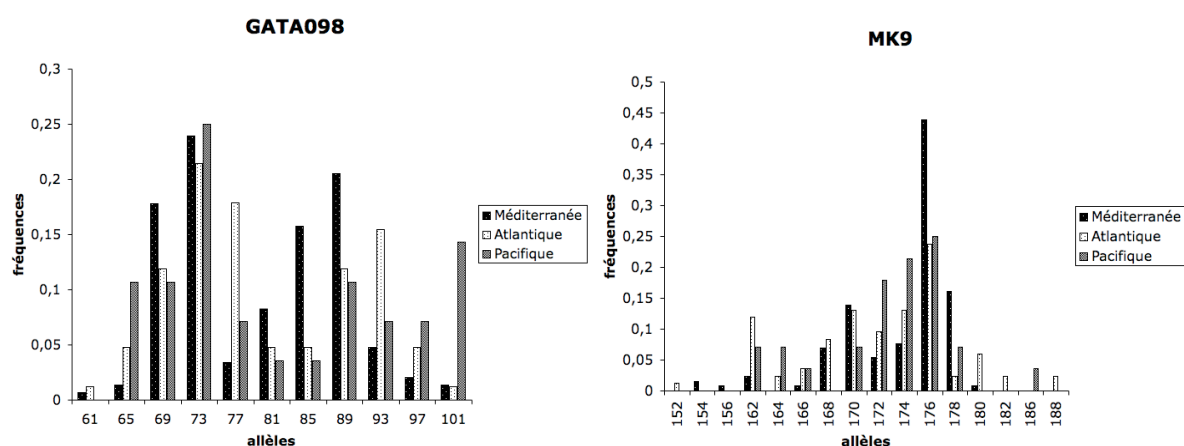
Population	locus#1	locus#2	p-value
Méd	GATA098	MK9	0,08305
<b>Méd</b>	<b>GATA098</b>	<b>GATA053</b>	<b>0,03807</b>
<b>Méd</b>	<b>MK9</b>	<b>GATA053</b>	<b>0,02816</b>
Méd	GATA098	MK6	0,65474
Méd	MK9	MK6	0,70418
Méd	GATA053	MK6	0,61125
Méd	GATA098	EV92Mn	0,96256
Méd	MK9	EV92Mn	0,83584
Méd	GATA053	EV92Mn	0,28664

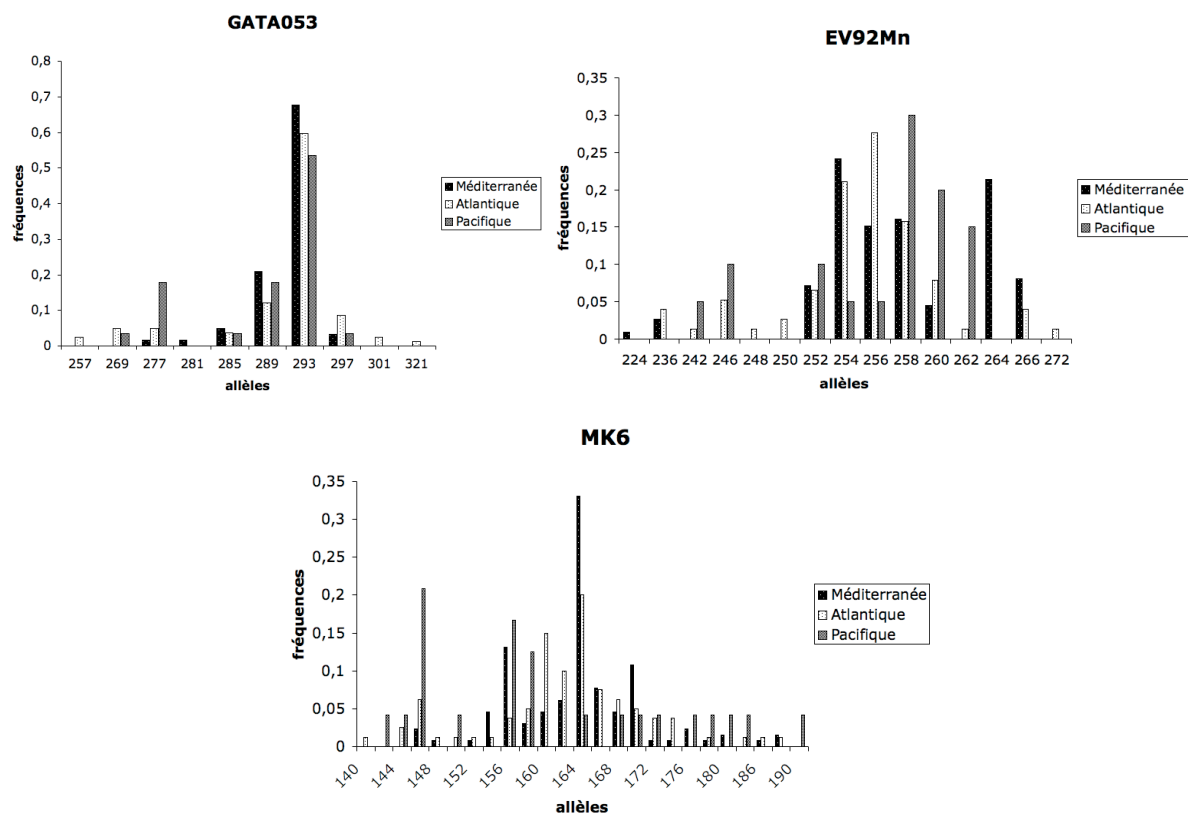
Méd	MK6	EV92Mn	0,07774
Atl	GATA098	MK9	0,80293
Atl	GATA098	GATA053	0,99687
Atl	MK9	GATA053	0,76238
Atl	GATA098	MK6	0,16862
Atl	MK9	MK6	1,00000
Atl	GATA053	MK6	0,20624
Atl	GATA098	EV92Mn	0,13520
Atl	MK9	EV92Mn	0,62369
Atl	GATA053	EV92Mn	0,13938
Atl	MK6	EV92Mn	0,33473
Ala	GATA098	MK9	non calculé
Ala	GATA098	GATA053	non calculé
Ala	MK9	GATA053	1,00000
Ala	GATA098	MK6	non calculé
Ala	MK9	MK6	1,00000
Ala	GATA053	MK6	1,00000
Ala	GATA098	EV92Mn	non calculé
Ala	MK9	EV92Mn	non calculé
Ala	GATA053	EV92Mn	1,00000
Ala	MK6	EV92Mn	1,00000

Pour l'Alaska, certains calculs n'ont pas été effectués par manque de données lorsque de trop nombreux allèles n'étaient pas identifiés (l'échantillon pacifique étant de petite taille). On note donc deux déséquilibres de liaison en Méditerranée : entre les locus GATA098 et GATA053 d'une part, et GATA098 et MK9 d'autre part.

## II. Fréquences alléliques

La figure 11 présente, locus par locus, la fréquence de chaque allèle pour chaque population.





**Fig. 11.** Fréquences alléliques par locus et par population.

Voici quelques tendances pouvant être observés.

- Pour tous les loci, il existe des allèles propres à certaines populations.
- Aux loci GATA098, MK9, et GATA053, l'allèle le plus fréquent est le même pour les trois populations ; aux loci GATA098, MK9, GATA053, et MK6, l'allèle le plus fréquent est le même pour l'Atlantique et la Méditerranée. Au locus MK6, l'allèle le plus fréquent dans la population pacifique est nettement plus court (146 pb) que l'allèle le plus fréquent dans les deux autres populations (164 pb).
- Les fréquences alléliques au locus GATA098 ont une répartition bimodale nette en Méditerranée.
- Sur l'ensemble des loci, les profils sont globalement plutôt similaires d'une population à l'autre. Cependant, il semble que les fréquences des différents allèles soient légèrement plus homogènes dans l'Atlantique qu'en Méditerranée, en particulier pour certains loci (GATA053, MK6).

### ***III. Diversité génétique***

#### **A. Nombre d'allèles par locus**

Le nombre d'allèles par locus et par population varie de six (GATA053 en Méditerranée et Pacifique nord) à 21 (MK6 en Atlantique) (voir tableau 8).

Locus, paramètres	Méditerranée	Atlantique	Pacifique
<b>GATA098</b>			
n	73	42	14
N <sub>A</sub>	11	11	10

He	0,8385	0,8709	0,8968
Ho	0,8082	0,8333	0,8571
<b>MK9</b>			
n	65	42	14
N <sub>A</sub>	11	13	9
He	0,7537	0,8821	0,8677
Ho	0,7538	0,7857	0,8571
<b>GATA053</b>			
n	62	41	14
N <sub>A</sub>	6	9	6
He	0,4972	0,6209	0,6693
Ho	0,3226	0,6098	0,7143
<b>MK6</b>			
n	65	40	12
N <sub>A</sub>	19	21	15
He	0,8495	0,9142	0,9312
Ho	0,9077	0,9250	1,0000
<b>EV92Mn</b>			
n	56	38	10
N <sub>A</sub>	9	13	8
He	0,8403	0,8477	0,8632
Ho	0,6250	0,5263	0,5000

**Tab. 8.** Nombre d'individus génotypés (n), nombre d'allèles différents (N<sub>A</sub>), hétérozygotie attendue non biaisée (Nei, 1978) (He), et hétérozygotie observée (Ho) pour chaque locus et chaque population.

*Nombre moyen d'allèles par population.* Le nombre d'allèles moyen par locus le plus élevé est observé pour l'échantillon atlantique, avec 13,4 allèles par locus en moyenne, alors que la valeur la plus basse concerne le Pacifique, avec 9,6 allèles par locus en moyenne (tableau 9). Cependant, rappelons que l'échantillon pacifique ne compte que 14 individus, contre 45 en Atlantique et 78 en Méditerranée, d'où l'utilité du calcul de l'hétérozygotie attendue non biaisée (Nei, 1978).

Population	N <sub>A</sub> moy.	He	Ho
<b>Méditerranée</b>	11,2	0,7558	0,6835
SE		0,1497	0,2261
<b>Atlantique</b>	13,4	0,8272	0,7360
SE		0,1178	0,1640
<b>Pacifique</b>	9,6	0,8456	0,7857
SE		0,1022	0,1890

**Tab. 9.** Nombre moyen d'allèles différents (N<sub>A</sub>moy), hétérozygotie attendue non biaisée moyenne (He), et hétérozygotie observée moyenne (Ho) par population (multilocus). SE, écart-type.

## B. Hétérozygotie attendue

L'hétérozygotie attendue non biaisée est un estimateur de la variabilité génétique. Sa valeur par locus et par population varie de 0,4972 pour GATA053 en Méditerranée à 0,9312 pour MK6 dans le Pacifique (tableau 8). Sa valeur multilocus par population varie de 0,7558 en Méditerranée à 0,8456 dans le Pacifique nord (tableau 9).

**La diversité génétique est donc plus élevée dans l'Atlantique qu'en Méditerranée** (*cf* N<sub>A</sub> et He). Par ailleurs, on peut considérer que la population pacifique est plus variable que la population méditerranéenne (*cf* He), sa basse valeur de N<sub>A</sub> étant liée à la petite taille de l'échantillon pacifique.

#### IV. Différenciation génétique

##### A. Structuration au sein de chaque bassin

Pour la majorité des locus, la valeur de  $H_o$  est inférieure à la valeur de  $H_e$  (voir tableau 8). Cependant,  $H_o$  est supérieure à  $H_e$  pour quelques locus (MK6 dans les trois bassins, MK9 en Méditerranée, et GATA053 dans le Pacifique). Lorsque les locus sont groupés,  $H_o < H_e$  dans tous les bassins. Cette différence observée est testée statistiquement de deux façons : calcul de  $F_{IS}$ , et test de l'équilibre de Hardy-Weinberg (tableau 10).

Locus, paramètres	Méditerranée	Atlantique	Pacifique
<b>GATA098</b>			
$F_{IS}$	0,03630	0,04365	0,04587
HWE	0,2927	0,4984	0,8816
<b>MK9</b>			
$F_{IS}$	-0,00016	0,11045*	0,01266
HWE	0,4243	0,0230*	0,9177
<b>GATA053</b>			
$F_{IS}$	0,35313*	0,01816	-0,06996
HWE	0,0000*	0,6532	0,1915
<b>MK6</b>			
$F_{IS}$	-0,06908	-0,01192	-0,07755
HWE	0,4546	0,8143	0,8428
<b>EV92Mn</b>			
$F_{IS}$	0,25790*	0,38230*	0,43396*
HWE	0,0000*	0,0000*	0,0213*
<b>Tous locus</b>			
$F_{IS}$	<b>0,09649*</b>	<b>0,11148*</b>	<b>0,07464</b>
HWE	<b>≤0,001*</b>	<b>≤0,001*</b>	<b>0,3007</b>

**Tab. 10.** Valeurs de  $F_{IS}$  et résultats des tests de l'équilibre de Hardy-Weinberg (EHW). Les valeurs de  $F_{IS}$  signalées par un astérisque sont significativement différentes de zéro. Le tableau présente les valeurs du risque de première espèce ( $\alpha$ ) lors du rejet de l'hypothèse  $H_0$  : « la population est à l'équilibre de Hardy-Weinberg » ; les valeurs inférieures ou égales à 0,05 sont signalées par un astérisque.

Dans les bassins méditerranéen et atlantique, le défaut d'hétérozygotes sur l'ensemble des cinq locus est significatif



## B. Allèles nuls : calculs sur quatre locus

On observe, pour le locus *EV92Mn* et dans toutes les populations, une déviation significative par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg et des valeurs de  $F_{IS}$  élevées, notamment dans la population pacifique pour laquelle les quatre autres marqueurs sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Par ailleurs, toujours pour ce locus, le génotype de près de 25% des individus n'a pu être identifié sur gel d'acrylamide (contre 6 à 16 % pour les autres locus).

Cette situation évoque la possible présence d'un ou plusieurs allèles nuls. Un allèle nul est un allèle présent dans la population mais non identifié au laboratoire. Un individu homozygote pour cet allèle ne sera pas génotypé sur gel ; un individu hétérozygote (allèle nul)/(allèle visible) apparaîtra homozygote (allèle visible)/(allèle visible). Donc si, pour un locus donné, les allèles nuls sont nombreux ou fréquents :

- de nombreux individus ne seront pas génotypés,
- un excès « artificiel » d'homozygotes sera observé avec une valeur de  $F_{IS}$  « faussement » élevée, et une déviation exagérée par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Les résultats faisant intervenir *EV92Mn* doivent donc être interprétés avec précautions. On peut recalculer les paramètres  $N_A$ ,  $H_e$ ,  $H_o$ ,  $F_{IS}$  pour chaque population en excluant ce locus (tableau 11, figures 12 et 13).

Paramètre	Méditerranée	Atlantique	Pacifique
$N_A$	11,75	13,50	10,00
$H_e$	0,7347	0,8220	0,8413
$H_o$	0,6981	0,7885	0,8571
$F_{IS}$	0,05026*	0,04133	-0,01977
EHW (p)	≤ 0,01*	0,1415	0,8269

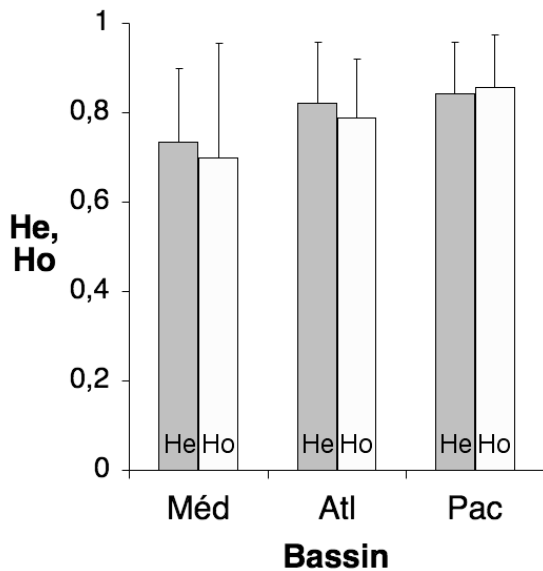
**Tableau 11.** Sur quatre locus (en excluant *EV92Mn*) : calculs du nombre moyen d'allèles différents par locus ( $N_A$ ), de l'hétérozygotie attendue non biaisée ( $H_e$ ), de l'hétérozygotie observée ( $H_o$ ), et tests de la différence entre  $H_o$  et  $H_e$  (valeurs de  $F_{IS}$  et valeur du risque de première espèce lors du test exact de Hardy-Weinberg).

Les valeurs des paramètres mesurant la diversité génétique ( $N_A$  et  $H_e$ ) restent comparables aux valeurs calculées avec cinq locus, et le classement des bassins par variabilité décroissante reste le même pour chaque paramètre (comparer le tableau 8 au tableau 11).

- d'après  $N_A$  : Atlantique > Méditerranée > Pacifique ;
- d'après  $H_e$  : Pacifique > Atlantique > Méditerranée (voir la figure 12)

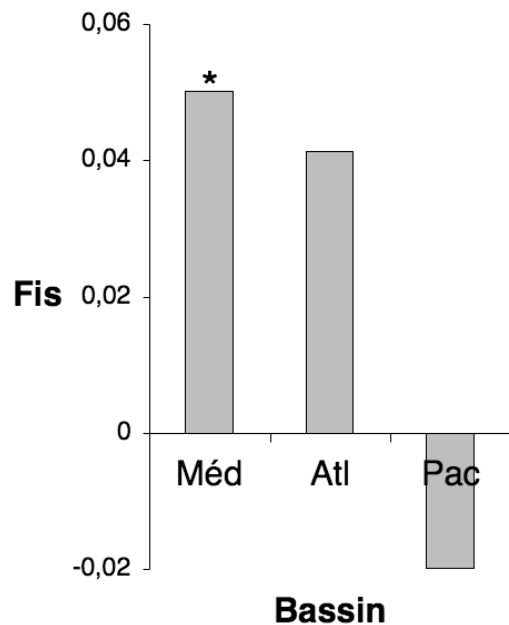
La conclusion selon laquelle la population méditerranéenne est la moins variable semble confirmée.

Lorsqu'on retire le locus *EV92Mn* des calculs, l'hétérozygotie observée augmente dans les trois bassins, particulièrement dans le Pacifique et l'Atlantique. En particulier, l'augmentation d' $H_o$  dans l'Atlantique conduit à ne plus percevoir de différence significative entre  $H_o$  et  $H_e$  dans ce bassin.



**Fig. 12.** Hétérozygoties attendue (He) et observée (Ho) moyennes calculées sur quatre locus pour chaque population. La ligne au-dessus de chaque barre indique l'écart-type. La valeur de He en Méditerranée est significativement plus faible que la valeur de He dans l'Atlantique ou le Pacifique ( $p < 0,05$  après tests de Student « par paires »). La différence d'hétérozygotie observée n'est significative qu'entre l'Atlantique et le Pacifique (au seuil  $p < 0,05$ , test de Student « par paires »). Méd : Méditerranée. Atl : Atlantique. Pac : Pacifique.

**Fig. 13.** Valeur du  $F_{IS}$  de Wright (1969) calculée pour chaque bassin à partir des données de quatre locus. \* : la différence d'avec zéro est significative au seuil  $p < 0,05$ . Les abréviations sont identiques à celles de la figure 12.



### C. Différenciation entre les bassins

#### 1) Distance de Nei (1978)

Le calcul de la distance génétique corrigée de Nei (1978) (D) entre chaque paire de populations a donné les résultats suivants (entre parenthèses, la valeur du risque d'erreur lorsqu'on rejette l'hypothèse  $H_0$  : « D est nulle »)

*Pour les cinq locus :*

- entre Méditerranée et Atlantique :  $D_{MA} = 0,085$  ( $p < 0,001$ )
- entre Méditerranée et Pacifique :  $D_{MP} = 0,166$  ( $p < 0,001$ )
- entre Atlantique et Pacifique :  $D_{AP} = 0,092$  ( $p < 0,001$ ).

Ces distances sont significativement différentes de zéro. L'ordre décroissant des distances est :  $D_{MP} > D_{AP} > D_{MA}$ .

*Lorsqu'on exclut EV92Mn des analyses, ces distances deviennent :*

- entre Méditerranée et Atlantique :  $D_{MA} = 0,066$  ( $p < 0,001$ )
- entre Méditerranée et Pacifique :  $D_{MP} = 0,106$  ( $p < 0,001$ )
- entre Atlantique et Pacifique :  $D_{AP} = 0,045$  ( $p < 0,001$ ).

Ces distances restent significatives, mais les trois valeurs sont inférieures aux valeurs trouvées en incluant *EV92Mn*. La distance la plus importante reste  $D_{MP}$ , cependant que  $D_{MA}$  est supérieure à  $D_{AP}$  (figure 14).

## 2) $F_{ST}$ de Wright (1969)

Une valeur de  $F_{ST}$  est calculée pour chaque paire de populations ; entre parenthèses, la valeur du risque d'erreur lorsqu'on rejette l'hypothèse  $H_0$  : «  $F_{ST}$  est nul ».

*Pour les cinq locus :*

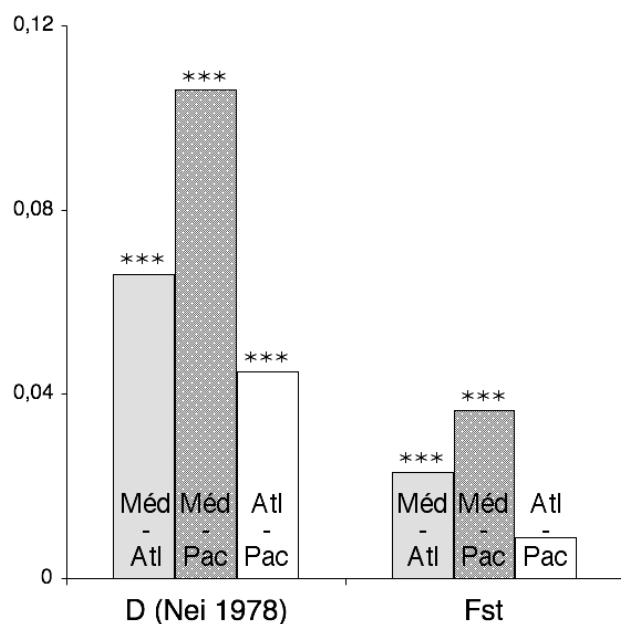
- entre Méditerranée et Atlantique :  $F_{ST MA} = 0,02369$  ( $p < 0,001$ )
- entre Méditerranée et Pacifique :  $F_{ST MP} = 0,04249$  ( $p < 0,001$ )
- entre Atlantique et Pacifique :  $F_{ST AP} = 0,01450$  ( $p = 0,036$ ).

Toutes ces valeurs sont faibles, mais significativement différentes de zéro. Entre la Méditerranée et chacun des deux autres bassins, la différenciation semble plus importante qu'entre l'Atlantique et le Pacifique.

*Lorsqu'on exclut *EV92Mn* :*

- entre Méditerranée et Atlantique :  $F_{ST MA} = 0,02305$  ( $p < 0,001$ )
- entre Méditerranée et Pacifique :  $F_{ST MP} = 0,03636$  ( $p = 0,001$ )
- entre Atlantique et Pacifique :  $F_{ST AP} = 0,00878$  ( $p = 0,088$ ).

La valeur de  $F_{ST}$  entre Atlantique et Pacifique n'est plus significativement différente de zéro (figure 14).



**Fig. 14.** Estimations, par paires de populations, de la distance génétique de Nei (1978) et du  $F_{ST}$  de Wright (1969). Les valeurs sont calculées à partir des fréquences génotypiques à quatre locus. \*\*\* : la valeur est significativement différente de zéro au seuil  $p < 0,001$ . Les abréviations sont identiques à celles de la figure 12.

## Discussion

### I. Vérifications

#### **A. Cohérence des données et erreurs de lecture**

Pour le locus *EV92Mn* en Atlantique, un défaut de lecture dû au phénomène de bandes-écho est suspecté. Ainsi, il semble d'autant plus prudent d'avoir réalisé les analyses statistiques en excluant ce locus.

#### **B. Déséquilibre de liaison**

Le déséquilibre de liaison est une situation dans laquelle les allèles de deux ou plusieurs locus ne sont pas associés au hasard. En d'autres termes, si deux locus A et B sont en déséquilibre de liaison, cela signifie que, pour un individu, le génotype au locus A « dépend » statistiquement du génotype au locus B. La détection, seulement en Méditerranée, d'un déséquilibre de liaison significatif entre deux paires de locus, peut être due à l'existence de différentes lignées reproductrices à l'intérieur de ce bassin. Cette hypothèse est discutée ci-après.

### II. La population méditerranéenne serait a priori la plus fragile

#### **A. Une population moins variable**

##### 1) Une variabilité nucléaire plus réduite que dans l'Atlantique et le Pacifique

Les valeurs de  $N_A$ ,  $H_e$  et  $H_o$  concordent en ce sens qu'elles suggèrent une diversité génétique nucléaire plus grande dans l'Atlantique qu'en Méditerranée. Ce résultat rappelle une observation de Valsecchi *et al.* (2004). À l'aide de neuf microsatellites, cette équipe avait observé que l'hétérozygotie observée d'un échantillon de six individus de mer du Nord ( $H_o = 0,90$ ) était supérieure à l'hétérozygotie observée d'un échantillon de 98 individus méditerranéens ( $H_o = 0,70$ ), sans toutefois que cette différence soit significative. Notre étude apporte un complément d'information intéressant. Tout d'abord, elle concerne des échantillons atlantiques plus nombreux ( $n = 45$ ), en nombre grossièrement comparable aux échantillons méditerranéens ( $n = 78$ ). Par ailleurs, nos échantillons proviennent pour une grande partie du Golfe de Gascogne, région plus proche du détroit de Gibraltar que la Mer du Nord. Enfin, la différence entre les bassins en termes d'hétérozygotie attendue est significative.

##### 2) Une variabilité mitochondriale également plus réduite

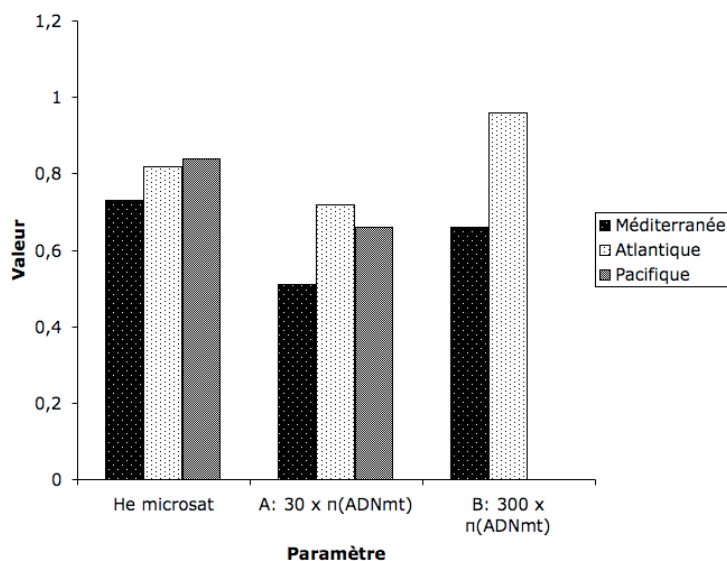
García Martínez *et al.* (1999) ont calculé une diversité nucléotidique mitochondriale ( $\pi$ ) plus élevée en Atlantique ( $\pi = 0,0032$ ) qu'en Méditerranée ( $\pi = 0,0022$ ). Par ailleurs, M. Macé a analysé la séquence de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial (ADNmt) des mêmes individus analysés dans notre étude. Il en a déduit des indices de diversité nucléotidique de 0,017 pour la Méditerranée, 0,024 pour l'Atlantique, et 0,022 pour le Pacifique. Les valeurs

absolues concernant la Méditerranée et l'Atlantique sont supérieures aux valeurs analogues calculées par García Martínez *et al.* (1999), mais la diversité nucléotidique en Méditerranée est effectivement inférieure à la diversité nucléotidique en Atlantique.

La comparaison des valeurs de diversité nucléotidique mitochondriale entre l'Atlantique et le Pacifique est à confronter à la comparaison des valeurs de He, calculées ici, entre ces deux bassins. En effet, dans les deux cas, la différence de variabilité est moins importante entre l'Atlantique et le Pacifique qu'entre la Méditerranée et l'un des deux autres bassins. La petite taille de l'échantillon pacifique ne permet pas une comparaison fine entre la variabilité de cette population et celle de la population atlantique. Retenons qu'en première approximation, la variabilité de la population pacifique paraît comparable à celle de la population atlantique, et supérieure à celle de la population méditerranéenne.

### 3) Bilan des comparaisons de variabilité

La figure 15 présente un bilan des calculs d'indices de variabilité nucléaire et mitochondriale pour les trois populations méditerranéenne, atlantique, et pacifique. On peut en conclure que la population de Méditerranée occidentale est la moins variable des trois, tant sur le plan nucléaire que sur le plan mitochondrial. Nos études semblent montrer des degrés de variabilité génétique comparables entre l'Atlantique et le Pacifique. Ce résultat devra être précisé par des analyses d'ADN faisant intervenir des échantillons pacifiques plus nombreux, et peut-être davantage de marqueurs nucléaires.



**Fig. 15.** Bilan des indices de variabilité génétique nucléaire et mitochondriale pour les trois bassins. Données « A » : données de M. Macé. Données « B » : données de García Martínez *et al.* (1999). Les valeurs de diversité nucléotidique mitochondriale ont été multipliées par 30 (A) et 300 (B) afin de permettre une visualisation plus facile.

### B. Une population plus réduite ?

Une variabilité génétique moindre peut être interprétée comme étant caractéristique d'une population de taille effective moindre (encadré 7).

Ainsi, on peut formuler l'hypothèse selon laquelle la population méditerranéenne a une taille effective plus réduite que les deux autres populations. Cette situation peut être interprétée de plusieurs façons qui ne s'excluent pas entre elles. i) L'effectif réel de Méditerranée occidentale est inférieur à l'effectif réel dans chacun des deux autres bassins. ii) Tous les individus de Méditerranée n'ont pas les mêmes chances d'accéder à la reproduction, ce qui pourrait être lié à diverses pressions, difficiles à quantifier, exercées sur cette population (par exemple, au sens large, dégradation de l'habitat).

### Encadré 7. Dérive génétique et taille effective d'une population ( $N_e$ ).

Soit une population de taille **finie**, présentant par ailleurs les caractéristiques d'une population théorique idéale suivantes (voir l'encadré 6, section Matériel et Méthodes) :

- 1- population d'organismes diploïdes à reproduction sexuée et à générations non chevauchantes (aucun croisement entre individus de générations différentes).
- 2- population où les croisements sont entièrement **aléatoires**.
- 3- population **close** génétiquement (absence de flux migratoires).
- 4- tous les individus, quel que soit leur génotype, ont la même capacité à se reproduire et à engendrer une descendance viable : **absence de sélection**.
- 5- **absence de mutation** et de distorsion de ségrégation méiotique (un individu **Aa** produira toujours 50% de gamètes **A** et 50% de gamètes **a**).

Cette population étant d'effectif **fini**, et les gamètes étant recrutés **au hasard** à chaque génération, chaque allèle d'un locus polymorphe a une certaine probabilité d'être **perdu** lors du passage d'une génération à la suivante. Cette probabilité est d'autant plus élevée que l'allèle est rare et que l'effectif de la population est **réduit**.

C'est le phénomène de **dérive génétique**, qui se traduit par un appauvrissement du patrimoine allélique de la population, et qui est d'autant plus marqué que **l'effectif** de cette population est réduit.

**La taille effective d'une population réelle ( $N_e$ )** est l'effectif d'une population par ailleurs idéale qui perdrait sa diversité génétique par dérive génétique à la même vitesse que la population réelle étudiée. En pratique,  $N_e$  est **souvent inférieur à l'effectif réel** de la population, car tous les individus n'ont pas les mêmes chances de transmettre leurs allèles à la génération suivante.

Par ailleurs, nous ne connaissons pas les relations génétiques entre les individus atlantiques que nous avons étudiés et les individus du reste de cet océan. Comme le suggèrent García Martínez *et al.* (1999), il est possible que la variabilité élevée de l'échantillon atlantique soit due aux contacts entre cet échantillon et diverses populations de passage dans cette partie de l'Atlantique nord.

### C. Variabilité et viabilité à long terme

Beebee et Rowe (2004) mentionnent les relations existant *a priori* entre variabilité génétique et viabilité à long terme d'une population (*cf supra*, Première partie, sections « Introduction » et « Discussion »). Ainsi, la viabilité à long terme de la population méditerranéenne serait *a priori* moins bonne que celle de la population atlantique.

Ces études de variabilité ont montré que **la population méditerranéenne de *Stenella caeruleoalba***, génétiquement moins variable et peut-être plus réduite, **était *a priori* la plus fragile des trois populations étudiées ici**, notamment à long terme.

## III. Différenciation génétique entre les populations des trois bassins

### A. Dans son ensemble, la population méditerranéenne est partiellement isolée

#### 1) Divergences nucléaires

Les divergences génétiques sont hautement **significatives** entre la population méditerranéenne d'une part et les populations atlantique ( $D_{MA} = 0,066$ ,  $F_{ST\ MA} = 0,023$ ) et pacifique ( $D_{MP} =$

0,106,  $F_{ST MP} = 0,042$ ) d'autre part. On considère généralement que suivant les valeurs de  $F_{ST}$ , la différenciation génétique entre les populations est :

de 0 à 0,05 : faible

de 0,05 à 0,15 : modérée

de 0,15 à 0,25 : importante

supérieure à 0,25 : très importante.

Ainsi, bien que significatives, ces valeurs sont **faibles**. De façon cohérente, la valeur de  $F_{ST}$  calculée par Valsecchi *et al.* (2004) entre Méditerranée et Mer du Nord est significativement différente de zéro. En effet, il eût été surprenant que les individus de Mer du Nord, mais pas les individus atlantiques, fussent apparentés aux individus méditerranéens.

## 2) Divergences mitochondriales

Les résultats de García Martínez *et al.* (1999) évoquent une franche divergence génétique entre Méditerranée occidentale et Atlantique nord sur le plan mitochondrial. En effet, rappelons (*cf supra*, section « Introduction ») qu'aucun haplotype de restriction n'était partagé entre les deux bassins. Cette différence notable a conduit les auteurs à calculer un indice Nm « mitochondrial » (Nmmt) pour lequel N représente le nombre effectif de femelles reproductrices, et m la proportion de migrants à chaque génération. Cette valeur, qui donne une estimation du nombre de femelles reproductrices migrantes à chaque génération, est de 0,98 entre Méditerranée et Atlantique.

## 3) Des femelles philopatrices ?

Toutes les valeurs de Nm doivent être interprétées avec une extrême précaution, comme le soulignent Valsecchi *et al.* (1997). En effet, ces interprétations reposent sur nombre de conditions qui, de façon générale, ne sont pas vérifiées dans la réalité. Le calcul de Nm est valable lorsque sont vérifiées certaines hypothèses dont on ne connaît *a priori* pas la validité dans la population réelle. Ainsi, nous ne pouvons pas interpréter les valeurs calculées de Nm comme des nombres réels de migrants à chaque génération. Tout au plus, ces valeurs peuvent être comparées entre différentes paires de population, voire peut-être entre différents marqueurs pour une même paire de populations.

Dans ces conditions, nous avons réalisé une estimation de Nm, où N est la taille effective de population et m est la proportion de migrants à chaque génération. Ce calcul donne une estimation de 10,30 pour les cinq locus, et de 10,60 sans le locus EV92Mn. Cette valeur ne représente pas un nombre réel de migrants à chaque génération. Cependant, elle est nettement supérieure à la valeur Nmmt de 0,98 calculée par García Martínez *et al.* (1999), où N était le nombre effectif de **femelles** reproductrices. La différence d'ordre de grandeur entre ces deux estimations venant de l'analyse de marqueurs différents peut suggérer que le flux génique médié par les mâles serait supérieur au flux génique médié par les femelles.

Effectivement, plusieurs études (par exemple les références citées dans Bérubé *et al.*, 1998) mentionnent le fait que, dans de nombreuses espèces de cétacés, les femelles montrent une philopatrie (attachement à un territoire géographique) supérieure à celle des mâles. Lors d'une étude portant sur des rorquals communs (*Balaenoptera physalus*), Bérubé *et al.* (1998) obtiennent une valeur de  $F_{ST}$  « mitochondrial » de 0,097 entre Méditerranée et Atlantique adjacent, ce qui correspondrait à une valeur de Nmmt relativement basse. En revanche, la valeur de  $F_{ST}$  « microsattellites » n'est pas significativement différente de zéro pour les mêmes échantillons, suggérant un flux de gènes important dû aux mouvements de mâles à travers le détroit de Gibraltar. De même, les dauphins bleu-et-blanc de Méditerranée seraient-ils peut-être caractérisés par une philopatrie des femelles supérieure à celle des mâles.

Notons que Bérubé *et al.* (1998) proposent aussi une autre hypothèse pour expliquer la plus grande différenciation entre deux bassins observée dans le cas du génome mitochondrial

par rapport au génome nucléaire. En effet, le génome mitochondrial n'existant que sous forme haploïde chez chaque individu, la taille effective de population prédite par le génome mitochondrial est quatre fois moindre que la taille effective de population prédite par le génome nucléaire. Ainsi, en cas d'isolement, par dérive génétique, le génome mitochondrial aurait tendance à se différencier plus rapidement que le génome nucléaire.

4) Des résultats concordants avec les études morphologiques et épidémiologiques

Les études morphologiques et épidémiologiques citées par Aguilar (2000) (*cf supra*, section « Introduction ») suggèrent elles aussi un certain degré de divergence entre population méditerranéenne et population atlantique. Ces résultats sont cohérents avec nos résultats de génétique nucléaire.

### **B. Quels sont les liens entre les populations atlantique et pacifique ?**

La distance génétique de Nei (1978) calculée entre Atlantique et Pacifique est de  $D_{AP} = 0,045$  ( $p < 0,001$ ). Cette distance est hautement significative, mais faible, et du même ordre de grandeur que la distance entre Atlantique et Méditerranée  $D_{MA} = 0,066$  ( $p < 0,001$ ). La valeur de  $F_{ST}$  entre Atlantique et Pacifique n'est pas significativement différente de zéro lorsqu'on exclut le locus douteux *EV92Mn*. Cependant Valsecchi *et al.* (1997) rappellent qu'il est hasardeux d'interpréter les valeurs de  $F_{ST}$  lorsque les échantillons sont de taille très inégale. Dans notre cas, où le nombre d'échantillons atlantiques est le triple du nombre d'échantillons pacifiques, ces résultats doivent être interprétés avec précaution.

Lors d'une étude portant sur les baleines à bosse (*Megaptera novæangliæ*), Valsecchi *et al.* (1997) calculent à l'aide de microsatellites une valeur de  $F_{ST}$  égale à 0,047 entre un échantillon du Pacifique nord et un échantillon de l'Atlantique nord de taille comparable. Cette valeur, bien que nettement supérieure à la nôtre, suggérerait un flux de gènes non nul entre les deux bassins. Les mysticètes sont généralement réputés migrer chaque année des eaux tropicales aux eaux froides et inversement ; peut-être une partie des individus changerait-elle parfois de bassin au cours de l'une de ces migrations.

Les dauphins bleu-et-blanc ont *a priori* une mobilité intrinsèque élevée, comparable à celle de grands mysticètes (Bérubé *et al.*, 1998), mais leurs habitudes migratoires dans l'Atlantique nord ne sont à notre connaissance pas bien élucidées. De plus, il s'agit d'une espèce d'eaux chaudes et tempérées, qui n'est généralement rencontrée ni au large de l'Argentine ou du Chili, ni dans les eaux de l'Archipel Canadien. La faible différenciation génétique apparente entre ces deux bassins n'est donc probablement pas expliquée par un flux de gènes actuel significatif.



#### IV. Structuration interne de la population méditerranéenne

**A. L'échantillon méditerranéen présente un excès d'homozygotes** (voir les tableaux 10 et 11)

##### 1) Un possible effet Wahlund

En Méditerranée, le défaut d'hétérozygotes observé par rapport au nombre d'hétérozygotes théoriquement attendus à l'équilibre de Hardy-Weinberg est significatif. Cette situation peut suggérer, outre l'existence d'une consanguinité significative ou de pressions sélectives exercées sur les locus étudiés, que l'échantillon est formé d'individus venant de deux ou plusieurs populations ne formant pas un ensemble panmictique. C'est l'« effet Wahlund » (voir encadré 8). Une des interprétations possibles est donc la suivante : la population méditerranéenne de dauphins bleu-et-blanc serait formé de deux ou plusieurs sous-populations formant un ensemble non panmictique.

##### **Encadré 8. L'effet Wahlund.**

Lorsqu'on analyse comme un ensemble des individus venant de plusieurs populations ayant divergé entre elles, on observe un manque d'hétérozygotes par rapport aux proportions attendue si la population formait un ensemble panmictique. C'est l' « effet Wahlund ».

Ce phénomène peut être formellement démontré ; nous donnerons ici un exemple. Soit un ensemble d'individus dans lesquels un locus présente deux allèles a et b, de fréquences  $p(a) = p = p(b) = q = 0,50$ . Un échantillon d'individus de cet ensemble est génotypé.

1<sup>er</sup> cas. Cet ensemble d'individus forme une population à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Dans ce cas, les fréquences génotypiques observées sont les suivantes :  $P(aa) = p^2 = 0,25$  ;  $P(bb) = q^2 = 0,25$  ;  $P(ab) = H_o = 2pq = 0,50 = H_e$ . L'hétérozygotie observée est égale à l'hétérozygotie attendue.

2<sup>nd</sup> cas. Cet ensemble d'individus provient de deux sous-populations, sp1 et sp2 d'effectif égal, ayant divergé entre elles de façon à ce que les fréquences alléliques soient les suivantes :  $p_1(a) = 0,75$  ;  $q_1(b) = 0,25$  ;  $p_2(a) = 0,25$  ;  $q_2(b) = 0,75$ . Chacune des sous-populations est cependant panmictique.

Dans ce cas, les fréquences génotypiques deviennent :

- dans la sous-populations sp1,  $P1(aa) = p_1^2 = 0,56$  ;  $P1(bb) = q_1^2 = 0,06$  ;  $P1(ab) = 2p_1q_1 = 0,38$ .
- de façon analogue, dans la sous-populations sp2,  $P2(aa) = 0,06$  ;  $P2(bb) = 0,56$  ;  $P2(ab) = 0,38$ .

Ainsi, lors de l'analyse, l'hétérozygotie observée sera égale à 0,38, alors que l'hétérozygotie attendue, qui ne dépend que des fréquences alléliques d'ensemble, sera égale à 0,50.

##### 2) Une structuration géographique ?

Nos échantillons méditerranéens proviennent de plusieurs zones géographiques. Nous pourrions calculer des indices de différenciation génétique entre ces différentes zones. Cependant, le nombre d'échantillon dont nous disposons est très variable d'une zone à l'autre, et l'interprétation des résultats serait fortement sujette à caution. Avec un échantillonnage légèrement plus équilibré, Valsecchi *et al.* (2004) ont testé la corrélation entre origine géographique et génotype au sein de la Méditerranée. Leurs résultats évoquent une possible structuration géographique des populations ; toutefois cet effet est peu marqué, et le petit nombre d'échantillons disponibles dans certaines zones rend les interprétations délicates.

##### 3) Une autre interprétation du défaut d'hétérozygotes

Valsecchi *et al.* (2004) constatent que dans leur échantillon, constitué d'animaux échoués, l'endogamie est élevée. Ceci se traduit par un excès d'homozygotes. Ces auteurs commentent

le fait que, de façon générale, les individus les plus consanguins auraient tendance à s'échouer plus fréquemment que les individus moins consanguins. Ainsi, les valeurs de  $F_{IS}$  seraient délicates à interpréter lors d'études portant sur des animaux échoués. Cependant, rappelons le fait que dans notre étude, l'échantillon atlantique, lorsqu'on exclut le locus *EV92Mn* douteux, ne présente pas un défaut d'hétérozygotes significatif. Ainsi, nous considérons que la valeur de  $F_{IS}$  significative observée en Méditerranée peut être le signe d'une structuration génétique à l'intérieur de ce bassin.

## B. Deux lignées mitochondriales en Méditerranée

### 1) Mise en évidence

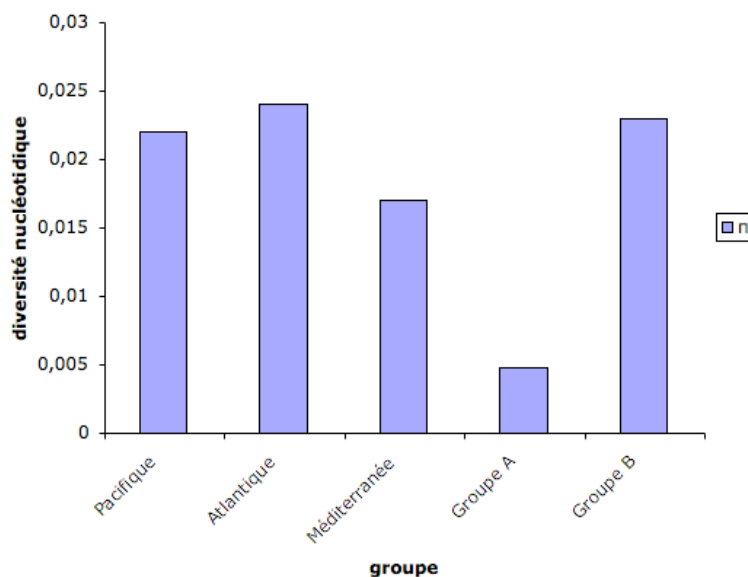
En séquençant la région de contrôle du génome mitochondrial, M. Macé a observé deux groupes de séquences. L'un d'eux (« groupe A ») est propre à la Méditerranée, l'autre (« groupe B ») est partagé entre Méditerranée et Atlantique. Ainsi, en Méditerranée, une lignée maternelle propre à ce bassin coexisterait avec une autre lignée maternelle se retrouvant par ailleurs dans l'Atlantique.

### 2) Variabilité génétique au sein de ces deux lignées

La figure 16 montre les indices de diversité nucléotidique mitochondriale calculés pour ces deux lignées. La variabilité génétique mitochondriale de l'ensemble de l'échantillon méditerranéen (« Méditerranée ») est intermédiaire entre la variabilité du groupe purement méditerranéen (« groupe A ») et la variabilité du groupe « méditerranéen / atlantique » (« groupe B »). La variabilité observée dans ce dernier groupe est comparable à la variabilité observée dans l'échantillon atlantique.

### 3) Interprétation de l'excès d'homozygotes observé avec les marqueurs nucléaires

La structuration génétique de la population méditerranéenne en deux lignées mitochondriales est une explication plausible au déficit global d'hétérozygotes observé dans cette population (« effet Wahlund »). Il semble donc que la population méditerranéenne soit constituée de deux lignées ne constituant pas un unique ensemble panmictique.



**Fig. 16.** Indice de variabilité nucléotidique ( $\pi$ ) de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial calculés pour plusieurs groupes d'échantillons (indiqués en abscisse).

### **C. Origine de la structuration génétique au sein de la population méditerranéenne (d'après M. Macé)**

La « Crise de Salinité Messinienne » est un grand événement géologique qui se serait produit voici cinq à six millions d'années. On suppose que des mouvements tectoniques ont été à l'origine de cet événement, se traduisant par un isolement du bassin méditerranéen par rapport à l'Atlantique. Peut-être les ancêtres du « groupe A » ont-ils été « piégés » dans ce bassin. La faible diversité génétique au sein de cette lignée suggère la possibilité d'un « goulet d'étranglement » (réduction momentanée de la taille effective d'une population) qui aurait pu avoir lieu voici quatre à cinq millions d'années. Cette situation aurait alors été aggravée par l'isolement reproductif et les conditions environnementales difficiles auxquelles aurait été confrontée la population.

### **V. Préserver la population méditerranéenne**

Les estimations absolues d'abondance de cétacés sont très délicates à obtenir. Dans le cas du dauphin bleu-et-blanc en méditerranée occidentale, on suggère habituellement une fourchette allant de plusieurs dizaines de milliers à quelques centaines de milliers d'individus (voir par exemple Aguilar, 2000, et les références indiquées dans cet article). Ces estimations semblent indiquer que cette population n'est pas en danger imminent d'extinction, mais il convient de rester prudent, pour plusieurs raisons.

1. Les effectifs de dauphins communs (*Delphinus delphis*) de Méditerranée occidentale sembleraient, d'après des témoignages repris par Bearzi (2003), avoir rapidement décliné en quelques dizaines d'années. Ce dauphin, peut-être bien représenté en Méditerranée occidentale au début du siècle dernier, y semble aujourd'hui devenu rare. Or, le dauphin bleu-et-blanc est proche écologiquement de cette espèce ; ses effectifs seraient donc *a priori* aussi susceptibles de diminuer rapidement.

2. La population méditerranéenne considérée dans son ensemble est moins variable génétiquement que les populations atlantique ou pacifique. Par ailleurs, cette population serait elle-même divisée en deux sous-populations divergentes dont l'une serait peut-être endémique de méditerranée, et présenterait une variabilité génétique particulièrement faible. Ainsi, cette population :

- est *a priori* vulnérable à long terme, du fait de sa relative homogénéité génétique,
- représente pour l'ensemble de l'espèce un patrimoine génétique à préserver.

3. Divers facteurs, dont l'effet est difficile à évaluer, sont susceptibles de menacer de façon plus ou moins directe les dauphins bleu-et-blanc en Méditerranée. Mentionnons par exemple la dégradation de l'habitat (pollution chimique, captures accidentelles dans divers engins de pêche, pollution sonore), ou diverses maladies, témoin l'épidémie de morbilivirose de 1990 - 1991 (Aguilar, 2000).

## Conclusions générales

I - Nous proposons une revue bibliographique des amplifications de microsatellites réalisées chez les cétacés et une description de conditions expérimentales optimisées pour l'amplification de plusieurs marqueurs en « multiplex ». Nous espérons que ces données apporteront une aide pratique à la résolution de diverses questions en génétique moléculaire des cétacés.

Cette étude a par ailleurs posé le problème de l'évolution d'un marqueur au sein de cet Ordre. L'analyse détaillée de cette évolution pourrait peut-être permettre d'éclaircir certains points concernant l'évolution au sein de l'Ordre des cétacés.

II - L'analyse de microsatellites chez *Stenella coeruleoalba* a montré que la population méditerranéenne était en partie isolée de la population atlantique, globalement moins variable que cette dernière, et peut-être subdivisée en différentes lignées reproductrices.

Le dauphin bleu-et-blanc ne semble pas menacé d'extinction à court terme en Méditerranée. Cependant, sa préservation ne doit pas être négligée et pourra être envisagée dans le cadre d'une politique de gestion responsable tenant compte de l'ensemble des acteurs du bassin méditerranéen, dont la situation géographique privilégiée et l'histoire géologique remarquable font un des grands « points chauds » du Monde en termes de biodiversité (Myers *et al.*, 2000).



## Références citées :

AGUILAR A.

Population biology, conservation threats and status of Mediterranean striped dolphins (*Stenella caeruleoalba*).

*Journal of cetacean research and management*, 2000, **2** (1): 17-26.

AGUILAR A., RAGA J. A.

The striped dolphin epizootic in the Mediterranean Sea.

*Ambio*, 1993, **22** (8): 524-528.

AMOS B., SCHLÖTTERER C., TAUTZ D.

Social-structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling.

*Science*, 1993, **260**: 670-672.

ANDERSEN L. W., BORN E. W., DIETZ R., HAUG T., OIEN N., BENDIXEN C.

Genetic population structure of Minke whales *Balænoptera acutorostrata* from Greenland, the north east Atlantic and the North Sea probably reflects different ecological regions.

*Marine Ecology - Progress Series*, 2003, **247**: 263-280.

ARCHER F. I.

Osteological variation in striped dolphins (*Stenella caeruleoalba*).

Article SC/49/SM28 présenté au comité scientifique de la Commission Baleinière Internationale, octobre 1997 (non publié). 30 pages.

BAKER C. S., MEDRANO-GONZALEZ L., CALAMBOKIDIS J., PERRY A., PICHLER F., ROSENBAUM H., STRALEY J. M., URBAN-RAMIREZ J., YAMAGUCHI M., VON ZIEGESAR O.

Population structure of nuclear and mitochondrial DNA variation among humpback whales in the north Pacific.

*Molecular Ecology*, 1998, **7**: 695-707.

BEARZI G., REEVES R. R., NOTABARTOLO DI SCIARA G., POLITI E., CAÑADAS A., FRANTZIS A., MUSSI B.

Ecology, status and conservation of short-beaked common dolphins *Delphinus delphis* in the Mediterranean.

*Sea Mammal Review*, 2003, **33**: 224-252.

BEEBEE T., ROWE G.

Conservation genetics.

In : BEEBEE T., ROWE G.

An Introduction to molecular ecology.

New York: Oxford University Press, 2004, 199-223.

BELKHIR K., BORSA P., CHIKHI L., RAUFASTE N., BONHOMME F.

Genetix 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations.

*Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France)*, 1996-2004.

BERTA A., SUMICH J. L., KOVACS K. M.

Marine mammals : evolutionary biology.

Burlington et San Diego : Academic Press, 2006. 736 p.

BÉRUBÉ M., AGUILAR A., DENDANTO D., LARSEN F., DI SCIARA G. N., SEARS R., SIGURJONSSON J., URBÁN-R J., PALSBOÛLL P. J.

Population genetic structure of north Atlantic, Mediterranean Sea and Sea of Cortez fin whales, *Balænoptera physalus* (Linnæus 1758): analysis of mitochondrial and

- nuclear loci.  
*Molecular Ecology*, 1998, **7**: 585-599.
- BÉRUBÉ M., JORGENSEN H., MACEWING R., PALSBOÛLL P. J.  
 Polymorphic di-nucleotide microsatellite loci isolated from the humpback whale, *Megaptera novaeangliae*.  
*Molecular Ecology*, 2000, **9**: 2181-2183.
- BÉRUBÉ M., URBAN J., DIZON A. E., BROWNELL R. L., PALSBOÛLL P. J.  
 Genetic identification of a small and highly isolated population of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the Sea of Cortez, Mexico.  
*Conservation Genetics*, 2002, **3**: 183-190.
- BONHOMME M., BLANCHER A., CROUAU-ROY B.  
 Multiplexed microsatellites for rapid identification and characterization of individuals and populations of Cercopithecidae.  
*American Journal of Primatology*, 2005, **67**: 385-391.
- BROWN-GLADDEN J. G., FERGUSON M. M., FRIESEN M. K., CLAYTON J. W.  
 Population structure of north american beluga whales (*Delphinapterus leucas*) based on nuclear DNA microsatellite variation and contrasted with the population structure revealed by mitochondrial DNA variation.  
*Molecular Ecology*, 1999, **8**: 347-363.
- BUCHANAN F. C., FRIESEN M. K., LITTLEJOHN R. P., CLAYTON J. W.  
 Microsatellites from the beluga whale *Delphinapterus leucas*.  
*Molecular Ecology*, 1996, **5**: 571-575.
- CALDWELL M., GAINES M., HUGHES C. R.  
 Eight polymorphic microsatellite loci for bottlenose dolphin and other cetacean species.  
*Molecular Ecology Notes*, 2002, **2**: 393-395.
- CALZADA N., AGUILAR A.  
 Geographical variation of body size in western Mediterranean striped dolphins (*Stenella caeruleoalba*).  
*Z. Saeugetierkd*, 1995, **60**: 257-264.
- CALZADA N., AGUILAR A., SORENSEN T. B., LOCKYER C.  
 Reproductive biology of female striped dolphin (*Stenella caeruleoalba*) from the western Mediterranean.  
*Journal of Zoology, London*, 1996, **240**: 581-591.
- CASSENS I., VAN WAEREBEEK K., BEST P. B., TZIKA A., VAN HELDEN A. L., CRESPO E. A., MILINKOVITCH M. C.  
 Evidence for male dispersal along the coasts but no migration in pelagic waters in dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*).  
*Molecular Ecology*, 2005, **14**: 107-121.
- CETACEAN RESEARCH AND RESCUE UNIT.  
 Classification / Taxonomy of Cetaceans.  
<http://www.crru.org.uk/education/factfiles/taxonomy.htm> Téléchargé le 23 janvier 2006.
- CETACEAN SPECIALIST GROUP.  
*Stenella caeruleoalba*.  
 In: IUCN 2004. 2004 IUCN Red List of Threatened Species. [www.redlist.org](http://www.redlist.org)  
 Téléchargé le 24 juin 2005.

- CERCHIO S., JACOBSEN J. K., CHOLEWIAK D. M., FALCONE E. A., MERRIWETHER D. A.  
 Paternity in humpback whales, *Megaptera novaeangliae* : assessing polygyny and skew in male reproductive success.  
*Animal Behaviour*, 2005, **70**: 267-277.
- CLAPHAM P. J., PALSBOELL P. J.  
 Molecular analysis of paternity shows promiscuous mating in female humpback whales (*Megaptera novaeangliae*, Borowski).  
*Proceedings of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 1997, **264**: 95-98.
- DI MÉGLIO N., ROMERO-ALVAREZ R.  
 Growth comparison in striped dolphins, *Stenella caeruleoalba*, from the Atlantic and Mediterranean coasts of France.  
*Aquatic Mammals*, 1996, **22**(1): 11-21.
- ESCORZA-TREVIÑO S., DIZON A. E.  
 Phylogeography, intraspecific structure and sex-biased dispersal of Dall's porpoise, *Phocaenoides dalli*, revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses.  
*Molecular Ecology*, 2000, **9**: 1049-1060.
- ESTRADA M., VIVES F., ALCARAZ M.  
 Life and productivity in the open sea.  
 In: MARGALEF R. (ed)  
 Key Environments : western Mediterranean.  
 Oxford: Pergamon Press, 1985, 148-197.
- FLEURY F.  
 Structure génétique d'une population théorique idéale.  
 In : Cours de génétique des populations.  
<http://gen-net-pop.univ-lyon1.fr/cours/chap3/index.htm> Téléchargé le 2 février 2006.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS.  
 Fisheries glossary. [www.fao.org/fi/glossary/default.asp](http://www.fao.org/fi/glossary/default.asp)
- FORCADA J., AGUILAR A., HAMMOND P. S., PASTOR X., AGUILAR R.  
 Distribution and numbers of striped dolphins in the western Mediterranean Sea after the 1990 epizootic outbreak.  
*Marine Mammal Science*, 1994, **10** (2): 137-150.
- FULLARD K. J., EARLY G., HEIDE-JORGENSEN M. P., BLOCH D., ROSING-ASVID A., AMOS W.  
 Population structure of long-finned pilot whales in the north Atlantic: A correlation with sea surface temperature?  
*Molecular Ecology*, 2000, **9**: 949-958.
- GARCÍA MARTÍNEZ J., MOYA A., RAGA J. A., LATORRE A.  
 Genetic differentiation in the striped dolphin *Stenella caeruleoalba* from European waters according to mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis.  
*Molecular Ecology*, 1999, **8**: 1069-1073.
- GEISLER J. H., SANDERS A. E.  
 Morphological evidence for the phylogeny of Cetacea.  
*Journal of Mammalian Evolution*, 2003, **10**: 23.
- GLOBAL REGISTER OF MIGRATORY SPECIES.  
*Stenella caeruleoalba*.  
[http://131.220.109.5/groms/Species\\_HTMLs/Scoerule.html](http://131.220.109.5/groms/Species_HTMLs/Scoerule.html) Téléchargé le 24 janvier



- 2006.
- GUO S. W., THOMPSON E. A.  
Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles.  
*Biometrics*, 1992, **48**: 361-372.
- HEYNING J., MEADS J.  
Evolution of the nasal anatomy of cetaceans.  
In: THOMAS J., KASTELAIN R. (eds.)  
Sensory abilities of cetaceans.  
New York : Plenum Press, 1990.
- HOELZEL A. R., DAHLHEIM M., STERN S. J.  
Low genetic variation among killer whales (*Orcinus orca*) in the eastern north Pacific and genetic differentiation between foraging specialists.  
*Journal of Heredity*, 1998, **89**: 121-128.
- HOELZEL A. R., POTTER C. W., BEST P. B.  
Genetic differentiation between parapatric 'nearshore' and 'offshore' populations of the bottlenose dolphin.  
*Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 1998-2, **265**: 1177-1183.
- HOELZEL A. R., NATOLI A., DAHLHEIM M. E., OLAVARRIA C., BAIRD R. W., BLACK N. A.  
Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): implications for demographic history.  
*Proceedings of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 2002, **269**: 1467-1473.
- KASUYA T.  
Growth and reproduction of *Stenella caeruleoalba* based on age determination by means of dentinal growth layers.  
*Scientific Report of the Whales Research Institute, Tokyo*, 1972, **24**: 57-79.
- KASUYA T.  
Effect of exploitation on reproductive parameters of the spotted and striped dolphins off the Pacific coast of Japan.  
*Scientific Report of the Whales Research Institute, Tokyo*, 1985, **36**: 107-138.
- KRÜTZEN M., VALSECCHI E., CONNOR R. C., SHERWIN W. B.  
Characterization of microsatellite loci in *Tursiops aduncus*.  
*Molecular Ecology Notes*, 2001, **1**: 170-172.
- KRÜTZEN M., BARRE L. M., CONNOR R. C., MANN J., SHERWIN W. B.  
'O father: where art thou?' - Paternity assessment in an open fission-fusion society of wild bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.) in Shark Bay, Western Australia.  
*Molecular Ecology*, 2004, **13**: 1975-1990.
- LYRHOLM T., LEIMAR O., JOHANNESON B., GYLLENSTEN U.  
Sex-biased dispersal in sperm whales: contrasting mitochondrial and nuclear genetic structure of global populations.  
*Proceedings of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 1999, **266**: 347-354.
- MIYAZAKI N., NISHIWAKI M.  
School structure of the striped dolphin off the Pacific coast of Japan.  
*Scientific Report of the Whales Research Institute, Tokyo*, 1978, **30**: 65-116.

- MOORE S. S., HALE P., BYRNE K.  
 NCAM: a polymorphic microsatellite locus conserved across eutherian mammal species.  
*Animal Genetics*, 1998, **29**: 33-36.
- MULLIS K. B., FALOONA F. A.  
 Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction.  
*Methods in Enzymology*, 1987, **155**: 335-350.
- MYERS N., MITTERMEIER R. A., MITTERMEIER C. G., DA FONSECA G. A., KENT J.  
 Biodiversity hotspots for conservation priorities.  
*Nature*, 2000, **403**: 853-858.
- NATOLI A., PEDDEMORS V. M., HOELZEL A. R.  
 Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses.  
*Journal of Evolutionary Biology*, 2004, **17**: 363-375.
- NEI M.  
 Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals.  
*Genetics*, 1978, **89**: 583-590.
- NIKAIDO M., ROONEY A. P., OKADA N.  
 Phylogenetic relationships among cetartiodactyls based on insertions of short and long interspersed elements: hippopotamuses are the closest extant relatives of whales.  
*Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1999, **96**: 10261-10266.
- NIKAIDO M., MATSUNO F., HAMILTON H., BROWNELL R. L., JR., CAO Y., DING W., ZUOYAN Z., SHEDLOCK A. M., FORDYCE R. E., HASEGAWA M., OKADA N.  
 Retroposon analysis of major cetacean lineages: the monophyly of toothed whales and the paraphyly of river dolphins.  
*Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2001, **98**: 7384-7389.
- VAN OOSTERHOUT C., HUTCHINSON W. F., WILLS D. P. M., SHIPLEY P.  
 Micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data.  
*Molecular Ecology Notes*, 2004, **4**: 535-538.
- PALSBØLL P. J., BÉRUBÉ M., LARSEN A. H., JORGENSEN H.  
 Primers for the amplification of tri- and tetramer microsatellite loci in baleen whales.  
*Molecular Ecology*, 1997, **6**: 893-895.
- PALSBØLL P. J., BÉRUBÉ M., JORGENSEN H.  
 Multiple levels of single-strand slippage at cetacean tri- and tetranucleotide repeat microsatellite loci.  
*Genetics*, 1999, **151**: 285-296.
- PAETKAU D., WAITS L. P., CLARKSON P. L., CRAIGHEAD L., VYSE E., WARD R., STROBECK C.  
 Variation in genetic diversity across the range of north american brown bears.  
*Conservation Biology*, 1998, **12**: 418-429.
- PARSONS K. M.  
 Reliable microsatellite genotyping of dolphin DNA from faeces.  
*Molecular Ecology Notes*, 2001, **1**: 341-344.

- PARSONS K. M., DURBAN J. W., CLARIDGE D. E., BALCOMB K. C., NOBLE L. R., THOMPSON P. M.  
Kinship as a basis for alliance formation between male bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the Bahamas.  
*Animal Behaviour*, 2003, **66**: 185-194.
- PERRIN W. F., REILLY S. B.  
Reproductive parameters of dolphins and small whales of the family Delphinidæ.  
*Report of the International Whaling Commission* (numéro spécial), 1984, **6**: 97-133.
- RASSMANN K., SCHLÖTTERER C., TAUTZ D.  
Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting.  
*Electrophoresis*, 1991, **12**: 113-118.
- RAYMOND M., ROUSSET F.  
Genepop (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism.  
*Journal of Heredity*, 1995, **86**: 248-249.
- RICHARD K. R., WHITEHEAD H., WRIGHT J. M.  
Polymorphic microsatellites from sperm whales and their use in the genetic identification of individuals from naturally sloughed pieces of skin.  
*Molecular Ecology*, 1996, **5**: 313-315.
- ROMAN J., PALUMBI S. R.  
Whales before whaling in the north Atlantic.  
*Science*, 2003, **301**: 508-510.
- ROONEY A. P., MERRITT D. B., DERR J. N.  
Microsatellite diversity in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*).  
*Journal of Heredity*, 1999, **90**: 228-231.
- ROONEY A. P., HONEYCUTT R. L., DAVIS S. K., DERR J. N.  
Evaluating a putative bottleneck in a population of bowhead whales from patterns of microsatellite diversity and genetic disequilibria.  
*Journal of Molecular Evolution*, 1999-2, **49**: 682-690.
- ROSA S., MILINKOVITCH M. C., VAN WAEREBEEK K., BERCK J., OPORTO J., ALFARO-SHIGUETO J., VAN BRESSEM M. F., GOODALL N., CASSENS I.  
Population structure of nuclear and mitochondrial DNA variation among south american Burmeister's porpoises (*Phocoena spinipinnis*).  
*Conservation Genetics*, 2005, **6**: 431-443.
- ROSEL P. E., FRANCE S. C., WANG J. Y., KOCHER T. D.  
Genetic structure of harbour porpoise *Phocoena phocoena* populations in the northwest Atlantic based on mitochondrial and nuclear markers.  
*Molecular Ecology*, 1999, **8**: S41-S54.
- RYCHEL A. L., REEDER T. W., BERTA A.  
Phylogeny of mysticete whales based on mitochondrial and nuclear data.  
*Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, **32**: 892-901.
- SAMBROOK J., RUSSELL D. W., 2000.  
Preparation of Genomic DNA from Mouse Tails and Other Small Samples.  
In : Molecular Cloning - A Laboratory Manual on The web. Chapter 6, Protocol 5.  
[http://www.molecularcloning.com/members/protocol\\_print.jsp?protocol=4038](http://www.molecularcloning.com/members/protocol_print.jsp?protocol=4038)  
téléchargé le 10 novembre 2005.
- SCHLÖTTERER C., AMOS B., TAUTZ D.

- Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species.  
*Nature*, 1991, **354**: 63-65.
- SHINOHARA M., DOMINGOROURA X., TAKENAKA O.  
Microsatellites in the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*.  
*Molecular Ecology*, 1997, **6**: 695-696.
- SLATKIN M., EXCOFFIER L.  
Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the expectation-maximization algorithm.  
*Heredity*, 1996, **76** (Pt 4): 377-383.
- TAUTZ D., SCHLÖTTERER C.  
Simple sequences.  
*Current Opinion in Genetics and Development*, 1994, **4**: 832-837.
- VALSECCHI E., AMOS W.  
Microsatellite markers for the study of cetacean populations.  
*Molecular Ecology*, 1996, **5**: 151-156.
- VALSECCHI E., PALSBOELL P., HALE P., GLOCKNER-FERRARI D., FERRARI M., CLAPHAM P., LARSEN F., MATTILA D., SEARS R., SIGURJONSSON J., BROWN M., CORKERON P., AMOS B.  
Microsatellite genetic distances between oceanic populations of the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*).  
*Molecular Biology and Evolution*, 1997, **14**: 355-362.
- VALSECCHI E., GLOCKNER-FERRARI D., FERRARI M., AMOS W.  
Molecular analysis of the efficiency of sloughed skin sampling in whale population genetics.  
*Molecular Ecology*, 1998, **7**: 1419-1422.
- VALSECCHI E., HALE P., CORKERON P., AMOS W.  
Social structure in migrating humpback whales (*Megaptera novaeangliae*).  
*Molecular Ecology*, 2002, **11**: 507-518.
- VALSECCHI E., AMOS W., RAGA J. A., PODESTA M., SHERWIN W.  
The effects of inbreeding on mortality during a morbillivirus outbreak in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella caeruleoalba*).  
*Animal Conservation*, 2004, **7**: 139-146.
- WAITS L. P., LUIKART G., TABERLET P.  
Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines.  
*Molecular Ecology*, 2001, **10**: 249-256.
- WALDICK R. C., BROWN M. W., WHITE B. N.  
Characterization and isolation of microsatellite loci from the endangered north Atlantic right whale.  
*Molecular Ecology*, 1999, **8**: 1763-1765.
- WALDICK R. C., KRAUS S. S., BROWN M., WHITE B. N.  
Evaluating the effects of historic bottleneck events: an assessment of microsatellite variability in the endangered, north Atlantic right whale.  
*Molecular Ecology*, 2002, **11**: 2241-2250.
- WEIR B. S., COCKERHAM C. C.  
Estimating f-statistics for the analysis of population-structure.  
*Evolution*, 1984, **38**: 1358-1370.

WOODS J. G., PAETKAU D., LEWIS D., MACLELLAN B.N., PROCTOR M., STROBECK C. 1999.  
Genetic tagging of free-ranging black and brown bears.  
*Wildlife Society Bulletin*, 1999, **27**: 616–627.

WRIGHT S.

Evolution and the Genetics of populations ; vol. 2 : The Theory of gene frequencies.  
Chicago : University of Chicago Press, 1969. 512 p.

## **Annexe 1 : Noms latins et vernaculaires des espèces de cétacés citées**

*Balæna mysticetus*: baleine franche du Groënland.  
*Balænoptera acutorostrata*: rorqual museau-pointu.  
*Balænoptera borealis*: rorqual boreal.  
*Balænoptera musculus*: baleine bleue.  
*Balænoptera physalus*: rorqual commun.  
*Berardius bairdii*: baleine à bec de Baird.  
*Cephalorhynchus commersonii*: dauphin de Commerson.  
*Delphinapterus leucas*: bélouga.  
*Delphinus delphis*: dauphin commun.  
*Eschrichtius robustus*: baleine grise.  
*Eubalæna australis*: baleine franche australe.  
*Eubalæna glacialis*: baleine franche noire.  
*Globicephala macrorhynchus*: globicéphale tropical.  
*Globicephala melas*: globicéphale noir.  
*Grampus griseus*: dauphin de Risso.  
*Hyperoodon ampullatus*: hyperoodon boréal.  
*Kogia simus*: cachalot nain.  
*Lagenorhynchus acutus*: dauphin à flancs blancs de l'Atlantique.  
*Lagenorhynchus albirostris*: dauphin à bec blanc.  
*Lagenorhynchus obliquidens*: dauphin à flancs blancs du Pacifique.  
*Lagenorhynchus obscurus*: dauphin sombre.  
*Megaptera novæangliæ*: baleine à bosse.  
*Mesoplodon bidens*: baleine de Sowerby.  
*Monodon monoceros*: narval.  
*Neophocæna phocænoïdes*: marsouin noir.  
*Orcælla brevirostris*: dauphin de l'Irrawaddy.  
*Orcinus orca*: orque.  
*Phocæna dioptrica*: marsouin à lunettes.  
*Phocæna phocæna*: marsouin commun.  
*Phocæna sinus*: vaquita.  
*Phocæna spinipinnis*: marsouin de Burmeister.  
*Phocænoïdes dalli*: marsouin de Dall.  
*Physeter macrocephalus*: grand cachalot.  
*Pontoporia blainvillei*: dauphin de La Plata.  
*Pseudorca crassidens*: fausse orque.  
*Sotalia fluviatilis*: tucuxi.  
*Steno bredanensis*: sténo.  
*Stenella attenuata*: dauphin tacheté pantropical.  
*Stenella clymene*: dauphin clymène.  
*Stenella cæruleoalba*: dauphin bleu-et-blanc.  
*Stenella frontalis*: dauphin tacheté de l'Atlantique.  
*Tursiops aduncus*: grand dauphin de l'Indo-Pacifique.  
*Tursiops truncatus*: grand dauphin.  
*Ziphius cavirostris*: baleine à bec de Cuvier.

**Annexe 2 : Poster présenté lors de la 19<sup>ème</sup> conférence annuelle de la Société européenne de cétiologie (ECS), à La Rochelle, du 2 au 7 Avril 2005 (European Research on Cetaceans, 2005, 19).**



## Microsatellite multiplex sets to investigate the population genetics of *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833)

BOURRET Vincent

**Bourret, V., Macé, M., Bonhomme M., and Crouau-Roy, B.**

Laboratoire « Evolution et diversité biologique », Université Paul Sabatier, UMR CNRS 5174, Bât. 4R3b2, 118 route de Narbonne, 31 062 Toulouse cedex 04, France. E.mail : vbourret2001@yahoo.fr

### Introduction

The striped dolphin *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833) (fig. 1) is widely distributed in the world's warm and temperate waters (Perrin *et al.*, 1994). As a species, it does not seem to be short-term endangered (Klinowska, 1991). However, assessing the genetic status of the Mediterranean stock may help to design management strategies. For instance, if it is genetically isolated from the Atlantic stock, therefore special attention should be paid in order to preserve this genetic resource. Furthermore, the existence of a gene flow through the Strait of Gibraltar could raise the question of the ecological management of this area.

Fig. 1. The striped dolphin *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833).



The Mediterranean and north eastern Atlantic populations have been shown to be quite distinct regarding maternal lineages (restriction polymorphism of mitochondrial DNA), with a limited gene flow across the Strait of Gibraltar (García Martínez *et al.*, 1999). However, male-mediated gene flow should be investigated using nuclear markers. Studying microsatellites, Valsecchi *et al.* (2004) found a significant genetic difference between North Sea samples and Mediterranean samples. However, Atlantic samples closer to the Strait of Gibraltar should be compared to western Mediterranean samples. **This poster presents optimized conditions for the multiplexing of microsatellites, providing a tool for such a study.**

### Material and methods

Samples from dead individuals (fig. 2) were collected from the Mediterranean and Alaskan waters (thanks to a loan by the University of Alaska Fairbanks Museum).



Fig. 2. Stranded individual

Locus	Repeat	First isolated in... (reference)	Literature results in striped dolphins
MK6	(GT) <sub>n</sub>	Bdat (1)	22 alleles, Ho=0.78 (2)
MK9	(CA) <sub>n</sub>	Bdat (1)	12 alleles, Ho=0.71 (2)
EV92Mn	(GT) <sub>n</sub>	Humpback whale (3)	7 alleles (3)
GATA053	(GATA) <sub>n</sub>	Humpback whale (4)	Not done
GATA098	(GATA) <sub>n</sub>	Humpback whale (4)	Not done
GATA417	(GATA) <sub>n</sub>	Humpback whale (4)	Not done

Table 1. Microsatellite loci tested. Ho : observed heterozygosity. Bdat : bottlenose dolphin aduncus type. (1) : Krützen *et al.* (2001) (2) : Valsecchi *et al.* (2004) (3) : Valsecchi and Amos (1996) (4) : Palsbøll *et al.* (1997).

After phenol-chloroform DNA extraction (Sambrook & Russell, 2001), polymerase chain reaction (PCR – Mullis & Faloona, 1987) was performed on an Eppendorf™ thermocycler for the 6 microsatellite loci described in table 1. We tested a variety of native DNA concentrations, annealing temperatures, and number of PCR cycles, in order to optimize multiplex sets.

### Results

- All markers but GATA417 (see table 1) were successfully amplified.
- The GATA053 amplification products were roughly 100 base pairs larger in the striped dolphin than in the humpback whale from Palsbøll *et al.* (1997). The 4 other markers displayed allele sizes similar in range to those from previously published results.
- Optimized conditions were achieved for 2 multiplex sets of 3 and 2 markers each (table 2).

Markers	Number of PCR cycles
GATA098, MK9, GATA053	34
MK6, EV92Mn	33

Table 2. The 2 multiplex sets. Native DNA concentration (20ng in 20.µL) and annealing temperature (51°C) are identical for both multiplex sets.

Alleles of microsatellites amplified by multiplexing can be identified using the appropriate software, as seen in fig. 3.

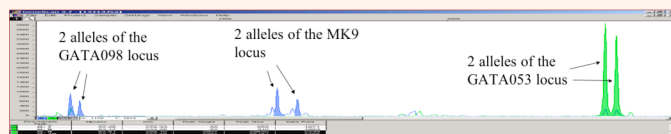


Fig.3. Example of graphic obtained using the ABI GeneScan™ software. Here, the individual tested is heterozygote for the 3 loci of the multiplex set.

- The genotyping of 41 Mediterranean and 13 Alaskan individuals gave the following results :

Table 3a).

Population	Sample size	Loci typed	Ho (SD)	MNA (SD)
Mediterranean	41	5	0.743 (0.035)	9.8 (3.56)
Alaska	13	5	0.799 (0.058)	8.6 (3.58)

Table 3b).

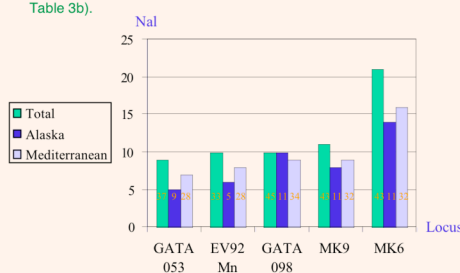


Table 3. Some results of the genotyping of 41 Mediterranean and 13 Alaskan individuals.

- data per population. Ho : observed heterozygosity. MNA : mean number of alleles per locus. SD : standard deviation.
- number of alleles per locus and per population. Nal : number of alleles. The number written within each bar is the number of genotyped individuals.

### Conclusions

- For 2 tetramer repeats, successful cross amplifications denote a relative **conservation of the flanking sequences** between Mysticeti and Odontoceti (see comments in Schlötterer *et al.*, 1991).
- We developed and optimized 2 multiplex sets providing a **high-throughput genotyping tool**.
- The microsatellites are **moderately to highly polymorphic** in both Mediterranean and Alaskan populations (table 3b). They can be usefully studied to investigate intraspecific genetic variability, demographic histories, and differentiation among populations.
- We are currently combining the study of microsatellites with the study of markers from the **major histocompatibility complex, sexual chromosomes, and mitochondria**. They will help to better investigate the gene flow between the Mediterranean Sea and the north eastern Atlantic.

This will allow a more extensive assessment of the striped dolphin population genetics in this area, to which future conservation policies shall refer.

### Literature cited

- García-Martínez J, Moya A, Raga JA & Latorre A (1999) *Molecular Ecology*, 8, 1069-1073.  
 Klimowka M (1991) Dolphins, Porpoises and Whales of the World. In : *The IUCN Red Data Book*. IUCN, Gland (Switzerland) and Cambridge (UK).  
 Krützen M, Valsecchi E, Connor RC & Sherwin WB (2001) *Molecular Ecology Notes*, 1, 170-172.  
 Mullis KB & Faloona F (1987) *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.  
 Palsbøll PJ, Bérubé M, Larsen AH & Jørgensen H (1997) *Molecular Ecology*, 6, 893-895.  
 Perrin WF, Wilson CE & Archer II FI (1994) In : *Handbook of Marine Mammals*, (ed. Ridgway SH & Harrison R), vol. 5, pp. 129-159. Academic Press, London (UK).  
 Sambrook J & Russell DW (2001) In : *Molecular Cloning : a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press.  
 Schlötterer C, Amos W & Tautz D (1991) *Nature*, 354, 63-65.  
 Valsecchi E & Amos W (1996) *Molecular Ecology*, 5, 151-156.  
 Valsecchi E, Amos W, Raga JA, Podestà M & Sherwin W (2004) *Animal Conservation*, 7, 139-146.

### Acknowledgments

We are grateful to the GECEM and F Dhermain, the University of Alaska Fairbanks Museum and B Jakobsen, Eis FERSO-BIO Agen and B Lafitte, AS Lemaire, and JL Fabre who provided samples. F Magné for technical lab assistance, and the Animal Biology Team of the Veterinary Faculty of Murcia for their valuable comments on the poster.



**Annexe 3 : Poster présenté lors de la 20<sup>ème</sup> conférence annuelle de la Société Européenne de Cétologie (ECS), à Gdynia (Pologne), du 2 au 7 Avril 2006 (à paraître dans *European Research on Cetaceans*, 20).**

# Microsatellite diversity among western Mediterranean and adjacent Atlantic striped dolphin populations



**Vincent J. R. Bourret, Matthías R. J. M. Macé, Brigitte Crouau-Roy.**

Laboratoire Evolution et diversité biologique, UMR CNRS 5174, Bât 4R3b2, 118 route de Narbonne, 31 062 Toulouse cedex 04, France.  
E. mail : vincent@um.es, matthias.mace@wanadoo.fr, bcrouau@cict.fr.

## Background

### General issue :

The western Mediterranean and the north-eastern Atlantic are subject to notable anthropogenic perturbations. In such basins, assessing a **species' population genetic structure and genetic diversity within populations** should be an **early step towards the design of proper conservation policies**. This study focuses on the striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*, Meyen 1833) (fig. 1) inhabiting these areas.

### Previous studies :

The populations of striped dolphins in these two basins have been shown to be quite distinct from one another regarding maternal lineages (restriction polymorphism of mitochondrial DNA ; García-Martínez *et al.*, 1999). Studies on microsatellites (autosomal nuclear markers) showed a significant genetic difference between a small North Sea sample and a Mediterranean sample (Valsecchi *et al.*, 2004). However, Atlantic samples closer to the Strait of Gibraltar should be compared to Mediterranean samples using nuclear markers.

### Objective :

The objective of this study is to **assess the extent and patterns of nuclear genetic variability among the western Mediterranean and adjacent Atlantic striped dolphins populations**, using polymorphic microsatellites.



**Figure 1. The striped dolphin *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833).** Photo A. Gannier.

## Results

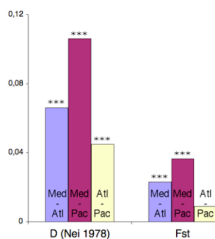
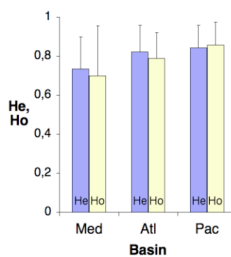
One locus (GATA417) failed to amplify. One locus (EV92Mn) was suspected of bearing null alleles. The genotype frequencies of the 4 remaining loci (GATA098, MK9, GATA053, MK6) were used to compute multilocus estimates of the parameters. Linkage disequilibrium was detected between two pairs of loci within the Mediterranean.

Most loci displayed quite similar allele frequency general patterns between the basins. However, the different alleles seemed more evenly represented in the Atlantic and Pacific than in the Mediterranean.

### • Genetic diversity within each basin.

The **Mediterranean population displayed the lowest autosomal variability**. At each locus, both expected (He) and observed (Ho) heterozygosities were lower in the Mediterranean than in any of the 2 other basins. Fig. 3 shows the mean heterozygosities. The mean He was significantly lower in the Mediterranean than in any of the 2 other basins ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3. Mean (multilocus) expected (He) and observed (Ho) heterozygosities in each basin.** Med : Mediterranean Sea. Atl : north eastern Atlantic. Pac : north Pacific. The line above each bar indicates the standard deviation.



**Figure 4. Pairwise estimates of Nei's (1978) genetic distances and Wright's  $F_{ST}$  (Weir and Cockerham, 1984).** \*\*\* deviation from zero is significant ( $p \leq 0.001$ ). Abbreviations are as in fig. 3.

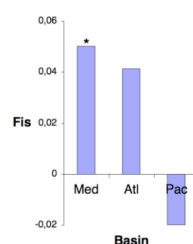
### • Genetic differentiation between the basins.

The genetic differentiation between the Mediterranean and the Atlantic is **slight, but highly significant**. This divergence seems to be greater than the divergence between the north Atlantic and north Pacific (fig. 4).

### • Heterozygote deficiency within the basins.

The observed heterozygote deficiency was **significant only in the Mediterranean**, as indicated by the Hardy-Weinberg exact test (Guo and Tompson, 1992) and the computation of  $F_{IS}$  (Weir and Cockerham, 1984) (fig. 5).

**Figure 5. Value of  $F_{IS}$  within each basin.** \* the deviation from zero is significant in the Mediterranean ( $p \leq 0.05$ ). Abbreviations are as in fig. 3



## Methods

### • Sampling :

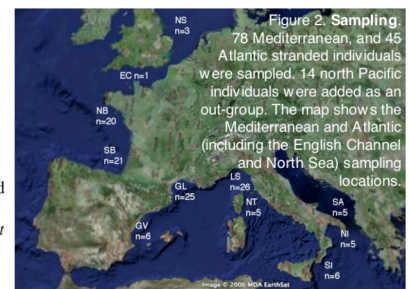
see fig. 2.

### • Laboratory methods :

sequencing and genotyping (6 microsatellites tested).

### • Statistical analyses :

Genepop (Raymond and Rousset, 1995) and Genetix 4.05 (Belkhir *et al.* 1996-2006).



**Figure 2. Sampling.** 78 Mediterranean, and 45 Atlantic stranded individuals were sampled. 14 north Pacific individuals were added as an out-group. The map shows the Mediterranean and Atlantic (including the English Channel and North Sea) sampling locations.

## Conclusions

The **nuclear genetic diversity appears to be lower within the Mediterranean** than within the Atlantic, as already observed for the mitochondrial genetic diversity (García-Martínez *et al.*, 1999).

Between the Mediterranean and the Atlantic, the nuclear genetic differentiation is not as sharp as the mitochondrial genetic differentiation estimated by García-Martínez *et al.* (1999). This suggests that the male-mediated gene flow between both basins could be greater than the female-mediated gene flow.

The low genetic differentiation between the Atlantic and Pacific basins may reflect a recent common origin of those populations probably with little, if any, current gene flow between those basins. A larger Pacific sample would allow a better investigation of this genetic relationship.

Within the Mediterranean, the deviation from Hardy-Weinberg equilibrium for most loci, may suggest either an inbreeding or a "Wahlund effect": the Mediterranean population would be subdivided. This may also be suggested by some significant linkage disequilibrium observed within this population. Indeed, Macé *et al.* (in prep.) found, within this basin, 2 highly divergent mitochondrial lineages bearing little admixture between them.

The **less diverse, partially isolated, and possibly subdivided** Mediterranean population, living in a highly humanised basin, should be adequately preserved.

## Literature cited

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996-2004) *Laboratoire Génome. Populations. Interactions*. CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).  
García-Martínez J, Moya A, Raga J A, Latorre A (1999) *Molecular Ecology*, **8**, 1069-1073.  
Guo S W, Thompson E A (1992) *Biometrics*, **48**, 361-372.  
Nei M (1978) *Genetics*, **89**, 583-590.  
Raymond M, Rousset F (1995) *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.  
Valsecchi E, Amos W, Raga J A, Podestà M, Sherwin W (2004) *Animal Conservation*, **7**, 139-146.  
Weir B S, Cockerham C C (1984) *Evolution*, **38**, 1358-1370.

## Acknowledgments

We are very grateful to W Dabin, A Dewez, F Dhermain, JL Fabre, B Jakobsen, B Lafitte, AS Lemaire, and E Valsecchi who provided samples, and to M Bonhomme, F Magné and A Rozzi for technical laboratory assistance.

## For further information

Please contact vincent@um.es. More information on this and related projects can be obtained at <http://www.edb.ups-lse.fr/>.



**En pages 113 à 117 : Annexe 4 : épreuve d'un article à paraître au *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom (JMBA)*.**

# Genetic variation and population structure of western Mediterranean and northern Atlantic *Stenella caeruleoalba* populations inferred from microsatellite data

Vincent J. R. Bourret\*, Matthias R. J. M. Macé and Brigitte Crouau-Roy

UMR 5174 UPS/CNRS 'Evolution et Diversité biologique' EDB, Bât 4R3b2 2e étage, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 TOULOUSE cedex 9 – France. \*Corresponding author, e-mail: vincent@um.es

The patterns of genetic differentiation and levels of genetic diversity among striped dolphin (*Stenella caeruleoalba*) populations from the North Atlantic Ocean (N=45 individuals) and the central and western Mediterranean Sea (N=78) were investigated using five polymorphic microsatellite loci. A North Pacific sample (N=14) was added as an out-group. Two of the markers were tetranucleotide repeats tested for the first time in this species. The Mediterranean, Atlantic and Pacific samples displayed a mean number of alleles per locus of 11.2, 13.4, and 9.6 respectively, suggesting a high but variable polymorphism across loci. The Mediterranean sample displayed particular characteristics: i) the lowest allelic richness and expected heterozygosity ( $He_{\text{Mediterranean}}=0.76$ , while  $He_{\text{Atlantic}}=0.83$  and  $He_{\text{Pacific}}=0.85$ ); ii) a significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium ( $P<0.001$ ;  $F_{IS}=0.050$ ); and iii) a significant linkage disequilibrium between two pairs of loci. These last two features, present neither in the Atlantic sample nor in the Pacific one, suggest that the western Mediterranean population might possibly be further subdivided. Significant genetic differentiation was detected between the Mediterranean and Pacific populations, and between the Mediterranean and Atlantic populations. However, pairwise Wright's  $F_{ST}$  was not significantly different from zero between the two geographically isolated Atlantic and Pacific populations.

## INTRODUCTION

The striped dolphin *Stenella caeruleoalba* (Meyen, 1833) is cosmopolitan in most of the world's warm and temperate seas, and is generally considered as a relatively abundant species (Archer II & Perrin, 1999; Reeves et al., 2003). According to the International Union for the Conservation of Nature (IUCN), the species is at 'lower risk' but 'conservation dependent' (Cetacean Specialist Group, 1996). In the western Mediterranean, the striped dolphin is the most abundant cetacean species according to transect survey estimations (95% confidence interval: 68,379 to 214,800 individuals after Forcada et al. (1994), although this estimate is not based on the most robust current prospecting methods). However, the Mediterranean population has recently been facing various threats such as morbillivirus epizootics, pollution, or fishing interactions, the effects of which are difficult to quantify precisely (Aguilar, 2000).

In the humanised areas of south-western Europe, assessing the striped dolphin's population genetic structure and genetic diversity within populations could be an early step towards the design of proper conservation policies (Beebee & Rowe, 2004). In a study of mitochondrial DNA (mtDNA) restriction polymorphism, García Martínez et al. (1999) found that none of the 27 restriction haplotypes was shared between a Mediterranean sample (N=76) and an Atlantic sample (N=22). However, due to the maternal mode of inheritance of the mtDNA, studying nuclear autosomal markers is also useful, especially in species displaying a complex

social behaviour. Previous studies on cetaceans (e.g. Bérubé et al., 1998) have suggested that a nuclear gene flow may occur whereas mtDNA reveals a strong geographical structure among populations. Using polymorphic nuclear markers, Valsecchi et al. (2004) found a significant differentiation between striped dolphin samples from the North Sea (N=6) and the Mediterranean Sea (N=98). The present study compares the patterns of genetic differentiation and levels of genetic diversity, using selectively neutral markers, between striped dolphin samples from the Mediterranean Sea (N=78), the Atlantic Ocean (N=45), and the North Pacific Ocean as an outgroup (N=14).

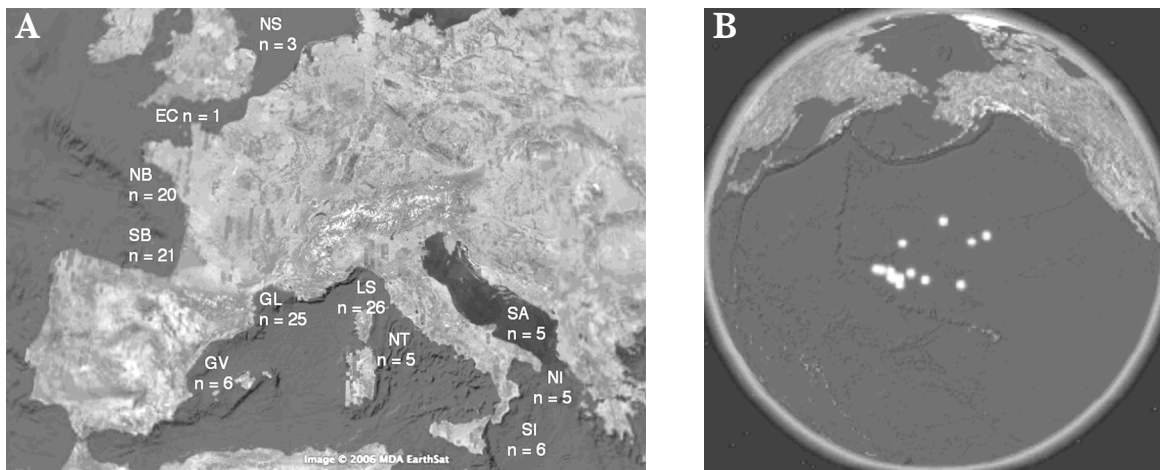
## MATERIALS AND METHODS

### *Sample collection*

Samples, consisting of muscle, skin and blubber, liver, or kidney from 123 dead stranded individuals, were collected in the western Mediterranean and the North Atlantic between 1989 and 2004. Samples from 14 dead by-caught individuals from the North Pacific were added as an out-group (Figure 1). Samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### *Laboratory protocols*

Deoxyribonucleic acid (DNA) extraction was performed using standard phenol:chloroform methods (Sambrook & Russell, 2000). Individuals were genotyped at five microsatellite loci. Three loci are dinucleotide repeats: MK6



**Figure 1.** (A), Sampling locations of the 78 Mediterranean and 45 Atlantic stranded individuals. The Mediterranean samples came from the Gulf of Valencia (GV), the Gulf of Lions (GL), the Ligurian Sea (LS), the northern Thyrrhenian Sea (NT), southern Ionian Sea (SI), the northern Ionian Sea (NI), and the southern Adriatic Sea (SA). The ‘Atlantic’ samples came from the southern Bay of Biscay (SB), the northern Bay of Biscay (NB), the English Channel (EC), and the North Sea (NS); (B), Sampling locations of the 14 dead by-caught individuals from the North Pacific.

and MK9 (isolated from *Tursiops aduncus*, Krützen et al., 2001), EV92Mn (isolated from *Megaptera novaeangliae*, Valsecchi & Amos, 1996). Two loci were tetranucleotide repeats: GATA053 and GATA098 (isolated from *Megaptera novaeangliae*, Palsbøll et al., 1997). Polymerase chain reactions (PCR; Mullis & Faloona, 1987) were conducted in 20  $\mu$ L volumes containing 10  $\mu$ L of Qiagen Multiplex Mix (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), primers to a final concentration of 0.2 to 0.5  $\mu$ M, and purified water to a final volume of 20  $\mu$ L. One primer of each pair (provided by Proligo, France) was fluorescently labelled. Reactions were cycled using the Eppendorf Gradient Mastercycler 5331 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) as follows: 15 min at 95°C, then 34 cycles of 30 s at 94°C, 90 s at 51°C, and 90 s at 72°C. A final extension step of 10 min at 72°C was added. Migrations were performed on a ABIprism automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the Genescan 500 TAMRA size marker, and gels were analysed using ABI GENESCAN and GENOTYPER softwares (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

#### Statistical analyses

The allelic richness (R) in each sample was computed as described in the FSTAT v. 2.9.3.2 package (Goudet, 1995). The unbiased expected heterozygosities ( $H_e$ ) and genetic distances were estimated after Nei (1978) and computed using the GENETIX (Belkhir et al., 1996-2004) package. Significance of the difference between the mean variability indices among the basins was tested using Student’s paired *t*-test. The Hardy-Weinberg (HW) exact test was performed after Guo and Thompson (1992) using the GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995) package. Frequencies of null alleles were estimated using the MICROCHECKER (Van Oosterhout et al., 2004) package. Population structure was analysed computing Wright’s (1969) F-statistics according to Weir & Cockerham (1984), using the GENETIX package. Population differentiation was estimated using  $F_{ST}$ , whereas departure from HW equilibrium (HWE) within the samples

was measured using  $F_{IS}$ . Values of  $R_{ST}$ , accounting for allele sizes, were computed after Michalakis & Excoffier (1996) using the GENEPOP package. Significance of the deviation from zero of Nei’s (1978) genetic distances (D) and Wright’s (1969) F-statistics were assessed by permutation tests.

## RESULTS

Amplifications were successful for the five loci, among which GATA098 and GATA053, two tetranucleotide markers which had not been previously amplified in this species.

#### Linkage disequilibrium

No significant linkage disequilibrium was detected when all samples were pooled. However, when pooling the samples by basin, significant linkage disequilibrium was observed only within the Mediterranean, between two pairs of loci: GATA098/GATA053 ( $P=0.038$ ) and MK9/GATA053 ( $P=0.028$ ).

#### Genetic diversity

The number of alleles per locus and population ranged from six (GATA053 in the Mediterranean and the Pacific) to 21 (MK6 in the Atlantic) (Table 1). The allelic richness (R) per locus and population ranged from 3.8 (GATA053 in the Mediterranean) to 13.0 (MK6 in the Pacific). The unbiased expected heterozygosity ( $H_e$ ) per locus and per population ranged from 0.497 (GATA053 in the Mediterranean) to 0.931 (MK6 in the Pacific), suggesting a high but variable level of polymorphism across loci. The observed heterozygosity ( $H_o$ ) per locus and per population ranged from 0.323 (GATA053 in the Mediterranean) to 1.000 (MK6 in the Pacific).

The mean number of alleles per locus in each population ranged from 9.6 in the Pacific to 13.4 in the Atlantic (Table 1). The mean allelic richness (R) was significantly higher both in the Atlantic ( $R=8.38$ ) and the Pacific ( $R=8.68$ ) than in the Mediterranean ( $R=6.63$ ) ( $P<0.05$ ). The mean multilocus  $H_e$  was also significantly higher in the Atlantic ( $H_e=0.827$ ) and the Pacific ( $H_e=0.846$ ) than in the Mediterranean ( $H_e=0.756$ ) ( $P<0.05$ ) with no significant difference

**Table 1.** Genetic variation at five microsatellite loci in *Stenella coeruleoalba*.

Locus/ parameter	Mediterranean	Atlantic	Pacific	Total
<i>GATA098</i>				
n	73	42	14	129
N <sub>A</sub>	11	11	10	11
R	6.980	8.014	9.152	7.923
He	0.839	0.871	0.897	0.865
Ho	0.808	0.833	0.857	0.821
<i>MK9</i>				
n	65	42	14	121
N <sub>A</sub>	11	13	9	16
R	6.395	8.865	8.132	7.865
He	0.754	0.882	0.868	0.827
Ho	0.754	0.786	0.857	0.777
<i>GATA053</i>				
n	62	41	14	117
N <sub>A</sub>	6	9	6	10
R	3.760	5.861	5.142	4.822
He	0.497	0.621	0.669	0.564
Ho	0.323	0.610	0.714	0.470
<i>MK6</i>				
n	65	40	12	117
N <sub>A</sub>	19	21	15	25
R	9.141	11.086	12.998	10.536
He	0.850	0.914	0.931	0.895
Ho	0.908	0.925	1.000	0.923
<i>EV92Mn</i>				
n	56	38	10	104
N <sub>A</sub>	9	13	8	15
R	6.853	8.060	8.000	8.093
He	0.840	0.848	0.863	0.865
Ho	0.625	0.526	0.500	0.577
<i>Mean ±SD</i>				
n	64.2 ±6.14	40.6 ±1.67	12.8 ±1.79	
N <sub>A</sub>	11.2 ±4.82	13.4 ±4.56	9.6 ±3.36	
R	6.63 ±1.92	8.38 ±1.88	8.68 ±2.83	
He	0.756 ±0.150	0.827 ±0.118	0.846 ±0.102	
Ho	0.684 ±0.226	0.736 ±0.164	0.786 ±0.189	

n, number of genotyped individuals; NA, number of different alleles detected; R, allelic richness based on a minimum sample size of 10 individuals; He, Nei's (1978) unbiased expected heterozygosity; Ho, observed heterozygosity; SD, standard deviation.

**Table 3.** Multilocus indices of genetic differentiation between three basins. Values below diagonals were computed using data from the five microsatellite loci, while values above diagonals were computed excluding the data from locus *EV92Mn*. For *D* and *F<sub>ST</sub>*, asterisks indicate significant deviations from zero (\*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001).

D	Med	Atl	Pac	FST	Med	Atl	Pac	RST	Med	Atl	Pac
Med		0.066***	0.106***	Med		0.023***	0.036***	Med		0.003	0.032
Atl	0.085***		0.045***	Atl	0.024***		0.009	Atl	0.013		-0.009
Pac	0.166***	0.092***		Pac	0.042***	0.015*		Pac	0.026	-0.010	

(A)

(B)

(C)

(A), pairwise values of Nei's (1978) genetic distance; (B) pairwise values of Wright's *F<sub>ST</sub>*; (C) pairwise values of *R<sub>ST</sub>*; Med, Mediterranean; Atl, Atlantic; Pac, Pacific.

**Table 2.** Values of *F<sub>IS</sub>* and results of the Hardy-Weinberg equilibrium exact test. The 'HWE' rows indicate the P-value of HWE exact test.

Locus/parameters	Mediterranean	Atlantic	Pacific
<i>GATA098</i>			
FIS	0.0363	0.0437	0.0459
HWE	0.2927	0.4984	0.8816
<i>MK9</i>			
FIS	-0.0002	0.1105*	0.0127
HWE	0.4243	0.0230	0.9177
<i>GATA053</i>			
FIS	0.3531*	0.0182	-0.0700
HWE	0.0000	0.6532	0.1915
<i>MK6</i>			
FIS	-0.0691	-0.0119	-0.0776
HWE	0.4546	0.8143	0.8428
<i>EV92Mn</i>			
FIS	0.2579*	0.3823*	0.4340*
HWE	0.0000	0.0000	0.0213
<i>All loci</i>			
FIS	0.0965*	0.1115*	0.0746
HWE	< 0.001	< 0.001	0.3007

\*, indicates that the *F<sub>IS</sub>* value is significantly different from 0 (P<0.05).

between the Atlantic and the Pacific. The mean multilocus Ho was lower in the Mediterranean (Ho=0.684) than in the Atlantic (Ho=0.736) and the Pacific (Ho=0.786), but the pairwise differences in Ho were not significant (P>0.05).

*Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)*

Most of the loci were in HWE. However, the heterozygote deficiency was significant for five locus/basin combinations among 15 (indicated by asterisks in Table 2). The multilocus computation of *F<sub>IS</sub>* and HWE exact test showed a significant heterozygote deficiency in the Mediterranean and the Atlantic. One of the markers (*EV92Mn*) was suspected of bearing null allele(s) in the three basins, with an estimated frequency of 0.12 in the Mediterranean, 0.19 in the Atlantic, and 0.19 in the Pacific. However, results about genetic variability and HWE remained similar when excluding *EV92Mn*

from the analyses (data not shown, available upon request), except that the departure from HWE in the Atlantic was no longer significant ( $P=0.142$ ,  $F_{IS}=0.0413$ ).

#### *Genetic differentiation between the basins*

The overall multilocus  $F_{ST}$  value (accounting for allele identity) was 0.025 considering all loci, and 0.023 excluding EV92*Mn*. The overall multilocus  $R_{ST}$  value (accounting for allele size) was lower with values of 0.011 (all loci), and 0.005 (without EV92*Mn*).

Pairwise Nei's (1978) genetic distance (D),  $F_{ST}$ , and  $R_{ST}$  values indicated that the highest nuclear genetic differentiation occurred between the Mediterranean and Pacific populations (Table 3). Computation of multilocus pairwise Nei's (1978) genetic distance (D) and Wright's (1969)  $F_{ST}$  indicated a slight but highly significant differentiation between the Mediterranean and Atlantic populations ( $P<0.001$ , tables 3A and 3B). Most analyses indicated a higher or more significant differentiation between the Mediterranean and the Atlantic than between the Atlantic and the Pacific.

## DISCUSSION

### *A higher genetic diversity within the Atlantic*

In order to compare the patterns of genetic differentiation and the levels of genetic diversity among striped dolphin populations, 45 Atlantic samples mainly from the Bay of Biscay and 78 Mediterranean samples were analysed. The values computed for R and  $H_e$  within each basin showed a higher nuclear genetic diversity within the Atlantic than within the Mediterranean; this trend was also observed for the mean number of alleles ( $N_A$ ) per locus largely dependent on the number of individuals sampled. This conclusion is consistent with Valsecchi et al.'s observations (2004) suggesting a higher level of allelic diversity in a North Sea sample ( $N=6$ ) than in a Mediterranean sample ( $N=98$ ), although this difference was not significant. Regarding mitochondrial DNA, García Martínez et al. (1999) found that mtDNA nucleotide diversity was higher in an Atlantic sample ( $N=22$ ) than in a Mediterranean sample ( $N=76$ ). Thus, the Atlantic population would be significantly more polymorphic than the Mediterranean population, regarding both nuclear and mitochondrial DNA.

Various hypotheses could explain the Atlantic population's higher genetic diversity. One explanation would be that the older a population is, the more polymorphic it is, as suggested by García Martínez et al. (1999). A second explanation would be a higher effective population size of the Atlantic population in relation to its large geographical range. The genetic diversity in the Pacific sample, despite its low number of individuals ( $N=14$ ), is approximately similar to or even slightly higher than the diversity in the Atlantic sample.

### *Genetic isolation between the basins*

Overall, based on autosomal microsatellites allelic frequencies information ( $F_{ST}$ ), the differentiation between *Stenella ceruleoalba* populations is low. The fact that the greatest genetic differentiation occurs between the Mediterranean and Pacific samples is consistent with the permanent isolation between those two basins since the worldwide radiation of *Stenella ceruleoalba* (Leduc et al., 1999).

The computation of Nei's (1978) genetic distance and Wright's (1969)  $F_{ST}$  indicates a slight but significant genetic differentiation between the Atlantic and the Mediterranean samples, suggesting a partial genetic isolation. When assuming an island model (Wright, 1969), the estimated number of migrants per generation (Nm) can be computed from  $F_{ST}$  where N is the effective population size and m the fraction of the population replaced by migrants at each generation. The computation of Nm gives a rough estimate of 10.30 with all loci, and 10.60 without EV92*Mn*. Due to sampling characteristics and model assumptions, this estimation may not reflect an actual number of migrants. However, it seems to differ notably from the mtDNA Nm estimation of 0.98 by García Martínez et al. (1999), where N is the effective number of females (Slatkin, 1989). The magnitude difference between these two rough estimates arising from different markers might suggest that the male-mediated gene flow could be higher than the female-mediated gene flow, but a precise quantitative assessment remains to be undertaken.

Surprisingly, most indices of genetic diversity indicate that the nuclear genetic differentiation between the Mediterranean and the Atlantic populations is greater than the differentiation between the Atlantic and the Pacific populations. The striped dolphin is essentially a tropical and temperate water species, and it is usually found neither in the waters off Southern Argentina or Chile, nor in the Canadian Archipelago (Archer II & Perrin, 1999). Moreover, the closure of the Panama seaway dates back to the late Pliocene (3–4 million years ago; Coates et al., 2004). Consequently, the low genetic differentiation between the Atlantic and Pacific samples is hardly accounted for by a significant current gene flow between these two oceans.

### *A significant heterozygote deficiency within the Mediterranean sample only*

Though the Atlantic and Pacific samples are in Hardy-Weinberg equilibrium, the Mediterranean sample displays significant heterozygote deficiency, in particular regarding GATA053, one of the newly amplified markers. Several hypotheses could explain this observation (Crouau-Roy, 1988), such as a bias due to the sampling of stranded animals, a significant inbreeding within the population, or a 'Wahlund effect' due to the sampling of two or more reproductively distinct populations. The hypothesis that stranded individuals might be, in some cases, more homozygous than the population they represent is discussed in Valsecchi et al. (2004). In the present study, though the Atlantic sample consists solely of stranded individuals, it does not display such a significant heterozygote deficiency. Furthermore, significant linkage disequilibrium (involving the two newly-tested tetranucleotides) is observed only within the Mediterranean sample, which can also be the consequence of the sampling of two or more reproductively distinct Mediterranean populations. So the Mediterranean striped dolphin population would itself be subdivided (this would be consistent with the bimodal distribution of the allelic frequencies observed within this basin for the tetranucleotide locus GATA098). Performing assignment tests, Valsecchi et al. (2004) found some slight indices of genetic differentiation according to geographic distance between sampling regions within the Mediterranean (e.g.



Gulf of Valencia, Ligurian Sea...). Gaspari (2004) also found significant genetic differentiation within the Mediterranean, between 'inshore' and 'offshore' striped dolphin groups. Further studies, such as analyses based on haplotypic data, could be carried out to investigate the exact relationship between possible Mediterranean distinct lineages.

#### *Conservation of the Mediterranean striped dolphins*

Though it does not seem to be in imminent danger of extinction, the Mediterranean striped dolphin population lives in a highly humanised area, and faces a range of threats whose effects are difficult to quantify. This study shows that, regarding nuclear markers, the Mediterranean population as a whole is genetically less variable than the Atlantic or Pacific population, and is partially reproductively isolated. Given its genetic characteristics, the Mediterranean striped dolphin population should therefore benefit from an adequate conservation effort.

We are grateful to W. Dabin, A. Dewez, F. Dhermain, J.-L. Fabre, B. Jakobsen, B. Lafitte, A.-S. Lemaire, and E. Valsecchi who provided samples, and to M. Bonhomme, F. Magné and A. Rozzi for technical laboratory assistance. We are also grateful to P. De la Rúa, J. Galián, A. Ortiz and J. Serrano for advice at various stages of the project and helpful comments on the manuscript, and to M. Oñate and B. Séverac for reviewing the English.

#### REFERENCES

- Aguilar, A., 2000. Population biology, conservation threats and status of Mediterranean striped dolphins (*Stenella caruleoalba*). *Journal of Cetacean Research and Management*, **2**, 17–26.
- Archer II, F.I. & Perrin, W.F., 1999. *Stenella caruleoalba*. *Mammalian Species*, **603**, 1–9.
- Beebe, T. & Rowe, G., 2004. *An introduction to molecular ecology*. New York: Oxford University Press.
- Belkhir, K., Borsari, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Bonhomme, F., 1996–2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bérubé, M. 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. *Molecular Ecology*, **7**, 585–599.
- Cetacean Specialist Group, 1996. *Stenella caruleoalba*. In 2004 IUCN Red list of threatened species. www.redlist.org downloaded on 24th of June 2005.
- Coates, A.G., Collins, L.S., Aubry, M.P. & Berggren, W.A., 2004. The geology of the Darien, Panama, and the late Miocene-Pliocene collision of the Panama arc with NorthWestern south America. *Geological Society of America Bulletin*, **116**, 1327–1344.
- Crouau-Roy, B., 1988. Genetic structure of cave-dwelling beetle populations: significant deficiencies of heterozygotes. *Heredity*, **60**, 321–327.
- Forcada, J., Aguilar, A., Hammond, P.S., Pastor, X. & Aguilar, R., 1994. Distribution and numbers of striped dolphins in the Western Mediterranean Sea after the 1990 epizootic outbreak. *Marine Mammal Science*, **10**, 137–150.
- García Martínez, J., Moya, A., Raga, J.A. & Latorre, A., 1999. Genetic differentiation in the striped dolphin *Stenella caruleoalba* from European waters according to mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis. *Molecular Ecology*, **8**, 1069–1073.
- Gaspari, S., 2004. *Social and population structure of striped and Risso's dolphins in the Mediterranean Sea*. PhD thesis, University of Durham, Durham, UK.
- Goudet, J., 1995. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485–486.
- Guo, S.W. & Thompson, E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, **48**, 361–372.
- Krützen, M., Valsecchi, E., Connor, R.C. & Sherwin, W.B., 2001. Characterization of microsatellite loci in *Tursiops aduncus*. *Molecular Ecology Notes*, **1**, 170–172.
- LeDuc, R.G., Perrin, W.F., & Dizon, A.E., 1999. Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome b sequences. *Marine Mammal Science*, **15**, 619–648.
- Michalakis, Y. & Excoffier, L., 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special interest to microsatellite loci. *Genetics*, **142**, 1061–1064.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A., 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, **155**, 335–350.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583–590.
- Palsbøll, P.J., Bérubé, M., Larsen, A.H. & Jørgensen, H., 1997. Primers for the amplification of tri- and tetramer microsatellite loci in baleen whales. *Molecular Ecology*, **6**, 893–895.
- Raymond, M. & Rousset, F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248–249.
- Reeves, R.R., Smith, B.D., Crespo, E.A. & Di Sciara, G.N., 2003. *Dolphins, whales and porpoises: 2002–2010 conservation action plan for the World's cetaceans*. Gland and Cambridge: IUCN.
- Sambrook, J. & Russell, D.W., 2000. Preparation of genomic DNA from mouse tails and other small samples. In *Molecular Cloning - A Laboratory Manual on The Web*. Chapter 6, Protocol 5. [http://www.molecularcloning.com/members/protocol\\_print.jsp?protocol=4038](http://www.molecularcloning.com/members/protocol_print.jsp?protocol=4038) downloaded on 10th of November 2005.
- Slatkin, M., 1989. Population structure and evolutionary progress. *Genome*, **31**, 196–202.
- Valsecchi, E. & Amos, W., 1996. Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Molecular Ecology*, **5**, 151–156.
- Valsecchi, E., Amos, W., Raga, J.A., Podestà, M. & Sherwin, W., 2004. The effects of inbreeding on mortality during a morbillivirus outbreak in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella caruleoalba*). *Animal Conservation*, **7**, 139–146.
- 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. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.
- Weir B.S. & Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.
- Wright, S., 1969. *Evolution and the genetics of populations. vol. 2: the theory of gene frequencies*. Chicago: University of Chicago Press.

Submitted 15 June 2006. Accepted XXXX.



## Table des illustrations

### Figures

<b>Fig. 1.</b> Le dauphin bleu-et-blanc <i>Stenella coeruleoalba</i> (Meyen 1833).....	17
<b>Fig. 2.</b> Arbre phylogénétique des cétartiodactyles, d'après Nikaido <i>et al.</i> (1999).....	18
<b>Fig. 3.</b> Distribution du dauphin bleu-et-blanc.....	18
<b>Fig. 4.</b> Feuille de manipulations correspondant à une PCR en multiplex de trois locus.....	30
<b>Fig. 5.</b> Images obtenues à partir du programme ABI Genotyper.....	31
<b>Fig. 6.</b> Electrophorèse en gel d'agarose des produits de la PCR (sur colonies bactériennes).....	33
<b>Fig. 7.</b> Chromatogramme obtenu, suite à une réaction de séquence.....	33
<b>Fig. 8.</b> Séquence de cinq microsatellites chez <i>Stenella coeruleoalba</i> .....	67
<b>Fig. 9.</b> [Résultats de l'étude de García Martínez <i>et al.</i> (1999)].....	77
<b>Fig. 10.</b> Origine géographique des échantillons utilisés.....	78
<b>Fig. 11.</b> Fréquences alléliques par locus et par population.....	84
<b>Fig. 12.</b> Hétérozygoties attendue ( $H_e$ ) et observée ( $H_o$ ) moyennes calculées sur quatre locus pour chaque population.....	88
<b>Fig. 13.</b> Valeur du $F_{IS}$ de Wright (1969) calculée pour chaque bassin... ..	89
<b>Fig. 14.</b> Estimations, par paires de populations, de la distance génétique de Nei (1978) et du $F_{ST}$ de Wright (1969).....	90
<b>Fig. 15.</b> Bilan des indices de variabilité génétique nucléaire et mitochondriale... ..	92
<b>Fig. 16.</b> Indices de variabilité nucléotidique ( $\pi$ ) de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial calculés pour plusieurs groupes d'échantillons.....	97

### Tableaux

<b>Tab. 1.</b> Position taxonomique de <i>Stenella coeruleoalba</i> au sein de l'Ordre des cétacés.....	19
<b>Tab. 2.</b> Microsatellites ayant été amplifiés chez des cétacés.....	34
<b>Tab. 3.</b> Bilan des nombres et proportions de chaque type de répétition constituant les microsatellites amplifiés chez des cétacés.....	64
<b>Tab. 4.</b> Conditions expérimentales permettant l'amplification de cinq marqueurs en deux multiplex... ..	65
<b>Tab. 5.</b> Probabilités d'identité monolocus.....	66
<b>Tab. 6.</b> Probabilités d'identité multilocus (par multiplex).....	66
<b>Tab. 7.</b> Conditions expérimentales qui permettraient l'amplification de cinq marqueurs en un multiplex unique.....	72
<b>Tab. 8.</b> Nombre d'individus génotypés ( $n$ ), nombre d'allèles différents ( $N_A$ ), hétérozygotie attendue non biaisée (Nei, 1978) ( $H_e$ ), et hétérozygotie observée ( $H_o$ ) pour chaque locus et chaque population.....	86
<b>Tab. 9.</b> Nombre moyen d'allèles différents ( $N_A$ ), hétérozygotie attendue non biaisée moyenne ( $H_e$ ), et hétérozygotie observée moyenne ( $H_o$ ) par population (multilocus).....	86
<b>Tab. 10.</b> Valeurs de $F_{IS}$ et résultats des tests de l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE).....	87
<b>Tab. 11.</b> [Calculs sur] quatre locus (en excluant EV92Mn).....	88





**Microusatellite en genetico di cetaciéu : aplicacioun à l'estùdi di pouplacioun de dóufin blu-e-blanc (*Stenella caeruleoalba*) de la Mediterragno pounenteso e de la zouno atlantico procho.**

Vuei, forço espèci de cetaciéu soun menaçado. La couneissènço de sa variabilita genetico intra-especifico sara utilo pèr sa counservacioun. Li microusatellite, marcaire mouleculàri forço variable, permèton d'aprecia aquelo variabilita. Presentan un bilans de l'aproufichamen de microusatellite vers li cetaciéu. Prepausan tambèn de coundicioun esperimentalo favourablo pèr l'amplificacioun de cinq d'entre aquéli marcaire, emai sa seguènci, vers lou dóufin blu-e-blanc.

Em'acò, presentan un'estùdi de l'estampadouro genetico di pouplacioun de *S. caeruleoalba* de Mediterragno e de l'Atlantico nord. La pouplacioun mediterragno es partidamen isoulado, e dins soun toutun mens variable que la pouplacioun atlantico ( $He_{Med} = 0,76$ ,  $He_{Atl} = 0,83$ ,  $p < 0,05$ ). De-mai, presento d'entre-signe qu'evoucon uno poussiblo soudivisioun. Aquéli resultat poudran èstre counsidera pèr la councepcioun de poulitico de counservacioun.

Vilo-Novo d'Avignoun, sièis d'òutobre 2006.



Toulouse, 2006

NOM : BOURRET

PRÉNOM : Vincent

TITRE :

Microsatellites en génétique des cétacés : application à l'étude des populations de dauphins bleu-et-blanc (*Stenella caeruleoalba*) de Méditerranée occidentale et de la zone atlantique proche.

RÉSUMÉ :

De nombreuses espèces de cétacés sont aujourd'hui menacées. La connaissance de leur variabilité génétique intraspécifique sera utile pour leur conservation à long terme. Les microsatellites, marqueurs moléculaires polymorphes de type répété, permettent d'apprécier cette variabilité. Nous présentons un bilan de l'utilisation des microsatellites chez les cétacés. Nous proposons également des conditions expérimentales optimales pour l'amplification de cinq de ces marqueurs, ainsi que leur séquence, chez le dauphin bleu-et-blanc (*Stenella caeruleoalba*). Puis nous présentons une étude de la structure génétique des populations de *S. caeruleoalba* en Méditerranée et Atlantique nord. La population méditerranéenne est partiellement isolée, globalement moins variable que la population atlantique ( $He_{Méd} = 0,76$ ,  $He_{Atl} = 0,83$ ,  $p < 0,05$ ), et présente des indices qui évoquent une possible subdivision. Ces résultats pourront être considérés lors de la conception de politiques de conservation.

MOTS-CLEFS :

Cetacea; génétique ; microsatellite; dauphin bleu-et-blanc; *Stenella caeruleoalba*; Méditerranée; Atlantique.

---

ENGLISH TITLE :

Microsatellites in cetacean genetics: application to the study of Western Mediterranean and adjacent Atlantic striped dolphin (*Stenella caeruleoalba*) populations.

ABSTRACT :

Many cetacean species are at risk today. Assessing their intra-specific genetic variability will help to better manage and conserve the populations. Microsatellites are repeated polymorphic molecular markers that allow the investigation of such variability. This work presents a review of the use of microsatellites in cetaceans. It also presents optimised experimental conditions for the amplification of five of these markers, as well as their sequence, in the striped dolphin (*Stenella caeruleoalba*). Finally, 137 individuals were genotyped to investigate the genetic structure and diversity of Mediterranean and Northern Atlantic striped dolphin populations. The Mediterranean sample appears at least partially isolated, and genetically less diverse than the Atlantic sample ( $He_{Med} = 0.76$  while  $He_{Atl} = 0.83$ ,  $p < 0.05$ ) and displays some signs of being possibly subdivided itself. These results can be of interest for the design of future conservation policies.

KEY-WORDS : Cetacea; genetics; microsatellite; striped dolphin; *Stenella caeruleoalba*; Mediterranean; Atlantic.