



Meilleures Pratiques

De l'ACCOBAMS Sur
La Génétique Des
Populations De Cétacés



Version 2, Novembre 2023

Meilleures pratiques de l'ACCOBAMS sur la génétique des populations de cétacés

Version 2, Novembre 2023

Ce document de Meilleures pratiques a été élaboré par les participant-es de l'« Atelier de l'ACCOBAMS sur la collecte de données sur la génétique des populations de cétacés dans la zone ACCOBAMS » qui s'est tenu en septembre 2022 : Pauline Gauffier, Anna Schleimer, Susana Salvador, Maýlis Salivas, Inês Carvalho, Olfa Chaieb, Greg Donovan, Michael Fontaine, Natalia Fraija, Tilen Genov, Pavel Gol'din, Nik Lupše, Sandro Mazzariol, Paula Méndez Fernández, Cristina Panti, Céline Tardy, Arda Tonay, Karina Vishnyakova (voir rapport [ACCOBAMS-MOP8/2022/Inf25](#)). La version 1 de ce document a été présentée à la 8^{ème} Réunion des Parties à l'ACCOBAMS, 29 novembre - 2 décembre 2022, Malte ([ACCOBAMS-MOP8/2022/Inf54](#)). La [Résolution 8.11](#) sur la Génétique des populations de cétacés invite les Parties à appliquer ces Meilleures Pratiques de l'ACCOBAMS sur la génétique des populations de cétacés. Des modifications mineures ont été réalisées en novembre 2023, notamment l'actualisation de l'Annexe 2, et sont donc incluses dans cette nouvelle version traduite en français (Version 2, Novembre 2023).

Certaines parties sont largement basées sur des lignes directrices existantes, comme celles développées par la Commission Baleinière Internationale (voir références citées dans le document). De plus, Ralph Tiedemann, Amy Van Cise, Elena Valsecchi ont apporté des commentaires éclairés et accepté qu'une partie du texte et des figures de leurs articles soient repris dans ce document de Meilleures pratiques.

En raison du développement rapide de nouvelles techniques d'analyse, ces Meilleures pratiques devront être considérées comme un document vivant et être mises à jour régulièrement.

Toutes les images (sauf indication contraire) ont été téléchargées sous licence Freepik Premium (Utilisation illimitée sans attribution). Direction artistique et conception par Irene Álvarez Vicente et Irem Özbek.



Citation : ACCOBAMS 2023. Meilleures pratiques de l'ACCOBAMS sur la génétique des populations de cétacés. Version 2, Novembre 2023.
Par : Gauffier, P., Schleimer, A., Carvalho, I., Chaieb, O., Donovan, G., Fontaine, M., Fraija, N., Genov, T., Gol'din, P., Lupše, N., Mazzariol, S., Méndez Fernández, P., Panti, C., Salivas, M., Tardy, C., Tonay, A., Vishnyakova, K. 99 p.

Sommaire

Introduction	4
01) La conception de l'étude	6
A) Définir les objectifs/hypothèses de l'étude	6
B) Le choix des marqueurs génétiques/omiques	7
C) La recherche de collaborateur·rice·s	9
02) Les permis pour la collecte d'échantillons	10
A) Les permis nationaux	10
B) Informer l'ACCOBAMS	11
03) Collecter les échantillons	12
A) L'échantillonnage par biopsie	13
B) Les animaux morts/échoués	16
C) L'ADN environnemental	16
D) L'échantillonnage par écouvillonnage	19
E) Les fèces	19
F) Les spécimens de musée	19
G) L'ADN ancien	20
H) Autres techniques – les squames	21
04) Conserver les échantillons	22
A) Recommandations générales	22
B) Le stockage à long terme	25
C) Le stockage dans les banques de tissus	26
05) Échanger des échantillons	27
A) Accord ou mémorandum d'entente	27
B) Les procédures CITES	27
C) Le Protocole de Nagoya sur l'accès et le partage des avantages	30
D) Informer le Point Focal National de l'ACCOBAMS	32
06) Traitement des échantillons	33
A) Techniques/protocoles de traitement	33
B) Les lignes directrices de la CBI sur le contrôle de la qualité	35
C) Laboratoires génétiques adaptés	36

07) Analyse de données	37
A) Les lignes directrices de la CBI sur l'analyse des données	37
B) L'ADN environnemental et les fèces	39
C) Les ressources computationnelles pour les données génomiques	39
08) Dissémination des résultats	41
A) Le Comité scientifique de l'ACCOBAMS	41
B) La communauté scientifique	41
C) Les Points Focaux Nationaux de l'ACCOBAMS	41
D) Les autres parties intéressées	41
E) Le grand public	41
09) L'archivage des données et la compilation de données provenant d'études précédentes	42
10) Science médico-légale	43
A) Cas particulier de l'identification individuelle des animaux en captivité	43
B) Identification d'espèces pour le commerce	43
11) Glossaire des termes	44
Références	48
Annexe 1	56
01) Résumé pour chaque espèce	56
02) Tableau résumé de la littérature scientifique existante	65
03) Liste de références relative aux résumés des espèces	81
Annexe 2	91
Laboratoires de génétique adaptés dans la zone ACCOBAMS [Novembre 2023]	91
Annexe 3	93
Exemple de protocole de laboratoire pour l'extraction d'ADN à partir de tissus	93
A) Méthode de précipitation à l'acétate d'ammonium	93
B) Méthode au phénol/chloroforme	95
Annexe 4	97
Exemple d'accord de transfert de matériel biologique	97

Introduction

Comprendre la structure des populations et délimiter les unités de conservation (c.-à-d. souvent, mais pas toujours, les "populations biologiques") est essentiel pour une bonne conservation et une bonne gestion. Bien qu'une telle compréhension nécessite l'intégration de résultats provenant d'une série de types de données et de techniques analytiques, la génétique des populations en est un élément fondamental. Les Plans de Gestion de Conservation (CMP¹) et le Programme de Surveillance à Long Terme (LTMP) sont deux éléments essentiels de la stratégie de gestion de l'ACCOBAMS.

L'objectif général des CMPs est d'intégrer des informations scientifiques pour permettre la gestion des activités humaines qui affectent une espèce donnée dans une zone donnée afin de maintenir un état de conservation favorable de cette espèce. Les quatre premières ébauches de Plans qui sont en cours d'élaboration concernent les rorquals communs, les dauphins de Risso, les grands dauphins et les dauphins communs en mer Méditerranée.

Pour maintenir le statut favorable d'une espèce dans l'ensemble de son aire de répartition, il faut déterminer la structure de la population dans l'aire de répartition (p. ex., la mer Méditerranée) et déterminer les unités à conserver (ainsi que leurs limites géographiques et temporelles). S'il n'est pas impossible qu'il n'existe qu'une seule population d'une espèce dans la mer Méditerranée, sans entrée (ou sortie) géographique ou temporelle, cela est peu probable. Il n'est donc pas surprenant que les quatre ébauches de CMP incluent des actions hautement prioritaires visant à déterminer quelles sont ces unités de gestion. Cela permettra ensuite de déterminer le statut de conservation et les menaces à l'échelle géographique appropriée pour chaque unité de gestion et de faciliter toutes les mesures de mitigation nécessaires.

Le LTMP est né du succès de l'« ACCOBAMS Survey Initiative » en mer Méditerranée en 2018 et d'un effort similaire en mer Noire en 2019, qui ont permis d'établir pour la première fois des estimations de référence pour l'abondance et la distribution estivales de nombreuses espèces. L'abondance (et sa tendance) est un paramètre clé pour déterminer le statut, mais l'interprétation des résultats des campagnes en mer nécessite une connaissance de la structure de la population et des déplacements saisonniers. En bref, supposer qu'une espèce ne se compose que d'une seule population alors qu'elle est divisée en plusieurs sous-populations peut conduire à des raréfactions locales.

Bien que les études génétiques puissent aborder un grand nombre de questions relatives aux cétacés, ces Meilleures pratiques se concentrent principalement sur les questions liées à la compréhension de la structure, de l'abondance et des déplacements des populations, afin que l'ACCOBAMS puisse atteindre ses objectifs de conservation et de gestion.



¹ Voir <https://accobams.org/fr/especes/plans-de-conservation/>

1. FIXER LES OBJECTIFS GÉNÉRAUX DE L'ÉTUDE

p. ex., [contribuer à] l'identification des unités à conserver dans une zone donnée.

2. EXAMINER LES INFORMATIONS/ ÉCHANTILLONS DISPONIBLES

- 2.1)** Si cela est possible et pertinent, utiliser les informations existantes (génétiques et non génétiques) pour formuler des hypothèses plausibles.
- 2.2)** Déterminer si une couverture géographique et/ou temporelle supplémentaire (échantillons) est nécessaire.
- 2.3)** Déterminer si une collaboration est nécessaire (c'est généralement le cas) et entamer la consultation dès le stade de la conception, y compris pour l'obtention des permis pertinents (Nagoya, CITES). Cela vaut pour la collecte sur le terrain, le traitement en laboratoire et les analyses.

3. CONCEPTION DE L'ÉTUDE - AVANT DE COMMENCER !

- 3.1)** Stratégie/méthode d'échantillonnage pour les nouveaux échantillons, y compris les "données auxiliaires", la plate-forme, le matériel d'échantillonnage, l'expertise, les autorisations, le stockage à court terme - la taille et la répartition des échantillons doivent être examinées conjointement avec les points 3.4 à 3.6.
- 3.2)** Étudier la situation en matière de permis en cas de franchissement de frontières (échantillons existants et nouveaux échantillons).
- 3.3)** Déterminer la stratégie de stockage/archivage à long terme pour permettre de nouvelles analyses dans le futur.
- 3.4)** Choisir le(s) marqueur(s) approprié(s) en fonction des objectifs et des ressources. Si l'on fait appel à plusieurs laboratoires, veiller à l'étalonnage si nécessaire. Respecter les lignes directrices relatives à la qualité de l'ADN.
- 3.5)** Le cas échéant, décider de l'hypothèse nulle ou des hypothèses nulles.
- 3.6)** Décider des techniques d'analyse (normalement plus d'une en fonction des marqueurs) et examiner la puissance requise pour atteindre les objectifs sous différentes hypothèses.

4. AU TRAVAIL!

- 4.1)** Effectuer le travail sur le terrain et l'analyse en suivant les lignes directrices recommandées.
- 4.2)** Rédiger un rapport avec l'ensemble des résultats.
- 4.3)** Soumettre à l'examen du Comité Scientifique de l'ACCOBAMS pour les implications en matière de gestion.
- 4.4)** Si les résultats ne sont pas concluants, ne pas désespérer - la science est itérative, alors retour au point 2!
- 4.5)** Publier et diffuser les résultats.

01) La conception de l'étude



A) Définir les objectifs/hypothèses de l'étude

La génétique peut fournir des informations pertinentes pour de nombreux aspects de la conservation et de la gestion des menaces pour les cétacés. Par exemple, les données génétiques peuvent être utilisées pour :

- Identifier et délimiter les espèces, les sous-espèces et les populations.
- Étudier l'occurrence de l'hybridation.
- Estimer la taille effective des populations.
- Identifier les individus et suivre leurs déplacements actuels.
- Caractériser les niveaux de connectivité et de différenciation génétiques entre les populations.
- Quantifier la diversité génétique au sein des populations avec des indications sur les processus démographiques passés.
- Résoudre l'admixture des populations et assigner les individus à la population dont ils sont le plus probablement originaires.
- Les sciences médico-légales.

Dans la zone ACCOBAMS, les CMP nécessitent souvent des informations provenant des analyses génétiques. La définition d'objectifs d'étude clairs déterminera la conception de l'étude en termes du nombre d'échantillons, des marqueurs génétiques, de la couverture spatio-temporelle et des collaborations. En définissant leurs attentes avant le début de l'étude, les scientifiques peuvent planifier un plan d'étude expérimental optimal. L'article de Waples *et al.* (2018) définit l'approche de la Commission Baleinière Internationale (CBI) pour déterminer la structure des stocks, et discute de l'utilisation des seuils de différenciation des populations qui nécessitent une gestion indépendante des stocks.

L'Annexe 1 présente une revue de la littérature existante sur la génétique des cétacés dans la zone ACCOBAMS jusqu'en septembre 2022, et identifie les lacunes dans les connaissances. **Les futures études devraient viser à combler ces lacunes et à mettre à jour ces informations.**

B) Le choix des marqueurs génétiques/omiques

En génétique des populations, on étudie la distribution des fréquences des allèles (patrons) dans l'espace et dans le temps résultant de certaines forces ou processus évolutifs. La caractérisation des fréquences et des distributions des allèles dans une population donnée permet de déduire les processus (p. ex., la dérive génétique, les mutations, les flux génétiques et la sélection naturelle) qui ont façonné les patrons observés dans cette population. L'analyse génétique des populations consiste à poser des questions biologiques pertinentes, à échantillonner des individus, à déterminer les fréquences des allèles pour différents *loci* et à utiliser des approches statistiques pour déduire les patrons et les processus.

L'une des étapes les plus importantes d'une étude de génétique des populations est le choix des marqueurs à analyser. Ce choix dépend de plusieurs facteurs, tels que le type de questions auxquelles on entend répondre, le budget disponible, le laboratoire ou la capacité technique (ressources humaines et informatiques) pour l'analyse des résultats (Tableau 1). Certains marqueurs peuvent être appliqués directement à des espèces non modèles (p. ex., le séquençage RADseq, ou Restriction-site Associated DNA sequencing en anglais), tandis que d'autres nécessitent le développement a priori d'amorces spécifiques à l'espèce (p. ex., les *loci* microsatellites), bien que, dans certains cas, des amorces provenant d'espèces étroitement apparentées puissent être utilisées. Il convient donc de procéder à une revue approfondie de la littérature existante afin de déterminer quels marqueurs ont déjà été appliqués à l'espèce concernée et/ou s'il est nécessaire de mettre au point de nouveaux marqueurs.

Les marqueurs moléculaires doivent être choisis de façon adéquate pour être neutres/adaptatifs (en fonction des questions), raisonnablement polymorphes, reproductibles et fournir des informations à la bonne échelle évolutive. Les marqueurs présentant des taux de mutation élevés, tels que les microsatellites (répétitions de séquences simples ou SSR en anglais), permettent de mieux comprendre les divergences récentes, tandis que les *loci* mitochondriaux, nucléaires ou d'autres séquences permettent de déduire l'histoire évolutive plus lointaine, compte tenu de leurs taux de mutation plus lents.

Le nombre minimum de marqueurs à utiliser dans une étude de génétique des populations varie en fonction de la diversité génétique de la population, de l'échelle de l'étude et du type de marqueur utilisé. Actuellement, les données génétiques et génomiques peuvent être utilisées pour estimer la diversité génétique, la structure de la population et l'histoire démographique. Les données génomiques comportant une densité plus élevée de marqueurs à travers le génome peuvent fournir une estimation plus précise de ces paramètres, ce qui entraîne parfois des recommandations de conservation différentes (Supple & Shapiro 2018).

Le coût du séquençage diminue continuellement ; cependant, la plupart des projets de conservation ont un budget limité qui ne permet le séquençage à l'échelle du génome que d'un petit nombre d'échantillons. Le compromis entre le nombre d'échantillons et le nombre de *loci* séquencés est une considération essentielle, et la meilleure approche dans chaque cas dépendra de la question posée et peut souvent être évaluée grâce à des simulations.

Une autre considération essentielle est l'analyse des données, en particulier les ressources et l'expertise disponibles pour analyser les données génomiques. Par exemple, le génotypage nécessite un génome de référence, qui peut ne pas encore être disponible pour certaines espèces de cétacés, et les logiciels d'analyse ne sont pas toujours faciles à utiliser. De plus, l'analyse des données génomiques nécessite une puissance informatique et une capacité de stockage de haute résolution (cf. section sur les [Ressources computationnelles](#)). En outre, il est souvent difficile d'interpréter les résultats des analyses faites sur génome entier et de les traduire en recommandations de conservation.

Tableau 1. Résumé restreint présentant certaines caractéristiques de différents marqueurs génétiques/génomiques.

	ADNmt (MITOCHONDRIAL)	MICROSATELLITES (SSR)	SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPs) ^a	GÈNE NUCLÉAIRE	GÉNOME COMPLET
Effet de la sélection	Neutre ^b	Neutre	Neutre or Adaptatif ^c	Adaptatif	Neutre et adaptatif
Mode d'héritabilité	Maternel	Biparental	Biparental	Biparental	Biparental
Taux de mutation	Faible	Élevé	Moyen-Élevé	Faible-Moyen	Faible-Moyen
Échelle temporelle	Longue	Courte	Courte	Variable	Variable
Couverture génomique	Faible	Génome complet	Génome complet	Faible	Génome complet
Quantité d'ADN requise	Faible	Moyenne (20-50 ng)	Élevée (≥50 ng)	Faible	Élevée (≥50 ng)
Qualité d'ADN requise	Faible Moyenne	Moyenne	Élevée	Faible-Moyenne	Élevée
Besoins techniques	Faibles	Faibles	Élevés	Faibles	Élevés
Temps nécessaire	Faible	Élevé	Faible	Faible	Moyen-Élevé
Coût	Faible	Moyen-Élevé	Moyen-Élevé	Faible	Élevé

a - Polymorphisme d'un seul nucléotide; b - Considéré sélectivement neutre; c - Peut être placé à l'intérieur ou à proximité des régions du génome sous l'emprise de la sélection

Pour plus de détails, les scientifiques sont invité-es à lire les articles suivants: Allendorf *et al.* 2010, Shafer *et al.* 2015, Andrews *et al.* 2016, Hunter *et al.* 2018, Cabrera *et al.* 2021, Willi *et al.* 2022.

C) La recherche de collaborateur·rice·s

Pour les études de population portant sur les unités de gestion ou de conservation, deux aspects sont essentiels en ce qui concerne les échantillons : (1) un nombre suffisant et (2) une répartition géographique et saisonnière suffisante. Dans une zone aussi vaste que la région ACCOBAMS, il est peu probable qu'un seul institut/organisation dispose d'échantillons suffisants pour répondre à ces deux exigences. Il est donc essentiel de développer une approche collaborative dans toute la région le plus tôt possible dans la conception de l'étude. Cette collaboration doit s'étendre à toutes les étapes du processus, depuis l'obtention, l'archivage et le partage des échantillons jusqu'au choix des marqueurs, des laboratoires et des analyses, et enfin jusqu'à la publication. Le développement des protocoles pour chacune de ces étapes permettra d'éviter tout malentendu entre les collaborateur·rice·s. Il est essentiel de souligner auprès de tous les collaborateur·rice·s potentiel·les l'importance de la collaboration par rapport au travail isolé et le fait que celle-ci renforce considérablement notre capacité à développer des mesures de conservation et de gestion adéquates.

L'atelier de l'ACCOBAMS sur la Collecte de données sur la génétique des populations de cétacés dans la zone ACCOBAMS², qui s'est tenu en septembre 2022, a produit une liste des institutions de recherche qui collectent et stockent des échantillons dans la zone ACCOBAMS, disponible sur le site internet de l'ACCOBAMS <https://accobams.org/fr/population-genetics/>. Cette liste comprend le nom de chaque institution et de la personne de contact correspondante, le type d'échantillons (échouages, biopsies sur animaux vivants, etc.) et le nombre d'échantillons disponibles par espèce. Il s'agit d'un document évolutif qui sera régulièrement mis à jour avec de nouvelles informations.

Il est également important d'envisager des collaborations avec des groupes de recherche en dehors de la zone ACCOBAMS, en particulier pour les espèces qui pourraient échanger des individus avec des zones adjacentes ou lorsque l'expertise pour, par exemple, de nouvelles techniques de laboratoire ou d'analyse, se trouve en dehors de la région.



² Voir le rapport ACCOBAMS-MOP8/2022/Inf25 (en anglais) disponible sur https://accobams.org/wp-content/uploads/2022/11/MOP8_Inf25_Report-of-the-ACCOBAMS-Workshop-on-Data-Collection-on-Cetacean-Population-Genetics.pdf

02) Les permis pour la collecte d'échantillons



A) Les permis nationaux

Le Plan de Conservation (*Annexe 2 de l'Accord*) contraint les Parties à :

- Développer « des programmes de recherche systématiques portant sur des animaux morts, échoués, blessés ou malades afin de déterminer les principales interactions avec les activités humaines et d'identifier les menaces réelles ou potentielles » (paragraphe 4.d) ;
- Développer les systèmes de collecte de données sur les observations, les prises accidentelles, les échouages, les épizooties et autres phénomènes relatifs aux Cétacés (paragraphe 5.a) ;
- Établir, en tant que de besoin, une base de données sous-régionale ou régionale pour gérer les informations collectées (paragraphe 5.d).

La collecte d'échantillons sur des individus échoués peut nécessiter un permis de l'autorité nationale compétente. Suite à la Résolution 1.10 de l'ACCOBAMS sur la *Coopération entre les réseaux nationaux d'échouages de cétacés et création d'une base de données*³, les Parties sont encouragées à créer un réseau d'échouage. Suite à la Résolution 3.9 de l'ACCOBAMS sur les *Lignes Directrices pour l'établissement d'une Banque de Tissus dans l'aire ACCOBAMS et Code d'Éthique*⁴, "Leurs activités doivent suivre les procédures mises en place par les autorités compétentes pour le traitement des animaux vivants ou morts sous le CITES. Par conséquent, les Banques de Tissus doivent suivre les procédures du CITES pendant l'acquisition, le traitement et la distribution des fragments de tissus ou les parties du corps".

De plus, l'Article II, paragraphe 1, de l'ACCOBAMS interdit tout "prélèvement" délibéré de cétacés, y compris le "harcèlement" et l'Article II, paragraphe 2, de l'ACCOBAMS établit la possibilité pour toute Partie d'accorder une dérogation à cette interdiction à des fins de recherche in situ non-létale visant à maintenir un état de conservation favorable pour les cétacés et après avoir obtenu l'avis du Comité Scientifique. Selon la Résolution 4.18 sur les *Lignes Directrices pour l'octroi de dérogations à l'Article II, paragraphe 1, aux fins de recherches in situ non-létales dans la zone de l'Accord*⁵, un permis est requis pour toutes les activités de recherche qui impliquent un harcèlement potentiel des cétacés en violation de l'interdiction de prélèvement délibéré établie par l'Article II.1 de l'Accord. **Les activités de recherche qui entrent dans cette catégorie comprennent la collecte d'échantillons par biopsie (ou écouvillonnage).** Les autorités nationales compétentes peuvent accorder les permis en question, en se conformant aux Lignes directrices de la Rés. 4.18.

³ https://www.accobams.org/wp-content/uploads/2016/06/ACCOBAMS_MOP1_Res.1.10_fr.pdf

⁴ https://www.accobams.org/wp-content/uploads/2016/06/ACCOBAMS_MOP3_Res.3.9_fr.pdf

⁵ https://www.accobams.org/wp-content/uploads/2016/06/ACCOBAMS_MOP4_Res.4.18_fr.pdf

Lors de l'échantillonnage d'animaux vivants, l'évaluation du projet par un comité de bien-être animal peut être nécessaire avant de demander le permis d'échantillonnage (p. ex., la Directive européenne 2010/63/UE et ses transpositions dans les législations nationales). D'autres permis peuvent également être nécessaires, notamment concernant le transport des échantillons depuis le lieu de collecte jusqu'à l'installation de stockage temporaire ou permanente (y compris les banques de tissus nationales) à l'intérieur d'un pays et les permis d'armes requis dans certains pays pour l'utilisation d'arbalètes/fusils pour la collecte de biopsies.

Tous ces permis sont parfois accordés par des autorités compétentes différentes (p. ex., en Espagne, les autorités régionales sont responsables de l'octroi des permis de collecte d'échantillons pour les échouages, les autorités nationales pour l'échantillonnage en mer et la "Guardia Civil" - équivalent de la gendarmerie nationale - réglemente les permis d'armes nécessaires pour utiliser une arbalète ou un fusil).

Les scientifiques doivent contacter les autorités nationales et régionales compétentes pour s'assurer le respect de toute la législation en vigueur relative à la collecte d'échantillons de cétacés dans leur pays.

B) Informer l'ACCOBAMS

Selon la Résolution 4.18 sur les *Lignes Directrices pour l'octroi de dérogations à l'Article II, paragraphe 1, aux fins de recherches in situ non-létales dans la zone de l'Accord*, les Parties se doivent d'informer l'ACCOBAMS de toutes les dérogations qu'elles octroient. Ces exceptions seront incluses dans une nouvelle section dédiée à cette question dans le format du rapport national [voir paragraphe 147 du rapport final de la [MOP8 ACCOBAMS-MOP8/2022/Doc31](https://accobams.org/wp-content/uploads/2022/05/MOP8.Doc31_Rapport-Final_FR-1.pdf)⁶].



⁶ https://accobams.org/wp-content/uploads/2022/05/MOP8.Doc31_Rapport-Final_FR-1.pdf

03) Collecter les échantillons



Conditions stériles

La collecte d'échantillons doit toujours être effectuée dans des conditions propres et stériles afin de minimiser la possibilité de contamination. Sur le terrain, les sources potentielles de contamination des échantillons comprennent l'environnement marin, les personnes qui manipulent l'échantillon et le lieu de traitement, ainsi que la contamination croisée à partir d'autres échantillons collectés simultanément Van Cise *et al.* (2022).

Le matériel de collecte d'échantillons, tel que les pointes de biopsie, les pinces/forceps et les scalpels, doit être soigneusement nettoyé après chaque usage à l'eau chaude et au détergent afin d'éliminer les débris visibles, puis être rincé à l'eau douce. Il est essentiel d'éliminer toute trace de détergent sur le matériel avant sa réutilisation, car celui-ci peut affecter l'extraction d'ADN et les analyses postérieures. Ensuite, le matériel d'échantillonnage doit être stérilisé en utilisant par exemple le protocole de nettoyage à l'eau de Javel et à l'éthanol suivant (Van Cise *et al.* 2022) :

1. Immersion pendant 10 minutes dans une solution d'eau de Javel à 10 %.
2. Rinçage à l'eau potable.
3. Rinçage avec de l'éthanol ou de l'isopropanol à 95 %.
4. Séchage à l'air libre puis stockage dans un récipient stérile inutilisé en vue d'une utilisation ultérieure.

Étiquetage

Il est recommandé de porter des gants et de travailler sur des surfaces propres avec du matériel stérile dans la mesure du possible. Les échantillons doivent être conservés dans un récipient pré-étiqueté et pré-rempli avec le tampon de stockage adéquat (si nécessaire). Pour éviter de perdre l'étiquetage des échantillons, il est recommandé d'étiqueter doublement chaque flacon à l'aide d'un marqueur permanent et d'éviter les étiquettes fixées avec du ruban adhésif qui risquent de se détacher. Il est conseillé de commencer par le récipient portant le numéro le plus petit et de suivre strictement les numéros, de manière à ce qu'ils reflètent l'ordre d'échantillonnage (Tiedemann *et al.* 2012). Au moins deux aliquotes d'échantillons doivent être prélevés, l'une pour l'analyse en cours et l'autre pour son archivage dans une banque de tissus.

Métadonnées associées

Au minimum, les métadonnées devraient inclure la date, l'heure, le numéro de l'échantillon, la latitude et la longitude et l'espèce.

Ensuite, si possible le sexe, la taille, le poids, la classe d'âge, les conditions de prélèvement : la position anatomique de prélèvement de l'échantillon, la méthode de collecte, le temps écoulé entre la collecte et la conservation de l'échantillon, les techniques de traitement sur le terrain, la méthode de stockage sur le terrain et le nombre de cycles de congélation/décongélation avant l'archivage

(Van Cise *et al.* 2022). Lors de l'échantillonnage d'animaux échoués ou de carcasses, les scientifiques doivent estimer le temps qui s'est écoulé depuis la mort selon le document de Meilleures pratiques de l'ACCOBAMS et l'ASCOBANS sur les examens post-mortem (ACCOBAMS-MOP7/2019/Doc 33)⁷, car la dégradation des tissus peut affecter postérieurement la qualité des données et l'interprétabilité des résultats obtenus (Van Cise *et al.* 2022).

Maximiser l'utilisation des échantillons

Même si ces lignes directrices concernent principalement les études génétiques, les échantillons collectés pourront également être utilisés pour d'autres types d'analyses. La liste suivante, non exhaustive, peut aider les scientifiques à **optimiser la collecte d'échantillons pour répondre à différents objectifs de recherche. La maximisation de l'utilisation des échantillons est toujours souhaitable dans la mesure du possible.**

Les échantillons de peau ou muscle peuvent être subdivisés à plusieurs fins :

- Génétique/génomique et/ou détermination du sexe (20-50 mg, immédiatement congelés dans de l'azote liquide, de la neige carbonique ou à -20°C ; ou stockés dans de l'éthanol, du DMSO ou une solution d'RNAlater™).
- Expression génétique/étude transcriptomique (analyse de l'ARN)/analyse des protéines (20-50mg, immédiatement congelés dans de l'azote liquide ou de la neige carbonique, ou conservés dans de l'éthanol ou une solution d'RNAlater™).
- Analyse des isotopes stables (20-50 mg, immédiatement congelés dans de l'azote liquide, de la neige carbonique ou à -20°C).

Les échantillons de lard peuvent être subdivisés à plusieurs fins :

- Analyse des contaminants (>150 mg, immédiatement congelés dans l'azote liquide, la neige carbonique ou à -20°C).
 - conservation dans du papier d'aluminium ou des récipients en verre dans le cas de l'étude des contaminants organiques persistants (p. ex., les contaminants organochlorés), les additifs plastiques, les PFAS, etc. pour éviter la contamination du récipient plastique
 - conservation dans des flacons en plastique (pas de papier aluminium) pour l'étude des métaux lourds.
- Analyse des hormones ou des acides gras (>100mg immédiatement congelés dans l'azote liquide, la neige carbonique ou à -20°C).

A) L'échantillonnage par biopsie

L'échantillonnage par biopsie est la méthode la plus courante pour collecter des échantillons de tissu sur des cétacés vivants et en liberté (Noren et Mocklin 2012), car elle permet d'éviter de capturer physiquement les animaux ou d'avoir un accès direct à ces derniers. En plus des études sur la structure génétique des populations (p. ex. Louis *et al.* 2014, Gaspari *et al.* 2015, Nykänen *et al.* 2019), les mêmes échantillons peuvent également être utilisés pour d'autres analyses telles que l'étude des contaminants (p. ex. Fossi *et al.* 2000, Ylitalo *et al.* 2001, Jepson *et al.* 2016) et du régime alimentaire (Kiszka *et al.* 2010a, Kiszka *et al.* 2014), ou des études pluridisciplinaires (Esteban *et al.* 2016, Giménez *et al.* 2018). Bien que la collecte d'échantillons par biopsie ne suscite généralement que des réactions comportementales relativement légères et de courte durée, ne laissant pas de blessures durables, et qu'il soit donc considéré comme une méthode "sûre" (Weller *et al.* 1997, Gorgone *et al.* 2008, Kiszka *et al.* 2010b, Giménez *et al.* 2011), il peut potentiellement causer des blessures graves ou la mort dans

⁷ Meilleures pratiques d'examen post mortem (en anglais: Joint ACCOBAMS and ASCOBANS document on Best practice on cetacean post mortem investigation and tissue sampling) disponible sur https://accobams.org/wp-content/uploads/2019/04/MOP7.Doc33_Best-practices-on-cetacean-post-mortem-investigation.pdf

certains cas extrêmes (Bearzi 2000) et doit donc être effectué avec le plus grand soin pour garantir la sécurité des animaux et des êtres humains.

Matériel

Les biopsies (épiderme et derme/lard) de cétacés en liberté peuvent être prélevées à l'aide d'une perche munie d'une pointe de biopsie pour les animaux nageant à l'étrave (Bilgmann *et al.* 2007) ou à distance à l'aide d'une arbalète ou d'un fusil modifié et de flèches munies de pointes (Krützen *et al.* 2002, Gorgone *et al.* 2008, Giménez *et al.* 2011, Figures 1 et 2).

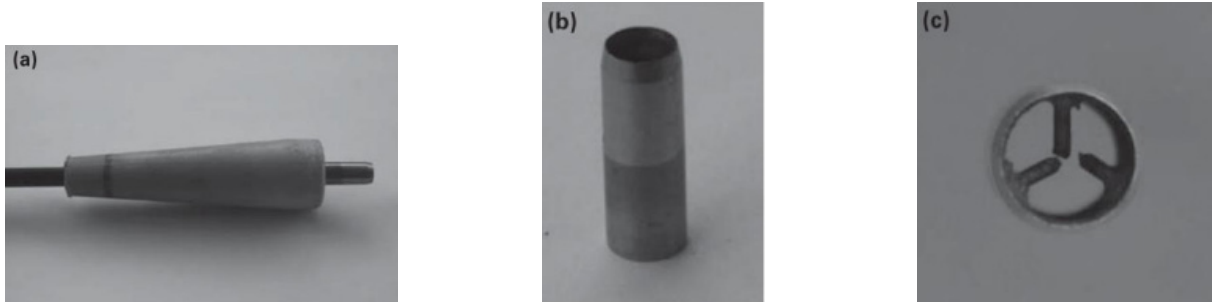


Figure 1. Matériel de biopsie utilisé pour l'échantillonnage à distance de peau/lard de cétacés. (a) Pointe de biopsie fixé au bout de la flèche. On voit également le flotteur qui stoppe l'insertion. (b) Pointe de biopsie. (c) vision interne de la pointe de biopsie montrant les picots qui permettent de retenir l'échantillon (Giménez *et al.* 2011, reproduction autorisée)

Le choix du matériel dépendra d'un certain nombre de considérations, notamment le comportement habituel de l'espèce cible (p. ex., pour les espèces susceptibles de nager à l'étrave le système de perche peut être utilisé, tandis qu'un système à distance pourra être préférable pour les espèces qui approchent rarement les bateaux), la taille de celle-ci (liée au choix de la puissance de tir et de la taille des pointes), le navire utilisé, le coût et la facilité d'obtention des différents types de matériel, ainsi que la législation locale/nationale relative à l'utilisation d'armes. En général, après avoir rebondi sur l'animal échantillonné, la flèche flotte dans l'eau et est récupérée à la main ou à l'aide d'une épuisette. Toutefois, dans certaines conditions, les flèches peuvent être reliées à l'arbalète/fusil pour faciliter leur récupération.



Figure 2. Échantillonnage par biopsie d'un individu adulte de grand dauphin (*Tursiops truncatus*) en liberté dans le golfe de Trieste, au nord de la mer Adriatique, utilisant une arbalète et une flèche spécialement fabriquée pour les biopsies (Photographie © Morigenos).

L'échantillonnage par écouvillonnage peut également être utilisé pour collecter des tissus épidermiques sur des animaux qui nagent à l'étrave (cf. section sur [L'échantillonnage par écouvillonnage](#)).



Sécurité

La sécurité des personnes est une priorité dans toutes les campagnes sur le terrain, et en particulier lors de la collecte de biopsies. Cela implique de connaître son matériel, d'utiliser correctement le mécanisme de sécurité, d'éviter de pointer l'arbalète/le fusil vers d'autres personnes et de ne pas laisser les armes sans surveillance, en particulier lorsqu'elles sont chargées. Les prélèvements ne doivent être effectués que sur des animaux d'apparence saine qui ne présentent pas de signes de malnutrition sévère, de mauvaise santé ou de difficulté à nager. Les petits ou les femelles accompagnées de petits ne doivent généralement pas être ciblés, bien que cela puisse dépendre de l'espèce et de l'étude. Le comportement et les mouvements des animaux doivent être pris en compte, car les mouvements erratiques peuvent compromettre l'efficacité et la sécurité de l'échantillonnage. Les échantillons de biopsie doivent idéalement être prélevés dans la zone située sous la nageoire dorsale (Figure 2) ou sur le flanc entre la nageoire dorsale et la partie supérieure du pédoncule caudal, bien que la zone cible puisse dépendre de l'espèce. La tête, la cage thoracique, les nageoires pectorales et la face ventrale doivent être évitées. Il convient d'être particulièrement prudent lorsqu'un animal non ciblé est susceptible de faire surface à côté de l'animal ciblé, ce qui peut entraîner des tirs accidentels dans la tête. Il convient d'approcher les animaux avec précaution afin de minimiser les perturbations, idéalement sur le côté, en convergeant vers la direction de nage des animaux, sans croiser leur route. La vitesse et la distance requises dépendront du comportement de l'animal et de l'espèce échantillonnée. Comme décrit ci-dessus, pour éviter tout risque d'infection et de contamination croisée, les pointes d'échantillonnage et le support des pointes sur les flèches doivent être soigneusement nettoyés et stérilisés avant chaque utilisation.



Stockage des échantillons

Les échantillons de biopsie sont généralement constitués de peau et de lard. L'échantillon complet peut être stocké tel quel immédiatement après avoir été prélevé, ou, de préférence et en fonction de l'analyse(s) à effectuer, il pourra être subdivisé en différentes aliquotes immédiatement après le prélèvement afin d'éviter plusieurs cycles de congélation/décongélation postérieurs (cf. section sur [La conservation des échantillons](#))



Données clés à collecter

Au minimum, les métadonnées mentionnées précédemment doivent être collectées pour chaque biopsie. Dans la mesure du possible, des informations supplémentaires doivent également être notées, notamment le matériel utilisé, la taille et la composition du groupe cible, le comportement et la réaction aux biopsies des individus cible et non cible, la distance par rapport à l'animal cible et le fait que l'échantillon ait été obtenu ou non, ainsi que toute autre information supplémentaire. Les informations sur les réactions au prélèvement (à la fois individuelles et collectives) devraient être aussi détaillées que possible et devraient être collectées indépendamment du fait que la tentative ait été réussie ou non. Dans la mesure du possible, les animaux échantillonnés devraient être photographiés pour être identifiés individuellement, afin (a) d'empêcher l'échantillonnage multiple d'un même individu à moins qu'il n'y ait de solides raisons scientifiques de le faire, (b) d'être en mesure d'intégrer les informations provenant des échantillons avec divers paramètres d'histoire de vie, démographiques et autres (p. ex., Ylitalo *et al.* 2001, Genov *et al.* 2019) et (c) de faciliter les études de suivi de la cicatrisation par photo-identification (Giménez *et al.* 2011). Dans la mesure du possible, les photographies doivent être prises au moment de l'impact ou juste après, pour que l'emplacement exact de la biopsie puisse être documentée et retrouvée sur des photographies ultérieures.



Formation du personnel

L'échantillonnage par biopsie doit être effectué uniquement par des personnes formées, expérimentées et habilitées (Gales *et al.* 2009), en possession de(s) permis nécessaires en vigueur (pour l'approche à distance réduite, les prélèvements et éventuellement le port d'arme) délivré(s) par les autorités compétentes (cf. section sur [Les permis nationaux](#)). Une expérience suffisante est nécessaire à la fois pour tirer avec l'arbalète ou le fusil et pour la conduite du bateau, car l'aptitude de la personne qui pilote est essentielle pour s'approcher correctement des animaux. Une formation de qualité joue un rôle fondamental dans la sécurité et la réussite des prélèvements par biopsies à distance. La formation des personnes inexpérimentées doit être supervisée par du personnel expérimenté et consiste généralement en une approche à plusieurs niveaux, avant d'essayer de prélever des échantillons sur des animaux vivants soi-même. Cela comprendra des exercices de tir sur des objets inanimés d'abord à terre puis en mer, ainsi que l'accompagnement en mer de personnes expérimentées effectuant des prélèvements de biopsies pour bénéficier de leur expérience de terrain. Une bonne communication à bord entre les différentes personnes responsables de tirer, piloter ou de faire des photographies sera la clé d'une biopsie réussie.

B) Les animaux morts/échoués

Un examen post-mortem complet est fortement recommandé dans la mesure du possible et en suivant le document conjoint de l'ACCOBAMS et l'ASCOBANS sur les Meilleures pratiques pour les examens post-mortem des cétacés et l'échantillonnage des tissus ([ACCOBAMS-MOP7/2019/Doc 33](#)). Des échantillons d'animaux échoués morts peuvent être collectés pour des études de génétiques et génomiques même sur des carcasses décomposées, ou des carcasses pour lesquelles un examen post-mortem complet n'est pas possible (p. ex., accès difficile, impossibilité de transport vers une installation spécialisée, manque d'équipement/personnel, etc.). Dans ces cas particuliers, de petits échantillons de peau (ou éventuellement de muscle) peuvent être prélevés à l'aide de matériel basique (gants, scalpel stérile, récipient stérile congelé à -20°C et/ou conservé dans de l'éthanol). De bons résultats d'extraction d'ADN ont également été obtenus à partir de peau desséchée provenant de carcasses en décomposition avancée ou d'échantillons séchés sous étuve (Fontaine *et al.* 2007, 2014). En effet, la décomposition bactérienne tend à être plus lente dans les tissus séchés. Ces échantillons peuvent ensuite être conservés congelés à -20°C ou dans de l'éthanol à 70%. En outre, des échantillons de fanons, de dents et d'os peuvent être prélevés en suivant les protocoles appliqués aux spécimens de musée (cf. section sur [Les spécimens de musée](#)). Pour plus d'informations sur la meilleure façon de conserver les échantillons d'échouage à des fins génétiques, voir la section sur [La conservation des échantillons](#).

Comme détaillé ci-dessus, l'échantillonnage de base des tissus de la peau/des muscles et du lard sur les animaux échoués peut servir plusieurs objectifs de recherche et devrait être encouragé chaque fois que cela est possible.

Lorsqu'un examen post-mortem plus détaillé peut être réalisé sur des animaux frais, les procédures détaillées dans les Meilleures pratiques de l'ACCOBAMS doivent être suivies ([ACCOBAMS-MOP7/2019/Doc 33](#)).

C) L'ADN environnemental

L'ADN environnemental (ADNe, ou eDNA en anglais), l'ADN pouvant être extrait à partir d'échantillons environnementaux (eau, sol, fèces), est une approche intéressante pour caractériser et surveiller la diversité du milieu marin. L'un des principaux avantages de cette méthode non invasive

est la possibilité d'utiliser des traces d'ADN pour étudier les organismes marins, ce qui réduit l'impact potentiel de l'échantillonnage direct d'organismes sensibles et augmente la capacité de détection précoce et de surveillance des espèces rares ou invasives (Goldberg *et al.* 2016). Les progrès en matière d'échantillonnage, de génération de données au moyen des technologies de séquençage et d'analyse des données sont à l'origine du succès des études de surveillance basées sur l'ADN environnemental, comme le montre l'augmentation exponentielle du nombre de publications sur le sujet. Cependant, dans toute étude, il est essentiel de prendre en compte au moins les trois principaux processus qui affectent la détection et la caractérisation correcte de l'ADNe: (1) la production d'ADNe en fonction de la taille, de l'état de santé, du sexe et de la densité des organismes étudiés ; (2) les effets du transport, des taux de diffusion et des courants sur l'ADNe dans l'eau ; et (3) la dégradation de l'ADNe, qui affecte la persistance et la quantité d'ADN présente dans l'environnement, principalement causée par la température, le pH et la lumière (Goldberg *et al.* 2015). Par conséquent, il est essentiel de concevoir une stratégie d'échantillonnage adéquate pour reproduire une image représentative de la communauté étudiée et minimiser les probabilités de contamination. Le protocole devra inclure le prélèvement de contrôles négatifs sur le terrain, la décontamination du matériel de prélèvement avant chaque utilisation (p. ex., grâce à une solution commerciale d'eau de Javel à 10 %) et un stock suffisant de matériel à usage unique pour la collecte de l'ADNe. Si le matériel doit être utilisé plus d'une fois, il devra être nettoyé à l'eau de Javel et soigneusement rincé avant chaque utilisation (Goldberg *et al.* 2016).

Dans la zone ACCOBAMS, les études d'ADNe appliquées aux cétacés en sont à leurs débuts, seules quelques études ont exploré le potentiel de cette méthodologie à ce jour (p. ex., Valsecchi *et al.* 2021, 2020). Cependant, les recherches menées ailleurs peuvent fournir des exemples utiles pour la collecte et le traitement des échantillons. En général, pour étudier l'ADNe la procédure opérationnelle comprendra : (1) la collecte d'échantillons environnementaux, (2) le traitement et la conservation des échantillons et l'extraction de l'ADN, suivis par (3) la préparation de la bibliothèque de séquençage de l'ADNe, le séquençage à haut débit et l'analyse des données de séquençage.

Il existe diverses méthodes de collecte d'échantillons d'eau. Par exemple, Valsecchi *et al.* (2021) ont utilisé des ferries comme plateforme opportuniste, en collectant des échantillons d'eau dans la salle des machines du ferry via un tuyau de dérivation interceptant l'eau de mer du circuit de refroidissement en amont du moteur. Il est également possible de collecter de l'eau dans des bouteilles Niskin ou Nansen déployées à différentes profondeurs pour analyser la stratification verticale (Closek *et al.* 2019). D'autres études ont utilisé des pompes à eau pendant ou après l'observation de cétacés (Parsons *et al.* 2018, Székely *et al.* 2021). Les études existantes rapportent différents nombre de répétitions (de 2 à 5) et volume d'eau collecté (de 1 à 4 litres par échantillon) (Hunter *et al.* 2018, Juhel *et al.* 2021, Ma *et al.* 2016, Parsons *et al.* 2018).

Il est recommandé de filtrer les échantillons d'eau dès que possible après leur collecte afin de maximiser la rétention de l'ADNe et de prévenir la dégradation de l'ADN. Toutefois, si cela n'est pas possible, certaines études ont déterminé qu'un délai de 1 à 2 semaines entre la collecte et la filtration est acceptable, sous condition de conserver l'échantillon d'eau au froid et à l'abri de la lumière, une option adéquate pouvant être l'utilisation de récipients stériles en plastique laminé (cf. Figure 3 pour une procédure opérationnelle standard). Il convient d'être particulièrement vigilant, car l'ADN contenu dans les échantillons d'eau se dégrade facilement et risquerait de ne plus être détectable. En outre, un effort particulier est requis afin d'éviter toute contamination croisée, car cela affecterait grandement le processus et la validité des résultats et des conclusions obtenus (Goldberg *et al.* 2016). Il existe différentes méthodes de filtration qui peuvent être réalisées directement sur le lieu de collecte des échantillons ou postérieurement dans une station de filtration. L'ADNe peut être efficacement collecté grâce à des filtres à membrane en nitrate de cellulose, fibre de verre, polycarbonate, nylon, polyéthersulfone (PES) ou acétate de cellulose (Djurhuus *et al.* 2017, Goldberg *et al.* 2016, Spens *et al.* 2017).

BOX 1. Standard Operational Procedure (SOP) for Commercial Vessel Transect eDNA Sampling.

- **(1) VOLUME OF SAMPLED WATER.** It would be good practice to filter large volumes of marine waters (up to membrane saturation), in order to retain as much eDNA as possible. Such a volume is however variable, depending on filter characteristics and on water density (e.g., day-time samples saturate the filters quickly, being rich in phytoplankton). According to our experience, from his study and in the analysis carried out in controlled environment (Valsecchi *et al.* 2020), we suggest the processing of **4–5 litres of marine water per filter.**

- **(2) FILTER POROSITY.** We did not find any significant difference between the three tested NC (nitrocellulose) filter types with porosity 0.22, 0.45, 0.8 μm . However, we suggest to exclude the 0.22 μm pore-size membrane, as filtration is very slow, and saturation is reached after 2–3 litres, without providing a better quantity/quality eDNA. Between the two remaining filter types, we recommend the use of **0.45 μm pore-size membranes,** in order to retain the smallest biological particles, consistent with findings by Li *et al.* (2018).

- **(3) NUMBER OF REPLICATES** sample replicates are necessary for both a) increase the total amount of eDNA retrieved from each single sampling station (useful for future analyses) and b) to reduce the false positive and negative rate inbuilt in the metabarcoding technique (Ficetola *et al.*, 2015). Thus, a **minimum of three replicas per station** is advisable (meaning a total of 12–13 litres collected from each sampling station).

- **(4) SAMPLE CONTAINER.** The **Bag in the Box Sampling System (BiBSS)** presents many advantages for the collection/preservation/storage of marine water samples for eDNA surveys (see **Box 2**).

- **(5) SAMPLING STATION DESIGN.** The selection of the geographic positions to locate fixed sampling stations (FSS) invariable over cruises, should aim to: (1) **sample**

- spots of biological interest** based on previous observational/literature data; (2) **prioritize points on bathymetric maps indicating habitat changes** (e.g., edge of continental shelf); (3) **select roughly equidistant sampling sites** (about 35–45 nautical miles apart) along the designated shipping lanes, to cover the whole route and (contingent on vessel schedule) allow the FSSs to be sampled during both day and night time. For the same reason, in order to sample adjacent points at different time of the day, it is recommendable to number the stations following the sampling chronological order, meaning that on the map they will not appear in a consecutive order. For example, if six fix sampling stations are selected, and three will be sampled on the outward journey and three on the return journey, the order along the route, on the map, will be: PortA-FSS6- FSS 1-FSS 5-FSS 2-FSS 4-FSS 3-PortB, with the three underscored sampling stations surveyed in the return journey.

- **(6) TIME BEFORE FILTRATION.** Preferably the water contained in the BiB bags should be filtered **immediately after collection** to maximise eDNA retention, and to simplify sample transportation, by avoiding transfer of bulky water samples. However, if this is not possible, sample storage times of 1–2 weeks between collection and filtering is well tolerated, provided that the BiBs are kept at 4 degrees and away from exposure to the sun during transport. It is important to note that water samples should never be frozen to avoid breaking of cellular components that would result in the release of extracellular DNA which is more easily lost in filtration.

- **(7) TIME BEFORE EXTRACTION.** After filtration **filters should be frozen a.s.a.p.** The time before extraction does not seem to have a negative effect within the tested time interval, although it is advisable to perform DNA extraction a.s.a.p. after filtration.

- **(8) IMPORTANCE TO COMBINE MOLECULAR TO VISUAL/TAXONOMIC CENSUS.** eDNA methods do not have perfect taxon detection and resolution. Therefore it is important to incorporate visual observations to monitor detection efficacy and support the molecular identification of new species (followed by the sequencing of their mitogenome in order to fill reference sequences gaps in molecular databases).

Figure 3. Procédure opérationnelle standard (Valsecchi et al. 2021, reproduction autorisée)

D) L'échantillonnage par écouvillonnage

Une autre méthode d'échantillonnage alternative qui ne nécessite pas de perforer la peau est l'écouvillonnage de la peau (Harlin *et al.* 1999, Gales *et al.* 2002). Cette procédure n'est possible que pour les espèces de cétacés qui ont tendance à s'approcher des bateaux (Farro *et al.* 2008), généralement les delphinidés. Un élément important à prendre en compte lors de la décision d'utiliser cette méthode est que la quantité de peau collectée peut être trop faible pour certaines analyses.

Cette méthode consiste à attacher un petit tampon à récurer en fibres synthétiques à l'extrémité de longues tiges (Harlin *et al.* 1999). Les échantillons sont collectés en frottant le tampon contre le flanc d'un dauphin qui s'approche du bateau (en général à l'étrave) afin de prélever et de retenir les cellules épidermiques exfoliées. Parfois, bien que l'échantillon ne soit pas visible sur le tampon, il est présent et les analyses génétiques peuvent être réalisées. En laboratoire, la peau sera séparée du tampon et l'ADN sera extrait selon un protocole standard similaire à celui des biopsies de peau.

Il est essentiel de pouvoir reconnaître les individus ayant déjà fait l'objet d'un échantillonnage, afin d'éviter les doublons.

Certains individus réagissent au contact du tampon à récurer (Harlin *et al.* 1999). Dans ces cas-là, ils augmentent leur vitesse de nage, sautent ou plongent après avoir été touchés mais, en général, ils reviennent à l'étrave relativement rapidement. Cela suggère que la procédure d'échantillonnage par écouvillonnage de la peau ne cause généralement des perturbations qu'à très court terme.

E) Les fèces

Une autre méthode non invasive à envisager est la collecte et l'analyse d'échantillons de matières fécales de cétacés. Cependant, la consistance des fèces de cétacés varie considérablement, allant de dépôts flottants mous et bien formés à des panaches plus fluides et dispersés (p. ex., Hermosilla *et al.* 2015, 2018). Les échantillons de fèces ne peuvent être collectés à la surface de l'eau que pendant un temps limité, avant qu'ils ne coulent. Dans les quelques secondes (ou minutes) qui suivent la défécation des animaux, les échantillons remontent à la surface et flottent et peuvent alors être collectés manuellement à l'aide d'un filet à mailles fines en nylon. Pour les fèces plus fluides, d'autres récipients tels que des sacs en plastique ou des seaux peuvent être utilisés pour le prélèvement, en fonction de la consistance de l'échantillon. Les échantillons collectés peuvent être conservés séparément dans des flacons en plastique, tels que des tubes Falcon ou de grands tubes eppendorfs, ou directement dans des contenants en plastique. Après le prélèvement, les échantillons doivent être congelés à -20°C ou fixés dans de l'éthanol à 70 ou 96% (pour plus d'informations, voir la section sur [La conservation des échantillons](#)).

F) Les spécimens de musée

La collecte d'échantillons dans des collections des musées permet également d'effectuer des recherches sur l'ADN (Nakahama, 2021). Il est essentiel d'éviter la contamination, la dégradation thermique (traitement à la chaleur, à l'ébullition ou à la vapeur chaude), l'utilisation de réactifs pouvant endommager l'ADN (p. ex., détergents, vapeur de benzène, etc.), et de faire attention aux procédures de rinçage et de lavage et aux conditions de stockage. Il est préférable de collecter et de conserver les échantillons de tissus durs non lavés (si possible), dans un endroit sec, frais (sauf s'ils sont congelés) et bien isolé. Les traitements thermiques ne sont pas souhaitables.

Parmi les échantillons d'os et de dents, les structures les plus denses sont préférables (p. ex., les dents, la bulle tympanique, l'os pétreux). Toutefois, la masse de l'échantillon est également importante et peut

être cruciale, c'est pourquoi les gros os (p. ex., les vertèbres entières) et les fanons doivent également être prélevés. Les échantillons de peau sèche peuvent être intéressants, mais ils sont souvent sujets à de la contamination microbienne. En outre, toutes sortes de préparations à base d'éthanol pur peuvent convenir à l'échantillonnage. D'autres solutions liquides et les échantillons imprégnés en paraffine peuvent être envisagés dans certaines conditions (plus de détails dans Straube *et al.* 2021).

Le prélèvement d'échantillons sur des spécimens d'os, de dents et de fanons est un échantillonnage destructif et doit être effectué en limitant au maximum les dommages sur les spécimens, en particulier ceux qui ont une importance historique (Freedman *et al.* 2018). Pour choisir la structure à échantillonner, il faut effectuer un examen externe du spécimen, et parfois un examen par tomographie (aussi appelé TDM ou CT-Scan). Avant de décider d'entreprendre un échantillonnage destructif, il est recommandé de réaliser des photographies, une photogrammétrie, un scan de surface en 3D et/ou une tomographie du spécimen. Pour extraire la poudre d'os, il est préférable de percer de petits trous à faible vitesse afin d'éviter tout dommage externe et l'échauffement de l'échantillon. Si elles existent, on choisira en priorité les zones où le spécimen déjà subi des dommages antérieurs, par exemple au cours de la collecte (McDonough *et al.* 2018). La masse minimale de la poudre d'os dépendra de l'âge et de la conservation du spécimen.

G) L'ADN ancien

Fulton et Shapiro (2019) ont rassemblé des recommandations pour la création d'un laboratoire d'ADN ancien (ADNa) pour l'extraction d'ADN de spécimens datant de plusieurs milliers d'années (potentiellement jusqu'à 100 000 ou 1 000 000 ans). En effet, les limites de la survie de l'ADN, la dégradation post mortem et la contamination posent un défi accru aux praticiens des laboratoires.

Par exemple, Fulton et Shapiro (2019) déclarent que :

"La complication majeure de la recherche sur l'ADNa découle de la faible proportion de copies survivantes de l'ADN endogène dans un extrait, par rapport à la nature omniprésente de l'ADN dans l'environnement. La grande sensibilité de la PCR permet de procéder à l'amplification à partir d'une seule ou de quelques copies de départ de la séquence cible, mais elle permet aussi souvent d'amplifier de l'ADN non désiré. Même lorsque le niveau de contamination est extrêmement faible, la PCR amplifie plus facilement l'ADN moderne par rapport aux molécules anciennes endommagées. Les copies du fragment ciblé peuvent contenir des lésions bloquantes, par exemple, qui affectent le processus de réplication de la polymérase, ou peuvent simplement être présentes en faible abondance, de sorte que la PCR n'entre dans la phase exponentielle que de nombreux cycles après le début de la réaction. Si seules quelques molécules contaminantes sont présentes et amplifiées au cours des premiers cycles de la PCR, elles seront rapidement plus nombreuses (et l'emporteront sur l'amplification de l'ADN ancien authentique).

La contamination peut se produire à tous les stades du traitement d'un échantillon d'ADNa. L'échantillon lui-même peut être contaminé. Par exemple, les os et les dents sont poreux et la contamination peut se produire par l'adhésion ou l'absorption d'ADN exogène provenant de micro-organismes présents dans l'environnement de dépôt. La contamination peut également se produire lors de la collecte ; c'est particulièrement problématique pour les études d'ADN d'origine humaine ou microbienne, lorsque la source de contamination est génétiquement similaire à l'ADN cible. La contamination peut également être introduite au cours des processus expérimentaux en aval, notamment l'extraction de l'ADN, la préparation de la bibliothèque de séquençage ou la préparation de la PCR. Le personnel peut introduire dans le laboratoire son propre ADN ou tout autre ADN transporté, sur des chaussures ou des vêtements par exemple, les réactifs peuvent être contaminés par de l'ADN humain ou animal, et des particules en suspension dans l'air peuvent pénétrer par le biais de systèmes de ventilation du bâtiment. L'ADN précédemment amplifié encore présent dans l'environnement du laboratoire est une autre source potentielle de contamination. Même la minuscule quantité d'ADN qui est aérosolisée à l'ouverture

d'un eppendorf est susceptible de contenir plus d'un million de copies dans un volume aussi petit que 0,005 µl. Cela représente potentiellement des milliers de fois le nombre de copies d'ADN conservées dans un échantillon ancien. Pour éviter ce problème, il est essentiel de maintenir une séparation stricte entre le laboratoire dans lequel les échantillons anciens sont préparés et tous les laboratoires où les échantillons sont traités après amplification."

Lignes directrices pour la recherche sur l'ADN ancien (Fulton et Shapiro 2019) :

1. Isolement physique du laboratoire pré-PCR d'ADN ancien et maintien strict d'un mouvement "à sens unique" suivant le gradient de concentration.
2. Contrôles négatifs durant l'extraction et la PCR.
3. Choix moléculaire approprié (majorité de fragments d'ADN courts).
4. Reproductibilité (multiples répétitions du processus d'extraction et de séquençage).
5. Clonage (sauvegarde).
6. Réplication indépendante.
7. Conservation biochimique.
8. Quantification du matériel de départ.
9. ADN provenant de restes associés (en particulier pour la recherche microbienne).
10. Utilisation d'un "ADN porteur" négatif dans les essais basés sur la PCR.
11. Modèle de dommages de l'ADN et diversité des séquences en fonction du temps ou de la conservation.
12. Évaluation critique des résultats (sens phylogénétique ou autres résultats raisonnables).

H) Autres techniques – les squames

Il est également possible d'obtenir des échantillons d'ADN de cétacés en liberté par la collecte de squames ou fragments de peaux mortes. Cette méthode consiste en la collecte de squames flottant dans le sillage des cétacés soit à l'aide d'une épuisette à partir d'une embarcation, soit en plongeant en apnée. Les squames sont ensuite retirés de l'épuisette à l'aide de pinces stériles en acier inoxydable et conservés dans du DMSO ou de l'éthanol. L'avantage de cette méthode non invasive est que le matériel d'échantillonnage requis est minime et que peu de compétences ou de formation sont nécessaires.

L'inconvénient de cette méthode est que les squames coulent rapidement, ce qui laisse peu de temps pour collecter l'échantillon. L'origine de l'échantillon peut donc généralement être attribuée à des individus se trouvant à proximité immédiate du site de collecte. Cependant, il est difficile d'attribuer un fragment de peau morte à l'individu effectivement échantillonné lorsque plusieurs individus se trouvent à proximité immédiate ou ont été en contact physique les uns avec les autres récemment (Whitehead *et al.* 1990). C'est la raison pour laquelle les échantillons de squames ne peuvent pas toujours être attribués à un individu donné, ce qui pose problème pour de nombreuses applications. L'ADN de squame est souvent dégradé et sa qualité et sa quantité sont très variables (Amos *et al.* 1992). Par exemple, pour extraire l'ADN d'un cachalot, il faut 40 mg de squames (Drouot *et al.* 2004). De plus, le nombre d'échantillons dupliqués peut être élevé, ce qui augmente le temps et le coût des analyses génétiques. La fréquence et les conditions d'occurrence des squames varient considérablement selon les espèces et les individus, et selon les zones d'étude. La méthode de collecte des squames est utilisée pour les grands cétacés, notamment les cachalots (Amos *et al.* 1992), les baleines à bosse (Valsecchi *et al.* 1998) et les rorquals communs. La plupart des échantillons de squames ont été analysés avec succès, confirmant que les échantillons contiennent suffisamment d'ADN pour effectuer des analyses génétiques (p. ex., Hoelzel et Donovan 1991, Neveceralova *et al.* 2022). Les squames sont plus efficaces pour déterminer le sexe que pour étudier la structure de la population. Cependant, la collecte de squames peut constituer une alternative viable pour certaines études où l'échantillonnage par biopsie n'est pas autorisé ou considéré comme indésirable. Cette méthode est également plus appropriée que l'échantillonnage direct pour les plateformes d'opportunité (p. ex., pour les bateaux de whale watching).

04) Conserver les échantillons



A) Recommandations générales

Les méthodes de conservation des échantillons influencent grandement la qualité et la quantité du matériel génétique disponible pour l'analyse. Leur objectif est de limiter la dégradation de l'ADN et de l'ARN, afin de minimiser les erreurs en aval et de maximiser la valeur scientifique des échantillons biologiques. Pour garantir une dégradation minimale des échantillons, ceux-ci doivent être conservés dans des milieux adéquats dès leur collecte sur le terrain.

La méthode de conservation des échantillons la plus appropriée dépend d'un certain nombre de facteurs liés à la conception de l'étude, à la logistique, à la disponibilité et au budget. La « norme d'excellence » pour la conservation des échantillons n'est pas toujours réalisable ni souhaitable compte tenu de certaines contraintes, et il peut être nécessaire de faire des compromis. Par exemple, toutes les approches de génotypage ne nécessitent pas un ADN de très haute qualité et peuvent donner de bons résultats à partir d'échantillons partiellement dégradés. Van Cise et ses collègues (2022) ont passé en revue les meilleures pratiques de conservation des échantillons biologiques de mammifères marins en relation avec les différentes technologies 'omiques' (p. ex., génomique, métagénomique, metabarcoding, transcriptomique). Le tableau 2 présente une comparaison des méthodes de conservation en fonction du type d'échantillon biologique et des analyses possibles.

Tableau 2. Comparaison des conservateurs et fixateurs habituellement utilisés pour la conservation d'échantillons biologiques pour les méthodes d'analyses 'omiques (et autres) (Van Cise et al. 2022, reproduction autorisée).

Biospecimen Type and Storage Methods																				
	SKIN/BLUBBER/ORGANS					FECES/GASTROINTESTINAL CONTENT					BLOW/CHUFF				BIOFLUIDS (E.G. BLOOD)					
	DMSO/5M NaCl (<-20°C)	-20°C	RNAlater (-20°C or -80°C)	Organic solvent (e.g. 95% EtOH, -20°C)	LN2 or -80°C	20% DMSO/5M NaCl (<-20°C)	-20°C (dry)	RNAlater (-20°C or -80°C)	95% EtOH (-20°C)	LN2 or -80°C	20% DMSO/5M NaCl (<-20°C)	-20°C	RNAlater (-20°C or -80°C)	95% EtOH (-20°C)	LN2 or -80°C	20% DMSO/5M NaCl (<-20°C)	-20°C	RNAlater (-20°C or -80°C)	EDTA vacutainer	LN2 or -80°C
Genetics*	1	2	1	2	3	2	2	2	2	3	1	2	2	2	3	-	2	1	1	3
Genomics**	1	2	1	1	3	0	1	2	1	3	-	2	?	1	3	-	2	1	1	3
Microbiomics***	0	2	1	1	3	0	1	2	1	3	0	1	2	1	3	-	1	2	1	3
Transcriptomics	0	0	2	0	3	0	0	2	0	3	0	0	2	0	3	-	0	2	-	3
Proteomics	0	0	?	0	3	0	0	?	0	3	0	0	?	0	3	-	0	?	-	3
Metabolomics	0	1	0	0	3	0	1	0	0	3	0	1	0	0	3	-	1	0	2	3
Epigenetics	1	2	?	2	3	-	-	-	-	-	?	?	?	?	?	-	2	?	1	3
Stable Isotopes	1	1	0	0	3	?	1	0	0	3	?	1	-	-	3	-	1	-	-	3
POPs	0	1	0	0	3	0	1	0	1	3	?	?	?	?	?	-	1	0	-	3
Steroid Hormones	0	1	0	0	3	0	1	0	0	3	0	1	0	0	3	-	1	0	?	3
Microplastics	?	3	?	2	3	?	3	?	2	3	?	3	?	2	3	-	3	?	-	3

Key: - analysis inappropriate for this tissue type; 0 unsuitable; 1 good; 2 better; 3 best; ? unknown

* Sanger sequencing, multilocus genotyping, genetic sex

**2nd generation sequencing

***amplicon sequencing, metagenomics

La meilleure option de conservation consiste à stocker les échantillons biologiques dès leur collecte dans un récipient à sec portable contenant de l'azote liquide, jusqu'à ce qu'ils puissent être transférés vers un lieu de stockage à long terme à une température égale ou inférieure à -80°C . Ce type de cryoconservation arrête tous les processus chimiques et biologiques de dégradation, notamment en inactivant les enzymes telles que les DNases, les RNases ou les protéinases. Si la surgélation dans l'azote liquide n'est pas possible, une deuxième option consiste à conserver les échantillons sur de la glace ou dans un congélateur à -20°C jusqu'à ce qu'ils puissent être transférés vers un lieu de stockage à long terme. Enfin, le stockage dans des conservateurs liquides, notamment de l'éthanol de qualité de laboratoire, des solutions de DMSO ou du RNAlater, peut constituer une méthode alternative sans congélation immédiate pour certains types d'études. Cependant, lors de l'utilisation de conservateurs liquides, il est important de prendre en compte les effets potentiels en aval de ces produits chimiques sur les analyses ultérieures, comme détaillé dans Van Cise *et al.* (2022).

Les recommandations supplémentaires de Van Cise *et al.* (2022) comprennent :

- Les conditions idéales pour le stockage à long terme des échantillons biologiques sont au sec et ultra-froides (-80°C ou moins).
- En général, les molécules extraites (p. ex., l'ADN, l'ARN, les protéines) stockées dans un tampon spécifique à cette molécule à -80°C sont stables pendant de plus longues périodes que celles stockées dans les tissus.
- Les conservateurs d'ARN/ADN à haute teneur en sel ne pénètrent pas dans les tissus congelés, à moins d'être spécifiquement formulés pour les tissus congelés.
- L'effet déshydratant de l'éthanol peut entraîner la libération de l'eau contenue dans l'échantillon de tissu, diluant ainsi le conservateur ; il est donc recommandé de le remplacer par de l'éthanol frais un à deux jours après la conservation initiale.
- La qualité de l'ADN est inversement corrélée au nombre de fois qu'un échantillon est décongelé ; il est donc essentiel de limiter le nombre de fois qu'un échantillon est décongelé après le prélèvement, par exemple en divisant l'échantillon en petites aliquotes.
- En ce qui concerne le rapport entre l'échantillon et le conservateur, la conservation de l'échantillon doit permettre un volume d'au moins cinq fois celui du fixateur pour le tissu.



L'ADN environnemental

En ce qui concerne l'ADN environnemental, la méthode la plus courante pour conserver les échantillons est sous la forme d'ADNe sur des filtres. Après la filtration à travers une membrane poreuse, l'ADNe concentré sur le filtre peut être conservé soit congelé, soit stocké dans un liquide de conservation ou séché à l'aide de billes de silice (Kumar *et al.* 2019). La filtration immédiate in situ présente l'avantage que les échantillons peuvent être immédiatement stockés dans un milieu de conservation approprié. Sous cette forme, l'ADNe conservé sur filtres peut être suffisamment stable pendant des mois voire des années (Kumar *et al.* 2019).



Les échantillons de matières fécales

Les échantillons de matières fécales sont mieux conservés en les stockant à -80°C , mais -20°C peut être envisagé comme une option alternative. De plus, les échantillons peuvent également être fixés dans de l'éthanol de 70 à 96 %.

○ Le papier filtre

Le papier FTA® est un produit commercial (Whatman®) composé de papier filtre imprégné d'un mélange de produits chimiques exclusif qui permet de lyser les cellules, d'empêcher la croissance bactérienne et de protéger l'ADN de l'échantillon. Le principe de base de la purification de l'ADN à l'aide du papier FTA® est simple : les échantillons biologiques sont appliqués sur le papier FTA® et séchés à l'air. Un petit disque de papier FTA® est ensuite prélevé et lavé pour éliminer tout matériau à part l'ADN (l'ADN reste piégé dans le papier). L'analyse peut ensuite être effectuée sur l'ADN encore attaché au papier, ou l'ADN peut être élué avant utilisation. Le sang, les caillots de sang et les tissus ont pu être échantillonnés avec succès par cette méthode (Smith & Burgoyne, 2004). La stabilité à long terme de l'ADN après avoir été élué du papier FTA® n'a pas encore été étudiée, c'est pourquoi il est préférable de traiter les échantillons uniquement au moment nécessaire.

B) Le stockage à long terme

Pour maximiser la disponibilité des tissus et des extraits d'ADN pour les études futures, il est recommandé de créer et de conserver des échantillons dans une banque de tissus. La création d'une banque de tissus standardisée pour chaque réseau facilite l'identification et la récupération des échantillons, et peut simplifier l'accréditation CITES pour faciliter les échanges d'échantillons entre les réseaux. L'archivage standardisé d'échantillons est essentiel pour les espèces rares, car il pourra falloir plusieurs années pour constituer un nombre d'échantillons suffisant pour produire des conclusions statistiquement robustes. L'accès à une gamme d'échantillons provenant de plusieurs individus et espèces stockés au même endroit facilite grandement les études à long terme de pathologie, écologie et de dynamique des populations ([ACCOBAMS-MOP7/2019/Doc 33](#)).

Une fois que toutes les analyses diagnostiques et autres analyses de routine ont été effectuées, les échantillons devront être stockés pour une conservation longue durée. Il est nécessaire de bien étiqueter les échantillons avec des informations détaillées sur la collecte/le terrain et les permis de collecte/exportation. Si nécessaire, les échantillons seront doublement identifiés avec des étiquettes de longue durée. L'étiquette devra contenir un numéro unique ou un identifiant qui facilite la recherche des métadonnées pertinentes de l'échantillon, par exemple dans la base de données de la banque de tissus. Idéalement, une base de données à jour devrait être disponible en ligne, contenant des informations sur l'animal et les tissus disponibles.

Les échantillons de référence consistent en des échantillons bien caractérisés pour lesquels une conservation longue durée et une traçabilité sont nécessaires avec un nombre d'accès réduit (maximum 3/4 fois par an). Pour ces échantillons, des flacons spécifiques pré-marqués et étiquetés pourront être utilisés, ce qui permettra une traçabilité appropriée grâce à un système de numérisation dédié et à un logiciel gérant les informations pertinentes. La conservation doit se faire à -80 °C pour les échantillons congelés. Ces échantillons devraient être considérés comme des références pour des recherches futures comme témoin, échantillon négatif ou positif, ou ayant des valeurs très rares, ou à partir desquels il est possible d'obtenir des cultures cellulaires.

Pour les petits échantillons (y compris les biopsies et les écouvillons), un protocole devrait être développé pour s'assurer que l'échantillon entier n'est pas consommé dans une seule analyse et qu'il est toujours disponible pour des analyses futures (et potentiellement plus puissantes).

⁸ <http://www.whatman.co.uk/>

C) Le stockage dans les banques de tissus

La Banque de Tissus des Mammifères Marins de la Méditerranée⁹

Cette banque collecte et préserve du matériel biologique collecté sur des mammifères marins échoués le long des côtes italiennes de la mer Méditerranée, en collaboration avec l'Université de Padoue, le Ministère italien de l'Environnement, les Instituts de Santé Animale et plusieurs autres organisations italiennes à but non lucratif dédiées à la recherche sur les mammifères marins. Elle fait partie du circuit de la Banque Internationale d'Échantillons Environnementaux ([IEBS](#)¹⁰) et dispose d'un permis CITES permanent pour l'échange d'échantillons (ITO20).

La Banque de Tissus des Mammifères Marins de la Méditerranée collecte, catalogue, conserve et distribue des tissus gratuitement, sur demande justifiée.

La Banque propose également d'autres services, notamment : - pathologie diagnostique - autopsie de spécimens complets - détermination de l'âge - identification des parasites - histochimie et immunohistochimie - dosage des hormones dans le sang, l'urine et les fèces - informations générales et littérature spécialisée sur les mammifères marins.

La Banque Nationale Ukrainienne d'Échantillons de Cétacés

Cette banque a été créée en 2019 à Kiev et est la première institution de stockage d'échantillons de mammifères marins dans le bassin de la mer Noire. Le principal lieu de stockage, établi à l'Institut de Zoologie Schmalhausen de l'Académie Nationale des Sciences d'Ukraine, comprend un congélateur de 750 litres (-80 °C) ainsi qu'un congélateur supplémentaire à -20 °C, ainsi que des espaces de stockage pour les matériaux secs et humides. Des guides de bonnes pratiques pour l'acquisition, le stockage et l'échange d'échantillons ont été développés et mis en place, et un contact avec la Banque de Tissus des Mammifères Marins de la Méditerranée existante a été établi. Un accord a été signé pour le transfert d'échantillons provenant d'autres institutions ukrainiennes (UkrSCES). Actuellement, des échantillons de cétacés de la mer Noire et des collections historiques provenant d'autres régions sont stockés dans cette banque d'échantillons.

Le réseau national échouage (RNE) français

Il s'agit d'un programme scientifique structuré et participatif créé en 1970 chargé de la surveillance des mammifères marins échoués le long des côtes françaises. Pour chaque échouage, des données et des échantillons sont prélevés selon des protocoles standardisés basés sur le document conjoint de l'ACCOBAMS et l'ASCOBANS sur les Meilleures pratiques pour les examens post-mortem des cétacés et l'échantillonnage des tissus ([ACCOBAMS-MOP7/2019/Doc 33](#)). Les échantillons sont ensuite conditionnés et conservés en fonction des analyses qui seront effectuées ultérieurement (p. ex., congelés, dans du formol, de l'éthanol).

La coordination scientifique du RNE revient à l'Observatoire Pelagis¹¹, placé sous la supervision du Ministère français de l'Écologie. Les membres du RNE reçoivent une formation scientifique sur le protocole standard de collecte de données et un cadre juridique (la « carte verte », c.-à-d. une autorisation de collecte et de transport d'échantillons). La gouvernance du RNE est assurée par un comité de pilotage composé d'environ 20 membres représentant la diversité des parties prenantes du RNE. Le rôle de ce comité est d'évaluer et de valider les protocoles, les demandes d'utilisation d'échantillons et les nouvelles demandes d'autorisation de collecte d'échantillons.

⁹ The Mediterranean Marine Mammal Tissue Bank <http://www.marinemammals.eu/index.php>

¹⁰ The International Environmental Specimen Bank <https://www.umweltbundesamt.de/en/topics/chemicals/international-environmental-specimen-bank-group>

¹¹ Observatoire Pelagis <https://www.observatoire-pelagis.cnrs.fr/>

05) Échanger des échantillons

A) Accord ou mémorandum d'entente

Avant d'échanger des échantillons, il sera très utile de rédiger un protocole d'accord ou mémorandum d'entente qui abordera différents aspects de la collaboration entre chercheurs et/ou institutions. L'accord peut prendre la forme d'un document contractuel signé par les parties concernées (ce document peut également être utile à fournir au Point Focal National ABS pour obtenir un consentement préalable éclairé en vertu du *Protocole de Nagoya*, voir la section sur [le Protocole de Nagoya](#)). Alternativement, ces points de discussion peuvent également être abordés de manière moins formelle par e-mail.

Les éléments qui doivent être pris en compte comprennent :

- **Propriété des échantillons** : l'organisme expéditeur conserve-t-il la propriété et le cas échéant le matériel non utilisé sera-t-il restitué à l'expéditeur ou stocké par le receveur après l'utilisation initiale ?
- Quelles métadonnées sont nécessaires à l'analyse ?
- **Utilisation des échantillons** : dans quelle(s) étude(s) les échantillons fournis seront-ils utilisés ?
- **Co-autorat dans les publications scientifiques** : les organismes fournisseurs des échantillons seront-ils inclus en tant que coauteurs dans tous les rapports et documents scientifiques incluant leurs échantillons (et concrètement quelles personnes seront coauteurs parmi les fournisseurs d'échantillons) ?
- **Documentation** : qui demandera les permis CITES/Nagoya pertinents et informera les Points Focaux Nationaux/SC de l'ACCOBAMS de l'échange ?
- **Coûts d'envoi des échantillons/permis** : qui couvrira les coûts des permis/échanges/laboratoire associés à l'échange d'échantillons ?
- **Retour d'informations sur les résultats** : quel type de données/informations sera renvoyé au fournisseur d'échantillons ?
- **Confidentialité**
- **Calendrier prévu** : quand le fournisseur d'échantillons peut-il s'attendre à recevoir des résultats exploitables ?

Un exemple d'accord de transfert d'échantillons biologiques est présenté en [Annexe 4](#). Ce document n'est pas censé être un modèle universel, mais plutôt une base pouvant être adaptée à chaque collaboration spécifique si nécessaire.

B) Les procédures CITES

La Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction (CITES) régleme l'échange d'échantillons biologiques entre ses pays membres. Nous considérons ici l'échange d'échantillons de cétacés à des fins scientifiques et non commerciales, y compris les tissus prélevés sur des cétacés en liberté (biopsies de peau et de lard, souffle, squames, etc.), les parties du corps de cétacés échoués (tissus et squelettes) ou les produits d'extraction de l'ADN.

Toutes les espèces de cétacés observées régulièrement dans la zone ACCOBAMS appartiennent à l'Annexe I ou II de la CITES (et à l'Annexe A dans la législation de l'UE). Selon la CITES, en règle générale :

- L'Annexe I (ou UE-A) contient des espèces menacées d'extinction pour lesquelles la CITES interdit le commerce international sauf à des fins non commerciales, y compris des fins de recherche scientifique. Pour l'échange d'échantillons provenant de ces espèces, les scientifiques devront demander des **permis d'importation et d'exportation (ou un certificat de réexportation)** aux

organes nationaux de gestion de la CITES.

- L'Annexe II contient des espèces qui nécessitent un commerce contrôlé pour lequel la CITES pourrait autoriser le commerce international s'il ne nuira pas à la survie de l'espèce dans la nature. Pour l'échange d'échantillons provenant de ces espèces, les scientifiques devront demander un **permis d'exportation (ou un certificat de réexportation)** aux organes nationaux de gestion de la CITES, mais aucun permis d'importation n'est nécessaire.
- Pour délivrer les permis d'exportation, les organes de gestion pourront exiger une preuve de l'origine licite des échantillons, notamment concernant leur acquisition et possession (voir le paragraphe sur les "Permis nationaux").

Certaines dérogations peuvent s'appliquer aux procédures générales de la CITES.

- **Dérogation relative aux échanges scientifiques (DES):**

Le [paragraphe 6 de l'Article VII](#) de la Convention comprend une dérogation appelée « dérogation relative aux échanges scientifiques» (c.-à-d. les prêts, donations et échanges à des fins scientifiques non commerciales) **permettant aux scientifiques ou institutions scientifiques enregistrés d'échanger des échantillons** ou spécimens CITES d'animaux non vivants sans appliquer les exigences des Articles III, IV ou VI¹². Aucun permis ou certificat CITES ne sera alors requis, mais les échantillons devront porter une étiquette "Échantillons biologiques CITES" délivrée ou approuvée par un organe de gestion de l'État qui a enregistré l'institution. Les conditions de la dérogation sont détaillées dans la [Résolution Conf.11.15 \(Rev. CoP18\)](#)¹³. Les scientifiques, les institutions scientifiques et les instituts de recherche en criminalistique doivent être **inscrit-es dans le registre du Secrétariat CITES (Registre CITES)**¹⁴ par un organe de gestion de leur État d'accueil conformément à certaines normes et doivent faire rapport chaque année sur l'utilisation de la dérogation.

Cette dérogation pourrait être utilisée pour l'échange d'échantillons de cétacés à des fins d'études de génétique de population dans la zone ACCOBAMS. Toutefois, certaines lois nationales ne reconnaissent pas cette dérogation (p. ex., *Portugal, Géorgie*) et certaines Parties n'ont aucune Institution officiellement enregistrée à la CITES (p. ex., *Géorgie, Türkiye*). Dans ces cas, la dérogation décrite ci-dessus ne pourra pas être utilisée.

- **Procédure simplifiée (PS) pour les échantillons biologiques :**

Contrairement à la DES, la procédure simplifiée n'est pas une dérogation, c'est un moyen simplifié d'appliquer les exigences normales de la CITES lorsque l'échange n'a aucun effet ou un effet négligeable sur la conservation de l'espèce concernée. La procédure est définie dans la [Résolution Conf. 12.3 \(Rev. CoP19\)](#)¹⁵, section XIII, paragraphe 22. La procédure simplifiée permet à l'organe de gestion de mettre à disposition des personnes et organismes de bonne foi des permis et certificats partiellement remplis, et donc de « préautoriser » l'échange sous certaines conditions. Cette procédure peut être appliquée à l'échange d'échantillons biologiques, tels que des tissus/morceaux de tissus de 5-25 mm³ (détaillé dans l'annexe 4 de la résolution Conf. 12.3 (Rev. CoP19)). La personne ou organisme bénéficiaire devra informer l'organe de gestion des permis et certificats utilisés et non utilisés pendant leur période de validité. De même, l'article 18 du [règlement \(CE\) n°865/2006](#)¹⁶ prévoit la délivrance préalable de permis

¹² <https://cites.org/fra/disc/text.php#VII>

¹³ Prêts, dons, ou échanges de spécimens de musées, d'herbiers et de recherche à des fins de diagnostic et de criminalistique <https://cites.org/sites/default/files/documents/COP19/resolution/F-Res-11-15-R18.pdf>

¹⁴ https://cites.org/fra/common/reg/f_si.html

¹⁵ <https://cites.org/sites/default/files/documents/F-Res-12-03-R19.pdf>

¹⁶ <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX:02006R0865-20220119>

et de certificats pour certains échanges d'échantillons biologiques de spécimens d'espèces inscrites aux annexes ou aux appendices de la CITES. Le type d'échantillons couverts par les permis et certificats pré-délivrés et leur utilisation sont spécifiés à l'annexe XI.

La procédure simplifiée pourrait donc être utilisée pour l'échange d'échantillons de cétacés à des fins d'études de génétique de population. Toutefois, certaines lois nationales ne reconnaissent pas cette procédure simplifiée. Dans ces cas, elle ne pourra pas être utilisée.

- **Introduction en provenance de la mer (IPM):**

Lors de la collecte d'échantillons en haute mer (zones situées au-delà des juridictions nationales), une procédure spéciale de la CITES peut s'appliquer. En effet, **[l'Introduction en provenance de la mer](#)** de spécimens d'espèces inscrites à l'Annexe I ou à l'Annexe II est réglementée par la Convention¹⁷. L'IPM est défini à l'Article 1 de la Convention comme le transport, dans un État de spécimens d'espèces qui ont été pris dans l'environnement marin n'étant pas sous la juridiction d'un État. La Conférence des Parties a adopté des orientations supplémentaires concernant la mise en œuvre pratique de ces dispositions dans la résolution **[Conf. 14.6 \(Rev. CoP16\)](#)**¹⁸. Il s'agit notamment des conditions de délivrance des certificats IPM et des permis d'importation/exportation si le spécimen/échantillon est prélevé par un navire, est enregistré dans un État et est transporté vers un autre État. Ceci pourrait être particulièrement pertinent pour les espèces pélagiques de cétacés dont la distribution s'étend dans les zones off-shore au-delà de la zone Atlantique adjacente de l'ACCOBAMS.

- **Cas particulier : à l'intérieur des frontières de l'UE :**

Conformément à la législation de l'UE¹⁹, aucun permis n'est nécessaire pour échanger des échantillons de cétacés à des fins de recherche non commerciale entre deux pays membres de l'UE.

Cependant, certains pays exigent l'émission d'un certificat intra-communautaire (CIC) (ex : Portugal), et/ou une preuve de l'origine licite des échantillons, notamment concernant leur acquisition et possession (voir Paragraphe sur les *Permis nationaux*).

En raison de la disparité entre les législations nationales, les scientifiques devraient contacter l'organe de gestion CITES²⁰ du pays exportateur et importateur pour s'assurer le respect de la procédure appropriée. Les Parties de l'ACCOBAMS devraient faciliter les échanges d'échantillons pour la génétique des populations et les objectifs de diagnostic en engageant la CITES avec la CBI pour une procédure claire et bien définie.



¹⁷ <https://cites.org/fra/prog/ifs.php>

¹⁸ <https://cites.org/sites/default/files/documents/COP/19/resolution/F-Res-14-06-R16.pdf>

¹⁹ <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A31997R0338>

²⁰ <https://cites.org/fra/parties/country-profiles/es/national-authorities>

C) Le Protocole de Nagoya sur l'accès et le partage des avantages

Le Protocole de Nagoya sur l'Accès aux Ressources Génétiques et le Partage Juste et Équitable des Avantages Découlant de leur Utilisation a été adopté par la Conférence des Parties à la Convention sur la Diversité Biologique lors de sa dixième réunion à Nagoya (Japon) en octobre 2010. Elle est entrée en vigueur le 12 octobre 2014 et comptait 131 parties en juillet 2021.

L'accès et le partage des avantages (APA) désignent la manière dont on peut obtenir l'accès aux ressources génétiques et comment les avantages résultant de leur utilisation seront partagés entre les personnes ou les pays qui utilisent les ressources (utilisateurs) et les personnes ou les pays qui les fournissent (fournisseurs).

Le Protocole de Nagoya sur l'APA établit un cadre juridique international basé sur trois sections :

- **L'accès aux ressources génétiques et aux connaissances traditionnelles qui leur sont associées en vue de leur utilisation** : Les États peuvent décider de soumettre cet accès à leur consentement préalable en connaissance de cause (ou consentement éclairé préalable) ou au consentement des communautés autochtones et locales concernées.
- **Le partage des avantages** : les avantages doivent être partagés de manière juste et équitable, selon des conditions établies d'un commun accord entre l'utilisateur et le pays fournisseur ou les communautés autochtones et locales concernées.
- **Conformité** : les Parties doivent adopter des mesures pour garantir que l'accès aux ressources génétiques et aux connaissances traditionnelles associées utilisées sous leur juridiction est conforme aux réglementations internes des pays fournisseurs en matière d'accès et de partage des avantages.

Ce protocole a été négocié afin d'assurer une plus grande certitude juridique et davantage de transparence, tant pour les fournisseurs que pour les utilisateurs de ressources génétiques, en :

- Créant des conditions plus prévisibles pour l'accès aux ressources génétiques.
- Contribuant à assurer un partage des avantages, lorsque des ressources génétiques quittent une Partie contractante fournissant des ressources génétiques.

Pour obtenir l'accès, les utilisateurs doivent d'abord obtenir l'autorisation (=CPCC) du pays fournisseur. De plus, le fournisseur et l'utilisateur doivent négocier un accord (=CCCA) pour partager équitablement les avantages qui en découlent.

- **Les Points Focaux Nationaux (PFN-APA)** : Les PFN-APA sont chargés de fournir des informations sur l'APA aux utilisateurs, notamment sur les correspondants nationaux (CN-APA) à contacter et sur les exigences et processus en vigueur dans les pays fournisseurs pour obtenir l'accès aux ressources génétiques
- **Les Autorités Nationales Compétentes (ANC)** : Les ANC sont des organismes établis par les gouvernements et sont chargés d'octroyer l'accès aux utilisateurs de leurs ressources génétiques et de représenter les fournisseurs au niveau local ou national. Les mesures nationales de mise en œuvre établissent le mode de fonctionnement des ANC dans un pays donné.

• **Consentement Préalable en Connaissance de Cause (CPCC)** (en anglais : Prior Informed Consent - PIC): Autorisation donnée par le CNA d'un pays fournisseur à un utilisateur (individu ou institution) avant l'accès aux ressources génétiques, conformément à un cadre juridique et institutionnel approprié.

• **Conditions Convenues d'un Commun Accord (CCCA)** (en anglais : Mutually Agreed Terms - MAT): Un accord conclu entre les fournisseurs de ressources génétiques et les utilisateurs sur les conditions d'accès et d'utilisation des ressources, ainsi que sur les avantages à partager entre les deux parties. Il doit inclure :

- Le type et la quantité de ressources génétiques, et la zone géographique/écologique de l'activité.
- Toute limitation des possibilités d'utilisation du matériel.
- Si les ressources génétiques peuvent être transférées à des tiers et dans quelles conditions.
- La reconnaissance des droits souverains du pays d'origine.
- Le renforcement des capacités dans divers domaines à identifier dans l'accord.

• **Certificat de conformité reconnu internationalement (CCRI)** : délivrés par les ANC du pays fournisseur, comme preuve que les ressources génétiques couvertes par le certificat ont été utilisées conformément au CPCC et que des CCCA ont été établies conformément aux exigences d'APA du pays fournisseur. Il sera notifié au [Centre d'échange APA \(ABS-CE\)](#)²¹.

Les informations concernant les Points Focaux Nationaux APA, les Autorités Nationales Compétentes, les mesures législatives, administratives ou politiques, les procédures APA, les clauses contractuelles nationales types, les certificats de conformité reconnus internationalement, les sites web ou bases de données nationales et les points de contrôle de chaque partie sont disponibles sur les [profils des pays APA](#)²².

Aperçu des étapes que les utilisateurs potentiels de ressources génétiques devraient suivre pour se conformer aux exigences en matière d'APA (d'après Davis et Borisenko 2017) :

1. L'utilisateur potentiel se renseigne sur les procédures APA du pays fournisseur, via le Centre d'échange APA et le PFN.
2. L'utilisateur potentiel suit le processus de CPCC et d'autres autorisations et négocie des CCCA avec l'ANC du pays fournisseur ou un autre organisme autorisé.
3. L'ANC accorde le CPCC ou délivre la preuve que le CPCC a été accordé par d'autres autorités/communautés : L'ANC délivre "un permis ou son équivalent" = permis d'accès national → L'utilisateur peut désormais accéder aux ressources génétiques et commencer à partager les avantages comme convenu dans les CCCA.
4. L'ANC soumet un permis national au Centre d'échange sur l'APA. Le Centre d'échange l'APA génère un CCRI avec un numéro d'identification unique.
5. L'utilisateur obtient et conserve le numéro CCRI lié aux ressources génétiques, aux dérivés et aux données couverts par le CPCC et les CCCA ; l'utilisateur fournit le numéro CCRI à d'autres utilisateurs si les ressources génétiques sont transférées (et autorisées par les CPCC/CCCA) ; de nouveaux CPCC/CCCA peuvent être nécessaires dans le cas de nouvelles utilisations/de nouveaux utilisateurs.

²¹ <https://absch.cbd.int>

²² <https://absch.cbd.int/fr/countries>

6. L'utilisateur soumet des informations, y compris numéro CCRI, aux Points de Contrôle du pays utilisateur aux étapes clés de l'utilisation, conformément aux règles du pays utilisateur.

7. Le Point de Contrôle du pays utilisateur soumet les informations au Centre d'échange APA. Le Centre d'échange APA publie un Communiqué du Point de Contrôle qui est envoyé au PFN et à l'ANC du pays fournisseur.

Le protocole de Nagoya peut également s'appliquer à l'intérieur d'un pays et entre les membres de l'UE.

En raison de la disparité des législations nationales, les scientifiques doivent contacter le Point Focal National APA du pays fournisseur pour comprendre quelles sont les procédures à suivre pour obtenir l'accès aux ressources génétiques.

D) Informer le Point Focal National de l'ACCOBAMS

Les PFN de l'ACCOBAMS²³ seront informés de tout échange d'échantillons afin de mettre à jour la base de données d'échantillons de l'ACCOBAMS.



²³ Liste actualisée des Points Focaux Nationaux de l'ACCOBAMS https://accobams.org/fr/a_propos/parties_et_etats_riverains/

06) Traitement des échantillons

A) Techniques/protocoles de traitement

Avec l'avènement de technologies de séquençage plus abordables, un nombre croissant de scientifiques utilisent la génétique et la génomique comme partie intégrante de leur recherche. Avant cela, il est essentiel que les scientifiques reconnaissent l'importance d'un matériel génétique (extraction) de haute qualité, en particulier dans le cas du séquençage à haut débit (Cammen *et al.* 2016). Indépendamment de l'objectif spécifique de l'étude, que ce soit dans le cadre de la génétique (p. ex., ADNmt, microsatellites) ou même de la génomique (p. ex., séquençage du génome entier), la première étape en laboratoire vers la génération de données est l'extraction de l'ADN (ou, dans le cas de la transcriptomique, l'extraction de l'ARN), qui peut varier selon le type d'échantillon (p. ex., sang, muscle).

La lyse du tissu est une condition préalable à l'extraction du matériel génétique. Celle-ci peut être obtenue, par exemple, par l'incubation de l'échantillon dans une solution de protéinase K / SDS (Strauss 1998).

L'extraction de l'ADN peut être réalisée à l'aide de l'un des kits disponibles, tels que le kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen) ou le kit *NucleoSpin® Tissue* (Macherey-Nagel, Allemagne), par une extraction au phénol-chloroforme (Sambrook & Russell 2006) ou une procédure de salage (Miller *et al.* 1988). Morin *et al.* (2015) détaille plusieurs méthodes d'extraction courantes à partir de biopsies cutanées. Les formulations internes pour les extractions d'ADN ont l'avantage d'être considérablement moins coûteuses (<0,5 € par échantillon) que les kits commerciaux (p. ex., 4 € par échantillon pour le kit *DNeasy Blood and Tissue de Qiagen*). Toutefois, la méthode d'extraction au phénol-chloroforme, en particulier, fait appel à des produits chimiques extrêmement toxiques et le protocole peut prendre plus de temps. En revanche, la méthode de précipitation à l'acétate d'ammonium utilise des réactifs non toxiques et facilement disponibles. [L'Annexe 3](#) présente deux protocoles d'extraction de l'ADN.

Échantillons d'ADN environnemental

Pour les échantillons d'ADN environnemental, une étape préalable à l'extraction de l'ADN doit être envisagée en fonction du type de filtre utilisé lors de la collecte et de la préparation de l'échantillon. Tests comparatifs des méthodes d'extraction en fonction du type de filtre utilisé (Deiner *et al.* 2015, Liang & Keeley 2013, Spens *et al.* 2017, Turner *et al.* 2014). Les "filtres ouverts" nécessitent une manipulation, grâce à un entonnoir à filtre et une pompe à vide, tandis que les "filtres fermés" réduisent les manipulations inutiles et l'extraction de l'ADN en aval a lieu à l'intérieur de la capsule du filtre, ce qui réduit considérablement les voies d'entrée de contamination potentielles. Les techniques de capture de l'ADNe à partir de "filtres ouverts" ont été testées de manière comparative par Liang & Keeley (2013), Turner *et al.* (2014) et Deiner *et al.* (2015), et à partir de "filtres fermés" par Spens *et al.* (2017).

Échantillons de matières fécales

L'isolement/extraction de l'ADN à partir d'échantillons de matières fécales de cétacés peut être réalisé à l'aide de kits spécialisés pour les fèces ou le sol (p. ex., le kit *Maxwell RSC Faecal Microbiome DNA* de Promega, le kit *QIAamp PowerFecal Pro DNA* de Qiagen, le kit *DNeasy PowerSoil Pro* de Qiagen), et une étape initiale comprenant des billes peut aider à décomposer les particules les plus grosses. Si le laboratoire en possède, les échantillons peuvent également être prétraités à l'aide d'un appareil à ultrasons pour la sonication (ou similaire).

L'extraction de l'ARN est la base de la recherche sur le transcriptome, qui porte sur l'expression des gènes. Plusieurs kits commerciaux sont disponibles. Les kits *RNeasy* micro ou mini (Qiagen) pourront être utilisés sur l'échantillon en fonction du rendement attendu en ARN. Le kit *Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue* (Bio-Rad) est une alternative valable pour les biopsies cutanées de cétacés.

Dans les deux types d'extraction, le matériel génétique est lié à la membrane de silice dans les colonnes d'essorage par l'ajout de sels chaotropiques et d'éthanol, et les molécules contaminantes sont éliminées par lavage avec différents tampons. Le nettoyage et le rendement des extraits purs sont obtenus par un traitement à la RNase dans le cas de l'ADN, et dans le cas de l'ARN par une DNase (Cammen *et al.* 2016).

La concentration et l'intégrité de l'ADN (ou de l'ARN) sont ensuite vérifiées soit au spectrophotomètre nanodrop (Desjardins & Conklin 2010) soit au bioanalyseur Agilent par exemple (Krupp 2005).

Dans le cas d'études génétiques, la **PCR (Polymerase Chain Reaction** en anglais, c.-à-d. la relation en chaîne de la polymérase) est nécessaire pour amplifier le matériel génétique suffisamment pour qu'il puisse être séquencé de manière fiable (p. ex., Sanger). Les protocoles de PCR varient, mais impliquent généralement un extrait d'ADN, un prémélange/mastermix (p. ex., le *PPP Master Mix* de Top-Bio s.r.o. ou le *GoTaq G2 Green Mastermix* de Promega, Madison, WI, USA), des amorces (primers en anglais) directes et inverses et de l'eau. À la place de ce "mastermix", on peut également utiliser un ensemble de Taq ADN polymérase, de dNTP, de MgCl₂ et de tampons de réaction. La matrice de la PCR doit ensuite être exposée à des cycles thermiques, par exemple grâce à un système à 96 puits *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Hambourg, Allemagne). Un exemple de cycles thermiques de réaction PCR consisterait en une dénaturation initiale à 94°C (30s), suivie de 30 cycles de 94°C (30s), 60°C (30s), et 72°C (30s), et d'une étape finale d'extension à 72°C (10min) (Rosel *et al.* 2005). Afin de mieux réussir à amplifier le matériel génétique, il est possible de modifier le profil d'amplification en ajustant la durée de chaque étape, le nombre d'étapes ou la température exacte d'hybridation. Pour une vue d'ensemble, voir Metzker & Caskey (2009).

Pour confirmer l'amplification, les produits PCR peuvent être séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 ou 2 % (Foote *et al.* 2019).

L'ADN extrait et amplifié peut ensuite être purifié par exemple à l'aide du kit *PCR Clean-up* (Macherey-Nagel, Allemagne) ou du *ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent* (Applied Biosystems, États-Unis), et séquencé en interne sur un analyseur, comme le *ABI Prism 3100xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), avec le kit *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems) (Mulholland *et al.* 2015), ou bien le séquençage peut être sous-traité commercialement (p. ex., Macrogen, USA ; GATC Biotech, Allemagne).

Lorsque l'on s'intéresse aux analyses **de tout le génome ou transcriptome**, l'ADN (ou l'ARN) extrait sera ensuite préparé pour le séquençage de nouvelle génération (NGS) sur une plateforme Illumina, par exemple. Pour ce faire, la préparation de la bibliothèque est une étape clef. Pour donner un exemple, les librairies de séquençage de l'ARN (RNAseq en anglais) peuvent être créées en interne à l'aide du kit de préparation de librairies pour Illumina comprenant le *NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep*, des amorces *NEBNext Multiplex Oligos* et du module *NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module* de New England Biolabs (Morey *et al.* 2022). La préparation des bibliothèques peut également être sous-traitée (p. ex., chez Novogene, Singapour). Comme alternative au séquençage de l'ARN, on peut aussi utiliser la qPCR (PCR quantitative ou en temps réel) ; cependant, celle-ci ne peut détecter que des séquences connues (les avantages et inconvénients liés au coût sont discutés dans Nonis *et al.* 2014). Voir Cammen *et al.* (2016) pour une vue d'ensemble des avancées plus générales en matière de séquençage à haut débit, et Foote *et al.* (2019) pour une méthodologie plus détaillée concernant la création de bibliothèques pour les analyses du génome.

B) Les lignes directrices de la CBI sur le contrôle de la qualité

Le Comité scientifique de la CBI a compilé des lignes directrices pour le contrôle de la qualité des données ADN et l'estimation du taux d'erreur, pour les études génétiques pertinentes pour les conseils de gestion de la CBI (Tiedemann *et al.* 2012). Ces lignes directrices traitent principalement de la prise de conscience, de la minimisation et du contrôle des erreurs de typage de l'ADN. Elles soulignent l'importance de signaler les taux d'erreur de génotypage (ou les incohérences dans les jeux de données). Les erreurs peuvent survenir à différents stades d'une étude d'ADN (Figure 4) et les lignes directrices proposent des mesures visant à minimiser ces erreurs ; les facteurs les plus importants qui contribuent aux erreurs sont probablement les échantillons mal étiquetés, les erreurs de saisie des données, etc. - parfois appelées "erreurs de manipulation". En revanche, les "erreurs systématiques" sont associées à la tendance de certains marqueurs génétiques et/ou types d'échantillons à être susceptibles d'erreurs en raison de leurs caractéristiques inhérentes.

Tiedemann *et al.* (2012) recommandent de prendre des mesures pour réduire le taux d'erreur global à environ 1 % pour les études de population utilisant des microsatellites et à moins de 1 % pour les études utilisant des SNP (Bonin *et al.* 2004, Broquet & Petit 2004, Morin *et al.* 2009), voire à des taux inférieurs pour les études de parenté et de marquage-recapture génétique afin de réduire le nombre de faux positifs (Bonin *et al.* 2004, Hoffman & Amos 2005, Waits *et al.* 2001). Dans tous les cas, les scientifiques doivent rapporter les taux d'erreur de génotype détectés au cours des contrôles de qualité (idéalement, les taux d'erreur spécifiques à un *locus* et les taux d'erreur globaux).

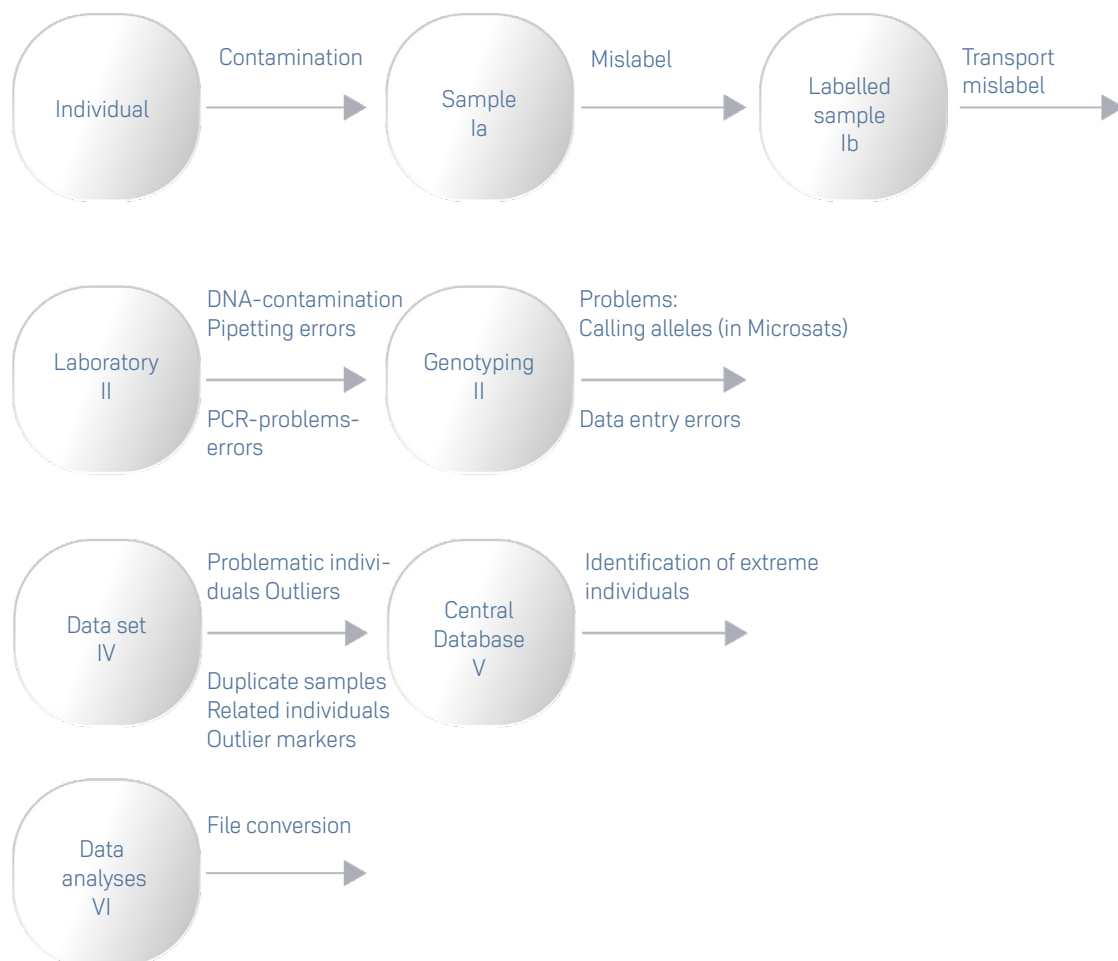


Figure 4. Organigramme des procédures d'analyse de l'ADN et des sources d'erreur potentielles (Tiedemann *et al.* 2012, reproduit avec l'autorisation de l'auteur).

C) Laboratoires génétiques adaptés

Les analyses génétiques requièrent une quantité considérable de traitements de laboratoire nécessitant un équipement spécifique (p. ex., centrifugeuse, thermocycleur PCR, séquenceur, congélateurs). Il peut donc être nécessaire de rechercher des collaborations avec des laboratoires qui peuvent fournir les installations et l'expertise requises. Certaines institutions se sont spécialisées dans des types d'analyses particuliers et peuvent traiter des échantillons contre rétribution, tandis que d'autres sont ouvertes à des projets de collaboration. Par souci de cohérence et dans la mesure du possible, tous les échantillons devraient être traités dans le même laboratoire, en suivant le même protocole. Si plusieurs laboratoires doivent être utilisés, un étalonnage approprié doit être effectué, en fonction des marqueurs.

Une base de données de laboratoires génétiques adaptés est disponible en [Annexe 2](#). Cette liste a été créée sur la base des informations reçues des PFN de l'ACCOBAMS et des participants à l'atelier de septembre 2022. Elle a ensuite été actualisée en novembre 2023. Il convient de noter que la liste n'est pas exhaustive et que d'autres laboratoires peuvent également disposer d'installations appropriées.



07) Analyse de données

A) Les lignes directrices de la CBI sur l'analyse des données

Fournir des lignes directrices détaillées sur tous les types d'analyses de données génétiques/omiques dépasse la portée de ces Meilleures pratiques et les outils existants sont fréquemment modifiés ou de nouveaux ajoutés. Le Comité scientifique de la CBI a compilé des documents détaillés sur différents aspects des analyses de données pertinentes pour les avis de gestion de la CBI (Waples *et al.* 2018) et ces documents sont en cours d'actualisation. Waples *et al.* (2018) abordent les aspects clés de l'analyse de données comprenant :

1. Identifier/délimiter les espèces, les sous-espèces et les populations.
2. Fournir des estimations de la taille de la population de recensement (N) et de la taille effective de la population (Ne).
3. Suivre les mouvements contemporains des individus.
4. Estimer les niveaux de connectivité à long terme entre les populations.
5. Quantifier la diversité génétique et fournir des informations sur les événements démographiques passés, goulets d'étranglement et expansions de population.
6. Résoudre les mélanges d'individus provenant de différentes populations reproductrices.

Ils abordent également certaines considérations analytiques importantes concernant les difficultés à identifier les seuils appropriés de différenciation des populations et d'indépendance démographique et l'interprétation des résultats génétiques. La définition d'une population dans un contexte de gestion est complexe et peut s'étendre sur un continuum allant de l'isolement à la panmixie. En définitive, du point de vue de la conservation, il est important que les mesures de gestion soient robustes face à l'incertitude de la structure de la population. On parle d'indépendance démographique lorsque les taux de migration sont suffisamment faibles pour que les processus dynamiques de la population soient principalement déterminés par les taux locaux de natalité et de mortalité. Ces unités démographiquement indépendantes nécessiteront des mesures de gestion distinctes.

Plusieurs principes fondamentaux se dégagent :

1. Clarifier les buts et les objectifs, quantifier les attentes avant le début de l'étude et déterminer un ou plusieurs marqueurs appropriés.
2. Suivre des mesures appropriées de contrôle de la qualité des données.
3. Vérifier si les population(s) sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg, c.-à-d. Fis.
4. Envisager plusieurs indices de diversité génétique.
5. Les tests statistiques constituent un point de départ utile, mais une valeur significative de p ne fournit aucune information autre que le rejet de l'hypothèse nulle. Utiliser diverses approches et intégrer les résultats (voir le Tableau 3 ci-dessous).
6. Ne pas surinterpréter les estimations ponctuelles.
7. L'absence de preuve de structure n'est pas une preuve d'absence de structure – essayer d'estimer la puissance des tests utilisés (ce qui n'est pas toujours facile).
8. Il est important d'examiner les hypothèses et les biais possibles (p. ex., le biais de détermination, l'influence des tests multiples, l'influence de la sélection).
9. Tenir compte de la distinction entre les résultats scientifiques, les conclusions et les recommandations.
10. Les effets de liaisons entre *loci* sont importants à prendre en compte dans les études génomiques.

Compte tenu de l'évolution constante des méthodes d'analyse, il convient de toujours consulter la littérature originale ainsi que les comptes rendus effectués par des organismes tels que la CBI. Il est souhaitable que les scientifiques publient leurs données et leurs scripts annotés afin de garantir la reproductibilité des résultats et d'améliorer la transparence des approches analytiques.

Tableau 3. Résumé de certains des outils d'analyse les plus courants utilisés en génétique des populations pour étudier les unités de gestion/unités à conserver (d'après CBI 2019) qui n'incluent pas les approches plus traditionnelles de test d'hypothèses où les populations putatives sont définies a priori. Il convient de noter qu'une étude approfondie visant à identifier les unités de gestion utilisera plusieurs approches et intégrera les résultats et les déductions qui en découlent, ainsi que des analyses non génétiques.

Le programme **STRUCTURE**²⁴ regroupe les individus de manière à minimiser les écarts par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE) au sein des groupes. Jusqu'à récemment, STRUCTURE était la méthode la plus utilisée d'assignation sans hypothèse basée sur la génétique pour étudier la structure des populations. Les études de simulation ont montré que le programme a une puissance relativement faible (il ne trouve généralement une structure que lorsque les FST sont supérieurs à environ 0,02). Alors que le nombre de groupes génétiques présents dans les données (k) est un paramètre d'entrée (sous la forme d'une gamme de valeurs possibles), STRUCTURE fournit une probabilité pour chaque valeur donnée de k. Si STRUCTURE peut identifier un certain nombre de groupes génétiques avec une probabilité élevée, cela ne signifie pas nécessairement que les groupes identifiés ne peuvent pas avoir d'autres sous-structures. Dans des scénarios de superposition spatiale dans la distribution des stocks, STRUCTURE pourrait détecter la présence d'hétérogénéité, mais ne permettra pas l'assignation de spécimens individuels à des stocks "supplémentaires" putatifs.

GENELAND²⁵ est un programme de génétique du paysage exécuté en R qui regroupe les échantillons en populations putatives homogènes en supposant un équilibre approximatif de Hardy Weinberg et de liaison entre *loci*, et en incorporant des données spatiales spécifiques aux individus. Bien que l'approche soit similaire à celle de STRUCTURE, la composante spatialement explicite offre généralement une plus grande puissance (tant que les stocks ne sont pas mélangés de manière aléatoire).

TESS²⁶ incorpore des informations spatiales et effectue un regroupement bayésien à l'aide de la tessellation ou découpage (division des échantillons en polygones les mieux adaptés), et fournit ainsi une méthode de génétique du paysage distincte de celle de GENELAND ou de STRUCTURE. L'utilisation de fractales dans TESS signifie que certains éléments de structure fine peuvent être manqués ou identifiés au mauvais endroit.

BAPS²⁷ utilise des méthodes bayésiennes pour identifier la structure génétique des populations en décrivant la variation moléculaire dans chaque sous-population à l'aide d'une distribution de probabilité conjointe distincte pour chacun des *loci* observés. Cette méthode est basée sur des distributions de fréquences d'allèles plutôt que sur des attentes d'équilibre, et peut donc ne pas avoir la puissance nécessaire pour détecter des populations ayant divergé très récemment.

L'approche **sPCA (Analyse en Composantes Principales spatiales)**²⁸ repose sur deux éléments clés : une autocorrélation spatiale, mise en œuvre à l'aide du I de Moran, et une évaluation de la variance de la fréquence des allèles à l'échelle mondiale et locale. Bien qu'elle s'appuie sur des données spatiales (qui sont incorporées dans une structure en réseau), elle n'utilise pas directement les coordonnées spatiales. La présence de plusieurs populations échantillonnées dans une même zone pourrait exagérer la variance locale, ce qui risquerait de masquer la structure à grande échelle. C'est pourquoi les modèles spatialement explicites utilisant des tests d'équilibre (tels qu'ils sont mis en œuvre dans GENELAND) peuvent être plus efficaces pour extraire la structure à l'échelle locale d'un assemblage mixte de populations.

²⁴ <https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure.html>

²⁵ <https://i-pri.org/special/Biostatistics/Software/Geneland/>

²⁶ <http://membres-timc.imag.fr/Olivier.Francois/tess.html>

²⁷ <https://www.helsinki.fi/en/researchgroups/network-pharmacology-for-precision-medicine/software>

²⁸ <https://www.nature.com/articles/hdy200834/>

B) L'ADN environnemental et les fèces

Dans toute étude, le choix des techniques d'analyse des données doit être guidé par la question scientifique à résoudre. Pour les échantillons d'eau contenant de l'ADNe, les méthodes non-PCR (p. ex., la métagénomique) peuvent ne pas être la meilleure approche pour étudier spécifiquement les taxons sélectionnés. En revanche, la PCR traditionnelle à partir de modèles mixtes (p. ex., le metabarcoding) permet d'amplifier et d'analyser spécifiquement une sélection de marqueurs moléculaires. Une limitation importante dans la sélection des marqueurs moléculaires est la quantité de séquences de référence disponibles avec lesquelles l'échantillon étudié pourra être comparé. Actuellement, les ARNr mitochondriaux 12S et 16S ont été largement utilisés comme séquences de référence pour les évaluations de la biodiversité des cétacés (p. ex., Valsecchi *et al.* 2021, 2020). Par ailleurs, des méthodes quantitatives (qPCR) ont également été utilisées pour quantifier et comparer des techniques à l'aide de marqueurs génétiques spécifiques aux taxons étudiés et pour étudier la structure génétique des populations de cétacés (p. ex., Parsons *et al.* 2018, Pinfield *et al.* 2019).

Des approches similaires peuvent être utilisées pour les échantillons de fèces de cétacés. Cependant, dans ce cas, une approche métagénomique peut également être utile, à condition que des séquences de référence de bonne qualité soient disponibles, pour l'évaluation de la biodiversité et la caractérisation simultanée de différentes composantes écologiques (p. ex., le régime alimentaire, les relations hôtes-parasites). De même, le metabarcoding et l'analyse qPCR peuvent être utiles pour analyser ce type de données.

C) Les ressources computationnelles pour les données génomiques

La détermination de l'approche (génétique ou génomique) la mieux adaptée à un cas particulier dépend de nombreux facteurs, notamment des ressources disponibles et des données requises pour répondre à une question scientifique spécifique. L'utilisation de techniques plus récentes présente l'avantage d'accroître la puissance statistique et la résolution à l'aide d'un plus grand nombre de marqueurs et, dans de nombreux cas, d'améliorer l'efficacité et le rapport coût-efficacité. Ces dernières années, le séquençage de nouvelle génération (NGS du sigle en anglais) utilisé pour produire des données génomiques a révolutionné et continue de révolutionner le domaine de l'écologie moléculaire en nous permettant de mieux comprendre (avec une résolution plus élevée) l'histoire évolutive des populations et des espèces, de délimiter les populations, de détecter la structure cryptique des populations et de détecter les régions génomiques qui pourraient faire l'objet de sélection. Cependant, les ressources économiques et informatiques nécessaires entraînent un compromis entre le nombre de *loci* qui peuvent être obtenus et le nombre de populations ou d'individus qui peuvent être séquencés (Aguirre-Liguori *et al.* 2020).

Le NGS produit de grandes quantités de données, générant habituellement 100 gigaoctets de données par génome, ce qui nécessitera une capacité élevée en termes de puissance de calcul, de stockage et de traitement bio-informatique, ce qui peut représenter un défi économique pour de nombreuses institutions. L'informatique en réseau est une option pour les scientifiques qui ne disposent pas actuellement des outils nécessaires pour exploiter pleinement ce type de données et représente un moyen valable (mais non gratuit) pour analyser relativement rapidement de grands jeux de données sans avoir à entretenir et à mettre à niveau ses propres serveurs.

Il est important de reconnaître que de nombreux pipelines bio-informatiques et analyses de génomique des populations nécessitent des compétences informatiques et de programmation assez avancées, en plus de la compréhension des concepts de génétique des populations. De plus, les pipelines

bio-informatiques et les lignes directrices relatives aux meilleures pratiques dans ce domaine n'ont pas encore été standardisés. Ces dernières années, des progrès significatifs ont été réalisés dans le développement de programmes plus faciles d'utilisation et de lignes directrices claires pour la collecte et l'application de la génomique à la biologie et à la gestion de la faune sauvage (Gomez-Sanchez & Schlötterer 2018, Gruber *et al.* 2018, Ravindran *et al.* 2019).

Quelques informations à prendre en compte :

- La taille des données d'un génome entier pour un individu est comprise entre 20 et 60 Go en fonction de la couverture et de l'espèce (la taille des génomes de cétacés varie entre ~2,3 Gb-3 Gb).
- La taille des données originales (données brutes) pour ~100 individus séquencés avec ddRAD-seq (avec une couverture de 20-30X) est d'environ 220 Go.
- Les analyses initiales génèrent généralement X fois (entre 2 et 10 fois) la taille des données brutes avant d'obtenir le fichier "final" utilisable.
- Pour effectuer des analyses de population (sélection, histoire démographique, etc.), de nouveaux fichiers seront générés.



08) Dissémination des résultats

La diffusion des résultats adaptée au public cible est importante pour les scientifiques, les organisations, les communautés et les décideurs politiques. Une diffusion efficace peut également favoriser la collaboration entre les partenaires et est essentielle à l'élaboration et à la mise en œuvre de mesures de conservation et de gestion efficaces.

A) Le Comité scientifique de l'ACCOBAMS

Le Comité Scientifique de l'ACCOBAMS est le principal organe scientifique conseillant l'ACCOBAMS pour lui permettre de développer des recommandations de conservation et de gestion efficaces. Il est conseillé, dans la mesure du possible, de soumettre les études de génétique des populations proposées à ce comité pour recevoir ses commentaires et conseils. Il est particulièrement important de soumettre les résultats des études de génétique des populations au Comité Scientifique dès que possible (c.-à-d. avant la publication formelle dans une revue à comité de lecture) car cela permettra d'incorporer les résultats dans les conseils de gestion dans les meilleurs délais.

B) La communauté scientifique

La publication en accès libre et les prépublications rendent les résultats de la recherche visibles et augmentent le nombre de citations. De plus, au-delà des publications académiques traditionnelles (articles de revues scientifiques, livres et présentations lors de conférences), la diffusion numérique peut permettre une adoption et une compréhension plus larges de la recherche. L'utilisation des réseaux sociaux, d'identifiants de scientifiques, de réseaux sociaux académiques (p. ex., Academia.edu, ResearchGate, LinkedIn, Google Scholar) et de wikis comme une forme spécifique de " *Open-notebook science*" peuvent augmenter la visibilité vers des millions d'utilisateurs.

C) Les Points Focaux Nationaux de l'ACCOBAMS

Les principaux résultats doivent être résumés dans le rapport national. En attendant l'adoption par la MOP8, les rapports nationaux doivent également inclure tout échange d'échantillons, les échantillons collectés pour alimenter la base de données d'échantillons de l'ACCOBAMS, les laboratoires génétiques potentiels pour l'analyse des cétacés et la liste des publications scientifiques. Les chercheurs doivent donc informer leur [PFN de l'ACCOBAMS](#) tous les trois ans de toute mise à jour de leur collecte/échange d'échantillons.

D) Les autres parties intéressées

Des contacts réguliers et continus avec les partenaires peuvent favoriser la diffusion des connaissances. Dans le cadre de l'ACCOBAMS, les informations peuvent être partagées par le biais de la plateforme "NETCCOBAMS", où des informations actualisées et les principaux résultats sont continuellement mis en ligne. Les scientifiques doivent également s'efforcer d'informer les parties prenantes concernées par le biais de canaux appropriés.

E) Le grand public

Les résultats des recherches présentés dans un jargon complexe et technique doivent être traduits dans un langage non technique que le grand public comprendra plus facilement. Cette approche inclut la communication sous forme de magazines, d'émissions de télévision ou radio de divulgation scientifique ou de communiqués de presse. Les technologies numériques offrent de nouveaux formats en ligne pour l'interaction avec le grand public et pour atteindre une partie de la population qui resteraient autrement hors de portée des méthodes de communication traditionnelles. Ces approches comprennent notamment les conférences TED diffusées sur YouTube et les blogs qui reçoivent souvent des millions de vues.

09) L'archivage des données et la compilation de données provenant d'études précédentes

Afin de contribuer à une science ouverte et transparente et de garantir la reproductibilité, il est recommandé que toutes les données brutes et traitées soient accessibles après leur publication ou pendant le processus de révision. Ces procédures permettront de disposer d'un vaste jeu de données pour des études et des examens futurs. Actuellement, diverses plateformes sont disponibles pour le stockage des données (p. ex., EMBO, GenBank, Dryad, Obis) qui peuvent être reliées entre elles pour favoriser un lien entre l'utilisation des données et les publications.



10) Science médico-légale

A) Cas particulier de l'identification individuelle des animaux en captivité

Selon le document "Taking of Cetaceans, Dolphinarium and Quasi-Dolphinarium : A Legal Analysis Relating to Accobams Parties" ([ACCOBAMS-MOP7/2019/Inf 09](#)), le Comité Scientifique de l'ACCOBAMS a exprimé ses préoccupations concernant la question de la capture de cétacés et des delphinariums en remarquant "l'illégalité des prélèvements de cétacés vivants dans la Mer Noire" et a appelé à "un inventaire et une évaluation approfondie de l'identité individuelle de tous les grands dauphins maintenus en captivité au moyen de méthodes génétiques, morphologiques et d'identification photographique", ainsi qu'à la mise en place de "mesures administratives appropriées afin d'empêcher la substitution des dauphins morts en captivité par des animaux capturés dans la nature" (Recommandation 8.2). Suite aux recommandations du Comité Scientifique, la Cinquième Réunion des Parties de l'ACCOBAMS a adopté la [Résolution 5.14](#), sur les Prélèvements délibérés de Grands dauphins vivants de mer Noire (*Tursiops truncatus*).

Lors de sa 17ème réunion, la Conférence des Parties à la CITES (Johannesburg, 2016) s'est penchée sur l'espèce susmentionnée (Recommandations 17.299-301). Les Parties sont désormais encouragées à utiliser l'analyse génétique pour confirmer l'origine des animaux avant la délivrance des permis d'exportation. De plus, les Parties sont encouragées à établir des banques de données nationales ou régionales où les données d'identification génétique pertinentes sont stockées et à les rendre accessibles en ligne, ainsi qu'à rapporter les exportations de *Tursiops truncatus ponticus* et leur origine au Comité pour les animaux de la CITES.

Un modèle de passeport génétique pour différentes espèces de cétacés gardées en captivité est en cours d'élaboration, en collaboration avec le Comité Consultatif de l'ACCOBAMS sur les questions liées à la captivité.

B) Identification d'espèces pour le commerce

De plus, la science médico-légale génétique est en passe d'être reconnue comme une discipline à part entière pour la protection de la faune. Les dents de cachalot *Physeter macrocephalus* (Annexe I de la CITES) ou d'orque *Orcinus orca* (Annexe II de la CITES) peuvent faire l'objet d'un commerce illégal à l'échelle mondiale (Baker *et al.* 2020). Ils peuvent faire l'objet de gravures ou être superficiellement sculptés, conservant ainsi leurs formes originales en tant qu'objets morphologiquement reconnaissables. Mais pour les pièces dépourvues de caractères morphologiques permettant de diagnostiquer l'espèce, les analyses génétiques peuvent s'avérer de puissants outils d'identification. Dans ces cas, les protocoles d'étude de l'ADN ancien ou des spécimens de musées pourront être applicables (voir sections correspondantes). L'extraction à base de silice de faibles volumes (0,01-0,02 g) de poudre de dentine-ciment de dents de cachalot et de gravures, qui peut être obtenue sans endommager de manière significative le spécimen, peut fournir suffisamment d'ADN pour le séquençage des *loci* mitochondriaux (Pichler *et al.* 2001).

1) Glossaire des termes



Le glossaire a été adapté à partir de Waples *et al.* (2018). Lorsqu'il est différent, le terme en anglais est indiqué en italique entre parenthèses pour faciliter la compréhension des publications scientifiques en anglais.

adaptation : le processus par lequel la fréquence des allèles qui améliorent la survie et/ou le succès reproductif (c.-à-d. la fitness) des individus dans un environnement donné augmente au fil du temps.

admixture : le résultat de croisements et de flux génétiques entre des populations génétiquement différentes.

allèle (*allele*): l'une des deux ou plus formes alternatives d'un gène ou d'une séquence de nucléotides à un locus donné.

fréquence allélique (*allele frequency*): proportion de tous les allèles à un locus donné qui sont d'un type spécifique au sein du groupe échantillonné.

test d'assignation (*assignment test*): méthode statistique utilisant des génotypes multilocus pour assigner des individus à la population dont ils sont le plus probablement originaires.

autosome : chromosome qui n'est pas un chromosome sexuel.

sélection équilibrante (*balancing selection*): forme de sélection naturelle qui agit pour maintenir le polymorphisme à un locus au sein d'une population.

connectivité (*connectivity*): niveaux d'échanges entre deux ou plusieurs groupes ou populations. La connectivité peut être démographique, auquel cas elle se rapporte à la mesure dans laquelle la croissance de la population et les taux vitaux sont affectés par la dispersion ; ou génétique, auquel cas elle se réfère à l'échange de gènes (c.-à-d. au **flux génétique**).

démographique (*demographic*): se rapporte aux processus qui affectent la taille d'une population (p. ex., la naissance, la mort, la fécondité, la dispersion des individus).

dérive génétique (*genetic drift*): changement aléatoire de la fréquence allélique d'une génération à l'autre. La dérive est censée avoir un effet plus important lorsque la taille effective de la population diminue.

différenciation génétique (*genetic differentiation*): accumulation de différences génétiques (fréquences alléliques ou substitutions de séquences) entre les groupes. La différenciation génétique peut être due à un flux génétique limité ainsi qu'à la sélection naturelle des gènes non neutres dans les groupes sympatriques.

diploïde (*diploid*): qui possède deux séries de chromosomes. Dans les populations à reproduction sexuée, un jeu est hérité de la mère et l'autre du père. Pour un locus diploïde donné, un individu peut avoir deux allèles différents (**hétérozygote**) ou deux allèles identiques (**homozygote**). Les *loci* à transmission autosomique sont diploïdes (voir **haploïde**).

dispersion: déplacement d'un individu hors de sa population d'origine vers une autre population. Telle qu'elle est utilisée dans le présent document, la dispersion implique généralement que l'individu qui se disperse se reproduise par la suite avec des membres de la nouvelle population, ce qui entraîne un flux génétique ; cependant, ce n'est pas toujours le cas. Chez de nombreuses espèces, mais pas chez les cétacés, la dispersion passive des gamètes ou des larves est courante.

diversité génétique (*genetic diversity*): variation génétique au sein des individus, des populations et entre les populations.

équilibre de Hardy-Weinberg HWE (*Hardy-Weinberg equilibrium*): état idéalisé dans lequel les fréquences génotypiques dans une population sont de simples produits des fréquences alléliques. En théorie, l'équilibre de Hardy-Weinberg est atteint dans des populations de taille infinie qui s'accouplent au hasard et qui ne subissent ni migration, ni sélection naturelle, ni mutation.

taille efficace de la population N_e (*effective population size*): taille d'une population "idéale" qui subirait le même taux de dérive génétique que la population étudiée. Dans une population idéale (également appelée population de Wright-Fisher), les générations sont discrètes, l'accouplement est aléatoire et chaque individu a une probabilité égale de contribuer aux gènes de la génération suivante, auquel cas $N_e = N$. Chez la plupart des espèces, y compris les cétacés, N_e est généralement inférieur au nombre d'individus recensés dans une population (voir **taille de la population**).

F_{IS} : mesure de la compatibilité des fréquences génotypiques observées dans un échantillon avec celles attendues dans le cadre de l'équilibre de Hardy-Weinberg. Des valeurs positives de F_{IS} indiquent un déficit d'hétérozygotes par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg, tandis que des valeurs négatives indiquent un déficit d'homozygotes par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

F_{ST} : mesure de la diminution de l'hétérozygotie, par rapport à celle attendue dans le cadre d'un accouplement aléatoire, qui résulte de la structure de la population. De faibles valeurs de F_{ST} indiquent que les fréquences alléliques sont similaires parmi les groupes comparés, tandis que des valeurs plus élevées indiquent une plus grande différenciation génétique entre les groupes.

flux génétique ou flux de gènes (*gene flow*): échange de gènes entre populations ou groupes. Le flux génétique peut résulter du déplacement d'un individu vers une nouvelle population/un nouveau groupe et de sa reproduction réussie avec les membres de ce groupe, ou du croisement entre des individus de populations ou de groupes différents sans qu'il y ait de mouvement permanent d'individus (seulement de gamètes) entre les groupes.

génotype (*genotype*): composition génétique (composition allélique) d'un individu, soit de l'ensemble de son génome, soit, plus couramment, d'un certain locus ou d'un ensemble de *loci* (voir **phénotype**).

haploïde (*haploid*): qui possède un seul jeu de chromosomes, de sorte qu'il n'existe qu'une seule copie d'un allèle ou d'une séquence à un locus donné. Chez les cétacés, l'ADNmt est un exemple de marqueur haploïde, car il n'est hérité que de la mère. Les marqueurs spécifiques des chromosomes sexuels, tels que les marqueurs du chromosome Y, présentent également un schéma de transmission haploïde (voir **diploïde**).

haplotype : combinaison d'allèles à des *loci* qui se trouvent sur un seul chromosome ou une seule molécule d'ADN et qui ont donc tendance à être hérités ensemble. Chez les cétacés, l'haplotype fait généralement référence à la séquence d'ADN mitochondrial détenue par un individu. Les allèles nucléaires en phase, par exemple les variants de PSN (SNP) physiquement situés sur le même chromosome, constituent également un haplotype.

hétérogénéité (*heterogeneity*): présence de plusieurs groupes génétiquement ou démographiquement distincts au sein d'un ensemble d'échantillons.

hétérozygote (*heterozygous*): qui possède deux allèles différents au locus d'un gène (p. ex., Aa).

homogénéité (*homogeneity*): absence de groupes génétiquement ou démographiquement distincts au

sein d'un ensemble d'échantillons.

homozygote (*homozygous*): qui possède deux copies du même allèle à un locus génétique (p. ex., AA).

hybridation (*hybridisation*): accouplement entre des individus issus de deux populations ou espèces génétiquement distinctes.

consanguinité (*inbreeding*): accouplement entre des individus qui sont plus étroitement liés que par le seul hasard. La consanguinité est censée accroître l'homozygotie car il y a une plus grande probabilité que le génotype d'un individu consanguin contienne des allèles identiques par filiation (hérités d'un ancêtre commun).

liaison (*linkage*): mesure du degré auquel les allèles de deux *loci* ne sont pas assortis de manière indépendante. Deux *loci* proches sur un chromosome ont une probabilité plus élevée d'être hérités ensemble que deux *loci* plus éloignés et sont donc dits liés. Des associations non aléatoires d'allèles à différents *loci* peuvent également résulter de la sélection naturelle, de la migration ou de la dérive génétique sans lien physique.

déséquilibre de liaison DL (*linkage disequilibrium LD*): association non aléatoire d'allèles entre des *loci*, souvent parce que les *loci* sont situés à proximité les uns des autres sur le même fragment d'ADN. Également connu sous le nom de déséquilibre gamétique. Le DL aléatoire se produit également dans toutes les populations en raison de la dérive génétique, et son ampleur est inversement proportionnelle à la taille effective de la population.

locus (pluriel loci) : fragment d'ADN situé à un endroit précis d'un chromosome donné ; souvent utilisé pour désigner un gène.

microsatellite : marqueur génétique composé de courtes unités de séquences d'ADN répétées plusieurs fois (p. ex., ATATATATAT). Bien que les microsatellites puissent se trouver sur les chromosomes sexuels et dans l'ADN mitochondrial, l'utilisation de ce terme dans la génétique des populations de cétacés se réfère généralement à des *loci* hérités par les deux parents et d'origine nucléaire. Les allèles des microsatellites sont généralement rapportés comme le nombre d'unités répétées (et donc de la taille) contenues dans un allèle donné, au lieu d'être directement séquencés.

migration : ce terme est couramment utilisé de deux manières différentes pour désigner : (a) les mouvements saisonniers entre deux zones géographiques qui sont liés au cycle de reproduction de la population, aux changements dans leur environnement physique (p. ex., formation de glace) et/ou à la disponibilité des proies ; et (b) les mouvements d'individus entre groupes ou populations, qui peuvent ou non aboutir à une reproduction réussie et à un flux de gènes. Sauf indication contraire, le terme "migration", tel qu'il est utilisé dans le présent document, implique à la fois les mouvements entre les populations et les flux génétique.

ADN mitochondrial ADNmt (*mitochondrial DNA mtDNA*): petite molécule d'ADN circulaire (chez les animaux, d'une longueur de ~16-20 kbp) qui se trouve dans les mitochondries (c.-à-d. à l'extérieur du noyau) d'une cellule. Chez les cétacés, l'ADNmt est hérité uniquement de la mère et constitue donc un exemple d'hérédité haploïde.

mutation : modification du matériel génétique d'une cellule. Les mutations peuvent inclure des substitutions d'un seul nucléotide, des délétions et des insertions, ainsi que des duplications, des pertes, des inversions et des translocations de segments de séquences d'ADN.

sélection naturelle (*natural selection*): contribution différentielle des génotypes à la génération suivante en raison de différences dans la survie et/ou la reproduction.

ADN nucléaire ADNn (*nuclear DNA nDNA*): ADN présent dans le noyau d'une cellule. Chez les cétacés, l'ADN nucléaire autosomique est hérité de façon biparentale, de sorte que le génotype d'un individu à un locus donné contient un allèle hérité de sa mère et un autre allèle hérité de son père. L'ADN nucléaire comprend également l'ADN présent sur les chromosomes sexuels.

diversité nucléotidique (*nucleotide diversity*): mesure de la variation génétique calculée à partir de données de séquences d'ADN, qui mesure la proportion moyenne des différences entre toutes les séquences d'ADN (c.-à-d. la différence moyenne entre deux séquences prises au hasard) au sein d'un groupe.

neutre (*neutral*): non influencé par la sélection naturelle.

espèce non modèle (*non-model species*): espèce qui n'a pas fait l'objet de recherches approfondies et pour laquelle des marqueurs ou des génomes de référence peuvent ne pas être disponibles.

phylogénétique (*phylogenetic*): terme utilisé pour décrire les relations évolutives entre les taxons.

phylogéographie (*phylogeography*): étude de la répartition des lignées génétiques d'un taxon dans le paysage, afin de mieux comprendre son histoire évolutive (son origine et sa propagation).

polymorphe/ique (*polymorphic*): qui possède plus d'un allèle à un locus. Ce terme est généralement utilisé pour désigner un groupe/une population plutôt qu'un individu, celui-ci étant plutôt considéré comme hétérozygote si plus d'un allèle est présent.

population : groupe d'individus qui coexistent dans l'espace et dans le temps et qui se reproduisent librement. Les termes souvent utilisés comme synonymes de "population" comprennent "sous-populations" et "stocks", bien que ceux-ci puissent également se référer à des unités d'intérêt pour la gestion et qui n'impliquent pas de croisement.

taille de la population N (*population size*): le nombre d'individus dans une population, souvent appelé taille de recensement (N_c). Couramment utilisée pour désigner soit tous les individus, soit uniquement les adultes (voir **taille effective de la population**).

amorçe (*primer*): courte séquence spécifique d'un locus (oligonucléotides) qui est complémentaire des régions flanquant le motif microsatellite ou la portion de gène cible.

séquençage de l'ADN associé à un site de restriction RAD (*Restriction site Associated DNA (RAD) sequencing*): séquençage de bibliothèques d'ADN comprenant des régions adjacentes à des sites de restriction.

polymorphisme d'un seul nucléotide PSN ou polymorphisme nucléotidique PN (*single nucleotide polymorphism SNP*): variation de la séquence d'ADN qui se produit lorsqu'un seul nucléotide (A, T, C ou G) diffère sur un site spécifique entre les individus ou à l'intérieur d'un individu (pour les marqueurs diploïdes).

stérile (*sterile*): exempt de bactéries ou d'autres micro-organismes vivants susceptibles de provoquer une contamination.



Références

- Aguirre-Liguori, JA, Luna-Sanchez JÁ, Gasca-Plneda J, Eguiarte LE (2020) Evaluation of the minimum sampling design for population genomic and microsatellite studies: an analysis based on Wild Maize. *Frontiers in Genetics*, 11: 870. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00870>
- Allendorf, F., Hohenlohe, P. and Luikart, G. (2010). Genomics and the future of conservation genetics. *Nat Rev Genet* 11, 697–709. <https://doi.org/10.1038/nrg2844>
- Amos, W., Whitehead, H., Ferrari, M. J., Glockner-Ferrari, D. A., Payne, R., and Gordon, J. (1992). Restrictable DNA from sloughed cetacean skin; its potential for use in population analysis. *Marine Mammal Science*, 8(3), 275–283. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1992.tb00409.x>
- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., and Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 81– 92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.28>
- Bearzi G (2000) First report of a common dolphin (*Delphinus delphis*) death following penetration of a biopsy dart. *Journal of Cetacean Research and Management* 2:217–222. <https://doi.org/10.47536/jcrm.v2i3.910>
- Bilgmann K, Griffiths OJ, Allen SJ, Möller LM (2007) A biopsy pole system for bow-riding dolphins: sampling success, behavioral responses, and test for sampling bias. *Marine Mammal Science* 23:218–225. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2006.00099.x>
- Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, Brochmann C, Taberlet P. (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* 13, 3261–3273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02346.x>
- Broquet T, Petit E (2004) Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics. *Molecular Ecology* 13, 3601–3608. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02352.x>
- Cabrera A.A, Bérubé M, Lopes X.M, Louis M., Oosting T., Rey-Iglesia A, Rivera-León V.E., Székely D., Lorenzen E.D, Palsbøll P.J. (2021) A genetic perspective on Cetacean Evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 2021 52:1, 131-151. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-012021-105003>
- Cammen, K. M., Andrews, K. R., Carroll, E. L., Foote, A. D., Humble, E., Khudyakov, J. I., Louis, M., McGowen, M. R., Olsen, M. T. and Van Cise, A. M. (2016). Genomic methods take the plunge: recent advances in high-throughput sequencing of marine mammals. *Journal of Heredity*, 107(6), 481–495. <https://doi.org/10.1093/jhered/esw044>
- Closek, C.J., Santora, J.A., Starks, H.A., Schroeder, I.D., Andruszkiewicz, E.A., Sakuma, K.M., Bograd, S.J., Hazen, E.L., Field, J.C., Boehm, A.B., 2019. Marine Vertebrate Biodiversity and Distribution Within the Central California Current Using Environmental DNA (eDNA) Metabarcoding and Ecosystem Surveys. *Front. Mar. Sci.* 6, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00732>
- Davis, K., Borisenko A. 2017. Introduction to Access and Benefit-Sharing and the Nagoya Protocol: What DNA Barcoding Researchers Need to Know. Pensoft Publishers, Sofia, 37 pp. <https://doi.org/10.3897/ab.e22579>
- Deiner, K., Walser, J.-C., Mächler, E., Altermatt, F., 2015. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biol. Conserv.* 183, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018>

Desjardins, P., and Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. JoVE (Journal of Visualized Experiments), (45), e2565. <https://dx.doi.org/10.3791/2565>

Djurhuus, A., Port, J., Closek, C.J., Yamahara, K.M., Romero-Maraccini, O., Walz, K.R., Goldsmith, D.B., Michisaki, R., Breitbart, M., Boehm, A.B., Chavez, F.P., 2017. Evaluation of Filtration and DNA Extraction Methods for Environmental DNA Biodiversity Assessments across Multiple Trophic Levels. Front. Mar. Sci. 4. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00314>

Drouot, V., Bérubé, M., Gannier, A., Goold, J. C., Reid, R. J., and Palsboll, P. J. (2004). A note on genetic isolation of Mediterranean sperm whales (*Physeter macrocephalus*) suggested by mitochondrial DNA. Journal of Cetacean Research and Management, 6(1), 29-32. <https://doi.org/10.47536/jcrm.v6i1.787>

Esteban R, Verborgh P, Gauffier P, Giménez J, Martín V, Pérez-Gil M, et al. 2016. Using a multi-disciplinary approach to identify a critically endangered killer whale management unit. Ecol Indic;66:291-300. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.01.043>

Farro, A. P. C., Rollo Jr, M. M., Silva Jr, J. M., and Marino, C. L. (2008). A simple protocol for a low invasive DNA accessing in *Stenella longirostris* (Cetacea: *Delphinidae*). Pan-American Journal of Aquatic Sciences 3(2): 130-134 [http://panamjas.org/pdf_artigos/PANAMJAS_3\(2\)_130-134.pdf](http://panamjas.org/pdf_artigos/PANAMJAS_3(2)_130-134.pdf)

Fontaine, M.C., Tolley, K.A., Siebert, U. et al. (2007) Long-term feeding ecology and habitat use in harbour porpoises *Phocoena phocoena* from Scandinavian waters inferred from trace elements and stable isotopes. BMC Ecol 7, 1. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-7-1>

Fontaine, M.C., Roland, K., Calves, I., Austerlitz, F., Palstra, F.P., Tolley, K.A., Ryan, S., Ferreira, M., Jauniaux, T., Llavona, A., Öztürk, B., Öztürk, A.A., Ridoux, V., Rogan, E., Sequeira, M., Siebert, U., Vikingsson, G.A., Borrell, A., Michaux, J.R. and Aguilar, A. (2014). Postglacial climate changes and rise of three ecotypes of harbour porpoises, *Phocoena phocoena*, in western Palearctic waters. Molecular Ecology, 23: 3306-3321. <https://doi.org/10.1111/mec.12817>

Footo AD, Martin MD, Louis M, Pacheco G, Robertson KM, Sinding MS, Amaral AR, Baird RW, Baker CS, Ballance L, Barlow J, Brownlow A, Collins T, Constantine R, Dabin W, Dalla Rosa L, Davison NJ, Durban JW, Esteban R, Ferguson SH, Gerrodette T, Guinet C, Hanson MB, Hoggard W, Matthews CJD, Samarra FIP, de Stephanis R, Tavares SB, Tixier P, Totterdell JA, Wade P, Excoffier L, Gilbert MTP, Wolf JBW, Morin PA. (2019). Killer whale genomes reveal a complex history of recurrent admixture and vicariance. Molecular Ecology, 28(14), 3427-3444. <https://doi.org/10.1111/mec.15099>

Fossi M, Marsili L, Neri G, Casini S, Bearzi G, Politi E, Zanardelli M, Panigada S (2000) Skin biopsy of Mediterranean cetaceans for the investigation of interspecies susceptibility to xenobiotic contaminants. Marine Environmental Research 50:517-521. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00127-6](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00127-6)

Freedman, J., van Dorp, L.B. and Brace, S., 2018. Destructive sampling natural science collections: an overview for museum professionals and researchers. Journal of Natural Science Collections, 5, pp.21-34. <https://www.natsca.org/article/2440>

Fulton, T.L., Shapiro, B. (2019). Setting Up an Ancient DNA Laboratory. In: Shapiro, B., Barlow, A., Heintzman, P., Hofreiter, M., Paijmans, J., Soares, A. (eds) Ancient DNA. Methods in Molecular Biology, vol 1963. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9176-1_1

Gales, N. J., Bowen, W. D., Johnston, D. W., Kovacs, K. M., Littnan, C. L., Perrin, W. F., Reynolds III, J. E., & Thompson, P. M. (2009). Guidelines for the treatment of marine mammals in field research. Marine Mammal Science, 25(3), 725-736. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2008.00279.x>

Gales, N. J., Dalebout, M. L., and Bannister, J. L. (2002). Genetic identification and biological observation of two free-swimming beaked whales: Hector's beaked whale (*Mesoplodon hectori*, Gray, 1871), and Gray's beaked whale (*Mesoplodon grayi*, von Haast, 1876). *Marine Mammal Science*, 18(2), 544-551. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2002.tb01055.x>

Gaspari S, Scheinin A, Holcer D, Fortuna C, Natali C, Genov T, Frantzis A, Chelazzi G, Moura AE (2015) Drivers of population structure of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in the Eastern Mediterranean Sea. *Evolutionary Biology* 42:177-190. <https://doi.org/10.1007/s11692-015-9309-8>

Genov T, Jepson PD, Barber JL, Hace A, Gaspari S, Centrih T, Lesjak J, Kotnjek P (2019) Linking organochlorine contaminants with demographic parameters in free-ranging common bottlenose dolphins from the northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment* 657:200-212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.025>

Giménez J, De Stephanis R, Gauffier P, Esteban R, Verborgh P (2011) Biopsy wound healing in long-finned pilot whales (*Globicephala melas*). *Veterinary Record* 168:101. <https://doi.org/10.1136/vr.c5284>

Giménez J, Louis M, Barón E, Ramírez F, Verborgh P, Gauffier P, Esteban R, Eljarrat E, Barceló D, Forero MG, de Stephanis R (2018) Towards the identification of ecological management units: a multidisciplinary approach for the effective management of bottlenose dolphins in the southern Iberian Peninsula. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 28:205-215. <https://doi.org/10.1002/aqc.2814>

Goldberg, C.S., Strickler, K.M., Pilliod, D.S., 2015. Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biol. Conserv.* 183, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.040>

Goldberg, C.S., Turner, C.R., Deiner, K., Klymus, K.E., Thomsen, P.F., Murphy, M.A., Spear, S.F., McKee, A., Oyler-McCance, S.J., Cornman, R.S., Laramie, M.B., Mahon, A.R., Lance, R.F., Pilliod, D.S., Strickler, K.M., Waits, L.P., Fremier, A.K., Takahara, T., Herder, J.E., Taberlet, P., 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods Ecol. Evol.* 7, 1299–1307. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595>

Gomez-Sanchez, D., and Schlötterer, C. (2018). ReadTools: A universal toolkit for handling sequence data from different sequencing platforms. *Molecular Ecology Resources*, 18, 676–680. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12741>

Gorgone AM, Haase PA, Griffith ES, Hohn AA (2008) Modeling Response of Target and Nontarget Dolphins to Biopsy Darting. *Journal of Wildlife Management* 72:926-932. <https://doi.org/10.2193/2007-202>

Gruber, B., Unmack, P. J., Berry, O. F., and Georges, A. (2018). DARTR: An R package to facilitate analysis of SNP data generated from reduced representation genome sequencing. *Molecular Ecology Resources*, 18, 691–699. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12745>

Harlin, A. D., Würsig, B., Baker, C. S., and Markowitz, T. M. (1999). Skin swabbing for genetic analysis: application to dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*). *Marine Mammal Science*, 15(2), 409-425. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1999.tb00810.x>

Hermosilla, C., Hirzmann, J., Silva, L.M.R., Brotons, J.M., Cerdà, M., Prenger-Berninghoff, E., Ewers, C., Taubert, A., 2018. Occurrence of anthroozoonotic parasitic infections and faecal microbes in free-ranging sperm whales (*Physeter macrocephalus*) from the Mediterranean Sea. *Parasitol. Res.* 117, 2531–2541. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5942-3>

Hermosilla, C., Silva, L.M.R., Prieto, R., Kleinertz, S., Taubert, A., Silva, M.A., 2015. Endo- and ectoparasites of large whales (Cetartiodactyla: *Balaenopteridae*, *Physeteridae*): Overcoming difficulties in obtaining appropriate samples by non- and minimally-invasive methods. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 4, 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.11.002>

Hoelzel, A. R., and Donovan, G. P. (1991). Report of the workshop on the genetic analysis of cetacean populations. *Genetic Ecology of Whales and Dolphins*. Edited by AR Hoelzel. Rep. Int. Whaling Comm. Spec. Issue, (13).

Hoffman JI, Amos W. (2005) Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology* 14, 599–612. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2004.02419.x>

Hunter, ME, Hoban, SM, Bruford, MW, Segelbacher, G, Bernatchez, L. (2018) Next-generation conservation genetics and biodiversity monitoring. *Evol Appl.*; 11: 1029– 1034. <https://doi.org/10.1111/eva.12661>

Hunter, M., Meigs-Friend, G., Ferrante, J., Takoukam Kamla, A., Dorazio, R., Keith-Diagne, L., Luna, F., Lanyon, J., Reid, J., 2018. Surveys of environmental DNA (eDNA): a new approach to estimate occurrence in Vulnerable manatee populations. *Endanger. Species Res.* 35, 101–111. <https://doi.org/10.3354/esr00880>

Jepson PD, Deaville R, Barber JL, Aguilar À, Borrell A, Murphy S, Barry J, Brownlow A, Barnett J, Berrow S, Cunningham AA, Davison NJ, ten Doeschate M, Esteban R, Ferreira M, Foote AD, Genov T, Giménez J, Loveridge J, Llavona Á, Martin V, Maxwell DL, Papachlimitzou A, Penrose R, Perkins MW, Smith B, de Stephanis R, Tregenza N, Verborgh P, Fernandez A, Law RJ (2016) PCB pollution continues to impact populations of orcas and other dolphins in European waters. *Scientific Reports* 6:18573. <https://doi.org/10.1038/srep18573>

Juhel, J., Marques, V., Polanco Fernández, A., Borrero-Pérez, G.H., Mutis Martínezguerra, M., Valentini, A., Dejean, T., Manel, S., Loiseau, N., Velez, L., Hocdé, R., Letessier, T.B., Richards, E., Hadjadj, F., Bessudo, S., Ladino, F., Albouy, C., Mouillot, D., Pellissier, L., 2021. Detection of the elusive Dwarf sperm whale (*Kogia sima*) using environmental DNA at Malpelo island (Eastern Pacific, Colombia). *Ecol. Evol.* 11, 2956–2962. <https://doi.org/10.1002/ece3.7057>

Kiszka J, Oremus M, Richard P, Poole M, Ridoux V (2010a) The use of stable isotope analyses from skin biopsy samples to assess trophic relationships of sympatric delphinids off Moorea (French Polynesia). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 395:48–54. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.08.010>

Kiszka J, Simon-Bouhet B, Chartier F, Pusineri C, Ridoux V (2010b) Individual and group behavioural reactions of small delphinids to remote biopsy sampling. *Animal Welfare* 19:411–417. <https://doi.org/10.1017/S0962728600001895>

Kiszka JJ, Méndez-Fernandez P, Heithaus MR, Ridoux V (2014) The foraging ecology of coastal bottlenose dolphins based on stable isotope mixing models and behavioural sampling. *Marine Biology* 161:953–961. <https://doi.org/10.1007/s00227-014-2395-9>

Krupp, G. (2005). Stringent RNA quality control using the Agilent 2100 bioanalyzer. Agilent technologies application notes.

Krützen M, Barré LM, Möller LM, Heithaus MR, Simms C, Sherwin WB (2002) A biopsy system for small cetaceans: Darting success and wound healing in *Tursiops spp.* *Marine Mammal Science* 18:863–878. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2002.tb01078.x>

Kumar, G., Eble, J. E., and Gaither, M. R. (2020). A practical guide to sample preservation and pre-PCR processing of aquatic environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 20(1), 29–39. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13107>

Liang, Z., Keeley, A., 2013. Filtration Recovery of Extracellular DNA from Environmental Water Samples. *Environ. Sci. Technol.* 47, 9324–9331. <https://doi.org/10.1021/es401342b>

Louis M, Viricel A, Lucas T, Peltier H, Alfonsi E, Berrow S, Brownlow A, Covelo P, Dabin W, Deaville R, De Stephanis R, Gally F, Gauffier P, Penrose R, Silva MA, Guinet C, Simon-Bouhet B (2014) Habitat-driven population structure of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the North-East Atlantic. *Molecular Ecology* 23:857-874. <https://doi.org/10.1111/mec.12653>

Ma, H., Stewart, K., Loughheed, S., Zheng, J., Wang, Y., Zhao, J. (2016) Characterization, optimization, and validation of environmental DNA (eDNA) markers to detect an endangered aquatic mammal. *Conserv. Genet. Resour.* 8, 561–568. <https://doi.org/10.1007/s12686-016-0597-9>

McDonough, M.M., Parker, L.D., Rotzel McInerney, N., Campana, M.G. and Maldonado, J.E., 2018. Performance of commonly requested destructive museum samples for mammalian genomic studies. *Journal of Mammalogy*, 99(4), pp.789-802. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyy080>

Metzker, M.L. and Caskey, C.T. (2009). Polymerase Chain Reaction (PCR). In eLS, John Wiley and Sons, Ltd (Ed.)

Miller, S., Dykes, D., and Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids res*, 16(3), 1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>

Morey, J. S., Balmer, B. C., Zolman, E. S., Takeshita, R., De Guise, S., Rowles, T. K., Smith, C.R, Wells, R.S and Schwacke, L. H. (2022). Transcriptome profiling of blood from common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the northern Gulf of Mexico to enhance health assessment capabilities. *Plos one*, 17(8), e0272345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272345>

Morin P.A., LeDuc R.G., Archer F.I., Martien K.K., Huebinger R., Bickham J.W. and Taylor B.L. 2009. Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium caused by low levels of microsatellite genotyping errors. *Mol Ecol Res* 9:498-504. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02502.x>

Morin, P. A., Parsons, K. M., Archer, F. I., Avila-Arcos, M. C., Barrett-Lennard, L. G., Dalla Rosa, L., Duchêne, S., Durban, J. W., Ellis, G. M., Ferguson, S. H., Ford, J. K., Ford, M. J., Garilao, C., Gilbert, M. T. P., Kaschner, K., Matkin, C. O., Petersen, S. D., Robertson, K. M., Visser, I. N., Wade, P. R., Ho S. Y. W. and Foote, A. D. (2015). Geographic and temporal dynamics of a global radiation and diversification in the killer whale. *Molecular Ecology*, 24(15), 3964–3979. <https://doi.org/10.1111/mec.13284>

Mulholland, V., Elliot, M., and Green, S. Diagnostics of Tree Diseases Caused by Phytophthora Species. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2620-6_5

Nakahama, N., 2021. Museum specimens: An overlooked and valuable material for conservation genetics. *Ecological Research*, 36(1), pp.13-23. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12181>

Neveceralova, P., Carroll, E. L., Steel, D., Vermeulen, E., Elwen, S., Zidek, J., Stafford, J.K., Chivell, W., Hulva, P. (2022). Population changes in a whale breeding ground revealed by citizen science noninvasive genetics. *Global Ecology and Conservation*, 37, e02141. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2022.e02141>

Nonis, A., De Nardi, B. & Nonis, A. (2014) Choosing between RT-qPCR and RNA-seq: a back-of-the-envelope estimate towards the definition of the break-even-point. *Anal Bioanal Chem* 406, 3533–3536. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7687-x>

Noren DP and Mocklin JA (2012) Review of cetacean biopsy techniques: Factors contributing to successful sample collection and physiological and behavioral impacts. *Marine Mammal Science* 28:154–199. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2011.00469.x>

Nykänen M, Louis M, Dillane E, Alfonsi E, Berrow S, O'Brien J, Brownlow A, Covelo P, Dabin W, Deaville R, de Stephanis R, Gally F, Gauffier P, Ingram SN, Lucas T, Mirimin L, Penrose R, Rogan E, Silva MA, Simon-Bouhet B, Gaggiotti OE (2019) Fine-scale population structure and connectivity of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in European waters and implications for conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 29:197–211. <https://doi.org/10.1002/aqc.3139>

Parsons, K.M., Everett, M., Dahlheim, M., Park, L., (2018) Water, water everywhere: environmental DNA can unlock population structure in elusive marine species. *R. Soc. Open Sci.* 5, 180537. <https://doi.org/10.1098/rsos.180537>

Pichler, F. B., Dalebout, M. L., and Baker, C. S. (2001). Nondestructive DNA extraction from sperm whale teeth and scrimshaw. *Molecular Ecology Notes*, 1(1– 2), 106–109. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00027.x>

Pinfield, R., Dillane, E., Runge, A.K.W., Evans, A., Mirimin, L., Niemann, J., Reed, T.E., Reid, D.G., Rogan, E., Samarra, F.I.P., Sigsgaard, E.E., Foote, A.D., 2019. False-negative detections from environmental DNA collected in the presence of large numbers of killer whales (*Orcinus orca*). *Environ. DNA* 1, 316–328. <https://doi.org/10.1002/edn3.32>

Ravindran, P. N., Bentzen, P., Bradbury, I. R., and Beiko, R. G. (2019). RADProc: A computationally efficient de novo locus assembler for population studies using RADseq data. *Molecular Ecology Resources*, 19, 272–282. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12954>

Rosel, P. E., Forgetta, V., and Dewar, K. (2005). Isolation and characterization of twelve polymorphic microsatellite markers in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Molecular Ecology Notes*, 5(4), 830–833. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01078.x>

Sambrook, J., and Russell, D. W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb-prot4455.

Shafer AB, Wolf JB, Alves PC, Bergström L, Bruford MW, Brännström I, Colling G, Dalén L, De Meester L, Ekblom R, Fawcett KD, Fior S, Hajibabaei M, Hill JA, Hoebel AR, Höglund J, Jensen EL, Krause J, Kristensen TN, Krützen M, McKay JK, Norman AJ, Ogden R, Österling EM, Ouborg NJ, Piccolo J, Popović D, Primmer CR, Reed FA, Roumet M, Salmons J, Schenekar T, Schwartz MK, Segelbacher G, Senn H, Thaulow J, Valtonen M, Veale A, Vergeer P, Vijay N, Vilà C, Weissensteiner M, Wennerström L, Wheat CW, Zielinski P. (2015a). Genomics and the challenging translation into conservation practice. *Trends in Ecology and Evolution*, 30(2), 78– 87. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.11.009>

Smith LM, Burgoyne LA. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper. *BMC Ecol.* 2004 Apr 8;4:4. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-4-4>

Spens, J., Evans, A.R., Halfmaerten, D., Knudsen, S.W., Sengupta, M.E., Mak, S.S.T., Sigsgaard, E.E., Hellström, M., 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods Ecol. Evol.* 8, 635–645. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12683>

Straube, N., Lyra, M.L., Pajmans, J.L., Preick, M., Basler, N., Penner, J., Rödel, M.O., Westbury, M.V., Haddad, C.F., Barlow, A. and Hofreiter, M., 2021. Successful application of ancient DNA extraction and library construction protocols to museum wet collection specimens. *Molecular Ecology Resources*, 21(7), pp.2299-2315. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13433>

Strauss, W. M. (1998). Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. *Current protocols in molecular biology*, 42(1), 2-2. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0202s42>

Supple, MA, and B, Shapiro (2018) Conservation of biodiversity in the genomics era. *Genome Biol.* 11;19(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1520-3>

Székely, D., Corfixen, N.L., Mørch, L.L., Knudsen, S.W., McCarthy, M.L., Teilmann, J., Heide-Jørgensen, M.P., Olsen, M.T., 2021. Environmental DNA captures the genetic diversity of bowhead whales (*Balaena mysticetus*) in West Greenland. *Environ. DNA* 3, 248–260. <https://doi.org/10.1002/edn3.176>

Tiedemann, R., Cipriano, F., Morin, P. a, Hoelzel, R. a, Palsbøll, P., Waples, R. S., Natoli, A., Bachmann, L., Postma, L., Double, M., Pampoulie, C., Skaug, H., and Baker, C. S. (2012). Updated guidelines for DNA data quality control and error rate estimation, for genetic studies relevant to IWC management advice. IWC-SC60, SC/64/SD2. Available at [Link](#).

Turner, C.R., Miller, D.J., Coyne, K.J., Corush, J., 2014. Improved Methods for Capture, Extraction, and Quantitative Assay of Environmental DNA from Asian Bigheaded Carp (*Hypophthalmichthys spp.*). *PLoS One* 9, e114329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114329>

Valsecchi, E., Arcangeli, A., Lombardi, R., Boyse, E., Carr, I.M., Galli, P., Goodman, S.J., 2021. Ferries and environmental DNA: Underway sampling from commercial vessels provides new opportunities for systematic genetic surveys of marine biodiversity. *Front. Mar. Sci.* 8, 1136. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.704786>

Valsecchi, E., Bylemans, J., Goodman, S.J., Lombardi, R., Carr, I., Castellano, L., Galimberti, A., Galli, P., 2020. Novel universal primers for metabarcoding environmental DNA surveys of marine mammals and other marine vertebrates. *Environ. DNA* 2, 460–476. <https://doi.org/10.1002/edn3.72>

Valsecchi, E, Glockner-Ferrari, D. , Ferrari, M., and Amos, W. (1998). Molecular analysis of the efficiency of sloughed skin sampling in whale population genetics. *Molecular Ecology*, 7(10), 1419-1422. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00446.x>

Van Cise, A., Switzer, A., Apprill, A., Champagne, C., Chittaro, P., Dudek, N., Gavery, M., Hancock-Hanser, B., Harmon, A., Kellar, N., Miller, C., Morin, P., Nelms, S., Robertson, K., Schultz, I., Timmins-Schiffman, E., Unal, E., and Parsons, K. (2022/under review). Best Practices for Collecting and Preserving Marine Mammal Biological Samples in the 'Omics Era'. SC/68D/SD and DNA/O3. Available at [Link](#).

Waits LP, Luikart G, Taberlet P (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* 10, 249-256. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01185.x>

Waples, R. S., Rus Hoelzel, A., Gaggiotti, O., Tiedemann, R., Palsbøll, P. J., Cipriano, F., Jackson, J., Bickham, J. W., and Lang, A. R. (2018). Guidelines for genetic data analysis. *Journal of Cetacean Research and Management*, 18, 33–80. Available at [Link](#).

Weller DW, Cockcroft VG, Würsig B, Lynn SK, Fertl D (1997) Behavioral responses of bottlenose dolphins to remote biopsy sampling and observations of surgical biopsy wound healing. *Aquatic Mammals* 23:49-58. <http://digitalcommons.unl.edu/usdeptcommercepub/132>

Whitehead, H., Gordon, J., Mathews, E. A., and Richard, K. R. (1990). Obtaining skin samples from living sperm whales. *Marine Mammal Science*, 6(4), 316-326.

<https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1990.tb00361.x>

Willi Y, Kristensen TN, Sgrò CM, Weeks AR, Ørsted M, Hoffmann AA. (2022) Conservation genetics as a management tool: The five best-supported paradigms to assist the management of threatened species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 4;119(1):e2105076119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2105076119>

Ylitalo GM, Matkin CO, Buzitis J, Krahn MM, Jones LL, Rowles T, Stein JE (2001) Influence of life-history parameters on organochlorine concentrations in free-ranging killer whales (*Orcinus orca*) from Prince William Sound, AK. *Science of the Total Environment* 281:183-203.

[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00846-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00846-4)



Annexe 1

Connaissances actuelles sur la génétique des populations de cétacés dans la zone ACCOBAMS [septembre 2022]

Les informations présentées ci-dessous sont basées sur la littérature scientifique disponible en septembre 2022. Cette étude couvre la zone ACCOBAMS et l'extension proposée aux Zones Économiques Exclusives de l'Espagne continentale et du Portugal continental (Rés. A/4.1²⁹), ci-après dénommée *zone d'extension ACCOBAMS*.

1) Résumé pour chaque espèce

Petit rorqual - *Balaenoptera acutorostrata*

Le petit rorqual est une espèce cosmopolite, largement répandue dans l'hémisphère nord et occasionnellement observée dans toute la mer Méditerranée (plus fréquemment dans sa partie occidentale), avec un seul registre historique en mer Noire. Des baleineaux sont régulièrement rapportés parmi les animaux échoués, qui pourrait suggérer l'existence d'une aire de mise bas dans la région. Au moins deux individus ont fait l'objet d'une analyse génétique : grâce à la région de contrôle de l'ADNmt (343 et 500 pb) (Pastene *et al.* 2007, Maio *et al.* 2016). L'haplotype du premier échantillon collecté en Méditerranée était identique à l'haplotype le plus commun dans l'Atlantique Nord (Pastene *et al.* 2007), et l'haplotype de l'autre individu était identique à un autre haplotype présent en Atlantique Nord (Maio *et al.* 2016).

→ Espèce non prioritaire - espèce non-régulière dans la zone ACCOBAMS.

Rorqual commun - *Balaenoptera physalus*

Le rorqual commun est présent dans l'Atlantique Nord, en Méditerranée centrale et occidentale et est rare dans ses parties méridionale et orientale (Cooke 2018). Son occurrence est variable selon la saison et la zone (Notarbartolo-di-Sciara *et al.* 2003). La plupart des études existantes se sont concentrées sur la différenciation génétique entre les populations de la mer Méditerranée et de l'Atlantique Nord. Elles ont utilisé des séquences de la région de contrôle d'ADNmt (200-400 pb) et des *loci* de microsatellites (6-29 *loci*) pour évaluer la structure génétique de la population, avec des échantillons provenant d'animaux en liberté et d'animaux échoués. La taille des échantillons variait entre 10 et 500, provenant principalement de la Méditerranée occidentale. Grâce à ces analyses de l'ADN mitochondrial et nucléaire, ces premières études suggèrent que la petite population méditerranéenne de rorquals communs (<1 700 individus ; Tardy *et al.* 2023, ACCOBAMS 2021, Notarbartolo-di-Sciara *et al.* 2003) est probablement résidente et génétiquement distincte des individus de l'Atlantique (Bérubé *et al.* 1998, Notarbartolo-di-Sciara *et al.* 2003). Un flux génétique limité et le déplacement de certains individus ont été identifiés entre la mer Méditerranée et l'Atlantique (Palsbøll *et al.* 2004, Bentaleb *et al.* 2011, Gauffier *et al.* 2018). Dans la population méditerranéenne, la diversité nucléotidique globale est deux fois plus faible que celle rapportée pour les populations de rorquals communs dans d'autres océans. La présence de deux haplotypes privés en Méditerranée confirme l'hypothèse de l'isolement génétique (Gauffier 2020, Tardy 2021). L'histoire démographique suggère que les rorquals communs de l'Atlantique Nord ont connu une expansion démographique post-glaciaire alors que la population de rorquals communs

²⁹https://www.accobams.org/wp-content/uploads/2016/06/ACCOBAMS_MOP4_Res.A-4.1.pdf

de la mer Méditerranée a décliné pendant cette période (Schleimer 2021, Tardy 2021). Malgré la petite taille de la population méditerranéenne et son habitat particulier, la population ne semble pas souffrir de dépression de consanguinité (Tardy 2021). À l'intérieur de la mer Méditerranée, la population ne présente pas de structure régionale (Tardy 2021). En outre, l'aire de répartition des rorquals communs de la mer Méditerranée comprend le détroit de Gibraltar (Gauffier 2020, Schleimer 2021).

Les résultats génétiques soulignent que tous les individus contribuent plus ou moins également au maintien de la diversité génétique de la population méditerranéenne de rorquals communs (Tardy 2021), ce qui est conforme au comportement solitaire du rorqual commun (Notarbartolo-di-Sciara *et al.* 2003). Dans la population de rorquals communs de Méditerranée, des vrais frères et sœurs ont été identifiés. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre la stratégie de reproduction de cette population, et pour quantifier le flux de gènes entre les populations de l'Atlantique et de la Méditerranée.

- Quantifier le flux génétique entre les populations de l'Atlantique et de la Méditerranée.
- Délimiter l'aire de répartition de la population méditerranéenne.
- Intégrer les données génétiques et non génétiques.
- Augmenter l'effort d'échantillonnage en hiver et dans le centre et l'est de la mer Méditerranée et dans la zone adjacente de l'Atlantique Nord.
- Augmenter le nombre d'échantillons en intégrant les données provenant d'os/fanons.
- Voir également le CMP sur les rorquals communs de Méditerranée³⁰.

Dauphin commun - *Delphinus delphis*

Le dauphin commun présente une large distribution qui inclut une série de sous-populations géographiquement séparées reflétant une certaine structure de population (Jefferson & Van Waerebeek 2002, Amaral *et al.* 2007, Mirimin *et al.* 2009, Stockin *et al.* 2014), probablement due à la distribution des proies et ses préférences d'habitat (Amaral *et al.* 2012). Peu d'études ont été réalisées sur la structure de la population de dauphins communs en Méditerranée (Amaral *et al.* 2007, Natoli *et al.* 2008, Moura *et al.* 2013). La plupart des études ont utilisé les séquences de la région de contrôle de l'ADNmt et de cytochrome b (400-1121bp) et les *loci* de microsatellites (9-15 *loci*) pour évaluer la structure génétique de la population, avec des échantillons (provenant de peau et de dents) d'animaux en liberté, capturés et échoués. La taille des échantillons varie entre 10 et 500, provenant principalement de la zone d'extension ACCOBAMS, certains du détroit de Gibraltar et de la mer Méditerranée occidentale. En mer Méditerranée, le front thermohalin Almería-Orán a été identifié comme une frontière environnementale qui entraîne une différenciation génétique entre la population méditerranéenne de dauphins communs se trouvant à l'est du front et une population de l'Atlantique Nord-Est qui utilise les eaux méditerranéennes de la mer d'Alboran (Natoli *et al.* 2008, Moura *et al.* 2013). Les dauphins communs présents à l'est du front Almería-Orán diffèrent génétiquement de ceux présents à l'ouest du front (Natoli *et al.* 2008, Moura *et al.* 2013). Des études supplémentaires sont nécessaires incluant plus d'échantillons et de marqueurs pour obtenir plus de détails sur la sous-structure de la population de cette espèce dans la région.

- Augmenter le nombre de marqueurs pour affiner la structure génétique des populations, identifier les populations locales/régionales.
- Évaluer comment le déclin de l'abondance affecte la diversité génétique.
- Voir également le CMP sur les dauphins communs de Méditerranée.

³⁰ Une fois adoptés, tous les CMPs seront disponibles sur <https://accobams.org/fr/especes/plans-de-conservation/>

Globicéphale noir - *Globicephala melas*

Il existe peu de littérature sur la génétique du globicéphale noir couvrant l'ensemble de sa distribution dans la zone ACCOBAMS. Une étude a utilisé des séquences d'ADN de la région de contrôle mitochondriale (800bp) et 11 *loci* microsatellites sur des échantillons d'animaux en liberté et échoués de la Méditerranée occidentale (80), du détroit de Gibraltar (90) et de la zone d'extension ACCOBAMS (50) (Verborgh *et al.* 2016, en prép.). Une forte différenciation génétique entre ces zones a été constatée avec les deux marqueurs. Les résultats suggèrent également une possible sous-structure en Méditerranée occidentale, entre la mer d'Alboran et la mer de Ligure/le golfe du Lion, bien que le nombre d'échantillons soit faible dans le golfe (15). La diversité génétique était plus faible dans les échantillons de la Méditerranée et du détroit de Gibraltar, et ces derniers présentaient des niveaux plus élevés de consanguinité. Une autre étude a comparé les individus échoués dans la zone d'extension ACCOBAMS avec le reste de l'Atlantique Nord en utilisant l'ADN mitochondrial (400 pb) (Monteiro *et al.* 2015). Ces auteurs ont constaté des niveaux élevés et significatifs de différenciation entre la zone d'extension ACCOBAMS et le reste de l'Atlantique Nord-Est. La diversité des haplotypes est très faible chez cette espèce, puisque seuls 7 haplotypes ont été décrits dans l'ensemble de l'océan Atlantique Nord et 15 dans le monde entier (Kraft *et al.* 2020), dont un propre à la mer Méditerranée et à Gibraltar, trois provenant de la zone d'extension et un partagé entre les 2 (Verborgh *et al.* 2016, en prép., Monteiro *et al.* 2015). Bien que les analyses génétiques n'atteignent pas le seuil de la sous-espèce, la divergence entre les populations des deux hémisphères suggère qu'elles devraient être considérées comme des Populations démographiquement indépendantes (Kraft *et al.* 2020). Une autre étude a utilisé les mêmes échantillons que Monteiro *et al.* (2015) mais a examiné la diversité génétique adaptative et les processus sélectifs avec deux *loci* adaptatifs du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH DRA et DQB) (Monteiro *et al.* 2016). La diversité globale des nucléotides était relativement faible pour les *loci* du CMH dans l'Atlantique Nord, mais comparable à celle d'autres populations. Des différences significatives ont été observées dans les fréquences alléliques au sein de l'Atlantique Nord. Les schémas de diversité et de divergence sont cohérents avec les effets à long terme de la sélection équilibrante opérant sur les *loci* du CMH, potentiellement médiatisés par les effets de la coévolution hôte-parasite. Les recherches futures devraient inclure de nouveaux échantillons provenant de Méditerranée nord occidentale afin de confirmer une éventuelle sous-structure au sein de la mer Méditerranée. En raison de la faible diversité globale, il pourrait également être nécessaire d'augmenter le nombre de microsatellites ou d'utiliser des techniques NGS.

- Évaluer la sous-structure au sein de la mer Méditerranée.
- Inclure des échantillons de Méditerranée nord occidentale.
- Évaluer comment le déclin de l'abondance affecte la diversité génétique.

Dauphin de Risso - *Grampus griseus*

Les données disponibles sur la génétique et la structure de la population du dauphin de Risso dans la zone ACCOBAMS sont limitées et se concentrent principalement sur les données d'ADN nucléaire et mitochondrial. En conséquence, le dauphin de Risso de Méditerranée est une population bien différenciée de celles des eaux du Royaume-Uni, sur la base de huit *loci* de microsatellites ($F_{ST} = 0,0296$ $p < 0,05$) et de la région de contrôle de l'ADNmt ($F_{ST} = 0,260$ $p < 0,001$; Gaspari 2004, Gaspari *et al.* 2007). Parmi les analyses effectuées, la diversité des microsatellites a été mesurée par le niveau de polymorphisme, les tests de déséquilibre de liaison et les écarts par rapport aux fréquences génotypiques de HW attendues. En outre, 619 pb de la région de contrôle de l'ADNmt ont été analysés dans le cadre de structuration génétique par la génétique du paysage en mesurant la diversité des nucléotides, en testant la neutralité et en effectuant des analyses phylogénétiques. Des échantillons de dauphins en liberté ($n = 24$) de la mer Ligure ont permis d'analyser les relations de parenté, suggérant une tendance à la philopatrie des femelles et à la dispersion des mâles (Gaspari 2004). La diversité nucléotidique de l'ADNr 16S

mitochondrial a montré qu'il pouvait être considéré comme un possible marqueur moléculaire adapté à l'étude de la structure et de la différenciation génétique individuelle parmi les populations de dauphins de Risso (Sönmez *et al.* 2012). Un échantillonnage plus poussé dans toute l'aire de distribution de l'espèce en mer Méditerranée et des recherches supplémentaires sont nécessaires pour clarifier la structure interne des populations.

- Collecter des échantillons dans toute l'aire de répartition de l'espèce afin d'acquérir une compréhension plus approfondie de la sous-structure de population.
- Intégrer les échantillons existants.
- *Voir également le CMP sur les dauphins de Risso.*

Orque - *Orcinus orca*

La recherche génétique sur les orques de la zone ACCOBAMS a été effectuée pour la sous-population habitant les eaux autour du détroit de Gibraltar (SoG) dans le but d'évaluer la différenciation génétique entre le SoG et l'Atlantique Nord (Foote *et al.* 2011, Esteban *et al.* 2016), ou à une échelle plus globale (Foote *et al.* 2019). Les études existantes ont utilisé la région de contrôle de l'ADNmt (989 pb), des mitogénomes complets (~16 390 pb) et partiels (12 814-14 689 pb), et jusqu'à 19 marqueurs microsatellites pour évaluer la structure génétique des populations, avec des échantillons obtenus principalement à partir d'animaux en liberté, mais aussi d'un individu échoué (Foote *et al.* 2011, Esteban *et al.* 2016). La littérature montre des haplotypes spécifiques aux pods correspondant à la structure sociale matrifocale observée chez les orques (Esteban *et al.* 2016), un faible flux génétique et aucun lien de parenté étroit entre les sous-populations du SoG et des îles Canaries (CI) (Esteban *et al.* 2016). À plus grande échelle (Atlantique Nord-Est), une différenciation génétique et écologique a été observée entre la "population C" (qui comprend les orques du SoG et de CI) et les populations de latitude plus élevée, A et B (Foote *et al.* 2011). Foote *et al.* (2019) ont également fourni un génome d'orque du SoG de référence, qu'ils ont inclus dans leur ensemble de données mondiales de génomes dans le but d'examiner la structure de la population mondiale d'orques. Dans l'ensemble, il a été démontré que les orques du SoG représentent une sous-population génétiquement et écologiquement distincte qui devrait être traitée comme une unité de gestion séparée afin de préserver la diversité génétique, culturelle et écologique au sein de cette sous-population d'orques (Esteban *et al.* 2016).

- Évaluer les niveaux de consanguinité.
- Évaluer l'effet du stress/de la pollution sur l'expression des gènes (transcriptomique), en comparaison avec d'autres populations d'orques par exemple.
- Délimiter les schémas de répartition de la population (dans l'espace et dans le temps).

Marsouin commun - *Phocoena phocoena*

Les marsouins communs de la zone ACCOBAMS comprennent deux unités : à l'Est la (les) population(s) isolée(s) de la mer Noire et des eaux adjacentes également reconnue(s) comme une sous-espèce distincte (*P. p. relicta* ; voir ci-dessous). À l'Ouest, les marsouins sont principalement absents de la mer Méditerranée, bien que des individus errants provenant probablement des côtes atlantiques de la Péninsule ibérique et de l'Afrique du Nord-Ouest s'aventurent le long des côtes méditerranéennes de l'Espagne. Les marsouins de la Péninsule ibérique et de Mauritanie atteignent de plus grandes tailles que ceux provenant de régions plus au nord de l'Europe ou de la Mer Noire (*p. ex.*, Smeenk *et al.* 1992, Donovan & Bjørge 1995, Sequeira 1996, López Fernández 2003, López-Fernández & Martínez-Cedeira 2011). Au fur et à mesure que les informations génétiques ont été accumulées à l'aide de données microsatellites et mitochondriales, il est devenu clair que les marsouins ibériques forment une population morphologiquement et génétiquement distincte, largement isolée (Fontaine *et al.* 2007, 2010, 2014) et étroitement liée à la population d'Afrique du Nord-Ouest (Fontaine *et al.* 2014). Fontaine *et al.* (2014 ; voir aussi la revue de Fontaine 2016) ont proposé que les marsouins ibériques et d'Afrique

du Nord-Ouest représentent ensemble un écotype distinct adapté aux systèmes de remontées d'eau le long de ces côtes. Compte tenu de leur divergence phylogénétique avec les sous-espèces décrites dans l'Atlantique Nord (*P. p. phocoena*) et dans la mer Noire (*P. p. relict*), de leur distribution allopatrique et de leurs particularités morphologiques et écologiques, il a été proposé d'élever cet écotype distinct au rang de sous-espèce séparée sous le nom de *P. p. meridionalis* (Fontaine *et al.* 2014, Fontaine 2016, Ben Chehida *et al.* 2021a, b). La diversité génétique des marqueurs microsatellites nucléaires et de l'ADNmt de la population ibérique est plus faible que celle de toutes les autres populations de marsouins communs documentées, à l'exception de celle de la mer Noire. Les analyses phylogéographiques et la modélisation des paléo-habitats suggèrent que l'écotype *remontée d'eau* du marsouin commun présent dans la péninsule ibérique et en Mauritanie descendrait d'une paléo-population aujourd'hui éteinte qui vivait dans la Méditerranée occidentale pendant le dernier maximum glaciaire (~20 000 ans avant le présent ; Fontaine *et al.* 2014, Ben Chehida *et al.* 2021a,b). Ces marsouins sont probablement entrés dans la mer Méditerranée à partir des populations de l'Atlantique Nord-Est et se sont séparés de celles-ci au cours des 30 000 dernières années. Les marsouins ont ensuite disparu de la Méditerranée pendant la période de réchauffement postglaciaire, mais ces lignées ont donné naissance aux groupes de la mer Noire et de la *remontée d'eau*, il y a environ 15 000 ans, ce dernier groupe donnant naissance aux groupes ibériques et d'Afrique du Nord-Ouest. Le séquençage d'un quart du mitogénome d'individus collectés sur une période de 30 ans (1990-2020) a révélé une baisse spectaculaire de la diversité, mais a également permis d'identifier des haplotypes distincts des mitotypes ibériques typiques. Ces haplotypes sont plus étroitement liés au clade mauritanien, mais en sont toujours distincts (Ben Chehida *et al.* 2021b). Cela suggère que des populations cryptiques génétiquement distinctes pourraient exister parmi les populations ibéro-mauritaniennes. D'autres études améliorant l'échantillonnage et la quantité de marqueurs génétiques (génomomes entiers et séquençage d'amplicons, Morin *et al.* 2021) sont nécessaires pour faire la lumière sur ces groupes énigmatiques existant près du détroit de Gibraltar, mais aussi pour évaluer l'ampleur de l'adaptation locale de ces populations, ainsi que leurs tendances démographiques.

- Augmenter l'échantillonnage le long de la côte nord-ouest de l'Afrique et de la côte sud de la Péninsule ibérique pour étendre la couverture géographique, mais aussi inclure des séries chronologiques pour évaluer les tendances de la population.
- Développer des enquêtes génomiques pour repérer la structure génétique cryptique, évaluer les niveaux du flux génétique et de l'adaptation locale dans les populations de marsouins communs, évaluer les tendances démographiques.
- Séquencer le génome entier d'échantillons modernes et anciens.

Cachalot - *Physeter macrocephalus*

La littérature existante sur la génétique du cachalot dans la zone ACCOBAMS s'est principalement concentrée sur la différenciation génétique entre les populations de la mer Méditerranée et de l'Atlantique Nord. La plupart des études ont utilisé des séquences de la région de contrôle d'ADNmt (200-400 pb) et des *loci* de microsatellites (3-16 *loci*) pour évaluer la structure génétique des populations, avec des échantillons provenant d'animaux en liberté et échoués (Drouot *et al.* 2004, Engelhaupt *et al.* 2009). La taille des échantillons varie entre 4 et 116, provenant principalement de la Méditerranée occidentale. La sex-ratio femelles/mâles est de 0,5:1, ce qui est significativement différent du ratio attendu de 1:1 (Engelhaupt *et al.* 2009). Au niveau mondial, la diversité de l'ADNmt est très faible chez les cachalots par rapport à d'autres cétacés, ce qui est cohérent avec une expansion récente de la population (Alexander *et al.* 2016, Morin *et al.* 2018). En mer Méditerranée, tous les individus échantillonnés portent le même haplotype mitochondrial, ce qui exclut toute analyse plus poussée de la diversité mitochondriale (Drouot *et al.* 2004, Engelhaupt *et al.* 2009, Alexander *et al.* 2016). Morin *et al.* (2018) ont rapporté deux haplotypes mitogénomiques pour leurs quatre échantillons méditerranéens. Dans l'ensemble, les niveaux de différenciation nucléaire sont inférieurs à la différenciation mitochondriale, dont on a supposé qu'elle résultait de la philopatrie des femelles et de la dispersion des mâles. Violi *et al.* (2023)

ont utilisé 5 000 à 10 000 *loci* SNP issus du séquençage RAD pour évaluer la structure génétique de la population à l'intérieur de la mer Méditerranée (ouest contre est). Leurs résultats suggèrent une différenciation significative entre les cachalots de l'est et de l'ouest de la Méditerranée. La dispersion entre les cachalots de la Méditerranée et de l'Atlantique Nord n'a pas été quantifiée et l'indépendance démographique de la population méditerranéenne n'a pas été confirmée. Compte tenu de l'influence des groupes sociaux sur la différenciation génétique dans d'autres océans, les études futures devraient également évaluer si une structuration génétique à fine échelle existe au sein de la mer Méditerranée.

- Augmenter la couverture des échantillons dans les zones orientales/sud de la Méditerranée et dans les zones adjacentes de l'Atlantique Nord.
- Délimiter l'aire de répartition de la population méditerranéenne.
- Quantifier le flux génétique entre les populations de l'Atlantique Nord et de la mer Méditerranée.
- Se concentrer sur la sous-structuration locale (en relation avec les groupes sociaux/clans vocaux par exemple).

Dauphin bleu et blanc - *Stenella coeruleoalba*

La majorité des études existantes se concentrent sur des échantillons méditerranéens (principalement dans la partie occidentale du bassin), par rapport aux échantillons de l'Atlantique Nord et du Pacifique. La recherche se focalise principalement sur : (1) la diversité génétique et la structure de la population de dauphins bleu et blanc en Méditerranée (Bourret *et al.* 2007, Gaspari *et al.* 2007) ; (2) les relations sociales (Gaspari *et al.* 2007) ; (3) les modèles spatio-temporels de la diversité génétique en Méditerranée (également liés aux épidémies) (Gaspari *et al.* 2019) ; (4) la biogéographie et l'évolution temporelle de la population de dauphins bleu et blanc (Méditerranée contre Atlantique) (Gkafas *et al.* 2017). La plupart des études ont utilisé des microsatellites (de 5 à 15 *loci*) et la région de contrôle de l'ADNmt. Des études récentes suggèrent l'existence d'une sous-population distincte dans le golfe de Tarente (Italie, mer Ionienne, Ciccarese *et al.* 2019). Des lacunes subsistent principalement pour étudier la population de la Méditerranée orientale, pour concentrer les études sur les implications possibles des foyers d'épizootie et d'autres facteurs de stress potentiels dans la diversité génétique et la résilience de la population. Les études génomiques font défaut jusqu'à présent.

- Augmenter l'effort d'échantillonnage en Méditerranée orientale.
- Utiliser des marqueurs génomiques pour résoudre la structure à fine échelle.
- Se concentrer sur les implications possibles des épizooties et d'autres facteurs de stress potentiels sur la diversité génétique et la résilience des populations (transcriptomique).

Sténo – *Steno bredanensis*

Les informations sur le sténo en Méditerranée sont très limitées, en particulier en ce qui concerne l'origine génétique et la structure de la population. Sur la base d'un nombre réduit d'échantillons (3 d'Israël et un de la mer Égée, Grèce) et de l'analyse des séquences d'ADNmt, les échantillons méditerranéens semblent se regrouper fortement avec ceux de l'Atlantique. Les principales lacunes en matière de données concernent les informations générales sur la distribution et l'abondance de l'espèce, ainsi que le manque d'échantillons dans l'ensemble de la zone ACCOBAMS.

- Collecter plus d'échantillons, augmenter la couverture
- Confirmer l'origine de la population
- Générer des informations de référence pour l'échantillonnage non invasif.

Grand dauphin - *Tursiops truncatus*

Les grands dauphins de l'Atlantique Nord-Est et de la Méditerranée vivent dans une large gamme d'habitats sur l'ensemble de leur aire de répartition. Plusieurs études génétiques ont identifié dans ces zones une structuration claire de la population basée sur des microsatellites mitochondriaux (région de contrôle), nucléaires (9-25 *loci*) et des polymorphismes de nucléotides simples (~26 000 SNP) avec des échelles géographiques variables (*p. ex.*, Natoli *et al.* 2005, Louis *et al.* 2014a, Nykänen *et al.* 2019, Moura *et al.* 2020). Les populations ségrégent typiquement entre les lignées habitant les environnements pélagiques et côtiers (Louis *et al.* 2014b, Gaspari *et al.* 2015, Nykänen *et al.* 2019), la divergence estimée entre ces deux écotypes s'est probablement produite entre le Dernier Maxima Glaciaire et la période post-glaciaire (~10 320 ans AP ; Louis *et al.* 2014b). Les dauphins pélagiques de l'Atlantique et de la Méditerranée ont probablement divergé pendant une période de forte productivité en mer Méditerranée (Louis *et al.* 2014a). Dans les environnements côtiers, les populations de grands dauphins sont généralement constituées de communautés sociales distinctes qui présentent une différenciation comportementale à petite échelle, résultant d'adaptations localisées à de petites échelles spatiales qui se traduisent par une structuration génétique à petite échelle (Natoli *et al.* 2005, Fernández *et al.* 2011, Louis *et al.* 2014a, Nykänen *et al.* 2019). La structure de sa population semble être en forte corrélation avec les différences environnementales (Natoli *et al.* 2005, Louis *et al.* 2014a, b). Les données montrent des preuves d'une structure de population à fine échelle dans le bassin méditerranéen, avec une division claire de la population au sein de la mer Adriatique et de la mer Levantine (Gaspari *et al.* 2013, Gaspari *et al.* 2015).

- Inclure des échantillons de la zone ibérique et un échantillonnage hivernal.
- Intégrer des données génétiques et non génétiques.
- Voir également le CMP sur les grands dauphins.

Baleine à bec de Cuvier - *Ziphius cavirostris*

Les baleines à bec de Cuvier sont des cétacés pélagiques plongeant à grande profondeur. On les rencontre dans toute la mer Méditerranée, et elles sont confinées aux régions plus profondes du talus continental. Bien que les paramètres de l'histoire de vie des baleines à bec de Cuvier soient encore mal connus, des informations sur le comportement de plongée, les préférences d'habitat et la distribution en mer Méditerranée sont disponibles. Une grande partie des connaissances provient des données d'échouage et de l'initiative Ziphius entreprise dans le cadre de l'ACCOBAMS. L'espèce est classée comme vulnérable en Méditerranée et compte moins de 10 000 individus matures. Très peu d'analyses génétiques sont disponibles, et les analyses de l'ADNmt (300 pb) ont indiqué un degré élevé de différenciation par rapport à la population de l'Atlantique et un faible flux de gènes maternels entre les bassins océaniques. Il a été suggéré que les baleines à bec de Cuvier de la mer Méditerranée devraient être considérées comme une unité évolutivement significative distincte (ESU) des autres populations du monde. Le nombre d'échantillons en Méditerranée était très faible (n=12 Grèce + 5 de la mer Levantine et de la mer Égée) et les individus étaient caractérisés par seulement deux haplotypes ADNmt privés T3 et T4 (Dalebout *et al.* 2005, Tonay *et al.* 2019). De nouveaux marqueurs tels que le ddRAD sont testés pour évaluer la structure de la population de cette espèce (Carroll *et al.* 2016). Une nouvelle étude incluant des échantillons utilisant des SNP ddRAD nucléaires (n=33) et des mitogénomes complets (n=3) a trouvé que les échantillons de la mer Méditerranée ont les niveaux de diversité les plus bas, indiquent une contraction de la population et ont divergé de l'Atlantique Nord il y a approximativement 0,5 millions d'années (Onoufriou *et al.* 2022). Les auteurs ont également identifié une sous-structure entre les bassins oriental (à l'est de la Sicile) et occidental (mer Ligurie) qu'ils considèrent comme 2 ESU (Onoufriou *et al.* 2022).

- Augmenter la taille de l'échantillon et la couverture pour mieux comprendre la structure de la population au sein de la mer Méditerranée.

Marsouin commun de la mer Noire – *Phocoena phocoena relicta*

Les marsouins communs de la mer Noire sont fréquemment observés dans les mers d'Azov et mer Noire et dans les Détroits turcs (TSS d'après le sigle en anglais, qui comprennent la mer de Marmara et les détroits du Bosphore et des Dardanelles) et sont rarement observés dans la mer Égée. Les marsouins communs de la mer Noire se différencient morphologiquement et génétiquement de ceux de l'Atlantique. On estime que les marsouins communs de la mer Noire et de l'Atlantique Nord ont divergé il y a 7000 ans et ont suivi des voies évolutives indépendantes (Fontaine *et al.* 2010, 2014). La divergence entre les populations occidentales et orientales de la mer Méditerranée s'est probablement produite vers environ 14 000 ans AP (Fontaine *et al.* 2014). La plupart des études ont été réalisées en utilisant des séquences de la région de contrôle d'ADNmt (344-5085 pb) et des *loci* de microsatellites (10-13 *loci*) pour évaluer la structure génétique de la population, avec des échantillons provenant d'animaux échoués et capturés (Rosel *et al.* 1995, 2003, Viaud-Martinez *et al.* 2007, Fontaine *et al.* 2007, 2010, 2012, 2014, Tonay *et al.* 2012, 2017, Llavona *et al.* 2014, Lah *et al.* 2016, Uzun *et al.* 2017, 2018, Ben Chehida *et al.* 2020). En outre, des méthodes de séquençage RAD à double digestion ont été utilisées pour analyser l'ADN nucléaire (2872-4924 SNP) des marsouins de la mer Noire, avec des tailles d'échantillons allant de 3 à 102 (Lah *et al.* 2016, Uzun *et al.* 2018). La mer Noire est la source des marsouins de la mer Égée (Rosel *et al.* 2003, Viaud-Martinez *et al.* 2007, Fontaine *et al.* 2012, Tonay *et al.* 2017). Malgré l'hétérogénéité morphologique, l'homogénéité génétique trouvée dans la mer Noire et les eaux adjacentes indique une population unique (Ben Chehida *et al.* 2020). Cependant, l'existence possible de populations de marsouins communs isolées localement dans les TSS ou dans la mer d'Azov a également été suggérée (Tonay *et al.* 2017, Uzun *et al.* 2017, 2018) et pourrait être associée à des processus sélectifs impliqués dans l'adaptation locale (Ben Chehida *et al.* 2020). Fontaine *et al.* (2012) ont révélé une forte réduction de la population (~90%) qui s'est produite au cours des 50 dernières décennies, en raison des tueries massives et des prises accidentelles dans les engins de pêche. À cela s'ajoute une autre étude sur les performances de plusieurs méthodes biomoléculaires pour l'identification des espèces dans des échantillons d'os d'odontocètes vieux de 800 à 1600 ans (Biard *et al.* 2017).

- Augmenter la couverture génomique car la diversité génétique est faible.
- Évaluer les pressions de sélection/adaptation.
- Séquencer le génome entier d'échantillons modernes et anciens.
- Analyser des séries temporelles génétiques pour étudier les changements démographiques et sélectifs.
- Évaluer l'impact du conflit ukrainien sur la population de marsouins communs en mer Noire.

Dauphin commun de la mer Noire – *Delphinus delphis ponticus*

Les dauphins communs de la mer Noire sont fréquemment observés dans la mer Noire et dans les Détroits turcs (TSS d'après le sigle en anglais, qui comprennent la mer de Marmara et les détroits du Bosphore et des Dardanelles). Plusieurs études sur le dauphin commun de la mer Noire dans la région ACCOBAMS sont actuellement disponibles et se concentrent sur les différences génétiques entre les populations de l'Atlantique, de la Méditerranée et de la mer Noire. Ces études ont utilisé des séquences de la région de contrôle d'ADNmt (404-428 pb), du cytochrome b (360 pb) et des *loci* de microsatellites (9 *loci*) pour évaluer la structure génétique de la population, à partir d'échantillons d'animaux échoués (Rosel *et al.* 1994, Natoli *et al.* 2008, Tonay *et al.* 2020). Le nombre d'échantillons varie entre 4 et 37. Rosel *et al.* (1994) et Natoli *et al.* (2008) ont suggéré qu'il existe des différences entre les dauphins communs de la mer Noire et ceux de la Méditerranée, bien que la différenciation ne soit pas significative en raison du nombre réduit d'échantillons. Cependant, une telle différenciation n'a pas été observée par les analyses de l'ADN mitochondrial comparant les échantillons de la mer Méditerranée, des TSS et de la mer Noire (Tonay *et al.* 2020). Par rapport à l'océan Atlantique, les valeurs de diversité des haplotypes et des nucléotides étaient plus faibles dans la mer Noire, les TSS et la mer Méditerranée

occidentale, ce qui suggère la migration des populations atlantiques vers ces deux mers (Tonay *et al.* 2020). La protection des mers ouvertes et des détroits étroits pour améliorer la connectivité peut être cruciale pour les dauphins communs, qui ont un potentiel de dispersion élevé (Tonay *et al.* 2020). Il sera nécessaire de mener des recherches génétiques sur l'ADN nucléaire et mitochondrial avec un plus grand nombre d'échantillons afin de mieux comprendre la phylogénie et la connectivité génétique entre les sous-populations de cette espèce.

- Augmenter le nombre d'échantillons pour réévaluer la différenciation entre la mer Noire et la mer Méditerranée.
- Intégrer les échantillons existants (provenant de collections de musées par exemple) pour augmenter le nombre d'échantillons.
- Ajouter des analyses/couverture génomiques, y compris un génome de référence.
- Voir également le CMP sur les dauphins communs.

Grand dauphin de la mer Noire – *Tursiops truncatus ponticus*

Le grand dauphin de la mer Noire habite la majeure partie de la mer Noire et du système des détroits turcs (TSS, qui comprend la mer de Marmara et les détroits du Bosphore et des Dardanelles) et est observé de manière saisonnière dans la mer d'Azov. Les grands dauphins de la mer Noire sont morphologiquement différents des dauphins de la Méditerranée. Ils appartiennent à au moins deux lignées génétiques différentes originaires de la mer Méditerranée (Natoli *et al.* 2005, Viaud-Martinez *et al.* 2008, Moura *et al.* 2013) et ces groupes se sont séparés des clades méditerranéens il y a environ 10 000 ans, ce qui pourrait témoigner de deux événements de colonisation et d'un effet fondateur (Moura *et al.* 2013). En outre, la présence de ces deux lignées a été démontrée dans des échantillons d'os anciens datant de 800 à 1600 ans (Biard *et al.* 2017). Plusieurs études ont été réalisées en utilisant des séquences de la région de contrôle d'ADNmt (404-630 pb), des mitogénomes complets et des *loci* de microsatellites (9 *loci*) pour évaluer la structure génétique des populations, à partir d'échantillons d'animaux échoués et captifs (Rosel *et al.* 1994, Natoli *et al.* 2005, Viaud-Martinez *et al.* 2008), d'animaux échoués uniquement (Tonay *et al.* 2018) et d'ADNa (Biard *et al.* 2017). La diversité génétique est faible et il semblerait qu'il existe une structure à l'intérieur de la mer Noire (Moura *et al.* 2013, Tonay *et al.* 2018), ainsi qu'une dispersion des femelles et un flux génétique à partir de l'habitat marginal (Natoli *et al.* 2005, Moura *et al.* 2013). Dans l'ensemble, la différenciation de la population de grands dauphins de la mer Noire par rapport aux populations adjacentes et les faibles niveaux de diversité génétique sont cause de préoccupation en matière de conservation (Tonay *et al.* 2018).

- Augmenter l'échantillonnage dans l'ensemble du bassin de la mer Noire, en mettant l'accent sur les populations locales.
- Réaliser des analyses génomiques pour évaluer l'histoire démographique, l'origine et la relation avec les populations méditerranéennes.
- Délimiter les schémas de répartition par rapport aux zones adjacentes et le flux génétique entre les populations.
- Identifier l'origine des grands dauphins en captivité, leur relation avec les populations sauvages et élaborer des lignes directrices sur les marqueurs adaptés à l'identification individuelle.
- Voir également le CMP sur les grands dauphins.

2) Tableau résumé de la littérature scientifique existante

ESPÈCE	RÉFÉRENCE	RÉGION	OBJECTIF	TYPE D'ÉCHANTILLON	** NB D'ÉCHANTILLONS	MARQUEUR(S)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
<i>Balaenoptera physalus</i>	Bérubé <i>et al.</i> 1998	Mer Méditerranée, Atlantique Nord, mer de Cortez	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou biopsiés	74	région de contrôle d'ADNmt 288 pb 6 <i>loci</i> de microsatellites	Existence de plusieurs populations ayant récemment divergé dans l'Amérique du Nord et la Méditerranée. Flux génétiques limités entre certaines zones.
	Palsbøll <i>et al.</i> 2004	Mer Méditerranée, Atlantique Nord	Distinguer entre flux génétique récurrent et divergence récente	Réutilise les échantillons de Bérubé <i>et al.</i> 1998	72	région de contrôle d'ADNmt	Soutient un modèle de flux génétique récurrent. Taux de migration de 2 femelles par génération.
	Tardy <i>et al.</i> 2020	Mer Méditerranée	Caractérisation de nouveaux marqueurs microsatellites	Tissus provenant d'animaux échoués ou biopsiés	50	39 <i>loci</i> de microsatellites	25 nouveaux microsatellites. Amplification croisée réussie.
	Schleimer <i>et al.</i> 2021	Mer Méditerranée, Atlantique Nord	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou biopsiés	MED: 154 GIB: 53	région de contrôle d'ADNmt 450 pb 20 <i>loci</i> de microsatellites	Connectivité contemporaine entre la Méditerranée et l'Atlantique Nord. L'aire de répartition des rorquals communs de la mer Méditerranée comprend le détroit de Gibraltar. Les rorquals communs de l'Atlantique Nord ont connu une expansion démographique post-glaciaire, tandis que la population de rorquals communs de la mer Méditerranée a décliné au cours de cette période.
	Tardy 2021	Mer Méditerranée	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou biopsiés	495	29 <i>loci</i> de microsatellites région de contrôle d'ADNmt 465pb	Taille de la population : 1 300 individus. Taille effective de la population : 400-500 individus. Population composée de nombreuses familles. Pas de dépression de consanguinité.

ESPÈCE	RÉFÉRENCE	RÉGION	OBJECTIF	TYPE D'ÉCHANTILLON	** NB D'ÉCHANTILLONS	MARQUEUR(S)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Maio <i>et al.</i> 2016	Mer Méditerranée	Identifier l'origine d'un spécimen échoué	Animal échoué	1	région de contrôle d'ADNmt 343 pb	L'haplotype était identique à un haplotype de l'Atlantique Nord.
	Pastene <i>et al.</i> 2007	Mer Méditerranée	Structure génétique des populations	Animal échoué	1	région de contrôle d'ADNmt 500 pb	L'haplotype de l'unique échantillon prélevé dans la mer Méditerranée est identique à l'haplotype le plus commun de l'Atlantique Nord.
<i>Delphinus delphis</i>	Amaral <i>et al.</i> 2007	Atlantique NE	Structure génétique des populations; phylogénie au sein du genre <i>Delphinus</i>	Tissus et dents provenant d'animaux échoués	55 zone d'extension ACCOBAMS + 13 Atlantique NE	ADNmt (630 pb région de contrôle, 1121 pb cyt b)	Preuve d'une structure de population basée sur le sexe dans l'Atlantique NE. Quelques groupes très divergents dans la Péninsule ibérique.
	Natoli <i>et al.</i> 2008	Mer Méditerranée et Atlantique ENE.	Structure génétique des populations en mer Méditerranée et flux génétiques avec les populations Atlantique.	Tissus provenant d'animaux échoués ou biopsiés	53 MED + 5 mer Noire + 47 zone d'extension ACCOBAMS	9 <i>loci</i> de microsatellites + région de contrôle d'ADNmt (428pb)	Faible différenciation de la population entre l'est et l'ouest de la Méditerranée. La direction des flux génétiques suggère des mouvements de femelles hors de la Méditerranée. Possible isolement de la population de la mer Noire par rapport à celle de la Méditerranée (nombre d'échantillons limité).
	Moura <i>et al.</i> 2013	Eaux européennes et mer Méditerranée	Structure génétique des populations en Europe	Tissus provenant d'animaux échoués, biopsiés ou de captures accidentelles	515 (253 zone d'extension ACCOBAMS, 17 Gibraltar, 26 MED)	15 <i>loci</i> de microsatellites	Panmixie dans la majorité de l'aire de répartition. La mer Méditerranée orientale (Grèce) est différenciée du reste.
	Ball <i>et al.</i> 2017	Portugal	Structure des relations de parenté	Animaux biopsiés	204 Portugal	15 <i>loci</i> de microsatellites	Des groupes de proches parents ont été trouvés dans la même zone, ce qui suggère un certain degré de fidélité locale.
	Lee <i>et al.</i> 2018	-	Rapporte le mitogénome complet du dauphin commun	Tissus provenant de captures accidentelles	1	16386 pb d'ADNmt (mitogénome complet)	La phylogénie multigénique a révélé que <i>D. delphis</i> est le parent le plus proche de <i>S. coeruleoalba</i> .

ESPÈCE	RÉFÉRENCE	RÉGION	OBJECTIF	TYPE D'ÉCHANTILLON	** NB D'ÉCHANTILLONS	MARQUEUR(S)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
<i>Globicephala melas</i>	Miralles <i>et al.</i> 2013	Global	Hybridation interspécifique chez les globicéphales spp.	Tissus provenant d'animaux échoués, biopsiés et de spécimens de musées	7 zone d'extension ACCOBAMS + 50 Atl NE	8 loci de microsatellites + région de contrôle d'ADNmt (703 pb)	L'hybridation introgressive, les augmentations de température actuelles et la faible variation génétique chez <i>G. melas</i> suggèrent que cette espèce pourrait être menacée au nord de son aire de répartition.
	Monteiro <i>et al.</i> 2015	Atlantique Nord	Différentiation de populations dans l'Atlantique Nord	Peau provenant d'animaux échoués	32 zone d'extension ACCOBAMS (+ 134 de l'Atlantique Nord)	région de contrôle d'ADNmt (400 pb) (+ acides gras et isotopes stable)	Niveaux de différenciation élevés et significatifs dans l'Atlantique NE. 3 haplotypes dans la zone d'extension ACCOBAMS (6 au total dans l'Atlantique Nord).
	Monteiro <i>et al.</i> 2016	Atlantique Nord	Différentiation de populations dans l'Atlantique Nord	Peau provenant d'animaux échoués	119 de l'Atlantique Nord, dont 26 de la zone d'extension ACCOBAMS	gènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (MHC DRA et DQB)	Différenciation significative entre zone d'extension ACCOBAMS et le reste de l'Atlantique Nord.
	Verborgh 2015, Verborgh <i>et al.</i> 2016	Atlantique Nord + mer Méditerranée	Structure des populations	Peau provenant d'animaux échoués ou biopsiés	Détroit de Gibraltar (90), mer Méditerranée (80 = 65 Alboran + 15 Ligure), zone d'extension ACCOBAMS (50) + Atlantique NE (28)	11 loci de microsatellites + région de contrôle d'ADNmt (800 pb)	La diversité est plus faible dans MED/GIB. 4 sous-populations : 1 détroit de Gibraltar + 1 Méditerranée intérieure (sous-structure possible entre Alboran et Ligure) + 2 Atlantique NE.
	Kraft <i>et al.</i> 2020	Global	Phylogéographie mondiale et diversité génétique	Réutilise les échantillons d'études existantes (notamment Monteiro 2013 et Verborgh 2015)	Tous les échantillons de Monteiro <i>et al.</i> 2015, 2016, Verborgh <i>et al.</i> 2016	15 loci de microsatellites + région de contrôle d'ADNmt (345 pb)	- La diversité des haplotypes est très faible, 7 haplotypes ont été décrits dans l'ensemble de l'océan Atlantique Nord et 15 dans le monde entier. - La divergence entre les populations des deux hémisphères suggère qu'elles devraient être considérées comme des Populations démographiquement indépendantes.

ESPÈCE	RÉFÉRENCE	RÉGION	OBJECTIF	TYPE D'ÉCHANTILLON	** NB D'ÉCHANTILLONS	MARQUEUR(S)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
<i>Grampus griseus</i>	Gaspari <i>et al.</i> 2004	Mer Ligure et mer Méditerranée	Différenciation entre les populations de l'Atlantique Nord et de la mer Méditerranée. Relations de parenté individuelle entre les groupes	Peau provenant d'animaux biopsiés (24) ou échoués (6)	30	Microsatellites Analyses de diversité génétique	La population de mer Méditerranée montre un niveau de variabilité plus élevé que la population de l'Atlantique NE.
	Gaspari <i>et al.</i> 2007	Mer Ligure et mer Méditerranée	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou biopsiés	33	Microsatellites Analyses de diversité génétique	Diversité génétique élevée.
	Sönmez <i>et al.</i> 2012	Türkyie	Structure génétique de l'individu	Muscle	1	ADNr mitochondrial 16S	Alignement d'une longueur de 529 pb du 16S .
<i>Orcinus orca</i>	Foote <i>et al.</i> 2011	Détroit de Gibraltar (+ mer du Nord)	Caractérisation de la structure des populations d'orques de l'Atlantique Nord	Peau provenant d'animaux biopsiés (10) + échoué (1)	11	région de contrôle d'ADNmt (989 pb) + mitogenomes complets (~16,390-pb) et partiels (12 814-14 689 pb) + 17 <i>loci</i> de microsatellites	La spécialisation en fonction des ressources entraîne une différenciation génétique en l'absence de barrières physiques aux flux de gènes.
	Esteban <i>et al.</i> 2016	Détroit de Gibraltar (+ Iles Canaries)	Évaluer le niveau de flux génétique et les différences écologiques entre les populations SoG et CI	Peau provenant d'animaux biopsiés (11) + échoué (1)	12	région de contrôle d'ADNmt (989-pb) + mitogenomes complets (~16,390-pb) pour une partie des individus + 19 <i>loci</i> de microsatellites	Haplotype spécifique à chaque groupe social, faible flux génétique entre les populations SoG et CI, différences écologiques.
	Foote <i>et al.</i> 2019	Détroit de Gibraltar (+ global)	Structure de la population mondiale	Peau provenant d'animaux biopsiés	1	WGS	Homogénéisation génétique aux basses latitudes et plus grande différenciation aux hautes latitudes.

ESPÈCE	RÉFÉRENCE	RÉGION	OBJECTIF	TYPE D'ÉCHANTILLON	** NB D'ÉCHANTILLONS	MARQUEUR(S)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
<i>Phocoena phocoena</i>	Fontaine <i>et al.</i> 2007 (BMC Biol)	Mer Noire + Péninsule ibérique (+ eaux européennes/nordiques)	Structure génétique + génétique du paysage en milieu marin	Peau / muscle / autres échantillons (échouages / captures accidentelles)	752 (78 mer Noire; 30 Péninsule ibérique; 642 eaux européennes/nordiques)	10 <i>loci</i> de microsatellites	Trois groupes génétiques principaux, la mer Noire étant un groupe génétiquement bien distinct et homogène. Les caractéristiques du milieu marin ont un impact sur la dispersion des individus, avec un isolement par la distance, mais pas en mer Noire.
	Fontaine <i>et al.</i> 2012 (PNAS)	Mer Noire (BS) + mer de Marmara (MS) + mer Égée Nord (AeS)	Structure génétique + histoire démographique/phylogéographique	Peau / muscle / autres échantillons (échouages / captures accidentelles)	89 (75 BS, 11 AeS, 3 MS)	10 <i>loci</i> de microsatellites + région de contrôle d'ADNmt	Homogénéité génétique entre BS, MS et AeS ; Effet fondateur il y a ~7000 ans lors de l'ouverture entre BS et Méditerranée ; Signal génétique de déclin de 90% de la population, cohérent avec les estimations de chasse jusqu'aux années 1980.
	Fontaine <i>et al.</i> 2014 (Mol Ecol)	Péninsule ibérique + Afrique NO + mer Noire	Histoire phylogéographique et isolement des écotypes/sous-espèces	Muscle / os / dents / peau	78 Mer Noire + 31 Péninsule ibérique + 15 Afrique NO	10 <i>loci</i> de microsatellites + ¼ du mitogénome	Identification de trois groupes génétiquement bien distincts et aussi divergents correspondant aux sous-espèces décrites <i>P. p. relictæ</i> et <i>P. p. phocoena</i> et d'une nouvelle lignée de sous-espèces non nommée possiblement <i>P. p. meridionalis</i> en Péninsule ibérique et en Afrique du NO. Divergence au cours du DMG liée aux populations paléo-méditerranéennes de marsouins communs.
	Ben Chehida <i>et al.</i> 2020 (Heredity)	Mer Noire (BS) + mer d'Azov (AzS) + mer de Marmara (MS) + mer Égée (AeS)	Relations entre structure génétique et hétérogénéité morphologique	Peau / muscle à partir d'échouages et de captures accidentelles	144 (87 BS, 11 AeS, 3 MS, 32 AzS)	10 <i>loci</i> de microsatellites + ¼ du mitogénome	Aucune structure génétique détectée, même en tenant compte de l'hétérogénéité morphologique documentée entre BS et AzS. La modélisation montre que les analyses avaient une puissance suffisante. La modélisation montre qu'une sous-structure peut encore être possible, en supposant un décalage entre la démographie et la génétique, ou si les différences phénotypiques sont dues à la sélection naturelle impliquant des marqueurs génétiques non neutres qui n'ont pas été échantillonnés dans le cadre de l'étude.

ESPÈCE	RÉFÉRENCE	RÉGION	OBJECTIF	TYPE D'ÉCHANTILLON	** NB D'ÉCHANTILLONS	MARQUEUR(S)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
<i>Physeter macrocephalus</i>	Drouot <i>et al.</i> 2004	Atlantique NE et mer Méditerranée (mer Tyrrhénienne, mer Ionienne, bassin nordoccidental, mer des Baléares)	Différenciation génétique entre Atlantique Nord et Mer Méditerranée	Squames de MED, tissus provenant d'animaux échoués en Atlantique Nord	13 (MED)	région de contrôle d'ADNmt (200 pb), 3 <i>loci</i> de microsatellites	Fréquence différente des haplotypes mitochondriaux entre MED et Atlantique Nord.
	Engelhaupt <i>et al.</i> 2009	Golfe du Mexique, Atlantique Nord, mer du Nord et mer Méditerranée	Tester l'hypothèse selon laquelle les bassins côtiers représentent des pools génétiques isolés d'unités sociales matrifocales	Biopsies et squames	44 (MED)	région de contrôle d'ADNmt (399 pb), 16 <i>loci</i> de microsatellites	Pas de diversité mitochondriale dans la région MED ; différenciation significative entre la région MED et les autres régions pour les marqueurs mitochondriaux et microsatellites.
	Alexander <i>et al.</i> 2016	Global; océan Pacifique, Indien, Atlantique, mer Méditerranée	Relations entre expansion de la population et faible diversité de l'ADNmt ; influence des régions géographiques et des groupes sociaux sur la structure génétique	Mix; réutilise les échantillons de MED de Engelhaupt <i>et al.</i> 2009	40 (MED)	région de contrôle d'ADNmt (394 pb), 13 <i>loci</i> de microsatellites	La faible diversité de l'ADNmt résulte probablement de l'expansion récente de la population ; différenciation entre les groupes sociaux et entre les régions géographiques dans certains océans.
	Morin <i>et al.</i> 2018	Global; océans Pacifique, Indien et Atlantique, mer Méditerranée	Comprendre quels mécanismes (démographie/ sélection) contribuent à la faible diversité de l'ADNmt	Tissus provenant d'animaux échoués ou biopsiés	4 (MED NO)	Mitogénomes	Haplotypes du mitogénome spécifiques à chaque bassin océanique ; 2 haplotypes en MED ; expansion de la population et divergence des bassins océaniques depuis la dernière période interglaciaire.

ESPÈCE	RÉFÉRENCE	RÉGION	OBJECTIF	TYPE D'ÉCHANTILLON	** NB D'ÉCHANTILLONS	MARQUEUR(S)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
<i>Physeter macrocephalus</i>	Violi <i>et al.</i> 2023	Mer Méditerranée (Est + Ouest) et Atlantique NE	Structure des populations, démographie, flux de gènes, liens de parenté au sein de la mer Méditerranée	Tissus provenant d'animaux échoués ou biopsiés	116 MED (34 Est; 82 Ouest)	5000-10,000 <i>loci</i> SNP (RADseq)	Fondation récente de la population MED, autour du DMG ; différenciation entre les populations MED de l'Est et de l'Ouest.
<i>Stenella coeruleoalba</i>	Bourret <i>et al.</i> 2007	Mer Méditerranée centrale et occidentale; Atlantique Nord; Pacifique Nord (groupe externe)	Différenciation génétique et niveaux de diversité génétique	Muscle, peau, lard, foie ou rein d'animaux échoués	78 (MED)	5 <i>loci</i> de microsatellites	La population de mer Méditerranée a montré les plus faibles richesses allélique et hétérozygotie attendue. Diversité génétique nucléaire plus élevée dans l'Atlantique qu'en Méditerranée.
	Gaspari <i>et al.</i> 2007	Mer Méditerranée centrale et occidentale; Atlantique NE;	Associations sociales et structuration génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou biopsiés (muscle, peau, foie et cœur)	149 (MED)	8 <i>loci</i> de microsatellites	<ul style="list-style-type: none"> - Différenciation entre MED et Atlantique Nord. - Différences sur de petites échelles géographiques au sein de la région MED et de la mer Ligure entre la zone côtière et la zone hauturière. - La structure de la parenté (pop. Ligure) : association plus importante chez les femelles que chez les mâles.
	Gkafas <i>et al.</i> 2017	Atlantique NE et Mer Méditerranée	Structure génétique des populations pour identifier les causes de la divergence génétique, l'effet des changements climatiques passés sur la démographie et la connectivité des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou de captures accidentelles. Peau et muscle	140	20 <i>loci</i> de microsatellites	Flux génétique directionnel du NE vers le sud et l'ouest dans l'Atlantique Nord, et de l'ouest vers l'est en mer Méditerranée. Division entre les populations de l'Atlantique Nord et de la mer Méditerranée au cours du Pléistocène moyen, et au sein de la mer Méditerranée entre les bassins est et ouest vers la fin du Pléistocène.

ESPÈCE	RÉFÉRENCE	RÉGION	OBJECTIF	TYPE D'ÉCHANTILLON	** NB D'ÉCHANTILLONS	MARQUEUR(S)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
<i>Stenella coeruleoalba</i>	Gaspari <i>et al.</i> 2019	Mer Méditerranée	Modèles spatio-temporels de diversité génétique dans la Mer Méditerranée	Tissus provenant d'animaux échoués ou biopsiés	368	région de contrôle d'ADNmt (919 pb) and 15 <i>loci</i> de microsatellites	Faible différenciation géographique en MED (expansion récente). Fluctuations cycliques de la composition génétique, qui correspondent à des épizooties récurrentes de morbillivirus.
	Ciccarese <i>et al.</i> 2019	Golfe de Tarante (mer Ionienne)	Différenciation locale d'une sous-population	Écouvillonnage de peau	25	cytochrome b d'ADNmt (421 pb)	Diversité nucléotidique et hétérogénéité élevées dans les échantillons du golfe de Tarente. 2 lignées distinctes en MED, dont une spécifique au golfe de Tarente.
<i>Steno bredanensis</i>	Kerem <i>et al.</i> 2016	Atlantique NE (Iles Canaries) + mer Méditerranée orientale (Israël)	Déterminer la structure génétique et l'origine de la population de mer Méditerranée	Peau provenant d'animaux échoués	3 MED (+6 Iles Canaries)	région de contrôle d'ADNmt (450 pb)	Forte évidence d'une origine Atlantique de la population MED. Population MED basale au sein du cluster Atlantique. 9 échantillons, 9 haplotypes.
	Albertson <i>et al.</i> 2022	Global	Décrire la phylogéographie mondiale	Peau et dents provenant d'animaux échoués, biopsiés ou de captures accidentelles	3 MED (réutilisent ceux de Kerem <i>et al.</i> 2016) + 333 globally	région de contrôle d'ADNmt (n = 360), mitogénomes (n = 19), et 6 introns nucléaires (n = 35)	Les échantillons de mer Méditerranée sont clairement groupés avec les séquences de l'Atlantique.
	Kommenou <i>et al.</i> 2022 (ECS)	Mer Égée, Grèce	Étude de cas sur un individu vivant échoué	Peau?	1	région de contrôle d'ADNmt et gène Cox1	Close proximité avec les haplotypes de l'Atlantique.
<i>Tursiops truncatus</i>	Natoli <i>et al.</i> 2004	Atlantique NE, mer Méditerranée et autres	Structure à petite échelle de la population de l'Atlantique Nord	Peau provenant d'animaux échoués, biopsiés ou de captures accidentelles	27 NE Atlantique 45 Mer Méditerranée	région de contrôle d'ADNmt (297 pb); 9 <i>loci</i> de microsatellites	Différenciation significative des populations suggérant un flux génétique restreint pour les mâles et les femelles. Différenciation entre les populations côtières et pélagiques.

ESPÈCE	RÉFÉRENCE	RÉGION	OBJECTIF	TYPE D'ÉCHANTILLON	** NB D'ÉCHANTILLONS	MARQUEUR(S)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
<i>Tursiops truncatus</i>	Natoli <i>et al.</i> 2005	Atlantique NE, mer Méditerranée et mer Noire	Structure des populations à grande et petite échelle et flux de gènes	Peau provenant d'animaux échoués, biopsiés ou d'écouvillonnage	35 zone d'extension ACCOBAMS; 42 MED Ouest; 32 MED Est; 16 mer Noire	région de contrôle d'ADNmt (630 pb); 9 <i>loci</i> de microsatellites	Structure de population claire sur l'ensemble de la zone géographique. Forte différenciation entre MED et mer Noire.
	Fernández <i>et al.</i> 2011	Péninsule ibérique	Structure de population à petite échelle	Tissus provenant d'animaux échoués, biopsiés ou de captures accidentelles	60 Espagne (Galice; Pays basque et Iles Canaries) 31 Portugal (continental, Sado et Açores)	région de contrôle d'ADNmt (549 pb); 10 <i>loci</i> de microsatellites	Différenciation à petite échelle entre la population résidente (Sud Galice et Sado) et les autres régions.
	Moura <i>et al.</i> 2013	Global; mer Méditerranée; mer Noire	Différenciation des populations et analyse phylogénétique	Tissus provenant d'animaux échoués ou biopsiés	8 Atlantique NE 10 MED 10 mer Noire	75 mitogénomes complets	La population côtière est différente de la population pélagique de l'Atlantique NE. Le rayonnement dans les environnements pélagiques est récent et a probablement été suivi d'un retour à l'habitat côtier.
	Louis <i>et al.</i> 2014a	Atlantique NE et mer Méditerranée	Structure des populations	Tissus de peau provenant d'animaux échoués, biopsiés ou de captures accidentelles	405 (~52 MED; Galice, Gibraltar/ Cadiz)	région de contrôle d'ADNmt (682 pb); 25 <i>loci</i> de microsatellites	Structure de population claire entre les populations côtières et pélagiques ; Structure de population à petite échelle au sein de ces groupes. Différenciation entre les populations de l'Atlantique et de la mer Méditerranée.
	Louis <i>et al.</i> 2014b	Atlantique NE et Mer Méditerranée	Structure de la population ; différenciation des écotypes, histoire démographique	Tissus de peau provenant d'animaux échoués ou biopsiés	405 (~52 from MED; Galice, Gibraltar/Cadiz)	région de contrôle d'ADNmt (682 pb); 25 <i>loci</i> de microsatellites	Les populations côtières ont probablement été fondées par la population pélagique de l'Atlantique après le DMG. Les dauphins pélagiques de l'Atlantique et de MED ont probablement divergé au cours d'une période de forte productivité dans la MED.
	Gaspari <i>et al.</i> 2015a	Mer Méditerranée	Différenciation génétique et dispersion	Tissus de peau provenant d'animaux échoués ou biopsiés	89 MED (63 mer Adriatique, 6 mer Ionienne; 6 mer Égée; 14 mer Tyrrhénienne)	région de contrôle d'ADNmt (920 pb); 12 <i>loci</i> de microsatellites	Différence génétique entre toutes les populations. Structure à petite échelle des populations dans l'Adriatique. Flux génétique important de la partie nord de l'Adriatique vers les eaux adjacentes.

ESPÈCE	RÉFÉRENCE	RÉGION	OBJECTIF	TYPE D'ÉCHANTILLON	** NB D'ÉCHANTILLONS	MARQUEUR(S)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
<i>Tursiops truncatus</i>	Gaspari <i>et al.</i> 2015b	Mer Méditerranée	Phylogéographie de la structure des populations de mer Méditerranée	Tissus de peau provenant d'animaux échoués ou biopsiés	194 MED (87 mer Adriatique; 10 mer Égée; 16 mer Tyrrhénienne; 14 mer Ionienne; 68 bassin Levantin)	région de contrôle d'ADNmt (920 pb); 12 <i>loci</i> de microsatellites	Différence génétique entre les populations pélagiques et côtières. Division des populations à petite échelle dans la mer Adriatique Adriatique et du bassin Levantin.
	Gonzalvo <i>et al.</i> 2016	Mer Méditerranée (golfe d'Ambracia)	Différenciation génétique des grands dauphins dans le golfe d'Ambracia	Tissus de peau provenant d'animaux échoués ou biopsiés ou d'écouvillonnage	19 golfe d'Ambracia	région de contrôle d'ADNmt (442 pb)	Haplotypes uniques et faible diversité génétique pour la population du golfe d'Ambracia. Différenciation entre cette population et les autres.
	Brotons <i>et al.</i> 2019	Mer Méditerranée (Iles Baléares)	Structure de la population autour des Iles Baléares	Tissus de peau provenant d'animaux échoués ou biopsiés	50 samples (26 Gymnésies; 22 Pityuses; 9 Comunité Valencienne)	région de contrôle d'ADNmt (660 pb) 11 <i>loci</i> de microsatellites	Différenciation génétique entre les îles Baléares et la Péninsule.
	Nykanen <i>et al.</i> 2019	Atlantique NE	Structure des populations à petite échelle et connectivité	Tissus de peau provenant d'animaux échoués ou biopsiés	33 Gibraltar/Cadiz 33 Nord de l'Espagne (Galice)	14 <i>loci</i> de microsatellites	Structure de populations à petite échelle pour les populations côtières, faibles niveaux de connectivité entre ces populations.
	Moura <i>et al.</i> 2020	Global, dont mer Méditerranée et mer Noire	Relations phylogénétiques du genre <i>Tursiops</i>	Tissus de peau provenant d'animaux échoués, biopsiés ou de captures accidentelles	8 Atlantique NE 10 MED 10 mer Noire	marqueurs RAD seq (26720 SNPs)	Monophylie pour le genre <i>Tursiops</i> ; flux génétique important entre les écotypes côtiers et pélagiques européens. Différence entre Atlantique pélagique et MED + mer Noire mais avec un certain flux génétique entre eux.
<i>Ziphius cavirostris</i>	Carroll <i>et al.</i> 2016	Mer Ligure (1), Iles Canaries (2), Écosse (1)	Évaluer l'utilité du séquençage ddRAD pour l'identification de SNP spécifiques dans le cadre d'études écologiques et évolutives	Peau provenant d'animaux biopsiés	04	marqueurs ddRAD	10000 <i>loci</i> seraient suffisants pour détecter la structure de la population. Toutefois, des analyses supplémentaires sont nécessaires.

ESPÈCE	RÉFÉRENCE	RÉGION	OBJECTIF	TYPE D'ÉCHANTILLON	** NB D'ÉCHANTILLONS	MARQUEUR(S)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
<i>Ziphius cavirostris</i>	Dalebout <i>et al.</i> 2005	Mer Méditerranée: Grèce + Croatie (+Atlantique Nord, hémisphère Sud, Pacifique Nord)	Phylogéographie	Tissus provenant d'animaux échoués	12 Grèce + 2 Croatie	région de contrôle d'ADNmt (300 pb)	Forte structure phylogéographique entre les bassins océaniques, la population de la mer Méditerranée étant isolée (deux haplotypes privés T3 & T4). Les <i>Ziphius</i> de la Mer Méditerranée doivent être considérés comme une unité évolutivement significative (ESU) distincte.
	Tonay <i>et al.</i> 2019	Mer Égée, mer Méditerranée orientale	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués	5	région de contrôle d'ADNmt (444 pb) cytochrome b (424 pb)	Les haplotypes de la région de contrôle étaient identiques à deux haplotypes précédemment identifiés dans les mers Ionienne (Grèce) et Adriatique (Croatie).
	Onoufriou <i>et al.</i> 2022	Mer Méditerranée (bassin oriental + mer Ligure) ; Global	Phylogéographie et structure génomique des populations	Tissus de peau provenant d'animaux échoués ou biopsiés	SNPs : 33 (19 Ouest + 14 Est) ADNmt: 3	30479 SNPs mitogénome complet (15219 pb) région de contrôle d'ADNmt (860 pb)	Forte structure phylogéographique entre les bassins océaniques. Les populations de la mer Méditerranée ont divergé il y a 0,5 millions d'années de l'océan Atlantique. MED occ. et MED orientale doivent être considérés comme une unité évolutivement significative (ESU) distincte.
<i>Delphinus delphis ponticus</i>	Biard <i>et al.</i> 2017	Mer Noire	Performance de trois méthodes biomoléculaires pour l'identification des espèces dans un assemblage mixte d'échantillons d'os d'odontocètes datant de 800 à 1600 ans	Matériel zooarchéologique excavé	10	cytochrome b (43 pb); mitogénome complet (72-100% couverture)	<ul style="list-style-type: none"> - Obtention des premières données sur le mitogénome. - La combinaison de ZooMS, de l'ADNmt et du séquençage shotgun constitue un outil puissant pour l'identification des espèces dans le cadre de l'ADNa/ADNe.

ESPÈCE	RÉFÉRENCE	RÉGION	OBJECTIF	TYPE D'ÉCHANTILLON	** NB D'ÉCHANTILLONS	MARQUEUR(S)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
<i>Delphinus delphis ponticus</i>	Rosel <i>et al.</i> 1994	Mer Noire	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués	4	région de contrôle d'ADNmt (404pb), cytochrome b (360pb)	Différenciation génétique entre les populations de mer Noire, Californie et du Pacifique.
	Natoli <i>et al.</i> 2008	Mer Noire	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués	5	région de contrôle d'ADNmt (428 pb) 9 loci de microsatellites	Suggère l'isolement de la population MED.
	Tonay <i>et al.</i> 2020	Mer Noire, Détroits turcs (TSS), mer Égée	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués	17+19*+1	région de contrôle d'ADNmt (428 pb)	<ul style="list-style-type: none"> - Différenciation observée entre l'océan Atlantique et la MED, les TSS et la mer Noire mais pas entre MED et la mer Noire. - Événements de colonisation multidirectionnelle de la MED à partir de l'océan Atlantique NE.
<i>Tursiops truncatus ponticus</i>	Biard <i>et al.</i> 2017	Mer Noire	Performance de trois méthodes biomoléculaires pour l'identification des espèces dans un assemblage mixte d'échantillons d'os d'odontocètes datant de 800 à 1600 ans	Matériel zooarchéologique excavé	11	Cytochrome b (43 pb); mitogénome complet (72-100% couverture)	<ul style="list-style-type: none"> - Des haplotypes anciens sont présents dans la population moderne - La combinaison de ZooMS, de l'ADNmt et du séquençage shotgun constitue un outil puissant pour l'identification des espèces dans le cadre de l'ADNa/ADNe.
	Moura <i>et al.</i> 2013	Mer Noire, mer Méditerranée	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués, ou biopsiés, scrub sampling	10 + 10 (réutilisés de Natoli <i>et al.</i> 2005)	mitogénome complet (16386 pb)	Séparation entre la mer Méditerranée orientale et la mer Noire visible dans deux lignées indépendantes, toutes deux séparées des clades de la mer Méditerranée il y a environ 10 000 ans.

ESPÈCE	RÉFÉRENCE	RÉGION	OBJECTIF	TYPE D'ÉCHANTILLON	** NB D'ÉCHANTILLONS	MARQUEUR(S)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
<i>Tursiops truncatus ponticus</i>	Natoli <i>et al.</i> 2005	Mer Noire, mer Méditerranée	Structure génétique des populations, ségrégation sexuelle	Tissus provenant d'animaux échoués, biopsiés, ou d'écouvillonnage	16+74	région de contrôle d'ADNmt (630 pb) 9 <i>loci</i> de microsatellites	- Deux lignées isolées dans la mer Noire montrant l'effet fondateur. - Effet directionnel du flux de gènes, suggérant l'émigration des femelles.
<i>Phocoena phocoena relicta</i>	Tonay <i>et al.</i> 2018	Mer Noire, TSS, mer Égée, mer Méditerranée	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués	31+31*+7+5	ADNmt	La différenciation de la population de grands dauphins de mer Noire par rapport aux populations adjacentes et les faibles niveaux de diversité génétique indiquent un problème de conservation.
<i>Tursiops truncatus ponticus</i>	Viaud-Martinez <i>et al.</i> 2008	Mer Noire, mer Méditerranée	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués, biopsiés, ou d'écouvillonnage	43+31 (partiellement réutilisés de Natoli <i>et al.</i> 2005)	région de contrôle d'ADNmt (442 pb)	Faible diversité génétique dans la mer Noire, associée à une différenciation importante et à quelques haplotypes partagés.
	Ben Chehida <i>et al.</i> 2020	Mer Noire, mer d'Azov	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués	55	région de contrôle d'ADNmt (3904 pb) 10 <i>loci</i> de microsatellites	Homogénéité génétique des marsouins de la mer Noire au niveau de l'ADNmt et des microsatellites, malgré une hétérogénéité morphologique.
	Biard <i>et al.</i> 2017	Mer Noire	Performance de trois méthodes biomoléculaires pour l'identification des espèces dans un assemblage mixte d'échantillons d'os d'odontocètes datant de 800 à 1600 ans	Matériel zooarchéologique excavé	10	cytochrome B (43 pb); mitogénome complet (72-100% couverture)	- Des haplotypes anciens sont présents dans la population moderne. - La combinaison de ZooMS, de l'ADNmt et du séquençage shotgun constitue un outil puissant pour l'identification des espèces dans le cadre de l'ADNa/ADNe.
	Fontaine <i>et al.</i> 2007	Mer Noire, mer de Marmara	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou de captures accidentelles	75+3*	10 <i>loci</i> de microsatellites	De fortes barrières au flux génétique ont été détectées dans la partie sud-est de l'aire de répartition.

ESPÈCE	RÉFÉRENCE	RÉGION	OBJECTIF	TYPE D'ÉCHANTILLON	** NB D'ÉCHANTILLONS	MARQUEUR(S)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
<i>Tursiops truncatus ponticus</i>	Biard <i>et al.</i> 2017	Mer Noire	Performance de trois méthodes biomoléculaires pour l'identification des espèces dans un assemblage mixte d'échantillons d'os d'odontocètes datant de 800 à 1600 ans	Matériel zooarchéologique excavé	10	cytochrome B (43 pb); mitogénome complet (72-100% couverture)	- Des haplotypes anciens sont présents dans la population moderne.
	Fontaine <i>et al.</i> 2007	Mer Noire, mer de Marmara	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou de captures accidentelles	75+3*	10 <i>loci</i> de microsatellites	De fortes barrières au flux génétique ont été détectées dans la partie sud-est de l'aire de répartition. - La combinaison de ZooMS, de l'ADNmt et du séquençage shotgun constitue un outil puissant pour l'identification des espèces dans le cadre de l'ADNa/ADNe.
	Fontaine <i>et al.</i> 2010	Mer Noire, mer de Marmara	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou de captures accessoires	75+3* (réutilisés de Fontaine <i>et al.</i> 2007)	10 <i>loci</i> de microsatellites	Les marsouins de la mer Noire et de l'Atlantique Nord ont divergé au cours des 7 000 dernières années.
	Fontaine <i>et al.</i> 2012	Mer Noire, mer de Marmara, mer Égée	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou de captures accessoires	75+3*+11 (réutilisés de Fontaine <i>et al.</i> 2007, 2010 sauf ceux de mer Égée)	région de contrôle d'ADNmt (705 pb) 10 <i>loci</i> de microsatellites	Forte réduction de la population (~90%) au cours des cinq dernières décennies, en raison d'une tuerie massive et de captures accessoires.
	Fontaine <i>et al.</i> 2014	Mer Noire, mer de Marmara	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou de captures accessoires	75+3* (réutilisés de Fontaine <i>et al.</i> 2007, 2010)	région de contrôle d'ADNmt (5085 pb), 10 <i>loci</i> de microsatellites	La divergence entre les populations occidentales et orientales de la mer Méditerranée s'est probablement produite pendant la période postglaciaire, vers environ 14 000 AP.

ESPÈCE	RÉFÉRENCE	RÉGION	OBJECTIF	TYPE D'ÉCHANTILLON	** NB D'ÉCHANTILLONS	MARQUEUR(S)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
<i>Tursiops truncatus ponticus</i>	Lah <i>et al.</i> 2016	Mer Noire	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou de captures accessoires	4	ddRAD - 2872 SNPs, 13 <i>loci</i> de microsatellites, région de contrôle d'ADNmt (414 pb)	Les marsouins de la mer Noire sont plus clairement séparés sur la base de marqueurs nucléaires ainsi que de marqueurs mitochondriaux privés et divergents.
	Llavona <i>et al.</i> 2014	Mer Noire	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou de captures accessoires	16	10 <i>loci</i> de microsatellites	La mer Égée, de Marmara et mer Noire semblent former un groupe distinct.
	Rosel <i>et al.</i> 1995	Mer Noire	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou de captures accessoires	9	région de contrôle d'ADNmt (394 pb)	Aucun haplotype commun n'a été trouvé entre les trois bassins océaniques, et la divergence de séquence estimée entre ceux-ci était élevée.
	Rosel <i>et al.</i> 2003	Mer Égée	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués	2	région de contrôle d'ADNmt (344 pb)	Déplacement des marsouins de la mer Noire vers la mer Égée.
	Tonay <i>et al.</i> 2012	Mer Noire, mer de Marmara, mer Égée	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou de captures accessoires	1+1*+1	région de contrôle d'ADNmt (364 pb)	Possibilité d'un groupe isolé dans les TSS.
	Tonay <i>et al.</i> 2017	Mer Noire, TSS, mer Égée	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou de captures accessoires	58+11*+1	région de contrôle d'ADNmt (358 pb)	Les marsouins de mer Noire se sont dispersés dans la mer Égée à travers les TSS. Possibilité d'un groupe isolé dans les TSS.
	Uzun <i>et al.</i> 2017	Mer Noire, TSS, mer Égée	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou de captures accessoires	57+15*+2	région de contrôle d'ADNmt (364 pb)	Possibilité d'un groupe isolé dans les TSS.
	Uzun <i>et al.</i> 2018	Mer Noire, TSS, mer Égée	Structure génétique des populations	Tissus provenant d'animaux échoués ou de captures accessoires	37+17*+1	ddRAD 4924 SNPs	Diversité génétique la plus élevée dans la mer Noire occidentale et les TSS, possibilité d'un groupe isolé dans les TSS.

ESPÈCE	RÉFÉRENCE	RÉGION	OBJECTIF	TYPE D'ÉCHANTILLON	** NB D'ÉCHANTILLONS	MARQUEUR(S)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
<i>Tursiops truncatus ponticus</i>	Viaud-Martinez et al. 2007	Mer Noire, mer de Marmara, mer Égée, proximité de Gibraltar	Évaluer le degré de différenciation morphologique et génétique	Tissus provenant d'animaux échoués ou de captures accessoires	95+3*+4+4	région de contrôle d'ADNmt (364 pb)	Sous-espèce <i>P. p. relicta</i> génétiquement différenciée et reconnue.

*Le système des Détroits turcs (TSS d'après le sigle en anglais, qui comprend la mer de Marmara et les détroits du Bosphore et des Dardanelles) n'est pas dans la zone ACCOBAMS. **Nombre d'échantillons inclus dans la zone ACCOBAMS



03) Liste de références relative aux résumés des espèces

Albertson, G. R., Alexander, A., Archer, F. I., Caballero, S., Martien, K. K., Hemery, L. G., Baird, R. W., Oremus, M., Poole, M. M., Duffield, D. A., Brownell Jr, R. L., Kerem, D., Mignucci-Giannoni, A. A. and Baker, C. S. Worldwide phylogeography of rough-toothed dolphins (*Steno bredanensis*) provides evidence for subspecies delimitation. Marine Mammal Science. <https://doi.org/10.1111/mms.12933>

Alexander, A., Steel, D., Hoekzema, K., Mesnick, S. L., Engelhaupt, D., Kerr, I., Payne, R., and Baker, C. S. (2016). What influences the worldwide genetic structure of sperm whales (*Physeter macrocephalus*)? Molecular Ecology, 25(12), 2754–2772. <https://doi.org/10.1111/mec.13638>

Amaral, A. R., Beheregaray, L. B., Bilgmann, K., Boutov, D., Freitas, L., Robertson, K. M., Sequeira, M., Stockin, K. A., Coelho, M. M., and Möller, L. M. (2012). Seascape genetics of a globally distributed, highly mobile marine mammal: The short-beaked common dolphin (genus *Delphinus*). PLoS ONE, 7(2), e31482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031482>

Amaral, A.R., Sequeira, M., Martínez-Cedeira, J. and Coelho, M.M., 2007. New insights on population genetic structure of *Delphinus delphis* from the northeast Atlantic and phylogenetic relationships within the genus inferred from two mitochondrial markers. Marine Biology, 151(5), pp.1967-1976. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0635-y>

Archer, F. I., Brownell, R. L. Jr., Hancock-Hanser, B. L., Morin, P. A., Robertson, K. M., Sherman, K. K., Calambokidis, J., Urbán R, J., Rosel, P. E., Mizroch, S. A., Panigada, S., Taylor, B. L. (2019). Revision of fin whale *Balaenoptera physalus* (Linnaeus, 1758) subspecies using genetics. J. Mammal. 100, 1653–1670. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyz121>

Archer, F. I., Morin, P. A., Hancock-Hanser, B. L., Robertson, K. M., Leslie, M. S., Bérubé, M., Panigada, S., Taylor, B. L. (2013). Mitogenomic phylogenetics of fin whales (*Balaenoptera physalus* spp.): genetic evidence for revision of subspecies. PLoS One 8:e63396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063396>

Ball, L., Shreves, K., Pilot, M., Moura, A. E. (2017) Temporal and geographic patterns of kinship structure in common dolphins (*Delphinus delphis*) suggest site fidelity and female-biased long-distance dispersal. Behav Ecol Sociobiol 71, 123. <https://doi.org/10.1007/s00265-017-2351-z>

Ben Chehida Y, Stelwagen T., Hoekendijk J., Ferreira M, Eira C.,, Pereira AT, Nicolau L., Thumloup J., Fontaine M. (bioRxiv). Harbor porpoise losing its edges: genetic time series suggests a rapid population decline in Iberian waters over the last 30 years. <https://doi.org/10.1101/2021.08.19.456945>

Ben Chehida Y, Thumloup J, Vishnyakova K, Gol'din P, Fontaine MC. 2020. Genetic homogeneity in the face of morphological heterogeneity in the harbor porpoise from the Black Sea and adjacent waters (*Phocoena phocoena relicta*). Heredity 124, 469–484 <https://doi.org/10.1038/s41437-019-0284-1>

Ben Chehida, Y., Loughnane, R., Thumloup, J., Kaschner, K., Garilao, C., Rosel, P. E., and Fontaine, M. C. (2021). No leading-edge effect in North Atlantic harbor porpoises: Evolutionary and conservation implications. Evolutionary applications, 14(6), 1588–1611. <https://doi.org/10.1111/eva.13227>

Ben Chehida, Y., Thumloup, J., Schumacher, C., Harkins, T., Aguilar, A., Borrell, A., Ferreira, M., Rojas-Bracho, L., Robertson, K. M., Taylor, B. L., Víkingsson, G. A., Weyna, A., Romiguier, J., Morin, P. A. and Fontaine, M. C. (2020). Mitochondrial genomics reveals the evolutionary history of the porpoises (*Phocoenidae*) across the speciation continuum. *Sci Rep* 10, 15190.

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-71603-9>

Bentaleb, I., Martin, C., Vrac, M., Mate, B., Mayzaud, P., Siret, D., De Stephanis, R., and Guinet, C. (2011). Foraging ecology of Mediterranean fin whales in a changing environment elucidated by satellite tracking and baleen plate stable isotopes. *Marine Ecology Progress Series*, 438, 285–302.

<https://doi.org/10.3354/meps09269>

Bérubé, M., Aguilar, A., Dendanto, D., Larsen, F., Notarbartolo Di Sciara, G., Sears, R., Sigurjónsson, J., Urban-R., J., and Palsbøll, P. J. (1998). Population genetic structure of North Atlantic, Mediterranean Sea and Sea of Cortez fin whales, *Balaenoptera physalus* (Linnaeus 1758): Analysis of mitochondrial and nuclear *loci*. *Molecular Ecology*, 7, 585–599. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00359.x>

Biard, V., Gol'din, P., Gladilina, E., Vishnyakova, K., McGrath, K., Vieira, F.G., Wales, N., Fontaine, M.C., Speller, C. and Olsen, M.T., 2017. Genomic and proteomic identification of Late Holocene remains: Setting baselines for Black Sea odontocetes. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 15, pp.262–271. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2017.07.008>

Bourret, V., Macé, M. and Crouau-Roy, B. 2007. Genetic variation and population structure of western Mediterranean and northern Atlantic *Stenella coeruleoalba* populations inferred from microsatellite data. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 87(1): 265–269.

<https://doi.org/10.1017/S0025315407054859>

Brotons, J. M., Islas-Villanueva, V., Alomar, C., Tor, A., Fernández, R., and Deudero, S. (2019). Genetics and stable isotopes reveal non-obvious population structure of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) around the Balearic Islands. *Hydrobiologia*, 7. <https://doi.org/10.1007/s10750-019-04038-7>

Carroll EL, Reyes C, Gaggiotti OE, Olsen MT, Maaholm DJ, Rosso M, Davison N, Martin V, Schiavi A, Aguilar de Soto N. (2016). Pilot study to assess the utility of ddRAD sequencing in identifying species-specific and shared SNPs among Blainville's (*Mesoplodon densirostris*) and Cuvier's (*Ziphius cavirostris*) beaked whales. *IWC report SC/66b/DNA/03*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2286.5527>

Chen, I., Nishida, S., Chou, L.-S., Tajima, Y., Yang, W.-C., Isobe, T., Yamada, T.K., Hartman, K. and Hoelzel, A.R. (2018). Concordance between genetic diversity and marine biogeography in a highly mobile marine mammal, the Risso's Dolphin. *Journal of Biogeography* 45(9): 2092–2103.

<https://doi.org/10.1111/jbi.13360>

Ciccarese S, Carlucci R, Ciani E, Corcella E, Cosentino A, Fanizza C, Linguiti G, Antonacci R. (2019). Cytochrome b marker reveals an independent lineage of *Stenella coeruleoalba* in the Gulf of Taranto. Chiang T-Y, editor. *PLoS One*, 14(3):e0213826. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0213826>

Cooke, J. G. (2018). *Balaenoptera physalus* (Fin whale). The IUCN Red List of Threatened Species 2018: E.T2478A50349982. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-9824-3_33

Dalebout ML, Robertson KM, Frantzis A, Engelhaupt D, Mignucci AA, Rosario Delestre RJ, Baker CS. (2005). Worldwide structure of mtDNA diversity among Cuvier's beaked (*Ziphius cavirostris*): implications for threatened populations. *Mol Ecol.*;14:3353–71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2005.02676.x>

Donovan, G. P., and Bjørge, A. (1995). Harbour porpoises in the North Atlantic: edited extract from the report of the IWC Scientific Committee, Dublin 1995. Reports of the International Whaling Commission, Special Issue, 16, 3-26.

Drouot, V., Bérubé, M., Gannier, A., Goold, J. C., Reid, R. J., and Palsbøll, P. J. (2004). A note on genetic isolation of Mediterranean sperm whales (*Physeter macrocephalus*) suggested by mitochondrial DNA. *Journal of Cetacean Research and Management*, 6(1), 29–32. <https://doi.org/10.47536/jcrm.v6i1.787>

Engelhaupt, D., Hoelzel, A. R., Nicholson, C., Frantzis, A., Mesnick, S., Gero, S., Whitehead, H., Rendell, L., Miller, P., De Stefanis, R., Cañadas, A., Airoldi, S., and Mignucci-Giannoni, A. A. (2009). Female philopatry in coastal basins and male dispersion across the North Atlantic in a highly mobile marine species, the sperm whale (*Physeter macrocephalus*). *Molecular Ecology*, 18(20), 4193–4205. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04355.x>

Esteban R, Verborgh P, Gauffier P, Giménez J, Martín V, Pérez-Gil M, Tejedor M, Almunia J, Jepson PD, García-Tiscar S, Barrett-Lennard LG, Guinet C, Foote AD and de Stephanis R. (2016). Using a multi-disciplinary approach to identify a critically endangered killer whale management unit. *J Appl Ecol* 66: 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.01.043>

Esteban R., P. Verborgh, P. Gauffier, D. Alarcón, J.M. Salazar-Sierra, J. Giménez, A.D. Foote, R. de Stephanis. 2016. Conservation Status of Killer Whales, *Orcinus orca*, in the Strait of Gibraltar, Eds: Giuseppe Notarbartolo Di Sciara, Michela Podestà, Barbara E. Curry, *Advances in Marine Biology*, 75: 141-172, <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2016.07.001>

Fernández, R., Santos, M. B., Pierce, G. J., Llavona, A., Lopez, A., Silva, M. A., Ferreira, M., Carrillo, M., Cermeño, P., Lens, S. and Piertney, S. B. (2011). Fine-scale genetic structure of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in Atlantic coastal waters of the Iberian Peninsula. *Hydrobiologia*, 670, 111–125. <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0669-5>

Fontaine MC (2016). Harbour porpoises, *Phocoena phocoena*, in the Mediterranean Sea and Adjacent Regions: Biogeographic Relicts of the Last Glacial Period, 1st edn. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2016.08.006>

Fontaine MC, Baird SJE, Piry S, Ray N, Tolley KA, Duke S, Birkun A, Ferreira M, Jauniaux T, Llavona Á, Öztürk B, A Öztürk A, Ridoux V, Rogan E, Sequeira M, Siebert U, Vikingsson GA, Bouquegneau J-M, Michaux JR (2007) Rise of oceanographic barriers in continuous populations of a cetacean: the genetic structure of harbour porpoises in Old World waters. *BMC Biology* 5. <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7007-5-30>

Fontaine MC, Roland K, Calves I, Austerlitz F, Palstra FP, Tolley KA, Ryan S, Ferreira M, Jauniaux T, Llavona A, Öztürk B, Öztürk AA, Ridoux V, Rogan E, Sequeira M, Siebert U, Vikingsson GA, Borrell A, Michaux JR, Aguilar A (2014) Postglacial climate changes and rise of three ecotypes of harbour porpoises, *Phocoena phocoena*, in western Palearctic waters. *Molecular Ecology* 23, 3306–3321. <https://doi.org/10.1111/mec.12817>

Fontaine MC, Snirc A, Frantzis A, Koutrakis E, Ozturk B, Ozturk AA and Austerlitz F (2012). History of expansion and anthropogenic collapse in a top marine predator of the Black Sea estimated from genetic data. *Proc Natl Acad Sci* 109: E2569–E2576. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201258109>

Fontaine MC, Thatcher O, Ray N, Piry S, Brownlow A, Davison NJ, Jepson P, Deaville R, Goodman SJ (2017) Mixing of porpoise ecotypes in southwestern UK waters revealed by genetic profiling. *R Soc Open Sci* 4, 160992. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.160992>

Fontaine, M. C., Tolley, K. A., Michaux, J. R., Birkun, J.A., Ferreira, M., Jouniaux, T., Llavona, A., Öztürk, B., Ayaka, A.Ö., Ridoux, V., Rogan, E., Sequeira, M., Bouquegneau, J.M., Baird, S.J.E. (2010). Genetic and historic evidence for climate-driven population fragmentation in a top cetacean predator: the harbour porpoises in European water, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277, 2829-2837. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0412>

Foote AD, Martin MD, Louis M, Pacheco G, Robertson KM, Sinding MS, Amaral AR, Baird RW, Baker CS, Ballance L, Barlow J, Brownlow A, Collins T, Constantine R, Dabin W, Dalla Rosa L, Davison NJ, Durban JW, Esteban R, Ferguson SH, Gerrodette T, Guinet C, Hanson MB, Hoggard W, Matthews CJD, Samarra FIP, de Stephanis R, Tavares SB, Tixier P, Totterdell JA, Wade P, Excoffier L, Gilbert MTP, Wolf JBW, Morin PA. (2019). Killer whale genomes reveal a complex history of recurrent admixture and vicariance. *Mol Ecol*. 28(14):3427-3444. <https://doi.org/10.1111/mec.15099>

Foote AD, Newton J, Ávila-Arcos MC, Kampmann M-L, Samaniego JA, Post K, Rosing-Asvid A, Sinding M-HS, Gilbert MTP. (2013). Tracking niche variation over millennial timescales in sympatric killer whale lineages. *Proc R Soc B* 280: 20131481. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.1481>

Foote AD, Vilstrup JT, De Stephanis R, Verborgh P, Abel Nielsen SC, Deaville R, Kleivane L, Martín V, Miller PJ, Oien N, Pérez-Gil M, Rasmussen M, Reid RJ, Robertson KM, Rogan E, Similä T, Tejedor ML, Vester H, Víkingsson

GA, Willerslev E, Gilbert MT, Piertney SB. (2011). Genetic differentiation among North Atlantic killer whale populations. *Mol Ecol*. 20(3):629-41. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04957.x>

Fossi, M. C., Panti, C., Marsili, L., Maltese, S., Spinsanti, G., Casini, S., Caliani, I., Gaspari, S., Muñoz-Arnanz, J., Jimenez, B. and Finoia, M. G. (2013). The Pelagos Sanctuary for Mediterranean marine mammals: Marine Protected Area (MPA) or marine polluted area? The case study of the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Marine pollution bulletin*, 70(1-2), 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.02.013>

Gaspari S, Airoidi S, Hoelzel AR. 2007. Risso's dolphins (*Grampus griseus*) in UK waters are differentiated from a population in the Mediterranean Sea and genetically less diverse. *Conservation Genetics* 8(3):727-732. <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9205-y>

Gaspari, S (2004) Social and population structure of striped and Risso's dolphins in the Mediterranean Sea, Durham theses, Durham University. Available at Durham E-Theses Online: <http://etheses.dur.ac.uk/3051/>

Gaspari, S., Azzellino, A., Airoidi, S. and Hoelzel, A.R. 2007. Social kin associations and genetic structuring of striped dolphin populations (*Stenella coeruleoalba*) in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology* 16(14): 2922-2933. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03295.x>

Gaspari, S., Holcer, D., Mackelworth, P., Fortuna, C., Frantzis, A., Genov, T., Vighi, M., Natali, C., Rako, N., Banchi, E., Chelazzi, G. and Ciofi, C. (2015a). Population genetic structure of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Adriatic Sea and contiguous regions: implications for international conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 25(2), 212-222. <https://doi.org/10.1002/aqc.2415>

Gaspari, S., Marsili, L., Natali, C., Airoidi, S., Lanfredi, C., Deeming, C. and Moura, A.E. (2019). Spatio-temporal patterns of genetic diversity in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 57(3): 721-734. <https://doi.org/10.1111/jzs.12265>

Gaspari, S., Scheinin, A., Holcer, D., Fortuna, C., Natali, C., Genov, T., Frantzis, A., Chelazzi, G., Moura, A.E. (2015b). Drivers of Population Structure of the Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) in the Eastern Mediterranean Sea. *Evolutionary Biology*, 42: 177–190. <https://doi.org/10.1007/s11692-015-9309-8>

Gauffier, P., 2020. Ecología y conservación del rorcual común en el Mediterráneo español. PhD thesis. Universidad de Cádiz.

Gauffier, P., Verborgh, P., Gauffier, P., Verborgh, P., Giménez, J., Esteban, R., Manuel, J., Sierra, S., and de Stephanis, R. (2018). Contemporary migration of fin whales through the Strait of Gibraltar. *Marine Ecology Progress Series*, 588, 215–228. <https://doi.org/10.3354/meps12449>

Gkafas, G.A., Exadactylos, A., Rogan, E., Raga, J.A., Reid, R. and Hoelzel, A.R. 2017. Biogeography and temporal progression during the evolution of striped dolphin population structure in European waters. *Journal of Biogeography* 44(12): 2681–2691 <https://doi.org/10.1111/jbi.13079>

Gonzalvo, J., Lauriano, G., Hammond, P.S., Viaud-Martinez, K.A., Fossi, M.C., Natoli, A., Marsili, L. (2016). The Gulf of Ambracia's Common Bottlenose Dolphins, *Tursiops truncatus*: A Highly Dense and yet Threatened Population. *Adv. Mar. Biol.* 75, 259–296. <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2016.07.002>

Jefferson, T.A. and Waerebeek, K.V. (2002). The taxonomic status of the nominal dolphin species *Delphinus tropicalis* van Bree, 1971. *Marine Mammal Science*, 18: 787–818. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2002.tb01074.x>

Kerem, D., Goffman, O., Elasar, M., Hadar, N., Scheinin, A., and Lewis, T. (2016). The rough-toothed dolphin, *Steno bredanensis*, in the eastern Mediterranean Sea: a relict population? *Advances in Marine Biology*, 75, 233–258. <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2016.07.005>

Kommenou, A. Gkafas, G., Drougas, A., Sarris, P., Kofidou, E., Sarantopoulou, J., Exadactylos, A., Garcia-Hartman, M. (2022). First documented alive stranding of a *Steno bredanensis* in Salamina Island, Aegean Sea, Greece. 33rd Conference of the European Cetacean Society, Ashdod, Israel, April 2022.

Kraft, S., Pérez-Álvarez, M.J., Olavarría, C. and Poulin, E. 2020. Global phylogeography and genetic diversity of the Long-finned pilot whale *Globicephala melas*, with new data from the southeastern Pacific. *Scientific Reports* 10(1): 1769. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58532-3>

Lah, L., Benke, H., Berggren, P., Gunnlaugsson, P., Lens, S., Lockyer, C., Öztürk, A. A., Öztürk, B., Pawliczka, I., Roos, A., Siebert, U., Skóra, K., Tiedemann, R. 2016 Spatially explicit analysis of genome-wide SNPs detects subtle population structure in a mobile marine mammal, the harbor porpoise, *PLoS ONE*, 11(10): e0162792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162792>

Lee, K., Lee, J., Cho, Y., Sohn, H., Choi, Y.-M., Lim, S. R., Yoon, S.-W., Jeong, D. G., Kim, J. H. (2018). Characterization of the complete mitochondrial genome and phylogenetic analysis of the common dolphin *Delphinus delphis* (Cetacea: Delphinidae). *Mitochondrial DNA Part B*, 3, 632–633 <https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1473720>

Llavona A. (2018) Population parameters and genetic structure of the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*, L. 1758) in the Northwest the Iberian Peninsula. PhD thesis. Aveiro University. <https://ria.ua.pt/handle/10773/24058?mode=full>

Llavona, V.A., Ferreira, M., López, A., Vingada, J.V., Pierce, G.J., Dabin, W., Deaville, R., Jauniaux, T., Rogan, E., Tonay, A. M., Dede, A., Brownlow, A., Laria, L., Fernández, C., Cermeño, P., Piertney, S.B. 2014 Population genetic structure of harbour porpoise *Phocoena phocoena* across Europe: implications for management, 28th Annual Conf. European Cetacean Society, Liege, Belgium, 77.

https://www.europeancetaceansociety.eu/sites/default/files/28th%20conference%20Liege%20abstract_book.pdf

López A (2003). Estatus dos pequenos cetáceos da plataforma de Galicia. PhD Thesis. Universidade de Santiago de Compostela, Spain

López-Fernández, A. and Martínez-Cedeira, J.A. (2011). Marsopa – *Phocoena phocoena*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A. and Cassinello, J. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>

Louis, M., Fontaine, M. C., Spitz, J., Schlund, E., Dabin, W., Deaville, R., Caurant F., Cherel, Y., Guinet, C., and Simon-Bouhet, B. (2014b). Ecological opportunities and specializations shaped genetic divergence in a highly mobile marine top predator. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 281, 20141558–20141558. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1558>

Louis, M., Viricel, A., Lucas, T., Peltier, H., Alfonsi, E., Berrow, S. D., Brownlow, A., Covelo, P., Dabin, W., Deaville, R., De Stephanis, R., Gally, F., Gauffier, P., Penrose, R., Silva, M. A., Guinet, C., and Simon-Bouhet, B. (2014a). Habitat-driven population structure of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the North-East Atlantic. Molecular Ecology, 23(4), 857–874. <https://doi.org/10.1111/mec.12653>

Maio, N., Giovannotti, M., Caputo Barucchi, V., Petraccioli, A., Pollaro, F., Guarino, F. M., Splendiani, A., De Stasio, R., Odierna, G. (2016). Haplotype characterization of a young stranded Common Minke Whale (*Balaenoptera acutorostrata* Lacépède, 1804): is the Mediterranean Sea a potential calving or nursery ground for the species?. Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy, 27(2), 205–208. <https://doi.org/10.4404/hystrix-27.2-11661>

Miralles, L., Oremus, M., Silva, M. A., Planes, S., and Garcia-Vazquez, E. (2016). Interspecific hybridization in pilot whales and asymmetric genetic introgression in northern *Globicephala melas* under the scenario of global warming. PLoS ONE, 11(8), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160080>

Mirimin, L., Westgate, A., Rogan, E., Rosel, P., Read, A., Coughlan, J. and Cross., T. (2009) Population structure of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) in the North Atlantic Ocean as revealed by mitochondrial and nuclear genetic markers. Mar Biol 156, 821–834. <https://doi.org/10.1007/s00227-008-1120-y>

Monteiro S.S., Mendez-Fernandez P, Piertney S., Moffat C.F., Ferreira M., Vingada J.V., Lopez A., Brownlow A., Jepson P, Mikkelsen B., Niemeyer M., Carvalho J.C., Pierce G.J. (2015) Long-finned pilot whale population diversity and structure in Atlantic waters assessed through biogeochemical and genetic markers. Marine Ecology Progress Series, 536 243–257. <https://doi.org/10.3354/meps11455>

Monteiro S.S., Vingada J.V., Lopez A., Pierce G.J., Ferreira M., Brownlow A., Mikkelsen B., Niemeyer M., Deaville R.J., Eira C., Piertney S. (2016) Major Histocompatibility Complex (MHC) class II sequence polymorphism in long-finned pilot whale (*Globicephala melas*) from the North Atlantic. Marine Biology Research, 12 (6), 595–607. <https://doi.org/10.1080/17451000.2016.1174266>

Monteiro, S. (2014) Population ecology of long-finned pilot whales (*Globicephala melas*) off the western coast of the Iberian Peninsula. PhD Thesis. Aveiro University
<http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/34429>

Morin PA, Archer FI, Avila CD, Balacco JR, Bukhman YV, Chow W, Fedrigo O, Formenti G, Fronczek JA, Fungtammasan A, Gulland FMD, Haase B, Peter Heide-Jorgensen M, Houck ML, Howe K, Misuraca AC, Mountcastle J, Musser W, Paez S, Pelan S, Phillippy A, Rhie A, Robinson J, Rojas-Bracho L, Rowles TK, Ryder OA, Smith CR, Stevenson S, Taylor BL, Teilmann J, Torrance J, Wells RS, Westgate AJ, Jarvis ED. (2021). Reference genome and demographic history of the most endangered marine mammal, the vaquita. *Molecular Ecology Resources*, 21(4), 1008-1020. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13284>

Morin, PA, Foote, AD, Baker, CS, Hancock-Hanser, BL, Kaschner, K, Mate, BR, Mesnick, SL, Pease, VL, Rosel, PL, Alexander, A (2018). Demography or selection on linked cultural traits or genes? Investigating the driver of low mtDNA diversity in the sperm whale using complementary mitochondrial and nuclear genome analyses. *Mol Ecol*. 27: 2604– 2619. <https://doi.org/10.1111/mec.14698>

Moura AE, Nielsen SCA, Vilstrup JT, Moreno-Mayar JV, M. Gilbert TP, Gray HWI, Natoli A, Möller L, Hoelzel R. 2013. Recent Diversification of a Marine Genus (*Tursiops spp.*) Tracks Habitat Preference and Environmental Change. *Systematic Biology* 62 (6): 865–877, <https://doi.org/10.1093/sysbio/syt051>

Moura AE, Shreves K, Pilot M, Andrews KR, Moore DM, Kishida T, Möller L, Natoli A, Gaspari S, McGowen M, Chen I, Gray H, Gore M, Culloch RM, Kiani MS, Willson MS, Bulushi A, Collins T, Baldwin R, Willson A, Minton G, Ponnampalam L, Hoelzel AR. (2020). Phylogenomics of the genus *Tursiops* and closely related Delphininae reveals extensive reticulation among lineages and provides inference about eco-evolutionary drivers. *Mol. Phylogenet. Evol.* 146, 106756.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106756>

Moura, A. (2010). Investigating the relative influence of genetic drift and natural selection in shaping patterns of population structure in Delphinids (*Delphinus delphis*; *Tursiops spp.*), Durham theses, Durham University. <http://etheses.dur.ac.uk/755/>

Moura, A.E., Natoli, A., Rogan, E., and Hoelzel, A.R. (2013). Atypical panmixia in a European dolphin species (*Delphinus delphis*): Implications for the evolution of diversity across oceanic boundaries. *Journal of Evolutionary Biology* 26: 63-75. <https://doi.org/10.1111/jeb.12032>

Natoli A, Peddemors VM, Hoelzel AR. 2004. Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. *J Evol Biol*. 17: 363-375.
<https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2003.00672.x>

Natoli, A., Birkun, A., Aguilar, A., Lopez, A. and Hoelzel, A. R. 2005. Habitat structure and the dispersal of male and female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences* 272: 1217-1226. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3076>

Natoli, A., Cañadas, A., Vaquero, C., Politi, E., Fernandez-Navarro, P., and Hoelzel, A. R. (2008). Conservation genetics of the short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) in the Mediterranean Sea and in the eastern North Atlantic Ocean. *Conservation Genetics*, 9(6), 1479–1487.
<https://doi.org/10.1007/s10592-007-9481-1>

Notarbartolo di Sciara, G., Zanardelli, M., Jahoda, M., Panigada, S., and Airoldi, S. (2003). The fin whale *Balaenoptera physalus* (L. 1758) in the Mediterranean Sea. *Mammal Review*, 33(2), 105–150.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2907.2003.00005.x>

Nykänen M, Louis M, Dillane E, Alfonsi E, Berrow S, O'Brien J, Brownlow A, Covelo P, Dabin W, Deaville R, de Stephanis R, Gally F, Gauffier P, Ingram SN, Lucas T, Mirimin L, Penrose R, Rogan E, Silva MA, Simon-Bouhet B, Gaggiotti OE. 2019. Fine-scale population structure and connectivity of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in European waters and implications for conservation. *Aquat Conserv.* 29: 197-211. <https://doi.org/10.1002/aqc.3139>

Onoufriou AB, Gaggiotti OE, de Soto NA, McCarthy ML, Morin PA, Rosso M, Dalebout M, Davison N, Baird RW, Baker CS, Berrow S, Brownlow A, Burns D, Caurant F, Claridge D, Constantine R, Demaret F, Dreyer S, Duras M, Durban JW, Frantzis A, Freitas L, Genty G, Galov A, Hansen SS, Kitchener AC, Martin V, Mignucci-Giannoni AA, Montano V, Moulins A, Olavarría C, Poole MM, Reyes Suárez C, Rogan E, Ryan C, Schiavi A, Tepsich P, Urban R., J, West K, Olsen MT, Carroll EL. 2022. Biogeography in the deep: Hierarchical population genomic structure of two beaked whale species. *Global Ecology and Conservation* 40: e02308. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2022.e02308>

Palsbøll, P. J., Bérubé, M., Aguilar, A., Notarbartolo-Di-Sciara, G., and Nielsen, R. (2004). Discerning between recurrent gene flow and recent divergence under a finite-site mutation model applied to North Atlantic and Mediterranean Sea fin whale (*Balaenoptera physalus*) populations. *Evolution.*, 58(3), 670. <https://doi.org/10.1554/02-529>

Pastene, L.A., Goto, M., Kanda, N., Zerbini, A.N., Kerem, D.A.N., Watanabe, K., Bessho, Y., Hasegawa, M., Nielsen, R., Larsen, F. and Palsbøll, P.J., 2007. Radiation and speciation of pelagic organisms during periods of global warming: the case of the common minke whale, *Balaenoptera acutorostrata*. *Molecular Ecology*, 16(7), pp.1481-1495. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03244.x>

Pierce GJ, Petitguyot MAC, Gutierrez-Muñoz P, Fariñas-Bermejo A, Fernández-Fernández D, Dolman S, Fontaine MC, Hernández-González A, López M, Read FL, Martínez-Cedeira J, Covelo P, Ivaylova S, Llavona A, López A, Méndez-Fernández P, Pérez Fernández B, Saavedra C, Santos MB, Verutes GM, Viñas L, Weir CR (2022) An endangered population of harbour porpoise *Phocoena phocoena* hidden in plain sight: biology, ecology and conservation of the Iberian porpoise. *Oceanography and Marine Biology - An Annual Review*, submitted (preprint available via MC Fontaine).

Rosel PE, Dizon AE, Heyning JE. 1994. Genetic analysis of sympatric morphotypes of common dolphins (*genus Delphinus*). *Mar Biol.* 119(2): 159-167. <https://doi.org/10.1007/BF00349552>

Rosel, P.E., Dizon, A.E. Haygood, M.G. 1995 Variability of the mitochondrial control region in populations of the harbour porpoise, *Phocoena*, on interoceanic and regional scales, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(6), 1210-1219. <https://doi.org/10.1139/f95-118>

Rosel, P.E., Frantzis, A., Lockyer, C., Komnenou, A. 2003 Source of Aegean Sea harbour porpoises, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 247: 257-261. <https://doi.org/10.3354/meps247257>

Schleimer, A (2021). Population biology of fin whales: applying demographic and evolutionary approaches to studying populations. PhD thesis. University of St Andrews and University of Groningen. Available at: <https://research.rug.nl/en/publications/da510173-1b02-4b0e-a6ff-7afc7d1cb09e>

Sequeira M. Harbour porpoises, *Phocoena phocoena*, in Portuguese waters. *Rep Int Whaling Comm.* 1996;46:583-6.

Smeenk, C., Leopold, M. F., and Addink, M. J. (1992). Note on the harbour porpoise *Phocoena phocoena* in Mauritania, West Africa. *Lutra*, 35, 98-104.

Sönmez,R., Tuncer, S., Yokeş, B. Genetic analysis of a stranded Risso's dolphin from the Turkish North Aegean coast of the Eastern Mediterranean. 2012. Journal of Agriculture and Rural Development. https://uad.bg/files/custom_files/files/documents/New%20knowledge/year1_n4/paper_sonmez_y1n4.pdf

Stockin, K.A., Amaral, A.R., Latimer, J., Lambert, D.M. and Natoli, A. (2014), Population genetic structure and taxonomy of the common dolphin (*Delphinus sp.*) at its southernmost range limit: New Zealand waters. Mar Mam Sci, 30: 44-63. <https://doi.org/10.1111/mms.12027>

Tardy C, Planes S, Jung JL, Ody D, Boissin E. (2020). Characterization of 25 new microsatellite markers for the fin whale (*Balaenoptera physalus*) and cross-species amplification in other cetaceans. Mol Biol Rep. 47(9):6983-6996. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05757-0>

Tardy, C (2021). Étude des grands mammifères marins en Méditerranée pour mieux adapter les politiques de conservation. PhD thesis. Ecole Pratique des Hautes Etudes and Centre de recherches insulaires et observatoire de l'environnement et WWF-France.

Tardy, C., Ody, D., Gimenez, O., and Planes, S., 2023. Abundance of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the north-western Mediterranean Sea, using photo-identification and microsatellite genotyping. Marine Ecology, 00, e12737. <https://doi.org/10.1111/maec.12737>

Tolley KA and Rosel PE (2006). Population structure and historical demography of eastern North Atlantic harbour porpoises inferred through mtDNA sequences. Marine Ecology Progress Series 327: 297-308. <https://doi.org/10.3354/meps327297>

Tonay AM, Dede A, Maracı Ö, Bilgin R. 2012. A preliminary genetic study on the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in the Turkish Seas. J. Black Sea/Mediterr. Environ. 18:83-89 <https://blackmeditjournal.org/volumes-archive/vol18-2012/vol-18-2012-no-1/a-preliminary-genetic-study-on-the-harbour-porpoise-phocoena-phocoena-in-the-turkish-seas/>

Tonay AM, Karaman K, Dede A, Danyer E, Aytemiz Danyer I, Uzun B, Meray Y, Deval C, Ozturk Amaha A, Bilgin R. 2019. Genetic investigation on Cuvier's beaked whale, *Ziphius cavirostris* on the coast of Turkey and Northern Cyprus, based on mtDNA sequences. World Marine Mammals Conference, 9-12 December 2019, Barcelona, 437pp. https://drive.google.com/file/d/109TlRRCh0aO___eOkd51WTWts02DHraS/view?usp=sharing

Tonay AM, Uzun B, Dede A, Amaha Öztürk A, Danyer E, Aytemiz Danyer I, Bilgin S, Öztürk B, Bilgin R. 2020. Population genetic structure of the short-beaked common dolphin from the Black Sea and the Turkish Straits System. Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal. 31(6):257-264 <https://doi.org/10.1080/24701394.2020.1788008>

Tonay AM, Uzun B, Dede A, Danyer E, Aytemiz Danyer I, Öztürk AA, Bilgin R. 2018. Genetic structure of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in the Turkish waters based on mtDNA sequences. 5th Ecology and Evolutionary Biology Symposium 18 -20 July 2018, İzmir Türkiye, 20-21pp.

Tonay AM, Yazıcı Ö, Dede A, Bilgin S, Danyer E, Aytemiz I, Maracı Ö, Öztürk AA, Öztürk B, Bilgin R. (2017). Is there a distinct harbor porpoise subpopulation in the Marmara Sea? Mitochondrial DNA. Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis. 28(4):558-564. <https://doi.org/10.3109/24701394.2016.1155118>

Uzun B, Tonay AM, Dede A, Danyer E, Danyer Aytemiz I, Öztürk Amaha A, Öztürk B, Bilgin R. 2018. Genetic investigation on the population structure of the harbour porpoises living in Turkish waters by double digest restriction associated DNA (ddRAD) sequencing. 32. Conference of European Cetacean Society, 6-10 April 2018, La Spezia, Italy. 79pp.

https://www.europeancetaceansociety.eu/sites/default/files/27253%20ABSTRACT%20BOOK_nuovo_LR.pdf

Uzun, B., Tonay, A.M., Dede, A., Danyer, E., Aytemiz, I., Bilgin, S., Öztürk, A.A., Öztürk, B., Bilgin, R. (2017) Do we need to conserve the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) population in the Marmara Sea separately? 31st European Cetacean Society Conference, Middelfart, Denmark. 154p.

https://www.europeancetaceansociety.eu/sites/default/files/AbstractBook_1.pdf

Valsecchi E., William Amos, Juan Antonio Raga, Michela Podesta, and William Sherwin. 2004. The effects of inbreeding on mortality during a morbillivirus outbreak in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Animal Conservation*, 7: 139–146. <https://doi.org/10.1017/S1367943004001325>

Verborgh, P. 2015. Demografía y estructura de las poblaciones de calderones comunes (*Globicephala melas*) en el Mediterráneo español. PhD Thesis. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

<https://accedacris.ulpgc.es/handle/10553/24377>

Verborgh, P., Gauffier, P., Esteban, R., Giménez, J., Cañadas, A., Salazar-Sierra, J. M. and de Stephanis, R. 2016. Conservation Status of Long-Finned Pilot Whales, *Globicephala melas*, in the Mediterranean Sea. In: Notarbartolo Di Sciara, G., Podestà, M. and Curry, B. E. (eds), *Mediterranean Marine Mammal Ecology and Conservation*. *Advances in Marine Biology*, vol. 75, pp. 173–203. Academic Press, Amsterdam.

<https://doi.org/10.1016/bs.amb.2016.07.004>

Verborgh, P., Gauffier, P., García Tiscar, S., Salazar, J.M., Esteban, R., Minvielle-Sebastia, L., Ridoux, V., Dabin, W., Martínez Cedeira, J.A., López, A., Ipiña, E.M., Monteiro, S.S., Ferreira, M., Berrow, S., Fossi, M.C., Marsili, L., Laran, S., Praca, E., Cañadas, A., Murcia, J.L., García, P. and de Stephanis, R. in prep. Population structure of long-finned pilot whales in Europe. *Marine Ecology Progress Series*.

Viaud-Martinez KA, Brownell Jr RL, Kommenou A, Bohonak AJ. 2008. Genetic isolation and morphological divergence of Black Sea bottlenose dolphins. *Biol Conserv*. 141: 1600-1611.

<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.04.004>

Viaud-Martínez KA, Martínez Vergara M, Goldin PE, Ridoux V, Öztürk AA, Öztürk B, Rosel PE, Frantzis A, Komnenou A, Bohonak AJ (2007) Morphological and genetic differentiation of the Black Sea harbour porpoise *Phocoena phocoena*. *Marine Ecology Progress Series* 338, 281-294.

<https://doi.org/10.3354/meps338281>

Viaud-Martínez, K.A., Vergara, M.M., Gol'din, P.E., Ridoux, V., Öztürk, A.A., Öztürk, B., Rosel, P.E., Frantzis, A., Komnenou, A. and Bohonak, A.J., 2007. Morphological and genetic differentiation of the Black Sea harbour porpoise *Phocoena phocoena*. *Marine Ecology Progress Series*, 338, pp.281-294.

<https://doi.org/10.3354/meps338281>

Violi, B., de Jong, M. J., Frantzis, A., Alexiadou, P., Tardy, C., Ody, D., de Stephanis, R., Giménez, J., Lucifora, G., e Silva, M. A., Oliveira, C., Alves, F., Dinis, A., Tejedor, M., Fernández, A., Arregui, M., Arbelo, M., Lopez, A., Covelo, P., and Hoelzel, A. R. (2023). Genomics reveals the role of admixture in the evolution of structure among sperm whale populations within the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology*, 32, 2715–2731. <https://doi.org/10.1111/mec.16898>

Annexe 2

Laboratoires de génétique adaptés dans la zone ACCOBAMS [Novembre 2023]

Note: cette liste non-exhaustive s'est basée sur les informations reçues des PFN de l'ACCOBAMS et des participant-es du workshop jusqu'en octobre 2022, et actualisée en novembre 2023 (d'autres laboratoires adaptés existent probablement dans chaque Partie).

PARTIE	LABORATOIRE	CONTACT
Croatie	Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb, Zagreb	Ana Galov: ana.galov@biol.pmf.hr
Égypte	Zoology Department, Faculty of Science, Al-Azhar University, Nasr City, Cairo	hamdy.ali.hamdy@gmail.com
France	Laboratoire de recherche: CRIOBE, UAR3278 - CRIOBE - CNRS - EPHE - UPVD, Perpignan	Serge Planes: planes@univ-perp.fr
	Laboratoire de recherche: MIVEGEC UMR IRD224 - CNRS5290 - University of Montpellier, Montpellier	Michael Fontaine: michael.fontaine@cnrs.fr
Grèce	Molecular Biology of Marine Mammals Conservation and Fish stocks, Dept. of Ichthyology and Aquatic Environment, School of Agricultural Sciences, University of Thessaly, Volos	Georgios A. Gkafas : gkafas@uth.gr
Italie	University of Siena, Departments of Department of Environmental, Earth and Physical Sciences, Siena	Maria Cristina Fossi: fossi@unisi.it Cristina Panti: panti4@unisi.it
	University of Padova, Department of Comparative Biomedicine and Food Science - Mediterranean Marine Mammals Tissue Bank, Padova	Cinzia Centelleghè: marinemammals.bca@unipd.it
Malte	Conservation Biology Research Group, Department of Biology, University of Malta, Msida	Adriana Vella: adriana.vella@um.edu.mt
Portugal	Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC), Population and Conservation Genetics group, Oeiras	Lounes Chikhi: chikhi@igc.gulbenkian.pt Inês Carvalho: carvalho.inesc@gmail.com
	Portugal Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Campus Universitário de Santiago, Aveiro	geral@ua.pt
	Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research (CIIMAR), Porto University, Matosinhos	Filipe Castro: filipe.castro@ciimar.up.pt
Slovénie	Morigenos – Slovenian Marine Mammal Society, Piran	Tilen Genov: tilen.genov@gmail.com ,morigenos@morigenos.org

PARTIE	LABORATOIRE	CONTACT
Espagne	Central Service for Experimental Research, University of Valencia, Valencia	Amparo Martinez: amparo.martinez@uv.es
	Marine Zoology Unit, Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology, University of Valencia, Valencia	Juan Antonio Raga: toni.raga@uv.es
	Department of Functional Biology, University of Oviedo, Oviedo	Álvaro Jesús Obaya González: dpto.biofun@uniovi.es
	[COMMERCIAL COMPANY] All Genetics and Biology SL, A Coruña	info@allgenetics.eu
	[COMMERCIAL COMPANY] Macrogen SPAIN, Madrid	info-spain@macrogen.com
Tunisie	Le Laboratoire de Biodiversité Marine, Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM), centre de Monastir, Monastir	Olfa Chaieb: offachaieb@yahoo.fr
Türkiye	Istanbul University Faculty of Aquatic Sciences, İstanbul	Arda M. Tonay: atonay@istanbul.edu.tr
	Zonguldak Bulent Ecevit University, Faculty of Science and Arts, Department of Biology	Mustafa Sözen: spalaxtr@hotmail.com mustafasozen@beun.edu.tr
Ukraine	Schmalhausen Institute of Zoology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv	Pavel Gol'din: pavelgoldin412@gmail.com
	Mechnikov Odesa National University, Odesa	Sabina Chebotar: kafgen@onu.edu.ua
	Karazin Kharkiv National University, Kharkiv	Oleksandr Zinenko: oleksandrzinenko@gmail.com



Annexe 3

Exemple de protocole de laboratoire pour l'extraction d'ADN à partir de tissus

A) Méthode de précipitation à l'acétate d'ammonium

1. Placer un petit morceau d'échantillon de tissu (la quantité exacte varie en fonction du type de tissu et de la quantité d'ADN cible) dans un tube de 1,5 ml à couvercle rabattable (p. ex. eppendorf); s'assurer que l'échantillon se trouve au fond du tube, centrifuger si nécessaire.
2. Ajouter 125 µl de tampon DigSol et de mélange de protéinase K à l'échantillon (le mélange doit avoir un rapport de 250 µl de tampon DigSol et 10 µl de protéinase K (10 mg/ml)) ; fermer le couvercle et centrifuger brièvement.
3. Placer dans un autoclave à 56°C pour la digestion, p. ex. pendant une nuit.
4. Une fois la digestion terminée, centrifuger brièvement et ajouter 300 µl d'acétate d'ammonium 4M dans chaque tube pour la précipitation des protéines.
5. Placer les tubes/plaques d'échantillons sur un agitateur ou un vortex pendant une période d'au moins 15 minutes à température ambiante pour précipiter les protéines.
6. Étiqueter des nouveaux tubes de 1,5 ml à couvercle rabattable pour le transfert d'échantillons dans les étapes suivantes.
7. Centrifuger les tubes/plaques d'échantillons pendant 10 minutes à 15 000 rpm.
8. Aspirer le surnageant (liquide clair contenant l'ADN) dans des tubes propres et précédemment étiquetés de 1,5 ml à couvercle rabattable (jeter les protéines précipitées qui sont généralement concentrées au fond, mais qui peuvent flotter au-dessus).
9. Ajouter 1 ml d'éthanol à 100% dans chaque tube.
10. Fermer les couvercles et retourner doucement les tubes plusieurs fois (20x) pour précipiter l'ADN.
11. Centrifuger pendant 10 minutes à 15 000 rpm.
12. Verser soigneusement l'éthanol hors du tube en veillant à ne pas perdre le culot d'ADN.
13. Ajouter 500 µl d'éthanol à 70 %, fermer les couvercles et retourner plusieurs fois pour rincer le culot d'ADN.
14. Si le culot se détache du fond du tube, centrifuger pendant 5 minutes à 15 000 rpm.
15. Verser soigneusement l'éthanol hors du tube et placer les tubes à l'envers sur un tissu propre (environ 30-60 minutes).
16. Après séchage complet, ajouter environ 100 µl de T10 EO.1 (la quantité ajoutée dépend de la taille du culot).
17. Agiter doucement le tube pour déloger le culot.
18. Placer les tubes au bain-marie ou à l'autoclave pendant 30 minutes (50°C) pour dissoudre le culot (agiter/vortexer toutes les 10 minutes).
19. Conserver à -20°C (long terme) ou à 4°C (court terme).

Préparation des Solutions

Tampon Tris 1 M (poids mol. 121,1 g) pH 8,0

Pour 200 ml:

- Dissoudre 24,22 g dans de l'eau distillée en remuant.
- Le pH devrait être environ 8,0.
- Stériliser à l'autoclave.

EDTA 0,5 M (poids mol. 372,2 g) pH 8,0

Pour 200 ml:

- Dissoudre 37,2 g dans de l'eau distillée en remuant.
- Veiller à ajuster le pH avec NaOH pendant la dissolution (pour que tout l'EDTA se solubilise).

SDS 20%

Pour 100 ml:

- Ajouter 20 g de SDS (utiliser de l'eau préalablement autoclavée car la solution finale ne pourra pas être autoclavée).
- Utilisez une hotte et portez un masque pour peser cette poudre.

Digsol (Solution de digestion) pH 8,0 (Bill Amos & Josephine Pemberton)

RECIPE	STOCK	FOR 1000ml	FOR 200ml
20 mM EDTA	EDTA (0.5 M, pH 8.0)	40 ml	8 ml
120 mM NaCl	NaCl	6.85 g	1.37 g
50 mM Tris	Tris (1 M, pH 8.0)	50 ml	10 ml
Distilled water		810 ml	172 ml

- Réchauffer tous les constituants jusqu'à ce qu'ils soient dissous.
- Stériliser à l'autoclave.
- Ajouter le SDS.

SDS (20%)		50ml	10ml
-----------	--	------	------

- Ajuster le pH à l'aide de HCl si nécessaire

4 M Acétate d'ammonium pH 7,5

Pour 100 ml:

- Dissoudre 30,83 g d'acétate d'ammonium dans de l'eau distillée.
- Stériliser à l'autoclave.
- Si nécessaire, ajuster le pH avec de l'acide acétique Glacial.

NB: L'acétate d'ammonium est hydrophile et la majeure partie du produit chimique de base est donc très humide, mais cela ne semble pas affecter le processus d'extraction.

T10 E0,1 (Tampon T.E. à faible teneur en EDTA) pH 7,5-8,0

Pour remettre en suspension l'ADN qui sera utilisé dans la PCR

Pour 400 ml :

Tris 10 mM → 4 ml de Tris 1 M (pH 8,5)

EDTA 0,1 mM → 80 µl de EDTA 0,5 M (pH 8,5)

- Ajuster le pH si nécessaire
- Stériliser à l'autoclave.

Protéinase K 10 mg/ml

- En aliquotes de 1 ml dans un congélateur à -20°C.

B) Méthode au phénol/chloroforme

[copiée depuis <https://www.thermofisher.com/>]

Matériel nécessaire

- Glycogène (20 µg/µL)
- NH₄OAc (acétate d'ammonium) 7,5 M
- Seau à glace
- Phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1)
- Éthanol à 100 %
- Neige carbonique ou congélateur à -80°C
- Éthanol à 70 %

Protocole - extraction au Phénol | Chloroforme

1. Ajouter un volume de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) à l'échantillon et agiter au vortex ou à la main pendant environ 20 secondes.
2. Centrifuger à température ambiante pendant 5 minutes à 16 000 × g. Éliminer soigneusement la phase aqueuse supérieure et transférer la couche dans un nouveau tube. Veiller à ne pas transférer de phénol pendant le pipetage.
3. Passer à l'étape de "Précipitation de l'éthanol", ci-dessous.

Protocole - Précipitation de l'éthanol

RÉACTIF	VOLUME
Glycogène (20 µg/µL)	1 µL
NH ₄ OAc 7,5 M	0,5 × volume de l'échantillon
éthanol à 100%	2,5 × (volume de l'échantillon + NH ₄ OAc)

1. Ajouter les réactifs à la phase aqueuse, dans l'ordre indiqué dans le tableau ci-dessus.
2. Placer le tube à -20°C pendant une nuit pour précipiter l'ADN de l'échantillon. Note : Si vous souhaitez poursuivre le protocole immédiatement, placez le tube dans de la neige carbonique ou à -80°C pendant au moins 1 heure.
3. Centrifuger l'échantillon à 4°C pendant 30 minutes à 16 000 × g pour culotter l'ADNc.
4. Retirer soigneusement le surnageant en veillant à ne pas toucher le culot d'ADNc.
5. Ajouter 150 µL d'éthanol à 70 %. Centrifuger l'échantillon à 4°C pendant 2 minutes à 16 000 × g. Retirer soigneusement le surnageant.
6. Répéter l'étape 3 une fois. Éliminez autant d'éthanol restant que possible.
7. Sécher le culot d'ADNc dans un concentrateur Thermo Scientific™ SpeedVac™ pendant 2 minutes ou à température ambiante pendant 5 à 10 minutes.
8. Remettre en suspension le culot d'ADNc dans 300 µL de tampon TEN en pipettant de haut en bas 30 à 40 fois.
9. Centrifuger brièvement pour recueillir l'échantillon et placer le tube sur de la glace.

Annexe 4

Exemple d'accord de transfert de matériel biologique

Objet:

L'objet de cet accord est de fixer les règles d'échange d'échantillons de cétacés à des fins de recherche non commerciale entre les deux institutions suivantes.

Les parties à cet accord sont :

L'Établissement fournisseur, également appelé "**Prestataire**" / "**Fournisseur**" :

Représenté par :

et **L'Institution destinataire**, également appelée "**Bénéficiaire**" :

Représentée par :

A) Le **Fournisseur** accepte de prêter au **Bénéficiaire** le Matériel Biologique (ci-après dénommé le "**Matériel**") décrit ci-dessous, qui sera utilisé aux fins décrites aux points (B) et (C):

- Nombre d'échantillons et espèces
- Type d'échantillon (peau, muscle, etc.)
- Tampon/méthode de conservation
- Codes d'identification et informations sur l'échantillon
- Méthodes de collecte des échantillons (y compris les permis d'échantillonnage nationaux)

B) Le **Bénéficiaire** s'engage à effectuer l'analyse décrite ci-dessous aux fins décrites au point (C) et à assurer la garde du **Matériel** jusqu'à sa consommation complète ou sa restitution en toute sécurité à **L'Établissement fournisseur**.

- Type d'analyse (ex : isotopes stables, génétique, contaminants, cause de décès, maladies, etc.)

C) Objet du Transfert de Matériel Biologique:

1/ Une description concise du projet de recherche est fournie ci-dessous.

- Nom du projet
- Référence du projet et organisme de financement (le cas échéant)
- Résumé succinct

2/ Un résumé de la méthodologie scientifique appliquée aux échantillons est fourni ci-dessous. *[Il doit préciser si les échantillons seront partiellement ou totalement consommés, ou si les échantillons seront modifiés ou transformés (p. ex., extraction d'ADN ou d'ARN) ou si un produit sera dérivé (p. ex., culture cellulaire)].*

D) Les deux parties acceptent les conditions suivantes:

3/ Si des protocoles particuliers sont nécessaires avant de fournir le **Matériel** [décrire brièvement], les coûts de préparation seront pris en charge par _____ [le **Fournisseur** et/ou le **Bénéficiaire**].

4/ Le **Matériel** reste la propriété du **Fournisseur/est** donné au **Bénéficiaire** [choisir l'option appropriée].

5/ Le **Matériel** ne peut être utilisé qu'à des fins de recherche non commerciales telles que décrites aux points (B) et (C). Si l'objectif convenu devait être modifié après la signature du présent Accord, le **Bénéficiaire** consulterait l'**Établissement fournisseur** et demanderait son approbation écrite, qui sera annexée au présent Accord.

6/ Si le **Matériel** doit être expédié, les frais d'expédition seront pris en charge par _____ [le **Fournisseur** et/ou le **Bénéficiaire**].

7/ Les deux parties s'engagent à fournir tous les documents nécessaires à l'échange légal d'échantillons biologiques à des fins de recherche non commerciale, y compris, mais sans s'y limiter, les permis CITES pertinents et les procédures du protocole de Nagoya.

9/ Toute partie du **Matériel** qui n'a pas été utilisée aux fins spécifiées aux points (B) et (C) doit être renvoyée au **Fournisseur/restera** stockée dans l'**Institution destinataire** [choisir l'option appropriée].

Le cas échéant, le **Matériel** devra être emballé et expédié de manière adéquate pour garantir son retour en toute sécurité par courrier recommandé ou assuré. L'**Établissement fournisseur** devra être contacté avant l'expédition. Les frais d'expédition seront à la charge du **Bénéficiaire**. S'il ne reste plus aucune partie du matériel après les analyses, l'**Établissement fournisseur** devra en être informé.

10/ Le **Bénéficiaire** s'engage à veiller à ce que les étiquettes de code soient toujours associées au **Matériel** concerné et à ce qu'elles ne soient pas perdues.

11/ Le **Bénéficiaire** est un "utilisateur final", ce qui signifie qu'aucune partie du **Matériel**, aucun produit du **Matériel** et aucune donnée relative au **Matériel** (espèce, origine, âge, sexe, lésions, ...) ne pourront être transmis à un tiers, sauf après consultation et approbation écrite de l'**Établissement fournisseur**. Ce transfert pourra nécessiter des autorisations spécifiques.

12/ Le **Bénéficiaire** est responsable de la conservation du **Matériel** décrit au point (A). La perte ou l'endommagement du **Matériel** doit être immédiatement signalé au **Fournisseur**.

13/ Le statut de co-auteur·trice est la manière la plus correcte de reconnaître la contribution d'autrui. Le **Bénéficiaire** accepte formellement que le ou les scientifique(s) ou membre(s) du personnel de l'**Établissement fournisseur** soient considérés comme co-auteur·trice·s dans tous les rapports, présentations et documents. Toutes les publications et tous les rapports devront préciser que le **Matériel** a été fourni par l'**Établissement fournisseur**, et mentionner les projets/sponsors appropriés en remerciements.

- Résultats attendus [y compris les thèses de licence, Master ou Doctorat, les publications scientifiques, les actes de conférence, les rapports aux autorités nationales ou internationales, etc.].
- Co-auteur-trice-s de l'**Établissement fournisseur** qui devront figurer dans toutes les publications, présentations et rapports résultant de ce projet : Dr./Mme/Mlle/M.
- Projets/sponsors à mentionner dans les remerciements.
- Autres personnes à mentionner spécifiquement dans les remerciements.

14/ Les résultats publiés devront être communiqués à l'**Établissement fournisseur**; une copie numérique de tous les documents devra être envoyée à l'**Établissement fournisseur**.

15/ Afin d'éviter la duplication des travaux futurs, toutes les données brutes doivent être envoyées à l'**Établissement fournisseur** (p. ex., les résultats de l'analyse des polluants, les résultats des signatures isotopiques, les séquences génétiques, etc.). Le **Bénéficiaire** conservera le statut de co-auteur-trice de ces données. Toute utilisation institutionnelle de ces données (p. ex., dans les rapports nationaux ou internationaux demandés par les autorités nationales) sera précédée d'une demande d'autorisation adressée par l'**Établissement fournisseur** au **Bénéficiaire** responsable de la production des données.

16/ Le **Bénéficiaire** fournira au **Fournisseur** une formation sur [sujet à déterminer en fonction des besoins et capacités des deux Parties].

Le présent accord prend effet en date du _____ et prendra fin (1) au terme du projet de recherche, (2) à la restitution des échantillons à l'**Établissement fournisseur**, (3) en cas de violation des conditions du présent accord par le **Bénéficiaire**, ou (4) à la demande de l'**Établissement fournisseur** de restituer ses échantillons [choisir les options appropriées].

Date:

Pour l'**Établissement fournisseur**:

Personne responsable:

Affiliation:

Téléphone:

Courriel:

Représenté légalement par:

Affiliation:

Courriel:

Signature du/de la représentant·e légal·e de l'Établissement:

Pour l'**Institution destinataire**:

Personne responsable:

Affiliation:

Téléphone:

Courriel:

Représentée légalement par:

Affiliation:

Courriel:

Signature du/de la représentant·e légal·e de l'Institution:



**Meilleures Pratiques De l'ACCOBAMS Sur
La Génétique Des Populations De Cétacés**

