

Étude préliminaire à l'évaluation de l'activité reproductrice du rorqual commun en Méditerranée

Brigitte SILIART¹, Caroline BERDER¹, Thierry LEGAVRE²,
Ronan RIVALLAN², Ange-Marie RISTERUCCI²,
Denis ODY³, Aurélie TASCOTTI³

¹LDHVET-ONIRIS, École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique

²CIRAD, UMR AGAP, INRA, Sup-Agro, Université Montpellier 2, CIRAD, France

³WWF, 6 rue des Fabres, 13001 Marseille, France

*Contact : brigitte.siliart@oniris-nantes.fr

Résumé. Le but de cette étude était d'évaluer la possibilité de suivre l'activité reproductrice des rorquals communs à l'aide de biopsies cutanées sur lesquelles ont été identifiés le sexe et la synthèse des stéroïdes qui ont la propriété de se stocker dans la graisse sous-cutanée des mammifères proportionnellement à leurs sécrétions. Ainsi, sur 2 saisons (de juin à septembre 2010 et 2011), près de 150 biopsies d'animaux ont été prélevées en Méditerranée nord-occidentale, le sexe a été déterminé par amplification des fragments d'ADN spécifiques du gène ZF-X et du gène ZF-Y, les stéroïdes ont été extraits de la graisse par chauffage et mesurés par radioimmunologie. Ces dosages montrent qu'au moins un tiers des femelles sont gestantes et que deux tiers des mâles ont un statut de reproducteur actif. À l'heure actuelle, il est encore difficile de statuer sur l'état des femelles qui ne présentent pas une hyperprogestéronémie car les variations hormonales au cours des cycles sont encore mal connues. Cette étude montre que le protocole utilisé peut permettre d'évaluer l'activité reproductrice des rorquals communs, mais il pourrait évoluer dans le but de mieux connaître les variations cycliques des femelles et de dépister les éventuelles naissances d'une saison à l'autre.

Mots-clés : Rorqual commun, sexage, génétique, gestation, progestérone, stéroïdes, population.

Abstract. Hormonal evaluation of reproductive status on fin whales in the Pelagos Sanctuary. The purpose of this study was to estimate the possibility of following the reproductive activity of rorquals by means of cutaneous biopsies on which steroids stored in subcutaneous fat were measured. During 2 seasons (from June till September, 2010 and 2011), about 150 biopsies were collected in the north-western Mediterranean. The sex was determined through the amplification of the specific DNA fragments of the gene ZF-X and ZF-Y. Steroids were extracted from fat by heating and measured by radioimmunology. The results show that at least a third of females are pregnant and that two thirds of males have a status of active stallion. It is still difficult to establish the state of the females which do not present a high progesterone rate because the hormonal variations during the cycles are still badly known. This study shows that its protocol can allow to estimate the reproductive activity of fin whales. It could evolve with the aim of improving knowledge of the cyclic variations of females and detecting the possible births from a season to an other.

Keywords: fin whale, genetic, sexing, gestation, progesterone, steroids, population

Introduction

L'impact de l'environnement sur la reproduction est une question sociétale qui fait l'objet de plus en plus d'études (INSERM collectif, 2011). Dans ce contexte, il est apparu nécessaire d'établir des critères de suivi de l'activité reproductrice des rorquals communs en Méditerranée afin d'en suivre les variations, afin de pouvoir identifier, quels que soient le genre, la maturité et l'activité sexuelle et, pour les femelles, la gestation. Plusieurs études ont été conduites sur les variations des sécrétions de stéroïdes gonadiques chez les grands mammifères marins (Kjeld *et al.*, 1992 ; Mansour *et al.*, 2002 ; Robeck et Montfort, 2006 ; Kellar *et al.*, 2006 et 2009). Pourtant, à l'heure actuelle, on connaît assez mal les caractéristiques physiologiques de chaque espèce. Il reste de nombreuses inconnues, autant sur les stéroïdes produits, que sur l'âge de la puberté, les périodes d'activité sexuelle, les variations hormonales au cours des cycles ou de la gestation chez les femelles. Cette étude préliminaire, chez les rorquals communs, est destinée à déterminer, à partir d'une biopsie cutanée, le sexe de l'animal et sa production de stéroïdes gonadiques, afin d'évaluer son statut reproducteur.

Matériel et méthodes

Le mode de vie des cétacés, qui ne passent que quelques pourcent de leur vie en surface, et les contraintes du travail en mer au large, limitent fortement les options pour prélever des tissus sur des animaux vivants. Le prélèvement doit être effectué "à la volée" au moment où les animaux sont accessibles en surface. Les biopsies sont réalisées à partir d'un pneumatique semi-rigide à l'aide d'une arbalète dont la flèche est équipée d'un petit emporte-pièce. La peau et le lard sont séparés et les deux échantillons sont placés rapidement au congélateur, la peau ayant été préalablement placée dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) pour les analyses génétiques. En parallèle au prélèvement, une photo-identification est réalisée selon un protocole strict.



Figure 1. Collecte de la biopsie avec une arbalète à bord du pneumatique (>1) ; récupération de l'échantillon avec le lard qui dépasse de la pointe (2) ; préparation de l'échantillon, séparation de la peau pour les analyses génétiques et du gras pour le dosage des hormones (3) ; tous les tubes sont congelés à bord (4).

L'identification du sexe repose sur l'amplification des fragments d'ADN spécifiques du gène ZF-X (porté par le chromosome X) et du gène ZF-Y (porté par le chromosome Y) selon Bérubé et Palsboll (1996).

Les stéroïdes sont extraits à partir des échantillons de graisse fondus à 80°C. Le résidu huileux obtenu est ensuite extrait dans un mélange eau/éthanol (1:4) et le surnageant est évaporé sous courant d'azote. Le résidu est repris avec du tampon (Albumine bovine 1%) avant d'être dosé. Les concentrations de progestérone, testostérone, androstènedione et estradiol sont mesurées par radioimmunosages pour chaque prélèvement. (estradiol : RIA Kit Spectria OD68633 IDS, progesterone : RIA Kit IM1188 Beckman Coulter, testostérone : RIA kit Spectria OD68628 IDS, androstènedione : RIA kit IM1322 Beckman Coulter).

Résultats

Près de 150 échantillons ont été prélevés au cours de 2 campagnes (juin 2010 et juillet-octobre 2011). Les prélèvements étaient de bonne qualité et ont généralement permis de réaliser correctement toutes les analyses. Les résultats sont consignés dans les tableaux I et II.

Tableau I. Dosages des principaux stéroïdes sexuels sur les biopsies cutanées de morquaux communs femelles, réalisées de juin à septembre 2010 en Méditerranée

N° Id	Estradiol pg/g de graisse	Progestérone pg/g de graisse	Testostérone ng/g de graisse	Androstènedione ng/g de graisse	Statut Reproducteur
E-R71	60	> 375	2	5	gestante
E-R10	70	> 375	2	13	gestante
E-R50	70	> 375	< 2	8	gestante
E-R54	68	> 375	2	5	gestante
E-R36	66	> 375	< 2	7	gestante
E-R11	53	> 375	< 2	5	gestante
E-R46	31	> 375	< 2	< 2	gestante
E-R58	43	312	< 2	4	gestante
E-R65	25	298	< 2	14	gestante
E-R68	49	298	< 2	2	gestante
E-R63	60	293	< 2	4	gestante
E-R23	55	232	< 2	7	gestante
E-R59	64	203	2	2	gestante
E-R28	95	177	4	7	gestante
E-R57	49	142	2	3	gestante
E-R29	43	108	2	4	gestante
E-R19	24	31	< 2	2	activité lutéale
E-R53	43	13	< 2	2	activité lutéale
E-R3	105	4	< 2	3	Chaleurs ?
E-R48	154	3	6	19	Chaleurs ?
E-R72	49	2	2	9	cyclée
E-R62	56	2	< 2	< 2	cyclée
E-R5	46	2	2	2	cyclée
E-R26	31	2	2	2	cyclée

N° Id	Estradiol pg/g de graisse	Progestérone pg/g de graisse	Testostérone ng/g de graisse	Androstènedione ng/g de graisse	Statut Reproducteur
E-R7	85	< 2	2	5	Chaleurs ?
E-R47	45	< 2	< 2	3	cyclée
E-R25	52	< 2	< 2	3	cyclée
E-R44	52	< 2	6	< 2	cyclée
E-R12	49	< 2	2	2	cyclée
E-R49	29	< 2	< 2	3	peu d'activité gonadique
E-R64	< 10	< 2	< 2	4	peu d'activité gonadique

En raison du taux élevé de progestérone (Mansour *et al.*, 2002), on peut en déduire que sur les 32 femelles, au moins la moitié (16) est très probablement gestante, 2 seulement ne semblent pas avoir d'activité gonadique notable, les autres sont apparemment cyclées, en raison de leurs productions notables d'estradiol et/ou de progestérone.

Tableau II. Dosages des principaux stéroïdes sexuels sur les biopsies cutanées de rorquals communs mâles, réalisées de juin à septembre 2010 en Méditerranée.

N° Id	Estradiol pg/g de graisse	Progestérone ng/g de graisse	Testostérone ng/g de graisse	Androstènedione ng/g de graisse	Statut Reproducteur
E-R70	62	4	41	> 60	actif
E-R56	87	4	36	> 60	actif
E-R40	23	6	30	> 60	actif
E-R45	33	6	26	> 60	actif
E-R39	53	4	26	47	actif
E-R51	58	4	24	> 60	actif
E-R55	88	2	24	30	actif
E-R75	47	4	23	> 60	actif
E-R37	47	4	23	44	actif
E-R38	33	4	22	> 60	actif
E-R60	71	4	21	> 60	actif
E-R41	69	2	21	45	actif
E-R42	50	2	20	> 60	actif
E-R73	34	4	18	> 60	actif
E-R21	78	6	16	41	actif
E-R24	22	2	14	26	actif
E-R33	40	2	14	35	actif
E-R27	27	2	13	24	actif
E-R34	147	< 2	12	23	actif
E-R66	38	2	10	34	actif
E-R32	25	2	10	18	actif
E-R30	75	4	7	31	actif
E-R52	73	2	7	14	actif

N° Id	Estradiol pg/g de graisse	Progestérone ng/g de graisse	Testostérone ng/g de graisse	Androstènedione ng/g de graisse	Statut Reproducteur
E-R67	30	< 2	7	28	actif
E-R9	64	< 2	5	7	actif
E-R1	56	< 2	4	11	actif
E-R31	85	< 2	4	< 2	inactif
E-R14	85	< 2	3	9	peu actif
E-R61	77	< 2	3	35	actif
E-R4	68	< 2	2	4	inactif
E-R17	38	< 2	2	4	inactif
E-R15	21	< 2	2	10	peu actif
E-R18	23	< 2	< 2	2	inactif
E-R8	78	< 2	< 2	2	inactif

Sur les 31 mâles, la majorité (24) a une activité gonadique de reproducteur, que l'on peut apprécier par sa nette production d'androgènes (testostérone et androstènedione) et d'estradiol (responsable de la libido chez les mammifères mâles) et 5 seulement n'ont pas du tout d'activité gonadique (2 ont une faible production).

Tableau III. Dosages des principaux stéroïdes sexuels sur les biopsies cutanées de rorquals communs femelles, réalisées de juin à octobre 2011 en Méditerranée.

N° Id	Estradiol pg/g de graisse	Progestérone ng/g de graisse	Testostérone ng/g de graisse	Androstènedione ng/g de graisse	Statut Reproducteur
F-R46	118	> 375	< 2	14	gestante
F-R51	45	> 375	< 2	4	gestante
F-R12	40	> 375	< 2	14	gestante
F-R56	31	> 375	< 2	7	gestante
F-R80	23	> 375	< 2	3	gestante
F-R47	32	343	5	13	gestante
F-R13	20	315	< 2	4	gestante
F-R6	84	312	2	6	gestante
F-R4	45	256	< 2	7	gestante
F-R24	74	247	< 2	8	gestante
F-R10	51	221	< 2	< 2	gestante
F-R27	73	48	< 2	4	activité lutéale
F-R41	16	38	< 2	4	activité lutéale
F-R69	41	17	< 2	6	activité lutéale
F-R49	39	14	< 2	5	activité lutéale
F-R23	41	4	2	8	peu d'activité gonadique
F-R62	35	2	< 2	5	peu d'activité gonadique
F-R48	112	< 2	< 2	10	cyclée
F-R7	68	< 2	< 2	11	cyclée
F-R36	45	< 2	< 2	3	peu d'activité gonadique

N° Id	Estradiol pg/g de graisse	Progestérone ng/g de graisse	Testostérone ng/g de graisse	Androstènedione ng/g de graisse	Statut Reproducteur
F-R8	38	< 2	< 2	5	peu d'activité gonadique
F-R61	24	< 2	2	9	peu d'activité gonadique
F-R78	22	< 2	< 2	7	peu d'activité gonadique
F-R39	18	< 2	< 2	5	peu d'activité gonadique
F-R38	16	< 2	< 2	3	peu d'activité gonadique
F-R37	11	< 2	3	2	peu d'activité gonadique
F-R17	< 10	< 2	< 2	< 2	peu d'activité gonadique
F-R59	< 10	< 2	< 2	7	peu d'activité gonadique
F-R52	< 10	< 2	< 2	2	peu d'activité gonadique

Sur les 29 femelles, 11 (environ un tiers) sont très probablement gestantes, 12 ne semblent pas avoir d'activité gonadique notable, 6 sont apparemment cyclées, en raison de leurs productions notables d'estradiol ou de progestérone.

Tableau IV. Dosages des principaux stéroïdes sexuels sur les biopsies cutanées de roquals communs mâles, réalisées de juin à septembre 2011 en Méditerranée.

N° Id	Estradiol pg/g de graisse	Progestérone ng/g de graisse	Testostérone ng/g de graisse	Androstènedione ng/g de graisse	Statut Reproducteur
F-R79	54	< 2	24	> 60	actif
F-R82	26	2	19	> 60	actif
F-R81	22	< 2	16	> 60	actif
F-R65	102	3	15	> 60	actif
F-R77	37	< 2	11	> 60	actif
F-R58	41	< 2	10	> 60	actif
F-R57	33	2	7	> 60	actif
F-R72	39	2	18	54	actif
F-R60	< 10	< 2	8	48	actif
F-R75	35	< 2	7	44	actif
F-R54	45	2	13	41	actif
F-R53	< 10	< 2	9	36	actif
F-R66	33	< 2	5	36	actif
F-R70	45	3	9	36	actif
F-R42	15	2	1	33	actif

N° Id	Estradiol pg/g de graisse	Progestérone ng/g de graisse	Testostérone ng/g de graisse	Androstènedione ng/g de graisse	Statut Reproducteur
F-R71	22	2	9	32	actif
F-R64	19	< 2	7	28	actif
F-R55	26	< 2	13	28	actif
F-R33	13	3	4	28	actif
F-R43	58	< 2	8	23	actif
F-R73	38	< 2	8	22	actif
F-R67	10	< 2	9	22	actif
F-R74	59	8	10	21	actif
F-R76	89	2	1	21	actif
F-R45	34	< 2	6	20	actif
F-R63	37	< 2	6	19	actif
F-R35	23	2	9	17	actif
F-R5	86	< 2	<2	16	actif
F-R16	54	< 2	3	16	actif
F-R50	< 10	< 2	7	13	actif
F-R31	11	< 2	< 2	12	peu actif
F-R22	29	< 2	< 2	11	peu actif
F-R32	33	< 2	4	11	peu actif
F-R40	22	< 2	5	10	peu actif
F-R21	56	< 2	< 2	10	peu actif
F-R25	14	< 2	< 2	9	peu actif
F-R19	56	< 2	< 2	9	peu actif
F-R14	58	< 2	< 2	8	peu actif
F-R26	59	< 2	< 2	7	peu actif
F-R34	37	< 2	3	6	peu actif
F-R44	58	< 2	3	5	peu actif
F-R18	37	< 2	< 2	3	inactif
F-R68	23	< 2	< 2	3	inactif
F-R9	31	< 2	< 2	2	inactif
F-R11	< 10	< 2	< 2	2	inactif
F-R30	31	< 2	< 2	2	inactif
F-R29	16	< 2	2	2	inactif
F-R20	33	< 2	< 2	< 2	inactif
F-R15	22	< 2	< 2	< 2	inactif

Sur les 49 mâles, 30 ont une activité gonadique de reproducteur et 8 seulement n'ont pas du tout d'activité gonadique (11 ont une faible production).

Discussion

Qualité des mesures de stéroïdes

Les échantillons étaient généralement de bonne qualité, quelques échantillons contenaient une trop faible quantité de graisse et les résul-

tats obtenus présentaient un risque important d'erreur. Si les valeurs mesurées n'étaient pas très élevées ou très faibles, ne permettant pas de statuer sur le statut reproducteur, aucun résultat n'a été produit. L'analyse génétique a montré que quelques rares animaux avaient été biopsiés par erreur 2 fois au cours d'une même campagne, mais cela a permis de constater que les mesures de stéroïdes se répétaient correctement eu égard à la précision des résultats (de l'ordre de 15 à 20 %) et à leur interprétation du statut de reproduction.

Évaluation du statut reproducteur

Chez les femelles, dans la mesure où les variations hormonales au cours du cycle sexuel et de la gestation ne sont pas connues avec précisions, les interprétations se fondent sur les connaissances physiologiques établies dans les autres espèces de mammifères. Pour les femelles on sait que la gestation s'accompagne d'une forte augmentation de la progestérone dans la première phase de la gestation mais, qu'en fin de gestation, la progestérone s'abaisse au profit d'une augmentation des estrogènes dont l'estradiol. Il est aussi vraisemblable qu'au moment des prélèvements (de juin à septembre) les animaux soient dans leur première partie de gestation, donc une forte élévation de la progestérone est un bon témoin de la gestation. Cependant une absence de progestérone ne peut exclure que la femelle n'est pas dans la deuxième phase de la gestation. Pour les autres animaux, les sécrétions notables d'estradiol et de progestérone sont les témoins d'une activité gonadique, sans que l'on puisse préciser la phase du cycle. Pour les animaux dont la production de stéroïdes est faible, en fonction des dates de prélèvement, l'interprétation peut-être un peu différente. Il peut s'agir soit de femelles impubères, soit d'animaux en dehors de leur saison sexuelle (= période de reproduction pendant laquelle la femelle présente des cycles) ce qui est peut-être plus probable en septembre qu'en juin, mais cela reste à démontrer.

Chez les mâles, la sécrétion d'androgènes (androstènedione et testostérone) révèle l'activité gonadique. Lorsqu'elle s'accompagne d'une valeur notable d'estradiol (liée à la libido chez les mammifères des 2 sexes), il s'agit probablement de reproducteurs actifs. Comme pour les femelles, une faible sécrétion de stéroïdes entre juin et septembre correspond probablement à des animaux impubères.

Conclusion

Cette étude préliminaire montre que les rorquals communs ont une activité reproductrice notable avec au moins un tiers (voire la moitié) des femelles prélevées gestantes. Il serait intéressant de poursuivre cette étude, à la fois pour tenter d'évaluer la naissance de petits (ce qui impliquerait des prélèvements et des analyses génétiques sur les jeunes) mais aussi pour mieux connaître les variations hormonales des femelles au cours de la gestation (ce qui impliquerait des prélèvements

et des analyses génétiques mensuellement au moins de mai à octobre), les travaux sur les cycles nécessiteraient une étude plus complexe puisqu'il faudrait disposer d'un suivi mensuel sur une année.

Références

- BERUBE M., PASBOLL P.J. (1996). - Identification of sex in Cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers *Molecular Ecology* 1996, 5, 283-287.
- INSERM Expertise collective. Reproduction en environnement, 2011 - Les éditions Inserm, 101 rue de Tolbiac, 75013 Paris.
- KELLAR M., TREGO L., MARKS I. and DIZON E., 2006. - Determining pregnancy from blubber in three species of delphinids. *Marine Mammal Science*, 22 (1): 1-16.
- KELLAR N., TREGO M., MARKS C., CHIVERS S., DANIL K., and ARCHER F., 2009. - Blubber testostérone: a potential marker of male reproductive status in short-beaked common dolphins. *Marine Mammal Science*, 25 (3): 507-522.
- KJELD J.M., SUGURJONSSON J. and ARNASON A., 1992. - Sex hormone concentrations in blood serum from the north Atlantic fin whale (*Balaenoptera physalus*). *J. Endocrinol.* 134(3) 405-413.
- MANSOUR A. H., MCKAY W., LIEN J., ORR J.C., BANOUB J.H., OIEN N. and STENSON G., 2002. - Determination of pregnancy status from blubber samples in minke whales. (*Balaenoptera acutorostrata*)- *Marine Mammal Science*, (18) 1: 112-120.
- PEREZ S., GIMENEZ J. and MANCERA J.M., 2011. - Use of blubber levels of progesterone to determine pregnancy in free-ranging live cetaceans. *Mar Biol*, 158, 1677-1680.
- ROBECK T.R. and MONFORT S.L., 2006. - Characterization of male killer whale (*Orcinus orca*) sexual maturation and reproductive seasonality. *Theriogenology* 66: 242-250.

