

Université du Québec  
INRS-Institut Armand Frappier  
Centre de Recherche en Santé

***Mesure de la longueur des télomères : un outil de détermination  
de l'âge des cétacés applicable aux recherches en écotoxicologie.***

Par  
Joanna Prime

Mémoire présenté  
pour l'obtention  
du grade de Maîtrise ès sciences (M. Sc.)  
en Sciences expérimentales de la santé (S.E.S.)

Jury d'évaluation

Examineur externe	Dr Éric Thorin Institut de Cardiologie de Montréal, Centre de Recherche.
Examineur interne	Dr Michel Charbonneau INRS- Institut Armand Frappier Centre de Recherche en Santé Humaine
Directeur de recherche	Dr Michel Fournier INRS-Institut Armand Frappier Centre de Recherche en Santé Humaine
Codirecteur de recherche	Richard Sears Station de Recherche sur les Cétacés des Îles Mingan

Droits réservés de Joanna Prime, 2005



## RÉSUMÉ

L'âge chez les animaux sauvages est toujours un paramètre difficile à estimer pour les scientifiques de terrain. La technique habituellement utilisée consiste à compter le nombre de couche de dentines présentes dans les dents de animaux. La difficulté est accrue pour les mammalogistes marins travaillant sur les cétacés, et plus particulièrement sur les mysticètes, qui possèdent des fanons. Le but de cette étude a été de mettre en place une nouvelle méthode de biologie moléculaire permettant de déterminer l'âge des animaux, en analysant leurs télomères.

Les télomères constituent la partie terminale des chromosomes et rétrécissent à chaque division cellulaire. Nous avons donc tenté d'établir une courbe étalon du type  $TRF = f(\text{âge})$  où TRF (abréviation anglaise pour Telomere Repeat Fragment) est la longueur des télomères, à partir d'animaux d'âge connus. L'échantillonnage s'est fait sur deux espèces de cétacés fréquentant le Saint-Laurent, Québec, Canada. Les baleines à bosse de l'Atlantique Nord dont l'aire de chasse estivale se situe à Mingan (MIN) et les bélugas de la population de l'estuaire du Saint-Laurent (ESL). L'ADN est extrait des cellules épidermiques, digéré par les enzymes de restriction RsaI et HinfI et les fragments sont séparés selon leur taille par gel d'agarose non-dénaturant 0,7 %. Ils sont ensuite transférés sous vide sur une membrane de nitrocellulose et hybridés à une sonde  $(CCCTAA)_4$  radiomarquée au  $^{32}P$ . L'analyse par Phosphor Imager nous permet de définir un paramètre estimant la longueur des télomères pour chaque individu selon l'équation  $TRF (pb) = \sum O.D._i / \sum (O.D._i/M.W._i)$ , où TRF est la longueur des fragments télomériques,  $O.D._i$  est l'intégration du signal dans l'intervalle  $i$  et  $M.W._i$  est la longueur du fragment télomérique à mi-distance de l'intervalle  $i$ .

Les résultats obtenus nous permettent d'identifier pour la première fois la séquence des télomères de bélugas ainsi que celle des baleines à bosse, à savoir une répétition de l'hexanucléotide TTAGGG. Chez les baleines à bosse, les analyses statistiques ne montrent pas de corrélation entre l'âge des animaux et la longueur de leur télomères. Cependant, on constate une tendance à la diminution ( $TRF = -43 \times \text{âge} + 9766$ ;  $r = -0,363$ ;  $p = 0,246$ ;  $n = 12$ ). Cette diminution a également été observée lors de l'analyse de perte annuelle de télomères sur des échantillons d'animaux d'âge inconnu (a

=-15 pb/an  $\pm$  352). Chez les bélugas, les analyses ne montrent aucune corrélation entre ces deux variables (TRF = 11,71 x âge + 16006 ; r =0,658 ; p =0,755 ; n =25). Les essais TRAP effectués sur deux biopsies de bélugas vivants de l'ESL nous montrent une activité de l'enzyme télomérase, responsable de l'élongation des télomères. Malgré le suivi annuel depuis 1979 de la population de baleines à bosse, ce sont des animaux migrateurs et il reste difficile d'obtenir des données individuelles. Le nombre d'échantillons de baleines à bosse utilisés dans cette étude est faible et il serait intéressant de poursuivre de telles études sur un échantillon de population plus grand. Concernant les bélugas, l'étude pourrait être approfondie en travaillant sur des animaux vivants, d'âge connu, en détectant l'activité télomérasique et en la reliant à une analyse toxicologique. Un échantillon de bélugas d'Arctique pourrait être étudié en parallèle et servir de contrôle négatif.

Cette méthode a permis d'ouvrir la voie à l'étude de l'âge des cétacés en utilisant des outils moléculaires. Il reste à approfondir les connaissances dans ce domaine et ce type d'étude, malgré la difficulté d'obtenir de grandes quantités d'échantillons.



Joanna Prime



Michel Fournier

## AVANT-PROPOS

La biologie moléculaire a toujours été ma matière préférée. Et les mammifères marins une passion. Seulement voilà, comment allier ces deux thèmes ?

C'est au cours d'un stage aux Îles Mingan, dans une station de recherche sur les cétacés, que l'idée d'un sujet me permettant d'allier les deux m'est venue. Les rorquals, malgré toute l'attention dont ils bénéficient auprès du public depuis ces deux dernières décennies, restent des animaux mal connus. Par exemple, on commence à connaître les routes de migrations des rorquals à bosse (Palsboll et al., 1997) mais celles des rorquals bleus ou bien des rorquals communs demeurent un mystère (Berube et al., 1998). De même, on n'a aucune certitude sur la longévité de ces animaux, seulement des hypothèses (Jonsgard, 1969). La connaissance de leur âge est également un paramètre difficile à obtenir. Pour les odontocètes (baleines à dents), cette donnée s'obtient par analyse des couches de dentine dans les dents. Mais l'accès à ce paramètre est limité par l'obtention des dents, qui ne peut se faire que sur des animaux morts ou en captivité. Chez les mysticètes (baleines à fanons), on ne peut se servir de cette méthode.

La présente étude consiste donc à définir une technique permettant de déterminer l'âge des mammifères marins, vivants, en liberté, par simple prélèvement de peau, grâce à des biopsies. Une première partie consiste à mettre au point cette méthode sur des échantillons de bélugas échoués dans le Golfe du Saint-Laurent et à établir une courbe étalon mettant en relation la longueur des télomères en fonction de l'âge des individus. La deuxième partie de cette étude consiste à transposer cette technique chez une espèce de mysticètes, les rorquals à bosse. Cette espèce est bien connue par la station de recherche des îles Mingan et présente divers avantages : les animaux sont facilement identifiables et certains reviennent régulièrement dans leur aire de chasse. Ainsi, un animal que l'on a identifié durant l'année suivant sa naissance nous sert de référence à l'établissement d'une courbe étalon du même type que celle des bélugas, à savoir la longueur des télomères en fonction de l'âge. Le but de cette étude est donc d'utiliser ces deux courbes comme référence pour de futures recherches sur ces espèces. Une fois la méthode validée, le prélèvement d'échantillons par biopsie sur des individus non connus de bélugas ou de

baleines à bosse nous donnera facilement l'âge de l'animal par comparaison avec la courbe étalon et nous permettra d'intégrer ce paramètre dans de nouveaux travaux tels que des études de dynamique de la population, d'immunologie ou encore de toxicologie.

## REMERCIEMENTS

À Michel Fournier pour la grande confiance dont il a fait preuve à mon égard, à Stéphane pour sa patience et ses conseils, à Daniel Cyr et son équipe pour leur accueil.

À Richard et au MICS car c'est là que tout a commencé, à l'équipe pour les bons moments partagés. A Black Jack pour ses feelings ainsi qu'à Guylaine pour ses coups de mains.

Au GREMM pour leur accueil et leur participation à cette étude, merci aussi à Rober Michaud.

À Guillaume et Éric Thorin pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire.

À la SAQ pour son soutien financier.

À ma mère pour sa confiance et son appui, à Benjamin pour toute sa précieuse aide.

Merci à Sophie, Soazig, Lorenza, Julien et Isabelle, bien sûr, pour leurs présences extra-scolaires.

À Pierre pour son soutien moral, présent malgré la distance.

A Sansévérino pour son accompagnement durant ces longues journées de rédaction.

Ainsi qu'à tous ceux que j'oublie.

Bon courage à Nils.



## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>III</b>
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>V</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>VII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....</b>	<b>XV</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Les cétacés.....</b>	<b>1</b>
1.1 Présentation des cétacés.....	1
1.2 La chasse à la baleine et ses impacts.....	2
1.2.1 Pays pratiquant la chasse à la baleine.....	3
1.2.2 Les espèces de baleines chassées.....	3
1.2.3 Impacts de la chasse sur les populations de cétacés.....	4
1.2.4 Changement de position face à la chasse à la baleine.....	4
<b>2 Écotoxicité des cétacés.....</b>	<b>5</b>
2.1 Les métaux lourds.....	7
2.1.1 De la source aux cétacés.....	7
2.1.2 Les paramètres qui affectent les taux de polluants des cétacés sont liés à différents paramètres.....	8
2.1.3 Les effets des métaux lourds sur les cétacés.....	11
2.2 Les Organochlorés.....	11

2.2.1	De la source aux cétacés.....	12
2.2.2	Les variations influençant les taux d'organochlorés rencontrés chez les cétacés .....	13
2.2.3	Les effets des organochlorés sur les cétacés .....	16
2.3	La radioactivité.....	17
<b>3</b>	<b>Stocks actuels des différentes espèces de cétacés.....</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>Importance de la connaissance de l'âge des cétacés.....</b>	<b>20</b>
<b>5</b>	<b>Inconvénients rencontrés lors de la détermination de l'âge des cétacés.....</b>	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>Techniques existantes pour connaître l'âge des cétacés.....</b>	<b>21</b>
<b>7</b>	<b>Présentation de la technique relative à la mesure des télomères .....</b>	<b>26</b>
<b>8</b>	<b>Les télomères .....</b>	<b>26</b>
8.1	Description des séquences télomériques .....	26
8.2	Conservation de la séquence télomérique .....	27
8.3	Le rôle des télomères.....	28
8.4	Existence de la télomérase .....	29
<b>9</b>	<b>Description du tissu utilisé.....</b>	<b>30</b>
<b>10</b>	<b>Objectifs .....</b>	<b>31</b>
	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>35</b>
<b>1</b>	<b>Échantillonnage des baleines à bosse.....</b>	<b>35</b>
<b>2</b>	<b>Échantillonnage des bélugas.....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>Détermination de l'âge.....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>Extraction de l'ADN.....</b>	<b>38</b>

<b>5</b>	<b>Essai TRAP (Telomerase Repeat Assay Polymerisation ).....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>Analyses par technique de Southern .....</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>Analyses statistiques .....</b>	<b>41</b>
<b>RÉSULTATS .....</b>		<b>43</b>
<b>1</b>	<b>Les baleines à bosse.....</b>	<b>45</b>
1.1	Relation entre la longueur des télomères et l'âge des individus .....	45
1.2	La perte annuelle individuelle de télomères .....	47
1.3	Autres observations.....	48
<b>2</b>	<b>Les bélugas.....</b>	<b>49</b>
2.1	Activité de la télomérase.....	49
2.2	Relation entre la longueur des télomères et l'âge des individus .....	50
2.3	Autres observations.....	51
<b>DISCUSSION.....</b>		<b>53</b>
<b>1.</b>	<b>Choix de la méthode expérimentale .....</b>	<b>53</b>
<b>2.</b>	<b>Tissu utilisé pour l'étude .....</b>	<b>56</b>
<b>3</b>	<b>État de la peau .....</b>	<b>58</b>
<b>4</b>	<b>Séquence télomérique chez les espèces étudiées .....</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>Longueur moyenne des télomères .....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>Perte des télomères des baleines à bosse .....</b>	<b>60</b>
6.1	Vitesse de perte .....	60
6.2	Variations intra-individuelles.....	63
6.3	Variations inter-individuelles .....	64
<b>7</b>	<b>Perte de télomères des bélugas.....</b>	<b>66</b>
7.1	Impact de l'état de santé des bélugas .....	66

7.2	Évaluation de l'activité télomérasique dans l'épiderme de bélugas de l'ESL .....	67
	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>69</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>71</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**BPC** : biphényles polychlorés

**BWU** : Blue Whale Unit (unité de chasse de baleines)

**CBI** : Commission baleinière internationale (IWC)

**CITES** : Convention on International Trade in Endangered Species on fauna and flora  
(Convention sur le trafic international d'espèces de faune et de flore en danger).

**DIG** : Digoxygénine

**ESL** : estuaire du Saint Laurent

**GREMM** : Groupe de Recherche et d'Éducation sur les Mammifères Marins

**IUCN** : International Union for Conservation of Nature and natural resources (union internationale pour la conservation de la nature et des ressources naturelles)

**MICS** : Mingan Island Cetaceas Study (station de recherche des îles Mingan)

**OC** : organochlorés

**PCR** : Réaction de polymérisation en chaîne

**RLF** : restriction length fragments (longueur des fragments de restriction)

**TRF** : telomeric restriction fragments (fragments de restriction télomériques)

**UV** : ultra-violets



## **LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX**

### **Liste des figures :**

Résultat d'une hybridation télomère-spécifique.....	43	Figure 9 :
Principe de la mesure de télomère par luminomètre.....	53	
Figure 10 : Principe de la mesure de télomères par chimioluminescence.....	54	
Figure 11 : Schéma de la séparation possible du derme et de l'épiderme de bélugas.....	56	
Figure 12 : Profils des baleines à bosse d'âge connu.....	63	
Figure 13 : Profils de tous les individus de baleines à bosse.....	64	

### **Liste des tableaux :**

Tableau 1 : Estimation de la population de différentes espèces de cétacés.....	19
Récapitulatif des biopsies de baleines à bosse .....	35
Tableau 3 : Récapitulatif du code de décomposition des cétacés selon Géraci et Lounsbury.....	37
Tableau 4 : Récapitulatif des variations annuelles des télomères de baleines à bosse.....	47
Tableau 5 : Récapitulatif des différentes vitesses de perte de télomères en fonction de l'espèce étudiée.....	60



## INTRODUCTION

### 1 Les cétacés

#### 1.1 Présentation des cétacés

Les baleines ont toujours fasciner les populations. Elles véhiculent un aspect mythique comme celui d'Arion ou de Moby Dick. Au cours des années 1980, la baleine bleue est devenue un symbole de conservation, au même titre que différentes espèces comme les éléphants, les pandas ou le blanchon. Elles continuent de subjuguier les gens qui se groupent massivement pour libérer une orque d'un parc d'attractions ou encore empêcher la captivité de bélugas dans certains aquariums. Certaines personnes leur accordent même des pouvoirs surnaturels. Les dauphins solitaires apparaissant à proximité de plages ou de port sont appelés dauphins ambassadeurs, comme s'ils étaient chargés de représenter leur espèce auprès de l'humanité. Il suffit de taper sur un moteur de recherche d'Internet « communiquer avec les baleines » et l'on obtient plus de 11 000 sites. Certains se disent même capables d'entrer en télépathie avec les dauphins ou autres cétacés.

Il devient donc difficile de parler de baleines sans entrer dans la polémique qu'elles suscitent. Cependant, il faut réapprendre à aborder ce sujet avec simplicité et esprit scientifique.

L'ordre des cétacés fait partie du règne animal, de l'embranchement des Vertébrés, de la classe des Mammifères. Ce sont des animaux possédant une longue durée de vie et se trouvant en haut du réseau trophique. Comme tous les mammifères, les cétacés sont vivipares. Après la parturition, le veau est nourri du lait produit par les mamelles. Ils respirent de l'air grâce aux narines se trouvant sur le dessus de la tête, appelé évent. Toutes ces caractéristiques sont celles d'un mammifère terrestre qui a dû s'adapter au milieu marin après une montée des eaux, il y a soixante millions d'années. Ce premier cétacé primitif, ancêtre des cétacés actuels, n'est autre que l'archéocète. D'autres

adaptations ont également suivies telles l'atrophie des membres postérieurs qui laissent place à une nageoire caudale horizontale, un raccourcissement des membres antérieurs en nageoires pectorales ou encore une perte du système pileux, permettant un meilleur hydrodynamisme.

Ces animaux évoluent dans l'eau, élément presque mille fois plus dense que l'air. Cette particularité physique leur a permis de se développer au-delà des contraintes que l'on peut rencontrer sur la terre. Chez les cétacés, il existe des animaux gigantesques, dépassant de loin en taille et en masse n'importe quel animal terrestre. La baleine bleue est le plus gros mammifère que la terre ait jamais connue. Elle mesure jusqu'à 33 m et peut peser jusqu'à 190 tonnes (Fontaine, 1998). Cependant, on en trouve aussi de plus petites espèces, telles que les marsouins, mesurant au maximum 1,8 m pesant jusqu'à 88 kg.

Les cétacés ont une large distribution. On les retrouve dans tous les océans, toutes les mers ouvertes et même dans certains fleuves tels que l'Amazone, peuplé de dauphins d'Amazonie. Les cétacés se divisent en 2 sous-ordres. Le premier, appelé odontocètes, comprend 70 espèces. Il a la particularité de posséder des dents. Le deuxième, les mysticètes, comprend 10 espèces qui possèdent des fanons. Ces différences leur confèrent un mode d'alimentation distinct. Les odontocètes se nourrissent essentiellement de poissons et de calmars tandis que les mysticètes se nourrissent de proies plus petites, telles que le plancton ou les petits poissons.

Depuis l'apparition de la biologie moléculaire, de nouvelles études ont permis d'accroître nos connaissances des cétacés grâce à des études phylogénétiques, des études de populations, des études comportementales (aires de reproduction) ou même des études écotoxicologiques (Berube et al., 1998 ; Berube et Palsboll, 1996 ; Gauthier et al., 1999b ; Wagemann et al., 1998a; Gauthier et al., 1999a ; Palsboll et al., 1997 ; Dizon et al., 1980).

## **1.2 La chasse à la baleine et ses impacts**

Introduite par les basques, la chasse à la baleine est apparue aux 11<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> siècles en Europe. Les produits baleiniers ont largement conquis l'économie mondiale. Les cétacés ont été reconnus pour la qualité de leur chair mais surtout pour la quantité de matières grasses qu'elles stockaient. L'huile servait à confectionner des savons, alimenter les

lampes ou comme lubrifiant. Les fanons, flexibles et imperméables avaient de multiples usages tels les baleines de parapluie ou de sous-vêtements.

### **1.2.1 Pays pratiquant la chasse à la baleine**

Les pays qui ont pratiqué le plus la chasse à la baleine au cours du 20<sup>ième</sup> siècle sont la Norvège et la Grande-Bretagne jusqu'au milieu des années 1950, qui pratiquent cette pêche comme tradition culturelle. Puis, le Japon a été le principal chasseur afin de palier aux conditions de famine laissée par la guerre. La Russie fut également un des principaux chasseurs.

### **1.2.2 Les espèces de baleines chassées**

Les cétacés les plus recherchés sont les grosses espèces pour l'abondance de matières premières (Schneider et Pearce, 2004). On retrouve donc le rorqual bleu, le rorqual commun, le rorqual à bosse, le petit rorqual, le rorqual de Sei et le cachalot. Durant la saison 1930-31, 2950 rorquals bleus ont été chassés en Antarctique. Les rorquals communs possédant deux fois moins d'huile que les rorquals bleus, leur chasse n'a commencé que plus tardivement, durant la saison 1937-38, où 30 000 individus ont été chassés. Par la suite, on compte 20 000 à 30 000 individus par saison de chasse jusqu'au milieu des années 1960. Les rorquals à bosse possèdent la même quantité d'huile que les rorquals communs mais leur population étant moins abondante, leur chasse est plus difficile. C'est pourquoi le pic de chasse, se situant durant la saison 1936-37, n'est que de 9 863 individus. Puis, 2 000 à 5 000 individus par an sont chassés jusqu'au milieu des années 60. Le cachalot a commencé à être exploité en 1957-58 ; 20 000 à 30 000 individus ont été chassés par an jusqu'en 1963-64. Son huile était utilisée comme lubrifiant par l'armée américaine et par le gouvernement russe pour le programme de fusées spatiales. Lorsqu'une espèce disparaît, les chasseurs s'attaquent à une autre. Le rorqual de Sei a donc commencé à être chassé après épuisement des autres espèces, en 1962-63. De plus, la quantité d'huile apportée par individu n'est que le sixième de celle

apportée par un rorqual bleu. En 1965-66, 25 453 individus ont été chassés. Le petit rorqual a également été chassé avec 6 000 à 9 000 individus par an.

### **1.2.3 Impacts de la chasse sur les populations de cétacés**

L'industrialisation après la première guerre mondiale ainsi que l'amélioration des techniques de chasse ont permis l'apparition de navires-usines. La surexploitation de cette matière première a entraîné un déclin énorme des populations de cétacés dans la première moitié du siècle dernier. Les mesures de conservation passant après la rentabilité des produits, les quotas instaurés par la commission internationale baleinière (CBI) ont été élevés (16 000 BWU/an depuis 1932). Ces quotas qui s'appliquent aux pays membres de la CBI, surtout en Antarctique, sont trop élevés dès le départ. Il faut ajouter à cela les prises pirates, les prises par les pays non-membres de la CBI, ainsi que la corruption. Les premiers signes de baisses dramatiques de population ont entraîné une diminution du quota à 15 000 BWU en 1954. En 1960, les quotas ont été suspendus pour 2 ans afin d'inciter la Norvège et les Pays-Bas à réintégrer la CBI. En 1962, 38 552 baleines ont été tuées, montrant une surconsommation des produits baleiniers. Les quotas ont donc été diminués progressivement jusqu'à 2 300 BWU en 1972, puis ont été abolis au profit d'un comptage espèce-spécifique.

### **1.2.4 Changement de position face à la chasse à la baleine**

Les mœurs changent à partir de 1972, lors de la conférence des Nations-Unies sur l'environnement marin. Cette conférence propose un moratoire interdisant la chasse à la baleine pour une durée limitée. Ce moratoire devait permettre aux populations de cétacés de se reconstituer mais fut rejeté par la CBI. Les États-Unis prohibent cependant la chasse à baleine dans leurs eaux territoriales sauf lorsqu'elle est la subsistance de culture de populations telles que les indiens. En 1973, le CITES (Convention on International Trade in Endangered Species on fauna and flora) vote en faveur de la protection des baleines grises, franches, baleines à bosse, baleines bleues et certains stocks de rorquals communs

et rorquals de Sei. En 1976, la consultation mondiale sur les mammifères marins instaure la devise «sauver plutôt que tuer». On voit donc le nombre de pays inscrits à la CBI quadruplé à partir de 1977. Ces pays s'inscrivent à la suite de la pression d'organisation conservationnistes non- et inter-gouvernementales. Ces pays font basculer la CBI en faveur de l'arrêt de la chasse à la baleine. Le moratoire est accepté en 1982 et l'arrêt de la chasse prend effet en 1986, afin de permettre un renouvellement des stocks après une chasse intensive.

## **2 Écotoxicité des cétacés**

Malgré ces 18 années d'arrêt de chasse à la baleine, plusieurs espèces de cétacés sont menacées d'extinction. La chasse n'est pas la seule responsable de cette situation. L'état de santé de ces animaux en est un autre. En plus d'une industrie baleinière abusive ayant provoqué une baisse considérable des stocks, de nouvelles sources anthropogéniques menacent cet équilibre naturel (Reijnders et al., 1999 ; Jepson et al., 2003 ; Muir et al., 1988).

Les cétacés accumulent les polluants marins tout au long de leur existence. La bioaccumulation apparaît quand les concentrations retrouvées dans un individu sont plus fortes que celles du milieu ambiant. Cette bioaccumulation survient au cours de l'alimentation et augmente avec les niveaux trophiques. Elle est aussi appelée biomagnification (Tanabe et al., 1994 ; Dietz et al., 1996). Les principaux polluants que l'on retrouve dans les mers sont les métaux lourds et les produits organochlorés. Ils contaminent fortement de gros prédateurs tels que les thons, espadons et requins ou encore les phoques, les dauphins et se concentrent dans les individus du haut de la chaîne alimentaire marine.

Cette pollution est préoccupante pour la survie de certaines espèces menacées. Elle l'est aussi pour des soucis de santé humaine. Les cétacés sont consommés principalement pour leur viande (muscles), leur gras, mais aussi pour leurs organes internes tels que le foie, les reins, les poumons, l'estomac, le petit intestin. La Norvège et le Groenland consomment surtout les petits rorquals de l'Atlantique Nord. Au Japon, les cétacés consommés proviennent de la chasse côtière de petits odontocètes, de la chasse scientifique aux

mysticètes, des échouages et des prises accidentelles. Ces animaux étant fortement pollués, les gouvernements ont décidé de réglementer le taux de viande contaminée pour la consommation. Ces règles de santé sont propres à chaque pays selon le taux de contamination marine local. Ainsi, le gouvernement du Danemark a recommandé en 1998 :

- de manger le gras et la viande des cétacés juste une ou deux fois par mois,
- que les filles et les femmes ne mangent pas de gras avant d'avoir donné naissance,
- de ne pas manger de viande dans les 3 mois de prévision de grossesse ou pendant la grossesse et l'allaitement,
- ne pas manger les organes.

En effet, la consommation de mercure provoque une intoxication rénale aiguë (Endo et al., 2003) et celle de méthyl-mercure peut avoir des impacts sur le système nerveux du fœtus (Endo et al., 2004). La cuisson des organes ne permet pas d'abaisser ces taux, au contraire. Les organes bouillis ont les mêmes quantités avant ou après cuisson (Endo et al., 2004) ou concentrent le mercure total aussi bien que les métaux essentiels (Zn, Cu, Fe) (Endo et al., 2002).

Cependant, les produits organochlorés et le mercure ne sont pas les seuls composés à craindre. De nouveaux polluants ont été synthétisés dans les années 1970 pour remplacer les BPC. Ce sont les composés polybromés. Ayant des propriétés de résistance au feu, ils sont largement utilisés dans les industries de fabrication de textiles, plastiques et caoutchouc. Malheureusement, ils sont aussi persistants. Ils sont bioaccumulés et amplifiés dans l'environnement. Afin de réduire et d'éliminer complètement les polluants organiques persistants (POP), 138 pays participèrent à des ateliers visant à préparer l'élaboration d'une réglementation internationale des POP en juin 1998. Les négociations intergouvernementales se conclurent en décembre 2000 et la convention de Stockholm sur les POP fut adoptée le 22 mai 2001. Son but est de protéger la santé humaine et l'environnement de la production l'usage et/ou la libération des POP. Les POP concernés par ce traité sont le groupe contenant les douze éléments suivants : l'aldrine, le chlordane, les dioxines et furanes polychlorés, le DDT, la dieldrine, l'endrine, l'heptachlore, l'hexachlorobenzène, le mirex, les BPC et le toxaphène.

Des recherches ont été effectuées par la station de recherche des îles Mingan (MICS) afin d'étudier plus particulièrement les espèces concernées par cette étude, à savoir les bélugas et les baleines à bosse (Gauthier et al., 1997a ; Metcalfe et al., 1999 ; Metcalfe et al., 2004). Ces recherches ont été effectuées par prélèvement de peau et de gras, à l'aide de biopsie (Gauthier et al., 1997b).

## **2.1 Les métaux lourds**

### **2.1.1 De la source aux cétacés**

#### **2.1.1.1 L'origine et la distribution**

Les éléments toxiques comme le mercure (Hg), le cadmium (Cd), le plomb (Pb) et les métalloïdes comme l'arsenic (As) ou le sélénium (Se) sont issus de l'industrialisation et de l'agriculture. Le mercure provient également du dégazage naturel de la croûte terrestre dans l'atmosphère ainsi que des rifts marins (Weiss et al., 1971). Ces métaux lourds s'accumulent dans l'atmosphère, se déposent à la surface des océans et sont brassés par les différents courants et marées du globe (Lawson et Mason, 2001). Les sédiments du Groenland montrent une augmentation de mercure liée aux activités minières développées depuis le début des années 70 ou celles de bases militaires. Ces installations peuvent avoir un impact sur l'environnement (Dietz et al., 1996).

#### **2.1.1.2 La métabolisation des métaux lourds**

Les protéines importantes pour le phénomène de détoxification des métaux lourds sont les métallothionéines (MT). Ces protéines, découvertes en 1957, jouent un rôle important dans la régulation homéostatique des métaux essentiels tels que le zinc et le cuivre. Les MT donnent ces cofacteurs pour réactions biochimiques aux autres métalloprotéines.

Cette affinité pour les cations leur permet de fixer des éléments non essentiels comme le mercure inorganique ou le cadmium (Das et al., 2000). Elles sont utilisées comme biomarqueurs de contamination par les métaux lourds chez les animaux aquatiques dont les mammifères marins car leurs concentrations augmentent avec le taux de contamination des animaux (Das et al., 2000 ; Caurant F. et Amiard-Triquet, 1995 ; Wagemann et Hobden, 1986).

Lors de leur alimentation, les cétacés accumulent le mercure dans le foie où il est métabolisé (Wagemann et al., 1998b ; Caurant et al., 1996 ; Meador et al., 1992) puis transporté et entreposé dans les organes internes des mammifères marins (Holsbeek et al., 1998). Les taux de mercure sont très hauts dans le foie, intermédiaires dans le rein, bas dans les muscles et très faibles dans la peau. Il en est de même pour le Cadmium qui s'accumule dans les organes internes des odontocètes (Leonzio et al., 1992 ; Honda et Tatsukawa, 1983)

## **2.1.2 Les paramètres qui affectent les taux de polluants des cétacés sont liés à différents paramètres**

### **2.1.2.1 L'alimentation**

Dans l'environnement marin, on trouve les métaux comme le mercure dans les poissons (Caurant et al., 1996 ; Das et al., 2000). Les calmars sont également connus pour accumuler le cadmium (Caurant et Amiard-Triquet, 1995 ; Nielsen et al., 2000) et sont donc une source significative de polluants pour leurs prédateurs.

Ceci représente une part importante de la chaîne alimentaire pélagique côtière (Honda et al., 1982). Les quantités de métaux lourds retrouvées dans les cétacés sont proportionnelles aux quantités contenues dans leurs proies. Ainsi, des différences sont visibles entre les mysticètes et les odontocètes. Les mysticètes, qui ont une alimentation pélagique hauturière, consomment peu de poissons. Leur alimentation, plus axée sur les euphosides et le zooplancton est donc moins contaminée en mercure. Il en est de même pour les autres métaux lourds. Il en résulte un faible taux de métaux lourds chez les

mysticètes. Les odontocètes ont une alimentation pélagique côtière, composée de poissons et de calmars. Ils sont donc plus touchés que les mysticètes par cette pollution. Lorsque l'on regarde les variations inter-espèces, on s'aperçoit que des animaux de même taille, ayant le même type d'alimentation, et se trouvant dans les mêmes régions, ont des taux de mercure similaires. C'est le cas pour la population de narvals et celle de bélugas de l'est de l'arctique. Ils ont le même taux de contamination (Wagemann et al., 1998b). Cependant, lorsque l'alimentation diffère, les taux de métaux lourds diffèrent aussi. Les dauphins bleu et blanc, qui mangent beaucoup de calmars et de petits poissons, ont des taux plus importants et ce quelque soit la localisation que les bélugas, dont l'alimentation se compose d'animaux vivant dans le fond et dans les sédiments (Dietz et al., 1996 ; Honda et Tatsukawa, 1983). En méditerranée, le niveau est multiplié par dix entre les dauphins bleu et blanc et les grands dauphins. Aux îles Faro, la concentration de cadmium est supérieure chez les globicéphales par rapport aux autres espèces de la même région car leur alimentation est principalement constituée de céphalopodes (Caurant et al., 1996 ; Nielsen et al., 2000).

Les cachalots ont une alimentation basée sur les céphalopodes. Ce sont les plus gros odontocètes et ils ont besoin d'une grande quantité de nourriture. Les taux rencontrés chez les cachalots sont donc très élevés, 500 fois supérieurs à ceux des globicéphales (Nielsen et al., 2000).

#### **2.1.2.2 L'habitat**

Au sein d'une même espèce, les variations de contamination observées sont principalement liées à une différence d'habitat (Wagemann et al., 1998b ; Honda et al., 1982). En effet, les mers les plus polluées contiennent l'alimentation la plus polluée. Ainsi, si l'aire de chasse d'une espèce est très contaminée, les proies vont également posséder des taux de polluants élevés. Le taux de pollution d'une espèce est donc étroitement relié au taux de pollution de ses proies, lui-même relié aux quantités de polluants présents dans le milieu environnant. Comme ces dernières sont plus étendues dans les pays développés, la pollution est plus grande dans les mers de l'hémisphère nord que celles de l'hémisphère sud. Les concentrations de marsouins de la mer du Japon sont

supérieures à celles des marsouins du détroit de Béring (Arctique) (Endo et al., 2003). On peut également noter des différences de concentrations de plomb chez les bélugas de l'arctique canadien et les bélugas du St Laurent.

Les individus d'une même espèce, d'un même groupe, se nourrissent à peu près en même temps des mêmes proies. Ils devraient donc avoir le même niveau de contamination (Nielsen et al., 2000). Il existe tout de même des différences. Elles peuvent être liées à la taille de chaque individu, l'âge ou encore le sexe.

### **2.1.2.3 Le sexe**

On note des différences de contamination par les métaux lourds selon le sexe de l'animal, pour une espèce donnée. Ces différences sont liées à la vitesse de nutrition et de métabolisme ou au cycle lipidique relié aux activités reproductrices comme la parturition ou la lactation. Les femelles excrètent certains métaux lourds lors de la gestation, par voie transplacentaire ou sanguine, puis lors de l'allaitement (Honda et al., 1982 ; Endo et al., 2004 ; Nielsen et al., 2000). On peut ajouter à cela un possible changement de régime (de proies).

### **2.1.2.4 L'âge**

Les taux de métaux lourds augmentent au cours de l'année suivant leur naissance. Cette augmentation correspond au transfert de la mère vers la progéniture par le lait maternel (Honda et al., 1982). Les taux continuent d'augmenter après sevrage. Le taux de mercure augmente avec l'âge dans le foie, le rein et le muscle (Leonzio et al., 1992). Il en est de même pour la contamination par le Cadmium (Meador et al., 1992 ; Leonzio et al., 1992 ; Honda et Tatsukawa, 1983). Ces taux augmentent dans le foie et dans les muscles avec l'âge (Paludan-muller C, 1993). Cependant, un maximum semble être atteint à l'âge de 4 ans dans les muscles et le foie tandis que la quantité diminue dans les reins.

Ces études qui contiennent le paramètre âge sont effectuées sur des carcasses d'animaux échouée, lors de nécropsies suivant les chasses scientifiques ou indigènes ou lors de prises accidentelles. Aucune étude n'est réalisée à partir d'animaux vivants.

### **2.1.3 Les effets des métaux lourds sur les cétacés**

Le Cadmium a des effets neurotoxiques et peut induire des parastases. A de plus forts taux d'expositions, il peut engendrer des ataxies (mauvaise coordination des mouvements), des réductions du champ de vision et une surdité. Comme les autres métaux lourds, il est transmis de la mère au fœtus systématiquement (Caurant et Amiard-Triquet, 1995). Des effets sur le fœtus sont à craindre à de très faibles niveaux. On a retrouvé des fœtus avec un taux de contamination de 11 ou 25,2 µg/l, concentrations induisant une embryotoxicité et des risques tératogènes chez les mammifères terrestres. Le cadmium peut également induire une néphrotoxicité (Das et al., 2000). Pour sa part, le mercure provoque des pathologies telles que «Minamata disease» (Honda et al., 1982).

## **2.2 Les Organochlorés**

Les principaux organochlorés (OC) rencontrés dans les mammifères marins sont les DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), les HCH (hexachlorocyclohexanes), les CHL (composés chlordanes) et les BPC (biphényles polychlorés) dont le HCBP (biphényle hexachloré) (Tanabe, 2002). On retrouve également le dieldrine, l'aldrine, le lindane, l'époxyde d'heptachlore et d'autres congénères de BPC.

## **2.2.1 De la source aux cétacés**

### **2.2.1.1 L'origine**

Utilisés massivement jusqu'en 1977 pour leurs propriétés physiques variables, ils ont été largement distribués dans l'environnement. Les sources de pollution des BPC sont localisées dans les pays développés tandis que les pollutions par les insecticides organochlorés (comme les DDT, les HCH ou les CHL) sont utilisés dans les pays en voie de développement (Tanabe, 2002). La destination finale de tous ces polluants apparaît comme étant l'environnement marin, et particulièrement les régions polaires. On peut ajouter à ces polluants les composés butyliques. La pollution majeure de ces polluants ne se situe pas seulement dans les pays développés mais aussi dans ceux en voie de développement, suggérant ainsi une pollution générale qui continue à se répandre à travers le globe. En effet, les conditions climatiques tropicales telles que des températures élevées ou de fortes pluies favorisent l'évaporation des organochlorés (OC), et par là même, leur dispersion globale. Les sources de pollution de ces produits et leurs destinations finales doivent être deux localisations différentes (Tanabe, 2002). En conséquence, les impacts toxiques ne vont pas se limiter aux écosystèmes locaux, près des sources émettrices, mais aussi à des régions inattendues telles que les régions arctiques et antarctiques (Muir et al., 1999).

### **2.2.1.2 La distribution**

Les solvants organochlorés étaient utilisés en grande quantité pour le dégraissage des métaux et le nettoyage à sec, ainsi que dans les industries des peintures, des colles ou des encres. Les déchets provenant de ces industries étaient répandus sur des terres désertes ou jetés à la mer avant l'interdiction de leur production. Les aérosols formés lors de combustion incomplète après incinération ou sous forme de vapeur ont été véhiculés dans l'air, augmentant leur dispersion. Un autre facteur de distribution dans l'environnement est l'érosion des sols par le vent. Cependant, ces produits n'étant pas solubles dans l'eau,

ils se déposent au fond des mers avec les sédiments. La production de ces OC et BPC a été interdite lorsque les premières traces retrouvées dans la vie sauvage (en 1966) ont été jugées comme ayant des effets toxiques. En 1972, l'atlantique nord comptait 20 millions de kg de BPC. Ils possèdent une forte persistance car ils sont très peu dégradés dans la nature. C'est pourquoi ce problème est toujours d'actualité. Dans les années 1960, 5 organochlorés ont été retrouvés dans 81 mammifères marins. Dans les années 1990, 265 polluants organiques ont été retrouvés dans plus de 5000 mammifères marins de part le monde (Hope et al., 1997 ; O'Shea et Brownell, 1994 ; De Guise et al., 1994).

### **2.2.1.3 La métabolisation**

L'entrée des polluants dans la chaîne alimentaire se fait par le plancton marin. La haute lipophilité des OC provoque leur bioaccumulation à travers le poisson pour se retrouver chez les mammifères (Jones, 1989 ; Tilson et al., 1979).

L'absorption des BPC par les cétacés se fait par voie orale, à travers l'alimentation. On les retrouve donc au niveau du foie, où ils sont métabolisés. Les produits engendrés peuvent se lier au glutathion (tripeptide présent dans le foie) ou aux lipoprotéines, ce qui facilite leur transport vers d'autres tissus et favorise leur entreposage dans les tissus adipeux (Lee et al., 2002). Cette accumulation est unique et spécifique aux mammifères marins. Ces derniers possèdent des taux de BPC élevés et ont donc une faible capacité à décomposer ces contaminants toxiques.

La monooxygénase benzo(a)pyrène (BPMO) est utilisée comme bio-indicateur de ces polluants. Son activité reflète l'exposition des mammifères marins aux OC (Fossi et al., 2003).

## **2.2.2 Les variations influençant les taux d'organochlorés rencontrés chez les cétacés**

Les différents taux d'organochlorés rencontrés chez les cétacés peuvent varier selon l'appareillage ou les étalons utilisés. Les variations de concentrations de produits

organochlorés rencontrés chez les mysticètes sont attribuables à la taille corporelle, la vitesse métabolique et à l'importance du compartiment lipidique pour la dilution de résidus. Elles sont également attribuées à des différences liées au métabolisme, à la cinétique et à des différences environnementales.

#### **2.2.2.1 Les différences liées au sexe de l'individu**

Les analyses sur des animaux immatures ne montrent pas de différences de concentrations en fonction du sexe. Les différences que l'on observe plus tardivement sont donc reliés aux gestations et à la lactation. Les mères sont capables de relarguer les produits en les transmettant à leur progéniture *via* le placenta et le lait. De même que pour les métaux lourds, les mâles ont des taux d'OC plus élevés que ceux des femelles après activité reproductrice et les quantités varient chez les femelles en fonction du cycle reproducteur (Hobbs et al., 2003). Cependant, on retrouve les mêmes congénères chez les femelles et les mâles.

Les aires de reproduction ou de mise-bas étant très pauvres en nourriture, les animaux sont contraints de jeûner, ou du moins de diminuer sensiblement leur consommation journalière de poissons. Elles puisent donc dans leurs graisses, là où sont stockés les organochlorés. Il découle que les contaminants sont relargués dans le système sanguin après métabolisation. Cela aide à leur excrétion par les fèces mais facilite également les transferts placentaire et lactationnel, augmentant les risques embryotoxiques ou néonataux.

#### **2.2.2.2 Les différences reliées à la localisation**

Les océans de l'hémisphère nord étant plus contaminés que ceux de l'hémisphère sud, les animaux peuplant les eaux nordiques ont donc tendance à se nourrir de proies plus contaminées que les individus de la même espèce peuplant les mers de l'hémisphère sud (Hobbs et al., 2003). Pour un même niveau trophique, comme chez le krill, les taux de DDT, CHL ou HCH sont légèrement plus élevés pour le Pacifique nord que pour

l'antarctique (Tanabe, 2002). Cette différence se retrouve à des niveaux trophiques plus élevés. Les petits rorquals pêchés en Antarctique entre les années 1984 et 1993 et ceux pêchés dans le Pacifique nord en 1987 et 1994 montrent une différence significative. Pour ce qui est l'océan Indien, Prudente et collaborateurs (1997) avancent que la contamination est réduite en OC persistants de part la rapide dissipation dans les phases d'eau tropicale.

### **2.2.2.3 Les variations liées au régime alimentaire**

La pollution par les OC est plus importante que celle des métaux chez les mysticètes car leurs proies sont pélagiques hauturières, là où se situe la pollution.

La différence de taux d'OC n'est pas forcément liée à des taux de contamination différents dans le milieu marin mais plus à une différence de régime alimentaire. Les petits rorquals d'Antarctique se nourrissent essentiellement de krill tandis que ceux du Pacifique nord ont une alimentation constituée majoritairement de poissons. Les échantillons de baleines grises prélevés au niveau de la côte sud californienne, une des zones les plus contaminées au monde en DDT car on y pratique l'agriculture intensive, ont révélé de faibles niveaux de contamination (Aono et al., 1997). Ce phénomène est dû au fait que cette aire n'est pas une aire de chasse mais sert de passage aux individus. De même, il existe deux types de population d'orques : les résidents et les nomades. Les résidents sont piscivores et les nomades ont une alimentation plus large (oiseaux marins, phoques, cétacés). On voit alors une différence de concentration entre ces deux populations vivant pourtant dans la même aire (Ross et al., 2000).

### **2.2.2.4 Variations temporelles**

De part leur caractère lipophile, les taux de contamination de BPC sont analysés dans le gras des cétacés. Beaucoup de ces animaux jeûnent durant la période hivernale. Un même animal ne montrera pas la même concentration de BPC selon que l'analyse soit faite en début d'été (peu de réserve lipidiques favorisant une concentration de polluants plus

élevée) ou en fin. Et pourtant, le taux de contamination corporelle global peut ne pas varier.

Les taux de BPC moyens mesurés chez les bélugas du Saint-Laurent sont de 78 900 ng/g (Muir et al., 1996). De même que pour les autres contaminants, les taux de BPC et de DDT augmentent avec l'âge chez les bélugas (Béland et al., 1993). La population de bélugas de l'ESL est considérée comme une population en danger depuis plusieurs années. L'habitat de ces animaux est un facteur influençant fortement leur contamination (Béland et al., 1993). Toutes ces études sont faites sur des carcasses de bélugas échoués et ne reflètent pas forcément l'état de santé de la population globale.

### **2.2.3 Les effets des organochlorés sur les cétacés**

Les OC sont des perturbateurs endocriniens qui agissent en mimant les hormones stéroïdes sexuelles, androgènes et oestrogènes, en se fixant aux récepteurs hormonaux et influençant la voie de signalisation cellulaire, ou en bloquant et altérant la liaison aux récepteurs hormonaux (anti-androgènes, anti-cérogènes) (Fossi et al., 2003). Plusieurs exemples suggèrent que l'exposition aux insecticides OC et aux BPC ont affecté les fonctions endocrines et la reproduction des mammifères marins. Des effets sur les stéroïdes, les hormones thyroïdiennes et certains cytochromes p450 surviennent également (Tanabe, 2002). Des transformations des tissus testiculaires et de l'épididyme dans les petits rorquals du Pacifique nord ont été observées (Aono et al., 1997). On observe une réduction du taux de testostérone dans le sang corrélée à l'augmentation de DDE dans le gras, suggérant un effet anti-androgène du DDE ou une interruption des stéroïdes par les OC. De même, des cas de pseudohermaphrodisme ont été vus chez la baleine franche du Groenland qui possédait des taux de contamination en BPC de 610 ng/g (Tarpley et al., 1997 ; Hoekstra et al., 2002b ; Hoekstra et al., 2002a). De guise et collaborateurs (1995b) ont observé des cas d'hermaphrodisme vrai dans la population de bélugas de l'ESL. Cette pathologie est liée à d'autres dysfonctions reproductives comme la stérilité ou des interruptions de gestation. Le métabolite du DDT a un potentiel cérogène et anti-androgène. Des taux trop importants peuvent donc affecter la vitesse, déjà lente, de reproduction chez les mysticètes. Des tumeurs et des problèmes

reproducteurs ont été observés dans les bélugas de l'ESL qui font partie des animaux les plus contaminés (De Guise et al., 1995a ; Martineau et al., 1994a ; Martineau et al., 1994a ; DeGuise et al., 1996 ; De Guise et al., 1995b ; Martineau et al., 2002b). Contrairement aux femelles d'Alaska dont la reproduction est active tout au long de la vie, les femelles du Saint-Laurent ne montrent aucune évidence de gestation après 21 ans (Béland et al., 1993). De plus, des lésions mammaires compromettent l'alimentation des petits qui sont allaités plus d'un an. Les femelles excrètent peu les BPC par le placenta et le lait car peu de petits survivent et le taux de gestation est faible. Des altérations ont aussi lieu dans le système reproducteur.

Béland et collaborateurs (1993) rapportent des cas de tumeurs ovariennes et du système endocrinien chez les bélugas de l'ESL. D'autres tumeurs ont été observées dans cette population où 40 % des animaux observés par nécropsie possèdent au moins un néoplasme, dont plus de la moitié se situent dans les tissus du système digestif. D'autres altérations surviennent : moins de 60 % des animaux possèdent un nombre normal de dents. La bouche, l'œsophage, les deux premiers compartiments gastriques ainsi que l'intestin forment des ulcères. Le système respiratoire est également touché, suggérant un effet lié à une immunosuppression. De plus, on a pu identifier dans de nombreux tissus des bactéries opportunistes. La contamination par les BPC diminue donc les capacités du système immunitaire (Bernier et al., 2000 ; De Guise et al., 1997 ; Martineau et al., 1994b ; Béland et al., 1993). De même, Simmonds et collaborateurs (1996) ainsi que Colborn et Smolen (2002) ont rapporté une augmentation de la mortalité de masse, des échouages anormaux à travers le monde. Ces anomalies sont apparues dans la deuxième moitié du 20<sup>ème</sup> siècle. Même si les facteurs responsables n'ont pas encore été démontrés, beaucoup de ces contaminants toxiques sont montrés du doigt.

### **2.3 La radioactivité**

Un autre contaminant apparaît dans les eaux des pays industrialisés. Ce polluant est le cæsium radioactif. Les sources de contamination sont les décharges d'usines radioactives (notamment dans les eaux irlandaises), les largages liés à l'accident de Tchernobyl de 1986, ou ceux liés aux essais d'armes nucléaires dans l'atmosphère. Il est distribué dans

tout l'Atlantique nord par les courants océaniques. Les taux de cæsium radioactif dans les marsouins, les phoques communs et les phoques gris échantillonnés à différentes distances de la source Sellafield (en Angleterre) sont variables. Les taux diminuent avec l'accroissement de la distance à la source. La contamination est plus importante dans cette espèce près des décharges. Ces résultats peuvent avoir une utilisation écologique car ils permettent de séparer les individus par groupes (Born et al., 2002).

Les essais nucléaires français en 1995 à Mururoa peuvent avoir des effets plus importants car les éléments chimiques employés (uranium) sont plus stables. Le temps de demi-vie physique du cæsium est de 30,17 ans et l'impact écologique est moins important si le temps de demi-vie est court.

### **3 Stocks actuels des différentes espèces de cétacés**

Malgré ces 18 années d'arrêt de chasse à la baleine, plusieurs espèces de cétacés sont toujours menacées d'extinction. Des études concernant le nombre d'individus pour chaque population de différentes espèces de baleines sont en cours afin de répondre à cette préoccupation (Lubick, 2003 ; Roman et Palumbi, 2003 ; Mitchell, 2004 ; Holt, 2004). Les chiffres annoncés par la commission baleinière internationale sont référencés dans le tableau 1.

**Tableau 1 : Estimation de la population de différentes espèces de cétacés. En ce qui concerne la population de baleines bleues de l'hémisphère nord, elle est présente en Atlantique nord mais les chiffres avancés sont trop incertains d'un point de vue scientifique.**  
 Source: <http://www.iwcoffice.org/estimate>

<b>Espèce</b>	<b>Localisation</b>	<b>Année de l'estimation</b>	<b>Approximation</b>
Petit rorqual	Atlantique nord	1987-1995	149 000
	Pacifique ouest	1989-1990	25 000
	Hémisphère sud	1988-1989	761 000
Baleine bleue	Hémisphère sud	1980-2000	400-1 400
Rorqual commun	Atlantique nord	1969-1989	47 300
Baleine grise	Pacifique nord est	1997-1998	26 300
	Pacifique nord ouest	actuellement	moins de 100
Baleine du Groenland	Mers de Beaufort, Bering, Chukchi	1993	8 000
Baleine à bosse	Atlantique nord ouest	1992-1993	11 570
	Sud de l'hémisphère sud	1988	10 000
Globicéphales	Atlantique Nord central et est	1989	780 000

#### **4 Importance de la connaissance de l'âge des cétacés**

Si l'âge des humains peut être connu par les registres de naissance, ce n'est pas le cas pour la plupart des organismes vivant en milieu naturel. Et pourtant, connaître l'âge des individus est de toute importance. Cela permet d'incorporer un nouveau paramètre aux études faites actuellement portant essentiellement sur les stocks de populations de baleines. Ces études nous indiquent une hausse de croissance de différentes populations. Selon les données de la commission baleinière internationale, la population de baleine du Groenland s'accroît à raison de 3,2 % par an ; ce taux d'accroissement celui des baleines à bosse est de 3,1% pour la période 1979-1993 dans le golfe du Maine. Cependant, ajouter l'âge nous donnerait un aperçu des dynamiques de populations des différentes espèces de rorquals et nous permettrait de mettre en relation certains paramètres historiques afin d'avoir une meilleure compréhension des événements relatifs à une population.

De même, connaître la structure âge d'une population permet de définir les impacts des interactions entre la population étudiée et son environnement et de mieux prévoir la gestion de cette population. Ceci est de la plus haute importance dans le cas des espèces en danger comme le rorqual de Sei, le rorqual bleu, le rorqual commun, les baleines franches d'Atlantique Nord ou du Pacifique Nord, les dauphins d'Hector ou la population de bélugas de l'ESL. Enfin, au sein même de la population, l'âge peut être utilisé dans les études regardant l'état de santé des individus. La connaissance de l'âge d'un individu permet de déterminer comment la vieillesse affecte différemment la reproduction, la santé ou encore d'autres comportements. Au fur et à mesure du vieillissement, les animaux montrent un déclin de fertilité et de survie (Hausmann et al., 2003b). Gilles Thierault, (2002) consultant sur le projet de l'étude de mortalité des travailleurs dans les industries de l'aluminium de la région du Saguenay, nous fait part de sa déception que Martineau et collaborateurs (2002a) n'aient pas étudié la distribution des cancers de bélugas du Saint-Laurent par catégories d'âge des individus. Cela aurait permis de connaître la classe de population la plus touchée par cette maladie. De plus, la

connaissance de ce paramètre nous permettrait de comparer et éventuellement de relier cette observation avec le milieu environnant tel que le taux de toxiques par classe d'âge.

## **5 Inconvénients rencontrés lors de la détermination de l'âge des cétacés**

Aujourd'hui, la détermination de l'âge d'animaux est souvent difficile car on manque de données historiques concernant les individus. Les biologistes de terrain dépensent beaucoup d'efforts pour déterminer l'âge des individus en les marquant. Ceci est valable dans les études chez des animaux terrestres (oiseaux, mammifères ou autres). On peut également utiliser des signes visuels comme des changements morphologiques corrélés à l'âge (plumage, pelage), ou l'état de la dentition après avoir endormi les individus. Dans le cas des baleines, le milieu dans lequel elles évoluent, de même que leurs grandes tailles, constituent une barrière à ce genre de techniques. De plus, ayant une respiration volontaire, les endormir conduirait à les asphyxier. Il faut donc voir naître ces animaux ou les identifier dans les mois ou, pour certaines espèces, les années suivant leur naissance par des techniques de photo-identification (Zeh et al., 2002). On utilise des changements morphologiques reliés à la taille des individus mais également à la couleur de leur peau. Les bélugas naissent café au lait. Ils prennent ensuite une couleur gris-bleuté jusqu'à l'âge de 4 à 6 ans. Après cela, ils sont blancs. De même, la queue des baleines à bosse juvéniles possède déjà le patron qui permet de l'identifier mais celle-ci semble recouverte d'un voile gris. Cette particularité, associée à la petite taille des individus ainsi que le comportement particulier qu'il affiche avec sa mère, nous permet de le définir comme un jeune de l'année, bien que l'on ait pas vu la délivrance.

## **6 Techniques existantes pour connaître l'âge des cétacés**

Jongsard a résumé en 1969 les techniques utilisées pour déterminer l'âge des mammifères marins. Malheureusement, peu de nouvelles techniques ont vu le jour depuis.

- Longueur du corps

Chez les cétacés, comme tous les mammifères, la longueur du corps est en relation étroite avec l'âge. Mackintosh et Wheeler ont été les premiers à introduire cette notion pour les rorquals bleus et les rorquals communs en 1929 (Jongsard, 1969). Cette notion est toujours utilisable. Cependant, elle reste subjective. Les animaux ne peuvent être mesurés avec précision depuis un bateau. Cette donnée reste donc à l'appréciation de chaque observateur, à moins de mesurer des carcasses échouées ou chassées.

- Détermination de l'âge en fonction du nombre de cicatrices

L'observation de cicatrices a également été proposée comme méthode d'analyse. Les cicatrices se forment chez les mâles à la suite d'affrontements pour l'accouplement avec une femelle. Partant du principe que ces cicatrices guérissent moins dans les eaux chaudes que froides, un lot de cicatrices est considéré comme équivalent à une migration. Ainsi, le nombre de cicatrices reflète l'âge de l'animal. Cependant, le nombre de ces observations dépend du caractère et de l'agressivité de chaque animal. De plus, il se limite principalement aux mâles. Sur le terrain, l'observation des cétacés ne permet pas toujours de déterminer le sexe de chaque individu. En effet, les parties génitales sont internes, exception faite lors de l'accouplement. Il est donc difficile de savoir si l'on est en présence d'un mâle ou d'une femelle.

- Observation des ovaires

Le nombre d'ovules relâchés permet également d'avoir un aperçu de l'âge des femelles. Les vitesses estimées dans les années 30 différaient selon les chercheurs (de 1 à 8 corpus d'après Mackintosh et Wheeler et 1 à 4 corpus d'après Wheeler pour les rorquals bleus et communs, pour une année, 1 à 3 corpus d'après Laurie) (Jongsard, 1969). En 1939, Peters observent qu'il existe 2 types de corpus : l'un pouvant être attribué à une ovulation non fécondée et l'autre à une ovulation fertile (Jongsard, 1969). Malgré tout, cette technique

implique de connaître l'âge de maturité sexuelle de chaque individu. La reproduction de ces animaux est mal connue et il faudrait également connaître la fréquence d'ovulation de ces animaux. Cette technique ne peut s'appliquer qu'aux femelles.

- Observation des fanons

Les fanons ont aussi été étudiés pour établir une relation avec l'âge. Une première hypothèse se basait sur l'observation de différentes colorations et de profondeur observées sur les fanons. Des traces plus profondes sont visibles tous les 15 à 18 cm. Cependant, aucune corrélation n'a pu être démontrée entre ces paramètres et l'âge des mysticètes. Une autre observation a été mise à jour. Lors de l'allaitement, les fanons sont plus lisses. Une deuxième technique a été développée afin de corréler l'âge de l'animal avec la distance parcourue depuis la mâchoire par cette partie. Les fanons sont composés essentiellement de kératine et s'usent rapidement. Comme les cheveux ou les ongles, ils poussent de manière régulière afin de compenser cette érosion. Le gros inconvénient de cette étude est que cette relation ne peut plus être établie lorsque l'animal atteint l'âge de 3 ou 4 ans et que toute la partie lisse reflétant la période de l'allaitement a disparu. Cependant, les traces retrouvées sur les fanons et analysées peuvent nous renseigner sur le régime de l'animal.

- Observation de l'oreille interne

Les couches de cire de l'oreille interne ont également été explorées pour déterminer l'âge. Mais cette technique comporte différents problèmes. Plus un animal vieillit, plus les vieilles couches se compriment rendant la lecture plus difficile. De plus, les comptes à l'œil nu ne permettent de mettre en évidence que 10 % des couches existant réellement. D'abord estimée à 2 couches par an, l'apparition de couches de cire a ensuite été révisée à la baisse, jusqu'à ce qu'une nouvelle hypothèse soit avancée, qui est que la vitesse d'apparition de couches de cires n'est pas constante au cours de la vie. Les études actuelles n'ont toujours pas permis de régler ce problème.

- Observation des yeux

Les lentilles cristallines sont la cible de cette technique. Le jaunissement du cristallin concerne un pigment d'une part, déjà présent à la naissance, d'autre part, s'accumulant depuis la naissance. Partant de ce principe, Nishiwaki a observé les lentilles de roquals bleus et communs (Jongsard, 1969). La couleur de celles-ci varie. On retrouve des lentilles incolores ou claires, prenant une coloration jaune clair puis jaune foncé.

Il a également observé que cet obscurcissement était proportionnel à la taille des animaux, au nombre de corpus ovariens des femelles ainsi qu'au poids des testicules chez les mâles. Cette mesure ne peut se faire que sur des animaux récemment décédés. En effet, les yeux sont les mets favoris des oiseaux marins et il n'est pas rare de retrouver une carcasse échouée dépourvue de ses yeux.

- Étude du squelette

La squelettochronologie, par coupes transversales de mandibules a montré un accroissement des couches de croissance mandibulaire avec l'âge. Cette technique aurait pu aider à déterminer l'âge mais le nombre de couches varient selon l'endroit examiné et devient constant à 13 couches.

- Observation des dents

Les dents nous renseignent également sur l'âge des animaux. Nishiwaki et Yagi ont publié une étude sur les odontocètes indiquant que les couches de dentine augmentent avec l'âge (Jongsard, 1969). La vitesse est de 2 couches par an. Cette méthode a été largement utilisée depuis et reprise pour les siréniens (Perrin et Myrick, 1980). Si les phoques ou les otaries peuvent être capturés et/ou endormis afin de prélever 3 dents permettant de calculer le nombre moyen de couches de dentines et d'en déduire l'âge, il n'en est pas de même pour les odontocètes. Il faut donc avoir accès aux carcasses et effectuer une nécropsie. Cette méthode a une autre limite qui est liée au fait que les mysticètes possèdent des fanons. Cette technique ne peut donc leur être appliquée.

- Marquage des animaux

La technique de capture-recapture est sans aucun doute la plus utilisée. Entre 1932 et 1965, près de 15 000 baleines dont les rorquals bleus, les rorquals à bosse, les rorquals de Sei, les cachalots ainsi que les rorquals communs, ont été marquées, essentiellement en Antarctique. La première difficulté consiste à marquer l'animal durant la nage. A l'aide d'une perche munie d'un objet acéré, les opérateurs doivent s'approcher de l'animal suffisamment près pour l'atteindre et le marquer aux flancs, avant que celui-ci ne plonge. De plus, l'opérateur doit avoir une idée de l'âge, au moins approximatif, de l'individu qu'il marque et doit atteindre l'animal sans le blesser. Jongsard (1969) nous indique que des scientifiques ont tenté de marquer un veau baleine à bosse mais ont touché les intestins, provoquant la mort du jeune quelques jours plus tard. Les premières marques faites sur les animaux ont été des ronds de 4,5 cm de diamètre apposés dans le gras, en prenant garde de ne pas toucher les muscles. Mais ces marques avaient le désavantage de vite cicatriser. D'autres marques plus grosses, donc plus visibles, ont ensuite été utilisées. Mais, en plus de ne pas blesser les animaux, l'autre difficulté est de retrouver ces animaux marqués. Dans la saison de chasse 1938-1939 en Antarctique, 5219 rorquals (rorquals bleus, rorquals communs et rorquals à bosse) ont été marqués. Seuls 181 ont été recouverts en 1939-1940. Cette technique a également été utilisée pour de petits cétacés tels que les bélugas de l'estuaire de la rivière Churchill ou encore les petits rorquals de certaines eaux de l'Atlantique Nord entre 1949 et 1950. Le marquage de la nageoire caudale a quant à lui été utilisé mais rapidement abandonné.

Un des problèmes majeurs de toutes ces méthodes est qu'elles sont destructrices pour l'animal. Elles impliquent que le sujet d'étude soit mort. En 1969 ce n'était pas gênant car les scientifiques embarquaient à bord des baleiniers et pouvaient donc effectuer toutes ces mesures sur les prises. Le contexte actuel ne permet pas ce type d'études. De plus, elles apportent peu d'information. Pour toutes ces raisons, bien qu'elle soit d'une très haute importance, la variable âge est donc souvent laissée de côté.

## **7 Présentation de la technique relative à la mesure des télomères**

Les récentes avancées faites en biologie moléculaire nous permettent d'élargir notre champ de recherche afin de déterminer l'âge des animaux. Ainsi, la perte graduelle des séquences télomériques, dont la vitesse a pu être déterminée grâce à l'ADN d'animaux d'âge connu, peut être utilisée comme un marqueur approximatif de l'âge pour des espèces. Dans ce cas, 2 mesures sont importantes : la longueur absolue des télomères à la naissance et la vitesse de changement de longueur des télomères.

Cette technique possède de nombreux avantages. Le premier est qu'elle n'est pas destructrice et peu envahissante pour les animaux. Le deuxième est qu'elle peut s'appliquer à de nombreuses espèces dont la connaissance du paramètre âge n'est pas disponible par le comptage de couche de dentines dans les dents tels que les poissons, les amphibiens, les reptiles ou les mammifères marins. De plus, cette méthode est rapide. Elle a déjà été mise en place sur certains oiseaux où 5 espèces ont été étudiées : le pinson zébré, le pingouin d'Adélie, la sterne hirondelle, le pétrel océanite et l'hirondelle d'arbre (Hausmann et al., 2003b ; Hausmann et al., 2003a ; Vleck et al., 2003). La mesure des télomères s'est effectuée sur l'ADN des érythrocytes prélevés par prise de sang. Une courbe étalon du type longueur des télomères en fonction de l'âge des animaux a ensuite été établie pour chaque espèce. Il s'avère que bien l'âge précis ne peut pas être déterminé avec certitude, on peut attribuer l'animal à un groupe d'âge avec 80 % de certitude.

## **8 Les télomères**

### **8.1 Description des séquences télomériques**

La notion de télomères est apparue en 1986, avec l'idée de vieillissement cellulaire (Cooke et Smith, 1986 ; Hayflick et Moorhead , 1961). L'ADN des cellules eucaryotes se trouve sous forme linéaire, en chromosomes. Les sections d'ADN double brins sont

généralement considérées comme des dommages à l'ADN (cassures double brins) par la cellule et déclenchent un arrêt du cycle cellulaire pour permettre un mécanisme de réparation de l'ADN. Pour que les fins des chromosomes ne soient pas confondues avec des cassures d'ADN, leur extrémité physique est une région chromosomique spécifique appelée région télomérique. Elle est composée de séquences répétitives d'ADN en tandem d'un hexanucléotide (TTAGGG)<sub>n</sub> (Blackburn, 1991 ; Rhodes et al., 2002 ; derSarkissian et al., 2004 ; Lansdorp, 2000). Les télomères sont des séquences d'ADN qui ne sont pas traduites (Blackburn, 2001). Les régions répétitives, adjacentes et internes aux télomères appelées séquences sous-télomériques possèdent des variants tels que TTGGGG ou TGAGGG (Wellinger et Sen, 1997 ; Blackburn, 1991 ; Lansdorp, 2000 ; Moyzis et al., 1988). Il existe d'autres régions chromosomiques composées de cette séquence, provenant de la fusion de chromosomes ancestraux, appelées séquences télomériques interstitielles et possédant une séquence télomérique exacte (Azzalin et al., 2001).

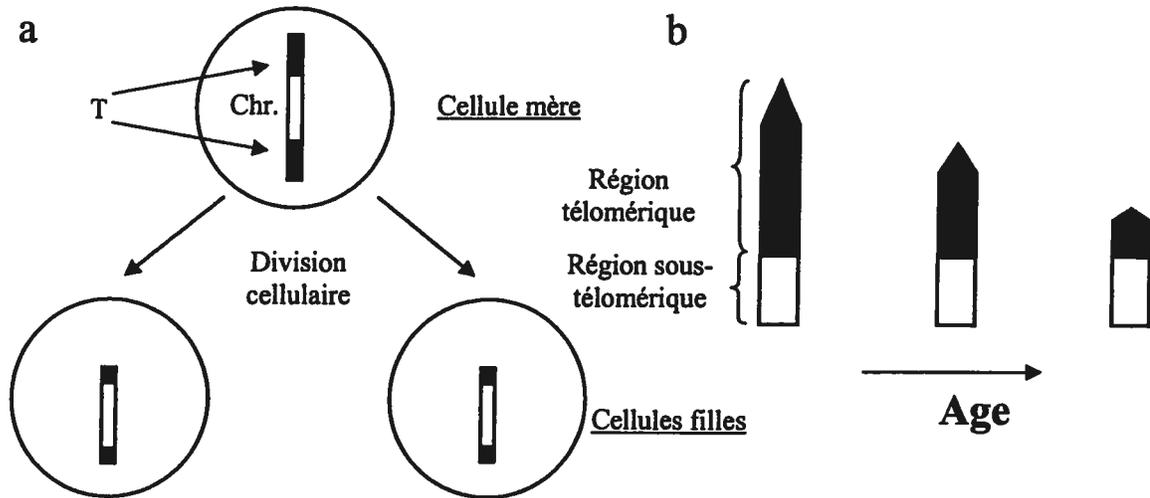
## **8.2 Conservation de la séquence télomérique**

Ces régions n'ont jamais été étudiées chez le rorqual à bosse ou le béluga mais sont extrêmement conservées au cours de l'évolution (Wellinger et Sen, 1997 ; Meyne et al., 1989). Une hypothèse avance que cette séquence remonte à un ancêtre commun il y a 400 millions d'années (Meyne et al., 1989). Des expériences menées sur 91 espèces différentes montrent que cette séquence est identique dans les différentes classes telles que les reptiles, les amphibiens, les poissons et les mammifères (marsupiaux, rongeurs, insectivores, carnivores, primates), ou encore certains champignons ou protozoaires (Wellinger et Sen, 1997). Ainsi, même les mammifères marins comme le phoque commun, *Phoca vitulina* (Meyne et al., 1989) ou le rorqual commun, *Balaenoptera physalus* (Meyne et al., 1989 ; Adegoke et al., 1993) possèdent cette séquence de télomères (Meyne et al., 1989). Des régions chromosomiques de séquence TTAGGG<sub>n</sub> non traduites sont retrouvées dans d'autres espèces de mammifères marins, de familles de balaenopteridae, eschrichtiidae et neobalaenidae comme le petit rorqual, le rorqual de Sei, de Bryde, le rorqual à bosse, la baleine grise, la baleine franche, la baleine franche

pygmée, la baleine du Groenland (Adegoke et al., 1993) et la baleine bleue (Adegoke et al., 1993 ; Arnason et Widegren, 1989).

### 8.3 Le rôle des télomères

La notion de vieillissement cellulaire a été amenée par les expériences de Hayflick et Moorhead (Hayflick et Moorhead, 1961). Ils établirent que les fibroblastes ont une durée de vie *in vitro* limitée. Cette limitation est due à la perte de longueur des télomères. Une fois la longueur des télomères critique, la cellule lance un programme de sénescence, provoquant la mort cellulaire. Les télomères ont été définis comme empêchant la fusion des extrémités des chromosomes entre eux et protégeant ainsi les régions sub-télomériques de l'érosion. Ils assurent ainsi une protection contre l'incapacité de l'ADN polymérase à traduire l'extrémité de l'ADN. En effet, elle nécessite un tremplin ARN 5'→3' et ne peut donc assurer une réplification totale des chromosomes, provoquant une perte graduelle des télomères à chaque division cellulaire (Blackburn, 1991 ; Lansdorp, 2000 ; Harley, 1991) (figure 1). Cette perte commence dès le développement embryonnaire (Cech, 2004 ; Sidorov et al., 2004 ; Butler et al., 1998) et est similaire pour toutes les fins de chromosomes (Henderson et al., 1996). La vitesse de perte est spécifique au tissu, allant de 50 à 200 pb par division cellulaire (Nakamura et al., 2002 ; Lansdorp, 2000 ; Greider, 1996). Ce phénomène est d'ailleurs impliqué dans diverses maladies comme l'athérosclérose (Chang et Harley, 1995), la maladie de Hutchinson-Gilford (Allsopp et al., 1992), le syndrome de Werner (Kipling et Faragher, 1999 ; Baird et al., 2003 ; Baird et al., 2004). Elle a lieu dans la plupart des cellules somatiques : les fibroblastes en culture (Harley et al., 1990) ou *in vivo* (Allsopp et al., 1992), les leucocytes du sang périphérique (Hastie et al., 1990), les cellules de la veine ombilicale ou de l'artère iliaque (Chang et Harley, 1995), dans les cellules sanguines, le placenta, les poumons, les muscles, le cerveau, le foie, les reins, la rate, les ovaires (Cooke et Smith, 1986).



**Figure 1** : Schéma de la perte télomérique; (a) au cours d'une division cellulaire où T représente les télomères, Chr. un chromosome. (b) représente la perte télomérique au cours de divisions successives à l'extrémité d'un chromosome. Les extrémités de chaque chromosome appelées télomères diminuent à chaque division cellulaire. Le nombre de division cellulaire augmentant avec l'âge, on en déduit que la longueur des télomères diminue avec l'âge.

#### 8.4 Existence de la télomérase

Dans les cellules germinales, une enzyme nommée télomérase vient contrecarrer ce mécanisme afin de ne pas léguer à leur descendance « un passé trop lourd » (Herrera et al., 1999 ; Blasco et al., 1997 ; Ogoshi et al., 1998). Cette enzyme ribonucléique étend la partie 3' de l'ADN et permet le maintien de la longueur des télomères (Blackburn, 1991 ; Harley, 1991 ; Greider et Blackburn, 1985).

Elle transporte une notion d'immortalité étudiée dans le cas de lignées cellulaires ou cancéreuses (Prowse et Greider, 1995 ; Cech, 2004 ; Bennett, 2003). Dans 90 % des tumeurs, les cellules expriment la télomérase (Autexier et Greider, 1996). C'est le cas de 75 % des carcinomes oraux, de 80 % des cancers du poumon, de 84 % des cancers de la prostate, de 85 % des cancers du foie, 95 % des cancers colorectaux et 98 % des cancers de la vessie (Belair et al., 1997). Mais l'activité télomérasique est avant tout un marqueur de la prolifération cellulaire (Belair et al., 1997). C'est pourquoi on détecte la protéine ou

l'ARNm de sa sous-unité catalytique hTERT à de faibles niveaux dans les cellules normales proliférantes (Fujimoto et al., 2003 ; Greider, 1998). Ainsi, les follicules de cheveux (Blackburn, 2000), l'épithélium lingual (Nakamura et al., 2002), l'épithélium mammaire, de prostate ou de vessie (Belair et al., 1997), les cellules souches de l'intestin (Hiyama et al., 1995a) ou sanguines (Hiyama et al., 1995b) montrent une activité télomérasique. Malgré cela, les télomères sont tout de même diminués dans certains épithéliums comme l'épithélium de colon (Hastie et al., 1990) ou d'uretère (Allsopp et al., 1992).

## **9 Description du tissu utilisé**

Le tissu qui semble le plus simple à acquérir chez les mammifères marins est la peau. Depuis le début des années 90, plusieurs expériences ont été réalisées grâce aux prélèvements par biopsies (Gauthier et al., 1997b ; Gauthier et Sears, 1999). D'autres études sont faites à partir de prélèvements sanguins sur les phoques ou bien certains cétacés comme les bélugas mais elles restent fastidieuses. La peau est une combinaison de tissus. L'épiderme qui protège le corps comme une barrière externe repose sur une membrane qui permet de joindre l'épiderme au tissu connectif (appelé également derme) et aux couches sous-cutanées de gras. L'épiderme est un des tissus auto-renouvelable qui demeure prolifératif tout au long de la vie. La prolifération a lieu uniquement dans la couche basale. A partir de la lame basale, les kératinocytes migrent à travers plusieurs couches suprabasales et subissent un processus continu de différenciation qui conduit à la formation de corne squameuse morte. Les cellules épidermiques ont un cycle de renouvellement de 26 à 42 jours. A l'inverse, le derme est pauvre en composants cellulaires et consiste majoritairement en composants de matrice extracellulaire (Harle-Bachor et Boukamp, 1996) (figure 2).

Au niveau de la peau, une faible activité télomérasique a été détectée (Nakamura et al., 2002). Cette activité semble être limitée aux couches basales de l'épiderme (Yasumoto et al., 1996 ; Kipling et Faragher, 1999 ; Ogoshi et al., 1998 ; Harle-Bachor et Boukamp,

1996 ; Taylor et al., 1996). Lorsque les cellules épidermales proliférantes migrent à la surface de la peau, elle arrêtent d'exprimer hTERT (Lindsey et al., 1991 ; Yasumoto et al., 1996 ; Ogoshi et al., 1998). De même, une exposition aux ultra-violets (UV) peut modifier cette activité télomérasique. En effet, les épidermes non protégés du soleil montrent une plus grande activité télomérasique (Ogoshi et al., 1998). Cependant, il existe une perte de télomères malgré l'expression de télomérase (Lewis et al., 2004). Par conséquent, les cellules épidermales, les kératinocytes ou les fibroblastes de peau semblent être un bon modèle pour développer cette méthode (Lindsey et al., 1991 ; Allsopp et al., 1992. ; Allsopp et Harley, 1995. ; Yasumoto et al., 1996. ; Friedrich et al., 2000. ; Nakamura et al., 2002.).

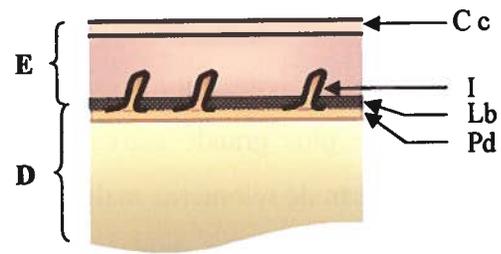
## **10 Objectifs**

Notre étude vise à développer une technique de mesure de la longueur des télomères, à partir d'échantillons de peau afin de déterminer l'âge des cétacés. La peau de baleines à bosse est prélevée par biopsies sur des animaux nageant librement dans leur aire de chasse de Mingan (figure 3). La peau des bélugas (figure 2a) est échantillonnée à partir de carcasses d'animaux retrouvés échoués dans l'ESL (figure 3). Les échantillons de baleines à bosse sont prélevés sur des animaux d'âge connu afin de pouvoir établir une courbe du type « longueur des télomères = f (âge des individus) » qui servira de référence dans la détermination d'individus d'âge inconnu. L'âge des bélugas est déterminé pour chaque carcasse par prélèvement de 3 dents et comptage de couches de dentine. La courbe ainsi générée servira elle aussi d'étalon afin de déterminer l'âge d'individus vivants de la population de l'ESL.

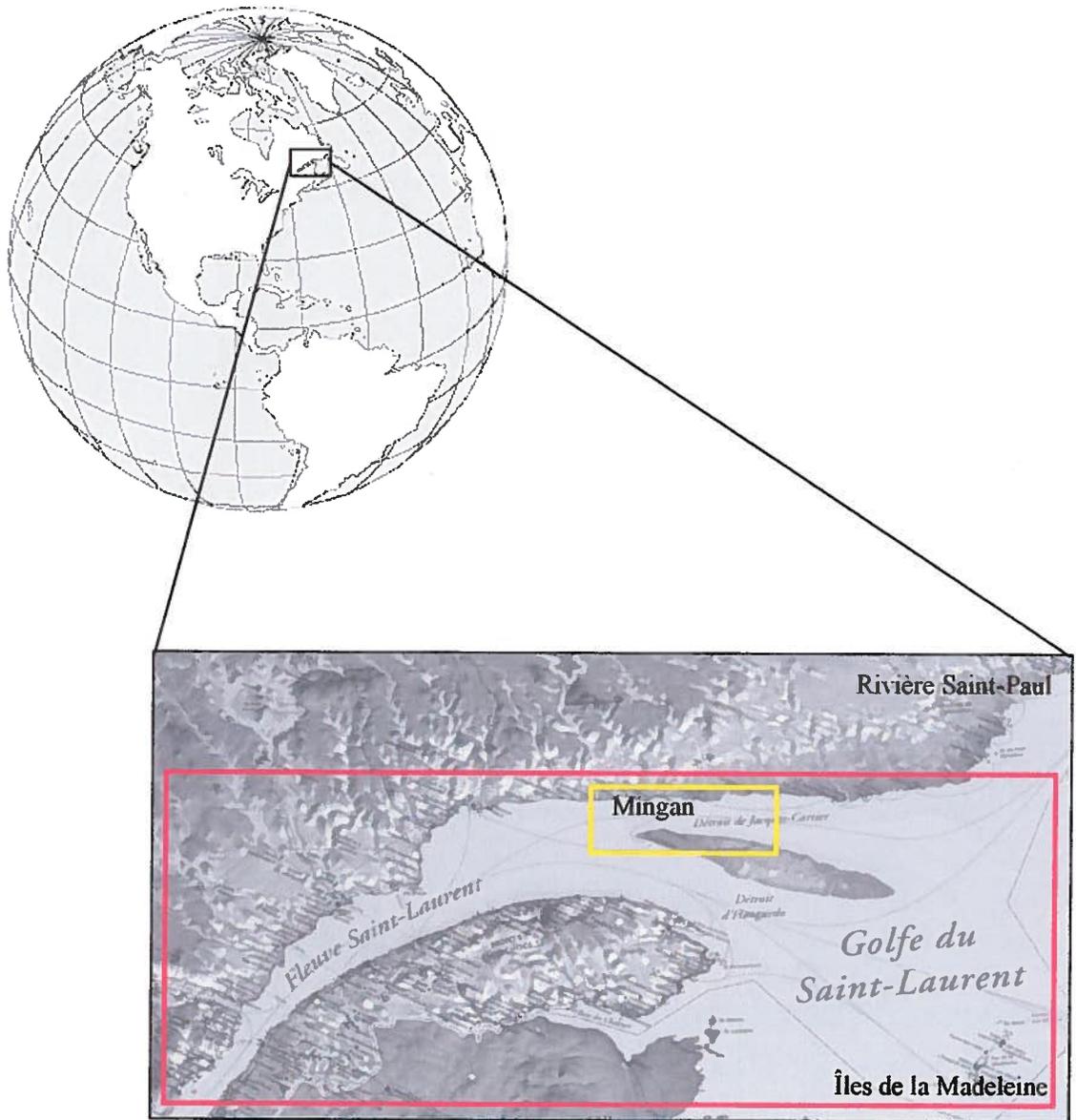
a



b



**Figure 2 :** (a) photo de peau de béluga montrant l'épiderme (E) face supérieure et le derme (D) face inférieure. (b) schéma de peau de béluga ; Cc : couche cornée; Pd : papillaire dermal; Lb : lame basale; I : interdigitalisation du papillaire dermal dans l'épiderme. L'épiderme repose sur le derme. Ils sont séparés par la lame basale et s'entremêlent au niveau des papillaires dermaux.



**Figure 3** : Aire d'échantillonnage des baleines à bosse  et des bélugas . Les biopsies des baleines à bosse ont été effectuées lors de leur présence sur leur aire de chasse de Mingan, Golfe du Saint-Laurent, Québec, Canada. Les échantillons de bélugas ont été prélevés sur des carcasses d'animaux échoués dans l'estuaire du Saint-Laurent ainsi que dans le Golfe du Saint-Laurent, Québec, Canada.

*Carte HydroQuébec*



## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **1 Échantillonnage des baleines à bosse**

Les échantillons de 13 individus ont été collectés à partir de la population de baleines à bosse de l'Atlantique Nord, dans l'aire de chasse de Mingan, Golfe du Saint-Laurent (Québec, Canada) entre juin et octobre, de 1990 à 2004 (figure 3). La peau a été récoltée par biosie sur des animaux nageant librement à l'aide d'une arbalète et d'une flèche à bout creux, comme décrit par Palsboll et collaborateurs (1991). Le tissu a été conservé dans une solution aqueuse de DMSO 20 % saturée en NaCl 6 M et entreposée à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Le sexe des individus a été préalablement déterminé par Berube et Palsboll (1996). La liste des biopsies est présentée tableau 2. Une partie des individus échantillonnés n'ont pas été vus accompagnés de leur mère la saison suivant leur naissance mais après. Il se trouve que tous ces animaux sont des femelles.

**Tableau 2 : Récapitulatif des biopsies de baleines à bosse prélevées dans la zone de Mingan. Les numéros des individus sont attribués par le MICS. Le sexe des individus (F = femelles, M = mâles) a été déterminé par analyses biomoléculaires ou par observations de comportement mère/veau. L'âge de l'individu à la biopsie a été calculé lorsque l'animal était nouveau-né (premier été suivant sa naissance) lors de son identification. ND = non disponible.**

<b>Identité de l'individu</b>	<b>Sexe</b>	<b>Année de biopsie</b>	<b>Age à la biopsie (ans)</b>
H 009	F	1990	8
H 009	F	2003	21
H 067	F	1992	4
H 067	F	2003	15
H 151	M	1991	2
H 151	M	2003	14
H 225	M	1991	0
H 225	M	1992	1
H 225	M	1993	2
H 226	M	1991	0
H 290	M	1993	0
H 379	M	1993	0
H 549	ND	2003	2
H 002	F	1991	ND
H 002	F	2004	ND
H 140	F	1992	ND
H 140	F	2004	ND
H 147	F	1992	ND
H 147	F	2004	ND
H 228	F	1991	ND
H 228	F	1992	ND
H 228	F	1993	ND
H 277	F	1992	ND
H 277	F	2004	ND

## 2 Échantillonnage des bélugas

Des individus de la population de bélugas de l'ESL, Québec, Canada, sont retrouvés échoués tous les ans entre Rivière Saint-Paul et les îles de la Madeleine (figure 3). Les carcasses de ces individus ont été utilisées pour l'échantillonnage. La peau des individus a été découpée, enveloppée d'une feuille de papier aluminium et conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les mâchoires ont été disséquées et conservées à température ambiante jusqu'à l'analyse des dents. Les échantillons de 31 bélugas ont été choisis parmi ceux échoués entre 1999 et 2002. Ils ont été sélectionnés en fonction du code de décomposition global de l'animal, établi selon Geraci et Lounsbury (1993) et présenté en tableau 3, lorsque que celui-ci était disponible ou selon un état similaire quand aucun code n'était attribué. Tous les échantillons de peau dont le code de décomposition était supérieur ou égal à 4 (état de décomposition très avancé) ont été rejetés de l'étude. De plus petites quantité de peau ont ensuite été ré-échantillonnées dans une solution aqueuse de DMSO 20 %, saturée en NaCl 6 M et conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  de façon à mimer les conditions de terrain.

**Tableau 3** : Récapitulatif du code de décomposition des cétacés selon Geraci et Lounsbury. Le code des carcasses de bélugas rencontrées dans l'ESL a été attribué grâce à cette nomenclature.

Code de décomposition	Caractéristiques
1	Animaux vivants
2	Carcasses en bonne condition, apparence normale
3	Passables, gonflements liés à la décomposition
4	Mauvaises, analyses ADN limitées
5	Momifiées ou débris squelettiques, tissus desséchés

### **3 Détermination de l'âge**

Les baleines à bosse de cette aire d'étude sont photo-identifiées depuis 1979. Nous avons choisi des échantillons d'animaux que l'on a vu le premier été suivant leur naissance. L'âge ainsi considéré est 0 an.

Pour les bélugas, les couches de dentine sont comptées sur 3 dents différentes pour chaque individu, assumant que 2 couches de dentine correspondent à 1 an (Perrin et Myrick, 1980).

### **4 Extraction de l'ADN**

Les extractions d'ADN sont effectuées avec la trousse GenomicPrep Cells and Tissue DNA isolation kit (Amersham Biosciences, Baie D'Urfé, Québec, Canada). L'épiderme et le derme sont séparés selon l'estimation de l'opérateur à l'aide d'une lame de coupeur. Un échantillon de 500 mg d'épiderme de beluga ou bien une quantité variable d'épiderme de baleines à bosse a été placé dans 10 ml de PBS, puis broyés longuement à 4 °C. Un lavage (répété deux fois) a ensuite été réalisé : le volume a été complété avec du PBS jusqu'à 50 ml et les tubes centrifugés à 1300g durant 5 min. Du tampon de lyse (1,2 ml) a été ajouté au culot et la préparation a été incubée durant 5 h à 37 °C. De la protéinase K (6 µl à 20 mg/ml) (Amersham Biosciences, Baie D'Urfé, Québec, Canada) a été ajoutée avant incubation durant 16 h à 55 °C. Après avoir laissé les tubes refroidir à température ambiante, 6 µl de RNase du kit ont été ajoutés et les tubes placés à 37 °C pendant 2 h. Une solution de précipitation de protéines (200 µl) a été ajoutée et les solutions divisées en deux dans des tubes Eppendorf de 1,5ml. Les tubes ont été centrifugés 5 min à 11 000 g, puis 500 µl de surnageant ont été placés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml propres. La précipitation de l'ADN a été obtenue par l'ajout de 100 µl de NaCl 1M et 600 µl d'éthanol 100 % (Alcools de commerce Inc, Brampton, Ontario) et en plaçant les tubes pendant 2 h à -20 °C. Après centrifugation à 11 000 g pendant 4 min, les surnageants ont été éliminés. Les culots ont été lavés par ajout de 500 µl d'éthanol dilué à 70 % avec de

l'eau et centrifugés durant 3 min à 11 000 g. Les culots ont été ensuite séchés et re-suspendus avec 50 µl de solution de réhydratation d'ADN.

## **5 Essai TRAP (Telomerase Repeat Assay Polymerisation )**

Deux biopsies ont été récoltées aléatoirement sur deux individus de la population de bélugas de l'ESL, par le Groupe de Recherche et d'Éducation sur les Mammifères Marins (GREMM), à l'embouchure du Saguenay. La peau a été placée dans des tubes cryogéniques insérés dans des tubes remplis d'isopropanol, placés dans une glacière d'azote liquide.

Les protéines totales de peau (derme + épiderme) de l'individu B, ainsi que les protéines totales de derme mais aussi d'épiderme de l'individu A ont ensuite été extraites et traitées comme décrit par le manufacturier (kit TRAPeZe™, Intergen, Purchase, NY, Etats-Unis). Le derme et l'épiderme ont été séparés par coupe mécanique à l'aide d'un scalpel. Les protéines sont extraites des tissus selon le principe qui suit. Chaque tissu (50 mg) a été broyé dans 200 µl de tampon de lyse CHAPS 1x (10 mM Tris-HCl pH=7,5 ; 10 mM MgCl<sub>2</sub> ; 1 mM EGTA ; 0,1 mM benzamidine ; 5 mM β mercaptoéthanol ; 0,5 % CHAPS ; 10 % glycérol) dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et maintenu à 4°C durant 30 min. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 12 000g durant 20 min, à 4°C. Les surnageants sont enfin séparés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml propres (par 160 µl) et la concentration totale de protéine est mesurée par la méthode de Bradford.

La détection de la télomérase se fait grâce au marquage au  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP terminal de la sonde servant de substrat à la télomérase, appelé primer TS. L'extrait total de protéines (1 mg) a ensuite été placé dans un thermocycleur avec le primer TS dans un tampon de réaction TRAP (20 mM Tris-HCl pH=8,3 ; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> ; 63 mM KCl ; 0,05 % tween 20 ; 1 mM EGTA) afin de subir une réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les amplifias ont enfin été analysés par gel PAGE 10 % non-dénaturant dans du tampon TBE 0,5 x (1,5 h à 400 V). Le gel a été séché et les produits de réaction sont visualisés par autoradiographie.

## 6 Analyses par technique de Southern

L'ADN génomique (10 µg) a été digéré par les enzymes de restriction RsaI et HinfI (1 unité/µg ; NEB, Pickering, Ontario, Canada) dans 20 µl de tampon de digestion durant 16 h à 37°C. Les fragments digérés ainsi que les marqueurs de poids moléculaires marqués au <sup>32</sup>P (Amersham Biosciences, Baie D'Urfé, Québec, Canada) ont été séparés par gel d'agarose 0,7 % non dénaturant (2,5 V/cm) dépurinés, dénaturés et neutralisés puis transférés par vacuum sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond-N+, Amersham Biosciences, Baie D'Urfé, Québec, Canada), selon les instructions du fabricant. Après avoir lié l'ADN à la membrane par lumière UV, les filtres ont été saturés durant 16 h à 49°C dans 100 ml de tampon phosphate (phosphate 0,5 M, pH 7,2, SDS 7 %, EDTA 10 mM). Une sonde radiomarquée au <sup>32</sup>P (1 000 000 cpm/ml), de séquence (CCCTAA)<sub>4</sub>, complémentaire à la séquence rencontrée fréquemment, c'est-à-dire TTAGGG<sub>n</sub> a été ajoutée dans 40 ml de tampon phosphate pour hybridation durant 16h à 49°C. Les membranes ont été lavées 5 min avec un tampon de SSC 2x, SDS 0,1 %. Ce lavage est répété. Puis, un lavage dans un tampon plus stringent SSC 1x, SDS 0,1 % a été effectué durant 10 mn. Ce lavage est également répété. Une analyse du gel grâce au système Phosphor Imager a permis la visualisation des signaux émis par la sonde spécifique aux télomères.

L'analyse densitométrique permet de déterminer la position et la force des signaux radioactifs de chaque puit (Molecular Analyst, Biorad, Mississauga, Ontario, Canada). La longueur des télomères a été calculée grâce à la formule  $TRF (pb) = \sum O.D._i / \sum (O.D._i/M.W._i)$ , où TRF (Telomeric Repeat Fragment) est la longueur moyenne des fragments télomériques, O.D.<sub>i</sub> est l'intégration du signal dans l'intervalle i et M.W.<sub>i</sub> est la longueur du fragment télomérique à mi-distance de l'intervalle i. Cette équation est celle décrite par Harley et collaborateurs et couramment utilisée depuis (1990). Elle est basée sur l'intégration du signal émis à un poids moléculaire i. La fenêtre d'analyse utilisée pour les bélugas est comprise entre 10 et 25 kb et celle des baleines à bosse est de 5 à 20 kb.

## **7 Analyses statistiques**

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisée avec le logiciel Statistica 6.0.

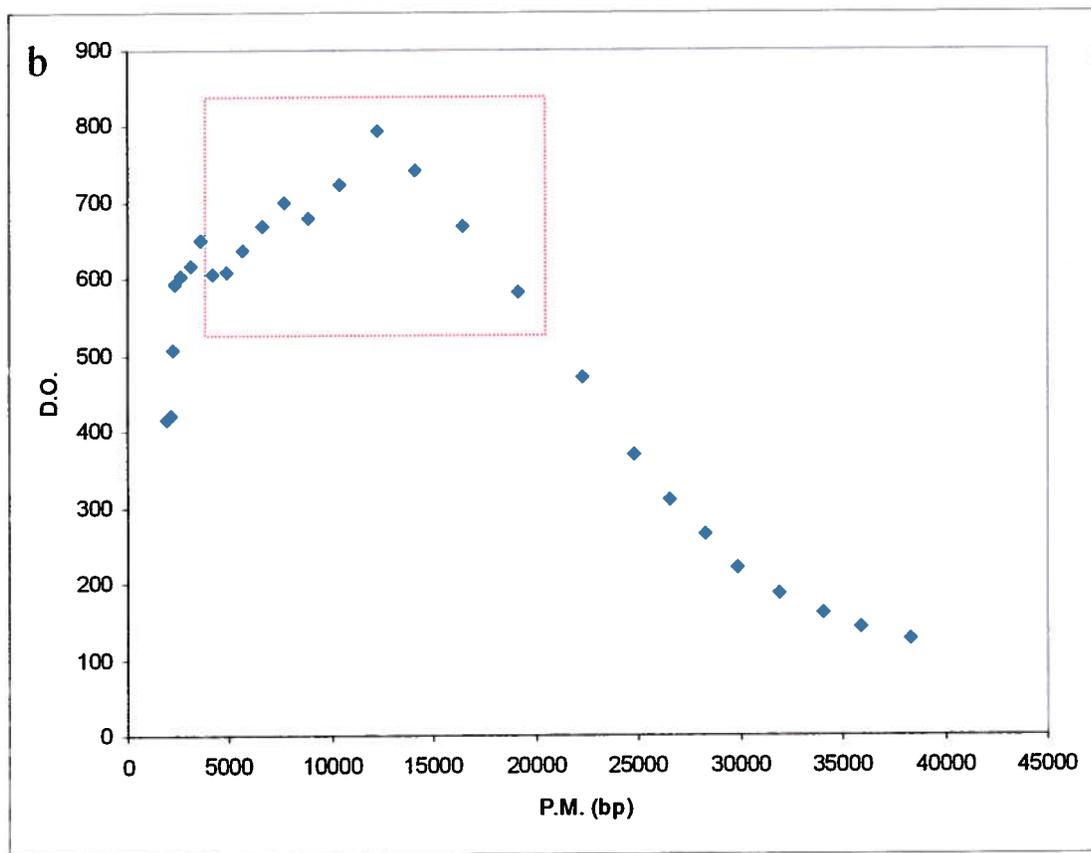
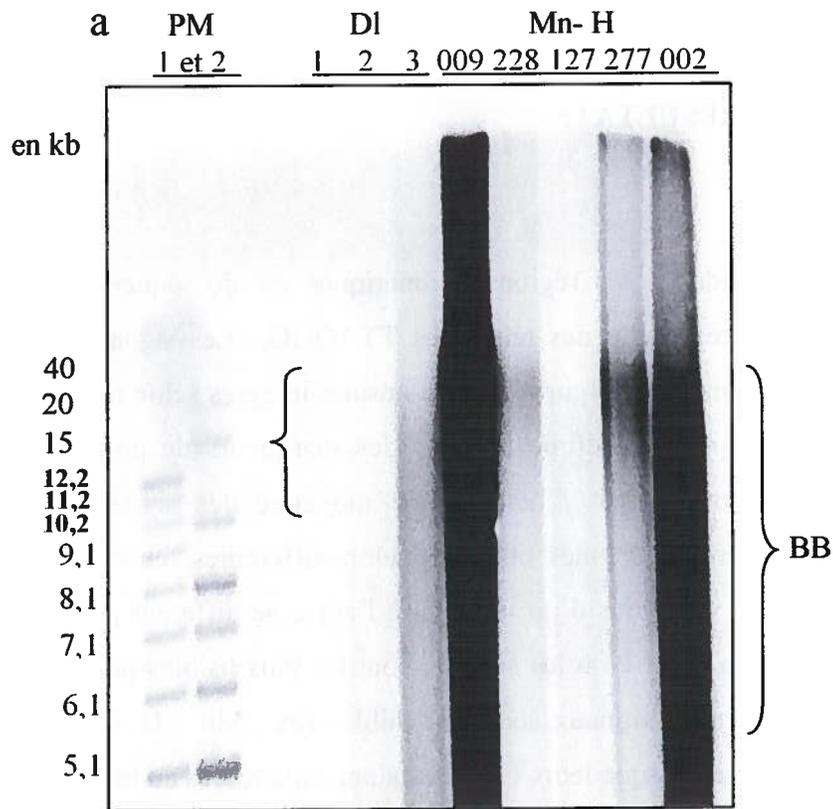
La normalité des données a été vérifiée à l'aide du test de Liliefors sur l'ensemble des données. Le coefficient de corrélation de rang de Spearman a été déterminé afin d'établir s'il existait un lien entre les variables âge et longueur des fragments des télomères.

Une ANOVA à un facteur a été réalisée afin de déterminer si soit le sexe ou soit l'année d'échouage influençait la longueur des télomères. Le seuil de significativité étant de  $\alpha = 0,05$ .



## RÉSULTATS

La sonde utilisée pour mettre en évidence les régions télomériques est de séquence (CCCTAA)<sub>4</sub>, séquence complémentaire à celle des télomères TTAGGG<sub>n</sub>. Les signaux mis en évidence par cette sonde radiomarquée (figure 4a) sont ensuite intégrés selon une fenêtre d'analyse propre à chaque espèce et définie à l'aide des marqueurs de poids moléculaires (figure 4b). Cette fenêtre permet d'obtenir une moyenne des signaux significatifs. Les longueurs de télomères moyennes obtenues selon différentes fenêtres varient pour chaque individu mais les variations d'un individu à l'autre ne diffèrent pas ou très peu. Nous avons donc choisi la fenêtre où les signaux sont les plus lisibles pour l'ensemble des données. Même si certains signaux semblent faibles (ex : Mn - H 127 figure 4a), ceux-ci n'ont été analysés que lorsque leurs valeurs étaient supérieures au bruit de fond. Pour les baleines à bosse, le signal est pris en compte entre 5 et 20 kb. Pour les bélugas, le signal analysé est compris entre 10 et 25 kb.



**Figure 4 :** (a) Résultat d'une hybridation télomère-spécifique. PM 1 et 2 = échelles de poids moléculaires; D1 1, 2 et 3 = ADN des bélugas 1, 2 et 3 digérés par RsaI et HinfI; Mn-H 009, 228, 127, 277, 002 ADN des baleines à bosse H 009, H 228, H 127, H 277 et H 002 respectivement digérés par RsaI et HinfI. B = fenêtre d'analyse des bélugas comprise entre 10 et 25 kb ; BB = fenêtre d'analyse des baleines à bosse comprise entre 5 et 20 kb. (b) Corrélation existant entre la densité optique (D.O.) obtenue et le poids moléculaire (PM) pour l'individu Mn - H 002. Le rectangle rouge représente les points sélectionnés pour l'analyse de mesure de longueur des télomères.

Afin de faciliter la compréhension du lecteur, la suite des résultats sera présentée de façon séparée pour chaque espèce.

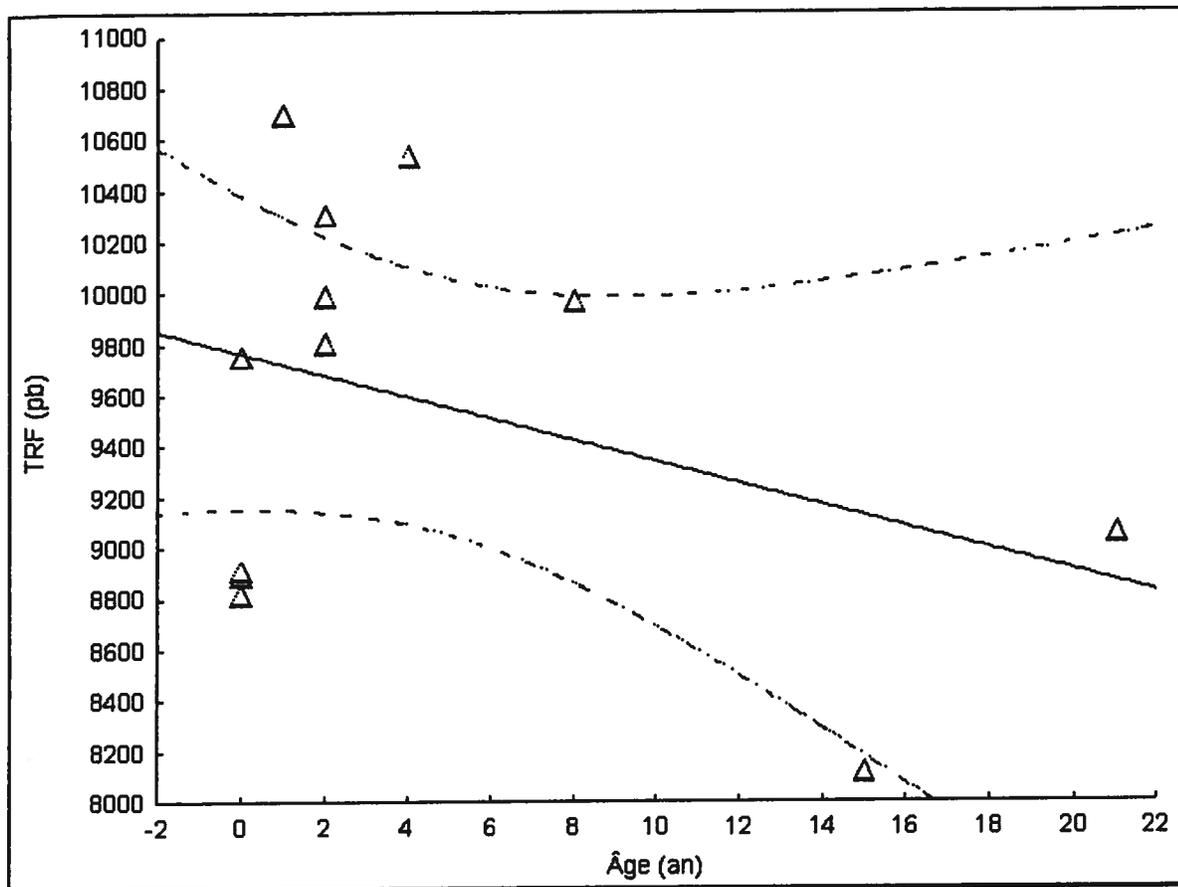
## **1 Les baleines à bosse**

Pour cette espèce, l'analyse s'effectue en deux parties. La première partie de l'étude porte sur la création d'une courbe étalon mettant en relation la longueur des télomères et l'âge des individus. La seconde partie porte sur l'établissement de la perte annuelle de longueur des télomères pour chaque individu et la comparaison de celle-ci avec la pente de la droite de régression de la première partie.

### **1.1 Relation entre la longueur des télomères et l'âge des individus**

La relation entre la longueur des télomères et l'âge des baleines à bosse a été étudiée à partir de treize observations de huit animaux d'âges connus : H 009, H 067, H 151, H 225, H 226, H 290, H 379 et H 549 dont certains ont subi deux (H 009, H 067 et H 151) ou trois (H 225) biopsies à des âges différents. Ces résultats permettent d'établir la courbe qui met en relation la longueur des télomères et l'âge des individus :  $TRF = f(\text{âge})$  (figure 5). La régression linéaire de ces données indique que les télomères ont tendance à diminuer avec l'âge des baleines à bosse selon l'équation de la droite de régression  $TRF = 9766 - (43 \times \text{âge})$ . Cependant, après avoir effectué le test de corrélation de Spearman,

nous ne pouvons affirmer que cette relation soit significative car le coefficient de corrélation est  $r = -0,363$  et la P-valeur est  $p = 0,246$ .



**Figure 5** : Longueur des télomères en fonction de l'âge des baleines à bosse. Les données pour les mâles et les femelles sont agglomérées. Les traits pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95%.

## 1.2 La perte annuelle individuelle de télomères

La deuxième partie de l'analyse est effectuée sur des animaux ayant subi plusieurs biopsies, à au moins un an d'intervalle. Nous avons utilisé les données des individus d'âge connu H 009, H 067, H 151 et H 225. De tous les animaux qui fréquentent cette aire de chasse, nombreux sont ceux dont on ne connaît pas l'âge. C'est le cas des individus H 002, H 140, H 147, H 228 et H 277. Ces individus ont subi deux biopsies (trois pour H 228). Nous avons ensuite regardé la tendance de la longueur des télomères. Pour cela, nous avons soustrait la longueur des télomères de la biopsie plus ancienne à la longueur des télomères de la biopsie la plus récente (ex :  $H_{140_{2004}} - H_{140_{1992}} = \Delta$ ). Nous avons donc la variation du nombre de paires de base pour un nombre d'années donné ( $\Delta$ ). Nous avons divisé ce nombre par le nombre d'années ( $x$ ) afin d'avoir la variation du nombre de paires de base par années ( $a$ ) pour chaque individu (ici  $a_{140} = \Delta/x$ , et  $x = 2004 - 1992$ ). Lorsqu'un individu a subi trois biopsies, la même chose est faite pour chacune des valeurs entre elles, nous amenant à trois résultats différents ( $\Delta_1$ ,  $\Delta_2$  et  $\Delta_3$ ). La fenêtre d'analyse est la même que celle utilisée dans la première partie, c'est-à-dire de 5 à 20 kb. Les résultats sont présentés dans le tableau 4. Grâce à ces observations, nous avons pu établir la relation de perte annuelle des télomères pour chaque individu. La moyenne de ces treize données est de  $-15$  pb/an. La valeur minimale rencontrée est une perte de  $-2\ 099$  pb et la valeur maximale est un ajout de  $3\ 239$  pb. Ceci nous permet de dire que les baleines à bosse, dans cette seconde partie de l'étude, perdent  $15$  pb  $\pm$   $352$  pb par année au niveau de la séquence télomérique des cellules de l'épiderme.

**Tableau 4 : Récapitulatif des variations annuelles des télomères de baleines à bosse.** Cette variation est calculée en soustrayant la valeur des télomères une ou plusieurs années après la première biopsie. Lorsque plusieurs biopsies d'un même individu sont analysées, les différences ont été calculé entre chaque année de biopsie et notée sous le sigle  $\Delta 1$ , 2 et 3.

<b>Identité de l'individu</b>	<b>Variation annuelle de télomère (a), en pb</b>
H 009	70
H 151	-174
H 067	220
H 225: $\Delta 1$	393
H 225: $\Delta 2$	-1807
H 225: $\Delta 3$	-707
H 277	-125
H 140	-97
H 228 : $\Delta 1$	3239
H 228 : $\Delta 2$	-2099
H 228 : $\Delta 3$	570
H 002	67
H 147	257
<b>Moyenne</b>	<b>-15</b>

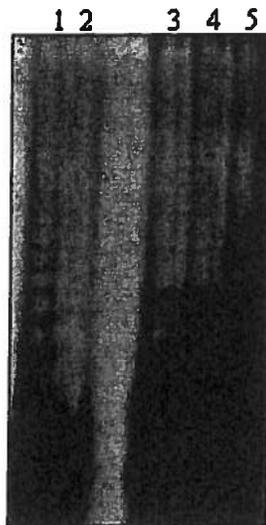
### 1.3 Autres observations

Nous avons réalisé des ANOVA à un facteur afin de déterminer si d'autres facteurs, indépendants du vieillissement des individus auraient pu influencer la diminution des télomères tels que le sexe ou la durée de conservation de l'échantillon. Dans ce but, des ANOVA à un facteur sont réalisés sur l'ensemble des données (première et deuxième partie) afin de déterminer si le sexe ou la durée de conservation de l'échantillon est un facteur influençant la longueur des télomères. Pour la durée de conservation de l'échantillon, les individus ont été regroupés dans deux catégories distinctes : les échantillons de 11 à 15 ans (animaux dont les biopsies ont été prises entre 1990 et 1994) et les échantillons récents (animaux dont les biopsies ont été prises en 2003 et 2004). Les résultats des tests montrent que la différence de longueur de télomères n'est pas relié au sexe de l'individu ( $p = 0,167$ ). De même, les biopsies de dix ans ou plus (entre 1990 et 1994) ne diffèrent pas des biopsies plus récentes (2003, 2004) ( $p = 0,745$ ).

## 2 Les bélugas

### 2.1 Activité de la télomérase

Deux biopsies ont été prélevées sur deux individus a et B de la population de bélugas de l'ESL. La biopsie de l'individu A est séparée de façon à traiter différemment le derme et l'épiderme tandis que la biopsie de l'individu B est traitée de manière à analyser les protéines totales de peau, soient celles du derme plus celles de l'épiderme. Les résultats de l'essai télomérase montrent une activité télomérasique pour tous ces échantillons (figure 6). Cette activité est forte pour l'échantillon de peau, pour l'individu B. Cette activité est plus faible pour l'échantillon de derme ou d'épiderme, pour l'individu A.



**Figure 6 :** Essai TRAP des échantillons de bélugas. Puits 1: contrôle positif de l'activité télomérasique; puits 2 : contrôle négatif de l'activité télomérasique; puits 3 : échantillon de derme de l'individu A; puits 4 : échantillon d'épiderme de l'individu A; puits 5 : échantillon de peau de l'individu B (derme + épiderme). Les mêmes quantités de protéines totales sont déposées dans les puits 3, 4 et 5.

## 2.2 Relation entre la longueur des télomères et l'âge des individus

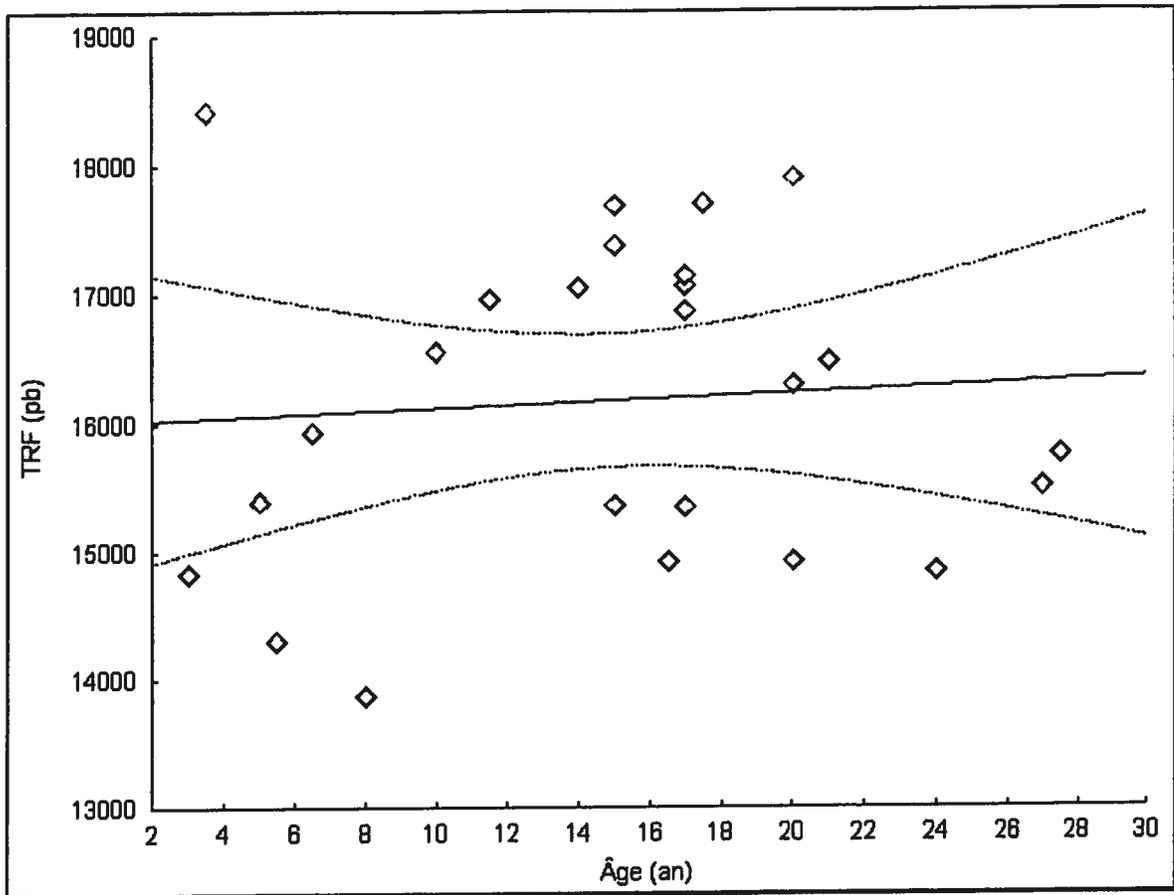
Les biopsies de bélugas ont été prélevées à partir de 1999. Les échantillons ont donc passé quatre ans au plus à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Malgré la stricte sélection des trente échantillons de bélugas, cinq individus ont dû être écartés de l'étude car ils montraient un ADN décomposé après analyse de l'ADN génomique sur gel d'agarose 0,7 % non-dénaturant (exemple figure 7).

L'état de décomposition pouvant avoir une influence sur la longueur des télomères, nous avons effectué une ANOVA à partir des neuf échantillons dont nous possédions le code de décomposition. Cette analyse indique une valeur  $p = 0,980$ . Cependant, sur les neuf échantillons testés, sept sont de code 3 et deux de code 2. La distribution du code de décomposition de ces échantillons n'est pas normale. Il est donc impossible de corréler ces deux facteurs. De plus, nous possédons trop peu d'informations pour interpréter de tels résultats.

L'analyse de la relation entre la longueur des télomères et l'âge des individus, en utilisant une fenêtre comprise entre 10 et 25 kb, montre que la longueur des télomères de bélugas n'est pas corrélée à l'âge des animaux ( $r = 0,066$  ;  $p = 0,755$  ;  $n = 25$ ) (figure 8). Elle n'est pas corrélée non plus au sexe des animaux ( $p = 0,690$ ), indiquant que ces deux facteurs n'ont pas d'interactions.



**Figure 7** : Différents états de conservation de l'ADN. PM = poids moléculaires, D1 1 = ADN en bon état, D1 2 = ADN décomposé. Lorsque l'ADN est décomposé, l'individu est soustrait de l'étude.



**Figure 8** : Longueur des télomères en fonction de l'âge des bélugas. Les données des mâles et des femelles sont agglomérées. Les traits pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95 %.

### 2.3 Autres observations

Comme pour les baleines à bosse, nous avons testé l'influence d'autres facteurs (le sexe et l'année de biopsie) sur la longueur des télomères de bélugas. Les ANOVA à un facteur montrent que la longueur des télomères n'est pas influencée par le sexe des animaux ( $p = 0,690$ ). De plus, elle n'est pas corrélée avec l'année d'échantillonnage ( $p = 0,093$ ). L'état de décomposition dans lequel est trouvé l'animal ne semble également pas affecter la longueur des télomères par une décomposition de l'ADN ( $p = 0,980$  ; 7 animaux de code 3 et 2 animaux de code 2).



## DISCUSSION

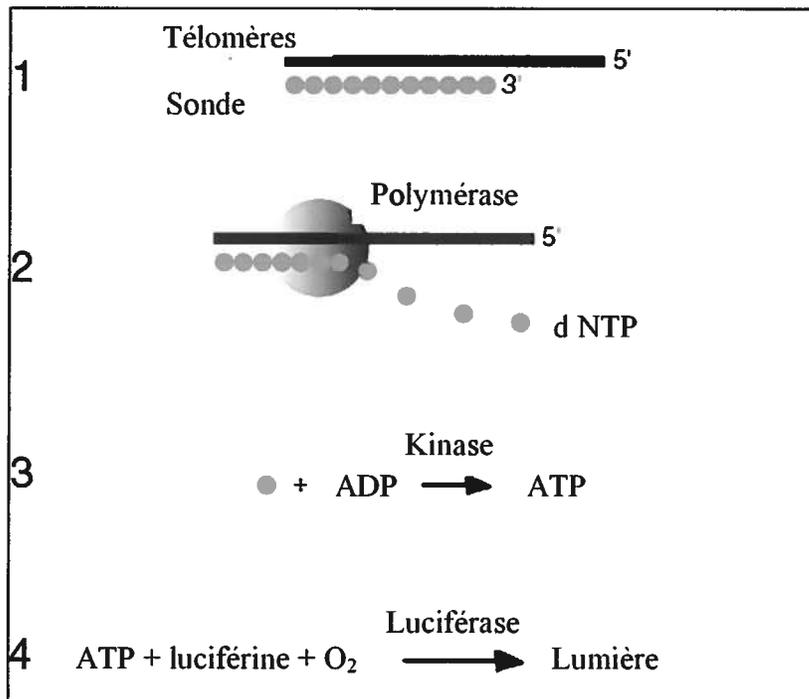
### 1. Choix de la méthode expérimentale

Il existe plusieurs méthodes permettant de mesurer la longueur des séquences télomériques. La technique d'hybridation *in situ* permet d'avoir une vue de la distribution des télomères dans le noyau pas nécessairement compacté (Henderson et al., 1996). La technique de Q-FISH (hybridation *in situ* fluorescente quantitative) permet de mesurer la longueur des télomères en métaphase mais aussi en interphase (Ferlicot et al., 2003). La PCR quantitative (Polymerisation Chain Reaction) a aussi été adaptée afin de mesurer les télomères (Cawthon, 2002). La méthode STELA (Single Telomere Length Analysis) a été développée spécifiquement pour les chromosomes sexuels (Baird et al., 2003). La technique PRINS (Primed *in situ*) produit une copie étiquetée des répétitions ADN télomériques *in situ* et mesure les TRF (Lavoie et al., 2003). Une autre méthode dérive d'un modèle enzymatique immunométrique où l'interaction anticorps-antigène a été remplacée par une hybridation à de l'ADN (FreuletMarriere et al., 2004). Grâce à un oligonucléotide couplé à de la biotine, l'acétylcholinestérase conjuguée à de la streptavidine permet de mesurer les télomères sur des lysats cellulaires.

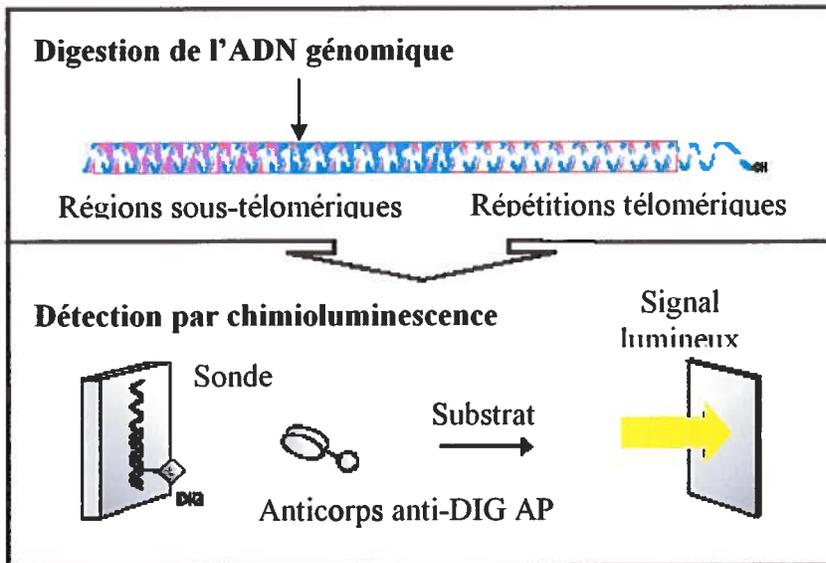
Parmi toutes les méthodes existantes, nous en avons testé deux avant de nous orienter vers la technique de Southern Blot. La première se nomme TeloGlo (Promega USA). L'oligonucléotide se fixe à l'ADN de séquence télomérique uniquement (figure 9, étape 1). Une pyrophospholyse de la sonde hybridée conduite par une polymérase (figure 9, étape 2) couplée à une transphosphorylation conduit à la production d'ATP (figure 9, étape 3). La production d'ATP est directement reliée à l'abondance de la cible spécifique qu'est la séquence retrouvée dans les télomères. Finalement, l'ATP est détecté par l'utilisation d'une solution de luciférase/luciférine, dont le signal lumineux produit est mesurée à l'aide d'un luminomètre (figure 9, étape 4) (Learish et al., 2002). Cette technique présente de nombreux avantages. Tout d'abord, elle n'utilise que très peu

d'ADN (1  $\mu\text{g}$ ). Dans notre cas, la quantité initiale d'échantillon est limitée puisqu'une biopsie n'apporte que 100 à 500 mg de peau et le rendement est de 0,750  $\mu\text{g}$  d'ADN/mg de peau. L'ADN peut être réutilisable pour d'autres études comme la phylogénie ou la détermination du sexe. La quantité d'échantillon est donc un sujet de préoccupation pour la mise au point de notre technique. De plus, elle ne nécessite pas de digestion de l'ADN. Le signal émis est dû uniquement à l'hybridation de la sonde aux séquences télomériques. Les régions sous-télomériques, dans lesquelles les enzymes coupent dans la méthode de Southern Blot, peuvent influencer la distance de migration des fragments d'ADN révélés avec la sonde télomère-spécifique. Cette méthode évite également les autres artéfacts dûs à la migration sur gel comme une différence de tension entre les différents puits. Un autre avantage non négligeable est que cette expérience s'exécute en une demi journée une fois que l'ADN est extrait. De plus, on peut analyser plus de quinze échantillons en même temps, en duplicata. Cependant, nos expériences ne nous ont pas permis de reproduire les conditions de la publication (Learish et al., 2002). En effet, les valeurs obtenues pour la mesure de télomères des échantillons étaient inférieures aux valeurs contrôles, nous donnant des mesures de luminescence négatives.

La deuxième méthode testée se nomme TeloTAGGG, manufacturée par Roche (Geron Corp, Menlo Park, CA USA). Le principe (figure 10) est sensiblement le même que celui de la technique de Southern Blot. L'ADN est digéré par des enzymes de restriction. Les fragments générés sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose selon leur poids moléculaire puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Une sonde couplée à de la digoxygénine (DIG) s'hybride aux séquences télomériques. Un anticorps dirigé contre la DIG est incubé à la membrane. Cet anticorps, couplé à une phosphatase alcaline émet un signal chimioluminescent lorsqu'il est en contact avec son substrat. Ce signal mesuré et comparé à l'échelle de poids moléculaire permet de calculer la longueur des télomères de l'échantillon. Cette technique a les mêmes avantages que celle de Southern Blot mais en possède un supplémentaire non négligeable : elle n'utilise pas de radioactivité. Elle est donc écologique, sécuritaire pour l'utilisateur et ne nécessite pas d'autorisation ou de maintenance particulière. Malheureusement, ce produit n'est pas très répandu d'utilisation. Les compositions peuvent différer d'un kit à l'autre.



**Figure 9** : Principe de la mesure de télomères par luminomètre. La sonde se fixe spécifiquement à l'ADN de séquence télomérique (1). La sonde est pyrophospholysée par une polymérase (2) puis transphosphorylée, conduisant à une production d'ATP (3). Une solution de luciférase/luciférine est ajoutée à l'échantillon, produisant un signal lumineux mesuré à l'aide d'un luminomètre (4). L'abondance de la lumière est directement reliée à la production d'ATP, elle-même dépendante de la cible spécifique qu'est la séquence télomérique.



**Figure 10** : Principe de la mesure de télomères par chimioluminescence. L'ADN est digéré par des enzymes de restriction coupant dans la partie sous-téломérique. Les fragments d'ADN sont séparés selon leurs tailles par électrophorèse sur gel d'agarose. Ils sont ensuite transférés sur membrane de nitrocellulose. La sonde couplée à un antigène DIG se fixe spécifiquement aux télomères. L'antigène est reconnu par un anticorps anti-DIG, couplé de façon covalente à une alcaline phosphatase. Un substrat est ajouté à l'échantillon, produisant de la chimioluminescence, mesurée par exposition à des films autoradiographiques. La longueur des télomères peut ensuite être calculée par comparaison à l'échelle de poids moléculaires.

Toutes ces raisons nous ont poussé à nous associer à un laboratoire où la technique de Southern Blot avec révélation radioactive est un procédé couramment utilisé. Le laboratoire d'Éric Thorin, de l'Institut de Cardiologie de Montréal possède tout le savoir faire nécessaire. J'ai donc pu y effectuer les expériences ainsi que l'analyse des résultats des échantillons de peau de bélugas et de baleines à bosse et bénéficier ainsi de l'expertise de l'équipe.

## 2. Tissu utilisé pour l'étude

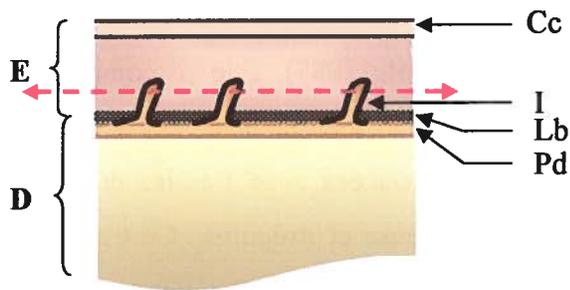
Les autres études utilisant les télomères pour déterminer l'âge des animaux sont effectuées à partir de prises de sang (Hausmann et al., 2003b ; Hausmann et al., 2003a ;

Vleck et al., 2003). Malheureusement, cet échantillon ne peut être collecté facilement chez les cétacés. En effet, le milieu dans lequel évoluent les cétacés constitue une barrière importante. De plus, ils ne peuvent être endormis car leur respiration est volontaire (Fontaine, 1998).

Notre étude sur les baleines à bosse, comme celle sur les bélugas, s'effectue à partir d'échantillons de peau. Ce tissu est choisi pour sa facilité de collecte et pour les faibles dommages qu'il entraîne sur les animaux (Gauthier et Sears, 1999). La peau est décrite comme une combinaison de tissus mesurant de 1 à 30 mm d'épaisseur chez les mammifères marins (Haldiman et al., 1985 ; Craig et al., 1987). Elle se compose du derme et de l'épiderme, comme chez l'Homme (Marieb ;Haldiman et al., 1985). Le derme possède de nombreuses cellules adipeuses, entrelacées avec l'assise du derme papillaire composée de tissu connectif fibreux blanc, dense et irrégulier. Ce tissu étant extrêmement compact, nous avons choisi d'extraire l'ADN de l'épiderme de nos échantillons.

Il existe de nombreuses inter-digitalisations entre le derme et l'épiderme. Une séparation de ces deux tissus par trypsinisation ou chauffage à 60 °C est impossible car les inclusions entre derme papillaire et épiderme sont trop nombreuses (Menon et al., 1986). L'épiderme repose sur le derme, faisant joint entre l'épiderme et le tissu connectif ainsi que les couches sous-cutanées de gras. Il protège le corps des agressions externes. C'est un tissu caoutchouteux qui possède des follicules pileux et des papilles sensibles. L'épiderme repose sur une lame basale de cellules germinatives. Cette couche donne naissance aux lipokératinocytes, qui se kératinisent en migrant vers la surface de la peau à chaque formation d'une nouvelle couche cellulaire (Menon et al., 1986). Les 12 à 60 couches ainsi formées ne sont pas franchement différenciées (Haldiman et al., 1985). Elles s'entremêlent, plus particulièrement dans les couches basses, aux mélanocytes présents dans les régions pigmentées de la peau et à la lame basale (Pfeiffer et Rowntree, 1996). L'épiderme de nos échantillons a été séparé du derme par coupure à l'aide d'une lame de scalpel. Cette séparation est approximative et il est possible qu'une faible partie du derme, notamment par les invaginations, ait été traitée avec l'épiderme (figure 11). La lame basale a été décrite comme en perpétuelle renouvellement. Les cellules migrant

ensuite vers l'extérieur se différencient en cellules de l'épiderme. Au fur et à mesure de cette migration, elles perdent leur capacité de prolifération. Il est possible que l'activité télomérasique détectée dans les échantillons de bélugas au niveau du derme ainsi que de l'épiderme soit due aux nombreuses interdigitalisations du derme et de la lame basale dans l'épiderme. Si tel est le cas, cette activité étant faible et restreinte à la lame basale, elle ne devrait pas influencer la mesure de la longueur des télomères pour la majorité de l'échantillon.



**Figure 11** : schéma de peau de béluga : (E) épiderme, (D) derme. Cc : couche cornée; Pd : papillaire dermal; Lb : lame basale; I : interdigitalisation du papillaire dermal dans l'épiderme. La flèche en pointillé rouge montre la coupe possible séparant l'épiderme du derme.

### 3 État de la peau

Il est possible que malgré la stabilité de l'ADN, la période de conservation prolongée des échantillons de baleines à bosse à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ait pu influencer l'état de l'ADN et donc, la longueur des télomères. Les résultats de l'ANOVA effectué nous permettent de conclure que ces deux facteurs ne sont pas corrélés ( $p = 0,167$ ).

En ce qui concerne les échantillons de bélugas, le temps de conservation est au maximum quatre ans, à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cependant, ils proviennent de carcasses d'animaux, dont on ne connaît ni la date, ni la cause exacte de la mort. L'ANOVA effectuée indique une valeur  $p = 0,980$ . Sur les vingt cinq échantillons, neuf possédaient un code de décomposition et ont pu être testés. Sept étaient de code 3 et deux de code 2. La distribution du code de

décomposition de ces échantillons n'est pas normale. Il est donc impossible de corréler ces deux facteurs. L'état de décomposition peut avoir une influence sur la longueur des télomères car une altération post mortem de l'ADN au niveau des télomères nous donnerait des résultats faussés, sous-estimés. Nous nous sommes donc basés sur les résultats obtenus après passage sur gel d'agarose pour déterminer la qualité de l'ADN.

#### **4 Séquence télomérique chez les espèces étudiées**

Puisque la séquence télomérique est extrêmement conservée entre les espèces, nous avons choisi de ne tester que la sonde complémentaire (CCCTAA)<sub>4</sub>. Les résultats nous montrent que la séquence télomérique observée chez ces deux espèces de cétacés est celle attendue, à savoir TTAGGG<sub>n</sub> pour les baleines à bosse ainsi que pour les bélugas. En effet, malgré sa conservation au cours de l'évolution, aucune étude n'identifiait les télomères comme tels chez ces deux espèces. Une étude observe une séquence d'ADN satellite lourde TTAGGG<sub>n</sub> non traduite chez les rorquals à bosse ainsi que sur d'autres espèces de baleines, mais ne fait pas la relation avec les télomères (Adegoke et al., 1993). Une autre étude compare les séquences télomériques sur quatre-vingt-onze espèces de vertébrés (Meyne et al., 1989). Même si cette séquence est identifiée comme TTAGGG<sub>n</sub> pour les rorquals communs, rien ne nous permettait d'extrapoler sur les espèces de notre étude. Ici, nous pouvons affirmer que les baleines à bosse, ainsi que les bélugas possèdent des télomères de séquence TTAGGG<sub>n</sub>. Nous sommes donc les premiers à avoir démontré que cette séquence est conservée chez les baleines à bosse, ainsi que chez les bélugas.

#### **5 Longueur moyenne des télomères**

Les télomères sont présents dans la peau des baleines à bosse ainsi que dans celle de bélugas. Pour les baleines à bosse, les douze échantillons analysés de huit animaux d'âge connu nous permettent de définir la perte des télomères selon l'équation suivante : TRF = 9 766 - 43 x âge (âge en ans, TRF en pb). Parmi ces individus, cinq ont eu une biopsie, deux ont eu deux biopsies et un individu a eu trois biopsies. La longueur des télomères à

la naissance selon la régression linéaire est de 9 766 pb. Cette valeur concorde fortement avec celle obtenue par le calcul de celle moyenne de quatre animaux de 0 ans, qui est de 9092 pb, soit 9,09 kb. La longueur moyenne des télomères à la naissance n'est pas corrélée avec la longévité de l'espèce mais peut être corrélée avec le temps de gestation (Vleck et al., 2003). On pense que plus le temps de gestation est long, plus la longueur des télomères à la naissance est court. En effet, plus la gestation est longue, plus les cellules embryonnaires effectuent des divisions cellulaires et donc, plus la longueur des télomères à la naissance est faible. Chez les baleines à bosse, le temps de gestation est de onze mois et chez les bélugas, il est de quatorze mois (Fontaine, 1998). La longueur des télomères à la naissance diffère d'un tissu à un autre pour un même individu (Prowse et Greider, 1995 ; Rhodes et al., 2002). Chez l'homme, la longueur des télomères est de  $13,8 \pm 1$  kb pour les cellules de l'épithélium lingual et de  $13,2 \pm 1$  kb (de 11,7 à 14,8 kb) pour les cellules épidermales (Nakamura et al., 2002 ; Butler et al., 1998), pour un temps de gestation de neuf mois. Les résultats obtenus pour la longueur des télomères à la naissance, à savoir de 9,76 kb pour les cellules épidermales de baleines à bosse, coïncident donc avec la littérature. Considérant que le temps de gestation de ces dernières est plus long (onze mois au lieu de neuf pour l'homme) et que la longueur des télomères à la naissance dans leurs cellules épidermales est plus court ( 9,76 kb contre 13,2 kb pour les cellules humaines). Cette évaluation n'a pas pu être effectuée pour les bélugas par manque d'échantillons à la naissance. Ces résultats nous démontrent que les télomères et l'âge sont étroitement liés et non indépendants chez les baleines à bosse.

## **6 Perte des télomères des baleines à bosse**

### **6.1 Vitesse de perte**

D'après la courbe  $TRF = f(\text{âge})$  observée sur les échantillons de baleine à bosse d'âge connu, la perte de télomères est de 43 pb/an. Afin de compléter cette observation, nous avons analysé les TRF d'animaux ayant subi plusieurs biopsies. Cette analyse comprenant des observations d'animaux d'âge connu et d'autres d'âge non connu nous donne une

variation annuelle de télomères de  $-15 \pm 352$  pb. On note que l'erreur type de ces variations annuelles, de 352 pb, est très supérieur à la variation elle-même, -15 pb, mais la tendance est la même que celle obtenue dans la courbe TRF = f (âge), à savoir - 43 pb. Cette perte de télomères est reportée dans les cellules épidermales humaines mais aussi dans différents tissus comme le placenta, les poumons, les muscles, le cerveau, le foie, les reins, la rate et les ovaires et dans d'autres types cellulaires comme les fibroblastes en culture, les cellules sanguines, les cellules épithéliales de colon (Cooke et Smith, 1986. ;Harley et al., 1990. ; Hastie et al., 1990. ;Lindsey et al., 1991. ;Lewis et al., 2004 ; Rufer et al., 1999). Cette diminution progressive conduit à une accumulation de petits télomères et à une instabilité chromosomique déclenchant la sénescence (Blackburn, 1991 ; Karlseder et al., 2002 ; Lansdorp, 2000). Il n'est donc pas étonnant de la retrouver dans les cellules épidermales de rorquals à bosse. La perte moyenne chez l'homme est de 50 à 200 pb par cycle de réplication (Prowse et Greider, 1995 ; Nakamura et al., 2002 ; Lansdorp, 2000 ; Greider, 1996). Elle est similaire pour toutes les fins de chromosomes, *in vivo* et *in vitro*, mais inégale au sein des chromosomes d'un même individu ou des cellules entre elles (Lindsey et al., 1991. ;Allsopp et al., 1992 ; Henderson et al., 1996.). Cette perte de 43 pb/an observée pour les rorquals à bosse est comparable avec celle rencontrée chez l'homme, qui est de  $20 \pm 7$  pb/an pour les cellules épithéliales (Lindsey et al., 1991),  $15 \pm 6$  pb/an ( $r = -0,38$  ,  $p = 0,001$ ) pour les fibroblastes de peau (Allsopp et al., 1992) *in vivo* mais qui est de 36 pb / an ( $r^2 = 0,260$ ) dans l'épiderme, tout type cellulaire confondu.

La perte de télomères est de 590 pb/an chez la brebis [TRF = 23,9 kb à la naissance (Shiels et al., 1999)]. Elle est encore plus importante chez la souris (Prowse et Greider, 1995 ; Herrera et al., 1999). Cette différence de vitesse de perte s'explique par le fait qu'il existe une relation entre la vitesse de perte et la longévité de l'espèce (Vleck et al., 2003). Un animal ayant une durée de vie courte perd considérablement ses télomères. La longévité des rorquals à bosse est de 40 ans. Ces données sont résumées tableau 5.

**Tableau 5 : Récapitulatif des différentes vitesses de perte de télomères en fonction de l'espèce étudiée.**

Espèce	Perte de TRF (pb/an)	Référence
Baleine à bosse : Cellules épidermiques	43	Travaux de la présente étude
Homme : Cellules épithéliales	20	Lindsey <i>et al.</i> , 1991
Fibroblastes de peau	15	Allsopp <i>et al.</i> , 1992
Épiderme (tout type confondu)	36	
Brebis :	590	Shiels <i>et al.</i> , 1999
Souris : Fibroblastes	75 pb/doublement de population (PD)	Prowse <i>et al.</i> , 1995
Fibroblastes embryonnaires de souris	3 800 à 4 920 pb/génération de souris	Herrera <i>et al.</i> , 1999

On observe ici que la courbe définissant la perte de télomères en fonction de l'âge est une droite. L'équation est calculée à partir de 8 données comprises entre 0 et 2 ans, 1 donnée de 4, 8, 14, 15 et 21 ans. Il existe différentes théories sur la perte de télomères. La courbe peut être de type bisegmentée. Durant la petite enfance (0 à 4 ans), la baisse de télomères est rapide et plus graduelle durant le reste de la vie (4 à 90 ans) (Nakamura *et al.*, 2002 ; Rufer *et al.*, 1999 ; Sidorov *et al.*, 2004 ; Zeichner *et al.*, 1999). Cette courbe peut également être de type trisegmentée. Pour les petits enfants, la perte de télomères est rapide (supérieure à 1 kb/an) suivie d'un plateau de 4 ans à l'âge adulte puis augmentant à la fin de la vie (Frenck *et al.*, 1998). Ici, la courbe est du type décrit par Allsopp *et al.* (1992) c'est-à-dire une droite. Cependant, nous n'avons que des échantillons simples de 4, 8, 14, 15 et 21 ans. Il faudrait compléter cette étude avec plus

d'échantillons, mieux répartis tout au long de la vie de ces animaux, c'est-à-dire jusqu'à 40 ans et augmenter le nombre d'échantillons à chaque âge.

## **6.2 Variations intra-individuelles**

Lorsqu'on regarde de manière individuelle les données obtenues pour les rorquals à bosse (figure 11), on s'aperçoit que les télomères des femelles (H 009 et H 067) ont tendance à diminuer entre 11 et 13 ans séparant leurs biopsies respectives. Lorsqu'on regarde le profil des mâles dont nous possédons plusieurs biopsies (H 151 et H 221), on s'aperçoit que les télomères tendent à augmenter. On pourrait penser que cette différence est sexe-dépendante.

Lorsqu'on regarde le profil des animaux d'âge inconnu (figure 12), 2 femelles (H 140 et H 277) ont un profil montant (13 ans de différence entre les 2 biopsies) et 3 autres ont un profil descendant (H 002, H147 et H 228 de 3, 13 et 14 de différence entre les 2 biopsies). Ces données sont mesurées sur 3, 13 et 14 ans. Même si nous n'avons pas de données concernant les mâles, on voit que la différence liée au sexe observée chez les animaux d'âge connu n'est pas significative. Cette hypothèse d'influence du sexe sur la variation de la longueur des télomères est totalement rejetée après une ANOVA à un facteur ( $p = 0,167$ ).

Le sexe des animaux est important cependant, il n'y a pas de différences de perte de télomères entre les femelles et les mâles. Ces résultats sont consistants avec une étude menée sur les sternes qui montrent que le sexe n'est pas un facteur influençant la longueur des télomères (Hausmann et al., 2003b).

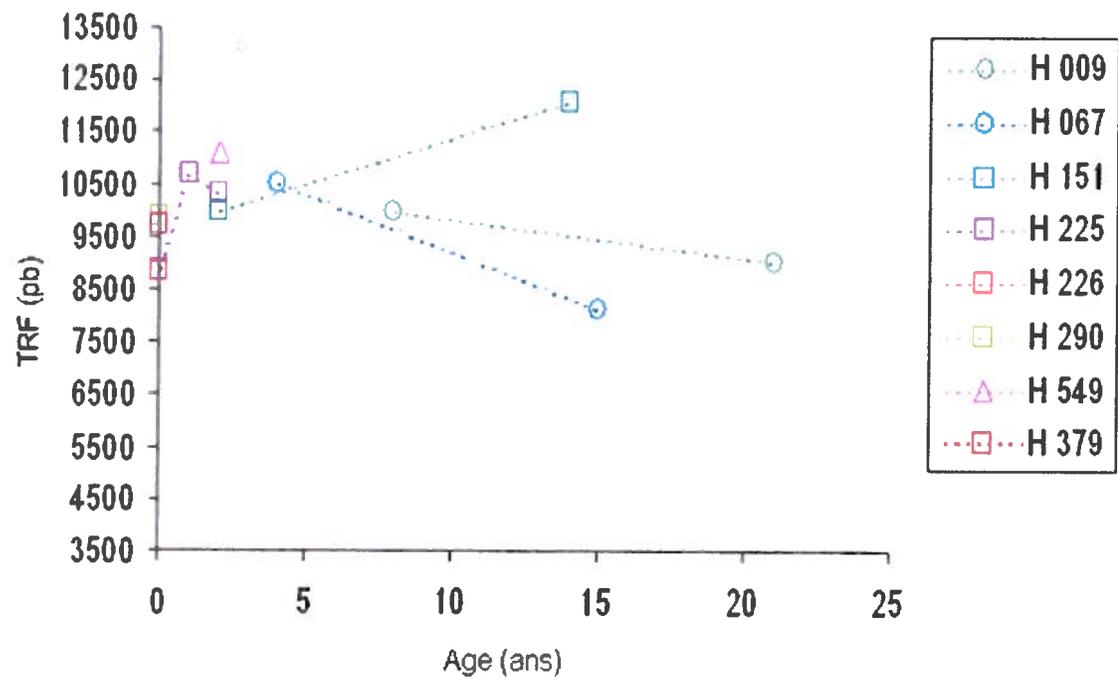
On peut penser que les variations intra-individuelles des baleines à bosse sont dues au fait que les biopsies ne sont pas toutes prises à des endroits identiques. Les biopsies sont généralement prises sur les flancs des animaux, en arrière et au-dessous de la nageoire dorsale. Cependant, la biopsie peut parfois être prise sur une autre partie du corps. On ne peut assurer que la biopsie se fait sur le même flanc et à l'endroit exact de la biopsie précédente. Cet exercice demande extrêmement de dextérité de la part de

l'expérimentateur et les animaux ne sont pas toujours d'une grande aide. Certains sont même réticents à se laisser approcher. On peut penser que la peau, qui subit de régulières agressions externes comme le soleil, les poissons parasites tels les lamproies, les frottements contre les reliefs sous-marins pour se débarrasser des parasites ou encore les blessures liées aux combats ou aux interactions sociales, ne se régénère pas uniformément. Si la longueur des télomères est bien fonction du nombre de divisions subies par le tissu, plus un tissu subit d'agressions, plus il doit se régénérer et donc plus les cellules vont se diviser et posséder des télomères courts. Une façon de remédier à ce problème serait de noter pour chaque individu l'endroit exact de la biopsie, si ce dernier correspond à une marque visible pouvant être une cicatrice, et corréler les différences de longueur de télomères avec les différentes parties du corps pour la globalité des biopsies (pour tous les individus confondus). On pourrait également effectuer plusieurs biopsies à différents endroits sur un même individu et regarder si l'on voit des variations. Cependant, les autorités ont pour politique la protection de ces espèces et les expérimentations nécessitant trop de dommages et d'interactions avec les animaux ne sont pas recevables.

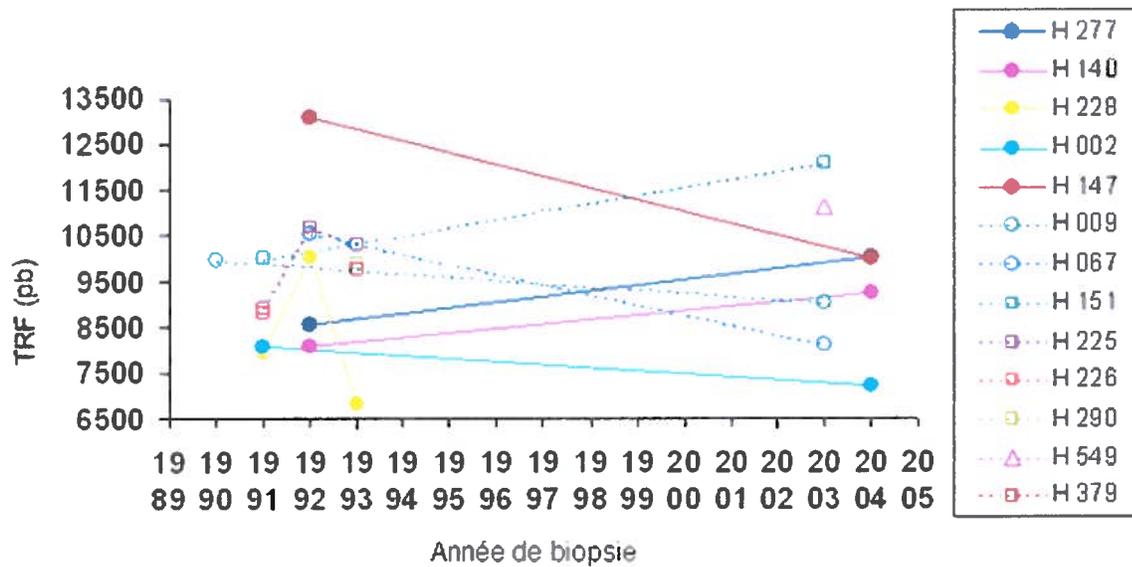
### **6.3 Variations inter-individuelles**

Même si les individus ont des profils de télomères différents, on n'observe pas de variations inter-individuelles majeures. Les données pour les âges 1 an (H 225), 4 ans (H 067), 8 ans (H 009), 15 ans (H 067) et 21 ans (H 009) sont simples. On ne peut donc pas en tirer de conclusion. La longueur des télomères des 4 individus de 0 ans (H 225, H 226, H 290 et H 379) est comprise entre 8 815 pb et 9 752 pb. Celle des individus de 2 ans (H 151, H 225 et H549) est comprise entre 9 806 pb et 10 306 pb. Les différences inter-individuelles sont donc de 936 pb et de 500 pb respectivement. Ceci est conforme avec les observations chez l'humain, à savoir que la longueur de télomères diffère d'un individu à l'autre de même âge pour un tissu donné (Prowse et Greider, 1995). De même, on n'observe pas de différences inter-familles (familles possédant des télomères très longs, ou au contraire très courts). Il y a donc une certaine homogénéité dans la longueur

des télomères, pour un tissu et un âge donné. Ce phénomène a également été observé chez l'homme (Frenck et al., 1998).



**Figure 12** : Longueur des télomères en fonction de l'âge des baleines à bosse. Les mâles sont représentés par des carrés (□) et les femelles par des ronds (○).



**Figure 13** : Longueur des télomères en fonction de l'année de biopsie des baleines à bosse. Les mâles sont représentés par des carrés (□) et les femelles par des ronds (○). Les animaux d'âge inconnu possèdent des symboles pleins (●) tandis que les animaux d'âge connu sont en transparents (○).

## 7 Perte de télomères des bélugas

### 7.1 Impact de l'état de santé des bélugas

L'analyse de la longueur des télomères des baleines à bosse a montré une tendance à la diminution en fonction de l'âge. On peut supposer que cette tendance deviendrait significative si le nombre de prélèvements augmentaient. Les biopsies ont été effectuées sur des animaux vivants et en bonne santé relative. L'état de santé des bélugas de l'ESL pourrait avoir affecté la longueur des télomères. Il serait donc intéressant d'utiliser cette méthode à partir d'échantillons d'animaux en bonne santé relative. Par la suite, l'utilisation de cette approche chez des animaux malades pourrait devenir informatrice de l'agressivité de la pathologie.

## 7.2 Évaluation de l'activité télomérasique dans l'épiderme de bélugas de l'ESL

Un autre facteur influençant la longueur des télomères est l'activité de la télomérase. Cette enzyme se retrouve principalement dans les cellules germinales. Elle permet de rallonger la longueur des télomères afin de léguer à notre descendance des chromosomes «neufs». Nous nous sommes donc interrogés sur l'existence d'une telle enzyme dans la peau de bélugas. Les essais TRAP réalisés sur les 2 échantillons prélevés aléatoirement chez deux individus vivants de la population de bélugas d'ESL montrent une activité télomérasique. Elle se retrouve dans l'épiderme de bélugas et elle est active.

L'épiderme est un tissu auto-renouvelant, proliférant tout au long de la vie. Il est composé de cellules épithéliales, les kératinocytes (appelé lipokératinocytes chez les cétacés), constamment renouvelées par division mitotique de la couche basale. Le cycle complet de remplacement des cellules est fréquent, de 26 à 42 jours chez l'homme (Lindsey et al., 1991 ; Nakamura et al., 2002 ; Harle-Bachor et Boukamp, 1996). Un dogme actuel consiste à penser que les cellules souches maintenant la production de cellules différenciées indéfiniment sont capables d'un tel mécanisme uniquement par activation de la télomérase (Lansdorp, 2000 ; Morrison et al., 1996). C'est le cas des cellules humaines de l'intestin, du tissu vasculaire, de la peau ou des tissus hématopoïétiques (Taylor et al., 1996 ; Hiyama et al., 1995b ; Hiyama et al., 1995a). Il n'est donc pas étonnant de rencontrer la télomérase dans la couche basale de l'épiderme de bélugas. Les nombreuses invaginations du derme et de l'épiderme ne permettent pas de savoir si la présence de télomérase est liée ou non à la lame basale ou si elle est présente dans tout le tissu. Cependant, malgré l'activation de la télomérase, la peau humaine voit quand même ses télomères diminuer. La majorité des kératinocytes exprimant la télomérase sont des cellules indifférenciées et incluent probablement les cellules souches.

La télomérase a été montrée comme active dans une proportion de un cas sur douze dans l'épiderme humain. Ici, les deux échantillons testés montrent une télomérase active. On peut se demander si le taux élevé de polluants comme les BPC ou les organochlorés sont responsables de tels événements. En effet, des facteurs exogènes modifient l'activité de la

téломérase, en réponse à des agressions. Les UV sont un carcinogène pour la peau. Ils altèrent l'ADN de l'épiderme. L'activation de la téломérase est un des premiers évènements ayant lieu lors de la photo-carcinogénèse (Ogoshi et al., 1998). C'est pourquoi des épidermes non protégés du soleil montrent une expression de téломérase significativement augmentée par rapport à des épidermes non exposés. D'autres facteurs comme certaines drogues ou les espèces oxydatives, considérées comme la majeure cause environnementale de raccourcissement des téломères, accélèrent la perte de téломères (Nakamura et al., 2002 ; Nawrot et al., 2004). Il peut donc être envisagé que les polluants environnementaux, présents en forte quantité au niveau de l'ESL et en contact permanent avec la peau des bélugas, puissent influencer l'activité téломérasique des cellules épidermales. Une étude comportant un plus grand nombre d'individus permettrait de répondre à ces hypothèses, ainsi qu'une analyse du taux de contaminants présents dans l'échantillon. Il pourrait être intéressant de comparer l'activité téломérasique de deux populations de bélugas : celle de l'ESL avec celle de l'Arctique. En effet, cette dernière est souvent considérée comme contrôle négatif en matière d'analyse de polluants (Wagemann et al., 1996b ; Muir et al., 1992 ; Wagemann et al., 1998a ; Wagemann et al., 1996a). Ainsi, il serait facile de regarder l'influence des taux de contaminants sur l'activité téломérasique.

## CONCLUSION

L'âge est un paramètre intéressant à connaître dans des études de population, des études comportementalistes ou encore écotoxicologiques. Dans la plupart des études faites chez les mammifères, ce paramètre est connu par un procédé utilisant les dents des animaux. Malheureusement, ce tissu est difficile à observer chez les cétacés, plus particulièrement chez les mysticètes qui ne possèdent pas de dents mais des fanons. Il faut donc utiliser une autre méthode. A ce jour, aucune méthode connue n'est suffisamment fiable pour déterminer ce paramètre.

L'objectif de ce travail de recherche consistait à mettre en place une courbe étalon de type longueur des télomères =  $f(\text{âge})$  chez deux espèces de cétacés (baleines à bosse et bélugas) grâce à des animaux d'âge connu. En effet, lorsque les cellules se divisent, une partie des télomères n'est pas copiée. Au fil des divisions, on a donc un raccourcissement de ces séquences. Le nombre de divisions cellulaires augmentant avec l'âge d'un individu, nous avons cherché à établir une relation entre la longueur des télomères et l'âge de l'individu. Cette méthode permettrait de pouvoir ajouter ce paramètre aux différentes études actuellement faites sur cette espèce par comparaison avec cette courbe.

A partir d'échantillons de peau prélevés par biopsie sur des baleines à bosse dans leur aire de chasse de Mingan (Qc, Canada) ainsi que sur des bélugas de la population de l'ESL (estuaire du Saint-Laurent, Qc, Canada) échoués entre 1999 et 2002, nous avons extrait l'ADN génomique. L'analyse des télomères nous montre que la séquence télomérique de ces deux espèces est identique à celle de 90 % des vertébrés (Meyne et al., 1989). La séquence télomérique est composée de  $\text{TTAGGG}_n$ . Nous avons été les premiers à démontrer de tels résultats pour les espèces de bélugas et de baleines à bosse.

Les expériences effectuées nous montrent des résultats différents selon l'espèce. Les biopsies de baleine à bosse ne nous permettent pas d'affirmer avec certitude qu'il existe une relation entre la longueur des télomères et l'âge des animaux mais la courbe montre tout de même une tendance à la diminution :  $TRF = 9766 - 43 \times \text{âge}$  ( $r = -0,363$ ,  $p = 0,246$ ,  $n = 13$ ).

Les prélèvements effectués sur les carcasses de bélugas ne montrent pas de corrélation entre la longueur des télomères et l'âge des individus. On peut observer une activité télomérasique dans chacun des deux échantillons de peau prélevés sur deux individus vivants de cette espèce, de la population de l'ESL. La présence de cette enzyme peut influencer la longueur des télomères et augmenter la faible corrélation entre ces deux facteurs.

Cette étude est un premier pas dans l'étude de l'âge des mammifères marins. La méthode développée semble en accord avec d'autres études portant sur ce sujet. Elle semble prometteuse et ouvre la voie à des études ultérieures portant sur la dynamique de populations de cétacés, l'éthologie avec un nouveau paramètre, sur des études âge-santé ou des corrélations âge-cancers, sans dommages irréversibles sur les animaux.

## BIBLIOGRAPHIE

ADEGOKE, J. A, U. Arnason et B. Widegren. 1993. "Sequence organization and evolution, in all extant whalebone whales, of a DNA satellite with terminal chromosome localization". Chromosoma, vol. 102, p. 382-8.

ALLSOPP, R. C. et C. B. Harley. 1995. "Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts". Experimental Cell Research, vol. 219, p. 130-6.

ALLSOPP, R. C, H. Vaziri, C. Patterson, S. Goldstein, E. V. Younglai, A. B. Futcher, C. W. Greider et C. B. Harley. 1992. "Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 89, p. 10114-8.

AONO, S, S. Tanabe, Y. Fujise, H. Kato et R. Tatsukawa. 1997. "Persistent organochlorines in minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) and their prey species from the Antarctic and the North Pacific". Environ Pollut, vol. 98, p. 81-9.

ARNASON, U. et B. Widegren. 1989. "Composition and chromosomal localization of cetacean highly repetitive DNA with special reference to the blue whale, *Balaenoptera musculus*". Chromosoma, vol. 98, p. 323-9.

AUTEXIER, C. et C. W. Greider. 1996. "Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis". Trends in Biochemical Sciences, vol. 21, p. 387-91.

AZZALIN, C. M, S. G. Nergadze et E. Giulotto. 2001. "Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin". Chromosoma, vol. 110, p. 75-82.

BAIRD, D. M, T. Davis, J. Rowson, C. J. Jones et D. Kipling. 2004. "Normal telomere erosion rates at the single cell level in Werner syndrome fibroblast cells". Human Molecular Genetics, vol. 13, p. 1515-24.

BAIRD, D. M, J. Rowson, D. Wynford-Thomas et D. Kipling. 2003. "Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells". Nature Genetics, vol. 33, p. 203-7.

BELAIR, C. D, T. R. Yeager, P. M. Lopez et C. A. Reznikoff. 1997. "Telomerase activity: a biomarker of cell proliferation, not malignant transformation". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 94, p. 13677-82.

- BENNETT, D. C. 2003. "Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes". Oncogene, vol. 22, p. 3063-9.
- BERNIER, J, S. De Guise, D. Martineau, P. Beland, M. Beaudet et M. Fournier. 2000. "Purification of functional T lymphocytes from splenocytes of the beluga whales (*Delphinapterus leucas*)". Developmental and Comparative Immunology, vol. 24, p. 653-62.
- BERUBE, M, A. Aguilar, D. Dendanto, F. Larsen, G. Notarbartolo di Sciara, R. Sears, J. Sigurjonsson, J. Urban-R et P. J. Palsboll. 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, vol. 7, p. 585-99.
- BERUBE, M. et P. Palsboll. 1996. "Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers". Molecular Ecology, vol. 5, p. 283-7.
- BLACKBURN, E. H. 1991. "Structure and function of telomeres". Nature, vol. 350, p. 569-73.
- BLACKBURN, E. H. 2000. "Telomere states and cell fates". Nature, vol. 408, p. 53-6.
- BLACKBURN, E. H. 2001. "Switching and signaling at the telomere". Cell, vol. 106, p. 661-73.
- BLASCO, M. A, H. W. Lee, M. P. Hande, E. Samper, P. M. Lansdorp, R. A. DePinho et C. W. Greider. 1997. "Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA". Cell, vol. 91, p. 25-34.
- BORN, E. W, H. Dahlgard, F. F. Riget, R. Dietz et T. Haug. 2002. "Regional variation of caesium-137 in minke whales from West Greenland, the Northeast Atlantic and the North Sea". Polar Biology, vol. 25, p. 907-913.
- BUTLER, M. G, J. Tilburt, A. DeVries, B. Muralidhar, G. Aue, L. Hedges, J. Atkinson et H. Schwartz. 1998. "Comparison of chromosome telomere integrity in multiple tissues from subjects at different ages". Cancer Genetics and Cytogenetics, vol. 105, p. 138-44.
- BÉLAND, P, S. DeGuise, C. Girard, A. Lagacé, D. Martineau, R. Michaud, D. C. G. Muir, R. J. Norstrom, E. Pelletier, S. Ray et L. R. Shugart. 1993. "Toxic compounds and health and reproductive effects in St. Lawrence Beluga Whales". J. Great Lakes. Res., vol. 19, p. 766-775.
- CAURANT F. et Amiard-Triquet. 1995. "Cadmium contamination in Pilot whales *Globicephala melas*: source and potential Hazard to the species". Marine pollution Bulletin, vol. 30, p. 207-210.

- CAURANT, F, M. Navarro et J. C. Amiard. 1996. "Mercury in pilot whales: possible limits to the detoxification process". Science of the Total Environment, vol. 186, p. 95-104.
- CAWTHON, R. M. 2002. "Telomere measurement by quantitative PCR". Nucleic Acids Res, vol. 30, p. e47.
- CECH, T. R. 2004. "Beginning to understand the end of the chromosome". Cell, vol. 116, p. 273-279.
- CHANG, E. et C. B. Harley. 1995. "Telomere length and replicative aging in human vascular tissues". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 92, p. 11190-4.
- COLBORN, T. et M. J. Smolen. 1996. "Epidemiological analysis of persistent organochlorine contaminants in cetaceans". Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 146, p. 91-172.
- COOKE, H. J. et B. A. Smith. 1986. "Variability at the telomeres of the human X/Y pseudoautosomal region". Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. 51 Pt 1, p. 213-9.
- CRAIG, A. S, E. F. Eikenberry et D. A. Parry. 1987. "Ultrastructural organization of skin: classification on the basis of mechanical role". Connective Tissue Research, vol. 16, p. 213-23.
- DAS, K, V. Debacker et J. M. Bouquegneau. 2000. "Metallothioneins in marine mammals". Cellular and Molecular Biology, vol. 46, p. 283-94.
- DE GUISE, S, J. Bernier, D. Martineau, P. Beland et M. Fournier. 1997. "Phenotyping of beluga whale blood lymphocytes using monoclonal antibodies". Developmental and Comparative Immunology, vol. 21, p. 425-33.
- DE GUISE, S, A. Lagace et P. Beland. 1994. "True hermaphroditism in a St. Lawrence beluga whale (*Delphinapterus leucas*)". Journal of Wildlife Diseases, vol. 30, p. 287-90.
- DE GUISE, S, A. Lagace, P. Beland, C. Girard et R. Higgins. 1995a. "Non-neoplastic lesions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) and other marine mammals from the St Lawrence Estuary". Journal of Comparative Pathology, vol. 112, p. 257-71.
- DE GUISE, S, D. Martineau, P. Beland et M. Fournier. 1995b. "Possible mechanisms of action of environmental contaminants on St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*)". Environmental Health Perspectives, vol. 103 Suppl 4, p. 73-7.
- DEGUISE, S, J. Bernier, M. M. Dufresne, D. Martineau, P. Beland et M. Fournier. 1996. "Immune functions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*): evaluation of mitogen-induced blastic transformation of lymphocytes from peripheral blood, spleen and

thymus". Veterinary Immunology and Immunopathology, vol. 50, p. 117-26.

DERSARKISSIAN, H, S. Bacchetti, L. Cazes et J. A. LondonoVallejo. 2004. "The shortest telomeres drive karyotype evolution in transformed cells". Oncogene, vol. 23, p. 1221-1228.

DIETZ, R, F. Riget et P. Johansen. 1996. "Lead, cadmium, mercury and selenium in Greenland marine animals". Science of the Total Environment, vol. 186, p. 67-93.

DIZON, A. E, S. J. Chivers et Perrin W.F. 1980. "Molecular genetics of marine mammals". The society for marine mammalogie, vol.

ENDO, T, K. Haraguchi, F. Cipriano, M. P. Simmonds, Y. Hotta et M. Sakata. 2004. "Contamination by mercury and cadmium in the cetacean products from Japanese market". Chemosphere, vol. 54, p. 1653-62.

ENDO, T, K. Haraguchi et M. Sakata. 2002. "Mercury and selenium concentrations in the internal organs of toothed whales and dolphins marketed for human consumption in Japan". Science of the Total Environment, vol. 300, p. 15-22.

ENDO, T, Y. Hotta, K. Haraguchi et M. Sakata. 2003. "Mercury contamination in the red meat of whales and dolphins marketed for human consumption in Japan". Environ Sci Technol, vol. 37, p. 2681-5.

FERLICOT, S, N. Youssef, D. Feneux, F. Delhommeau, V. Paradis et P. Bedossa. 2003. "Measurement of telomere length on tissue sections using quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH)". Journal of Pathology, vol. 200, p. 661-6.

FONTAINE, P.-H. 1998. "Les baleines de l'Atlantique Nord, Biologie et Ecologie". Editions MultiMondes, vol.

FOSSI, M. C, L. Marsili, G. Neri, A. Natoli, E. Politi et S. Panigada. 2003. "The use of a non-lethal tool for evaluating toxicological hazard of organochlorine contaminants in Mediterranean cetaceans: new data 10 years after the first paper published in MPB". Mar Pollut Bull, vol. 46, p. 972-82.

FRENCK, R. W. Jr, E. H. Blackburn et K. M. Shannon. 1998. "The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, p. 5607-10.

FREULETMARRIERE, M. A, G. PotockiVeronese, J. R. Deverre et L. Sabatier. 2004. "Rapid method for mean telomere length measurement directly from cell lysates". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 314, p. 950-956.

FRIEDRICH, U, E. Griese, M. Schwab, P. Fritz, K. Thon et U. Klotz. 2000. "Telomere length in different tissues of elderly patients". Mechanisms of Ageing and Development, vol. 119, p. 89-99.

FUJIMOTO, R, N. Kamata, M. Taki, K. Yokoyama, M. Tomonari, M. Nagayama et S. Yasumoto. 2003. "Gene expression of telomerase related proteins in human normal oral and ectocervical epithelial cells". Oral Oncology, vol. 39, p. 445-52.

GAUTHIER, J., C.D. Metcalfe and R. Sears. 1997a. "Chlorinated organic contaminants in blubber biopsies from northwestern Atlantic balaenopterid whales summering in the Gulf of St. Lawrence" . Mar Environ Research, vol. 44, p. 201-223.

GAUTHIER, J.M., Metcalfe, C.D., and Sears, R. 1997b. "Validation of the blubber biopsy technique for monitoring of organochlorine contaminants in balaenopterid whales". Mar Environ Research, vol. 43, p. 157-179.

GAUTHIER, J. and Sears, R. 1999. "Behavioral response of four species of balaenopterid whales to biopsy sampling". Mar. Mammal Science, vol. 15, p. 85-101.

GAUTHIER, J. M, H. Dubeau et E. Rassart. 1999a. "Induction of micronuclei in vitro by organochlorine compounds in beluga whale skin fibroblasts". Mutation Research, vol. 439, p. 87-95.

GAUTHIER, J. M, H. Dubeau, E. Rassart, W. M. Jarman et R. S. Wells. 1999b. "Biomarkers of DNA damage in marine mammals". Mutation Research, vol. 444, p. 427-39.

GERACI, J. R. et V. J. Lounsbury. 1993. "Marine Mammals Ashore : A field Guide for Strandings". Texas A & M Sea Grant Publications, Galveston, Texas, vol.

GREIDER, C. W. 1996. "Telomere length regulation". Annual Review of Biochemistry, vol. 65, p. 337-65.

GREIDER, C. W. 1998. "Telomerase activity, cell proliferation, and cancer". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, p. 90-2.

GREIDER, C. W. et E. H. Blackburn. 1985. "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts". Cell, vol. 43, p. 405-13.

HALDIMAN, J. T, W. G. Henk, R. W. Henry, T. F. Albert, Y. Z. Abdelbaki et D. W. Duffield. 1985. "Epidermal and papillary dermal characteristics of the bowhead whale (*Balaena mysticetus*)". Anatomical Record, vol. 211, p. 391-402.

HARLE-BACHOR, C. et P. Boukamp. 1996. "Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 93, p. 6476-81.

HARLEY, C. B. 1991. "Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?". Mutation Research, vol. 256, p. 271-82.

HARLEY, C. B, A. B. Futcher et C. W. Greider. 1990. "Telomeres shorten during ageing

of human fibroblasts". Nature, vol. 345, p. 458-60.

HASTIE, N. D, M. Dempster, M. G. Dunlop, A. M. Thompson, D. K. Green et R. C. Allshire. 1990. "Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing". Nature, vol. 346, p. 866-8.

HAUSSMANN, M. F, C. M. Vleck et I. C. Nisbet. 2003a. "Calibrating the telomere clock in common terns, *Sterna hirundo*". Experimental Gerontology, vol. 38, p. 787-9.

HAUSSMANN, M. F, D. W. Winkler, K. M. O'Reilly, C. E. Huntington, I. C. Nisbet et C. M. Vleck. 2003b. "Telomeres shorten more slowly in long-lived birds and mammals than in short-lived ones". Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, vol. 270, p. 1387-92.

HAYFLICK, L. et P. S. MOORHEAD. 1961. "The serial cultivation of human diploid cell strains". Experimental Cell Research, vol. 25, p. 585-621.

HENDERSON, S, R. Allsopp, D. Spector, S. S. Wang et C. Harley. 1996. "In situ analysis of changes in telomere size during replicative aging and cell transformation". Journal of Cell Biology, vol. 134, p. 1-12.

HERRERA, E, E. Samper, J. Martin-Caballero, J. M. Flores, H. W. Lee et M. A. Blasco. 1999. "Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres". EMBO Journal, vol. 18, p. 2950-60.

HIYAMA, E, T. Yokoyama, N. Tatsumoto, K. Hiyama, Y. Imamura, Y. Murakami, T. Kodama, M. A. Piatyszek, J. W. Shay et Y. Matsuura. 1995a. "Telomerase activity in gastric cancer". Cancer Research, vol. 55, p. 3258-62.

HIYAMA, K, Y. Hirai, S. Kyoizumi, M. Akiyama, E. Hiyama, M. A. Piatyszek, J. W. Shay, S. Ishioka et M. Yamakido. 1995b. "Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells". Journal of Immunology, vol. 155, p. 3711-5.

HOBBS, K. E, D. C. Muir, E. W. Born, R. Dietz, T. Haug, T. Metcalfe, C. Metcalfe et N. Oien. 2003. "Levels and patterns of persistent organochlorines in minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) stocks from the North Atlantic and European Arctic". Environ Pollut, vol. 121, p. 239-52.

HOEKSTRA, P. F, T. M. O'Hara, C. Teixeira, S. Backus, A. T. Fisk et D. C. Muir. 2002a. "Spatial trends and bioaccumulation of organochlorine pollutants in marine zooplankton from the Alaskan and Canadian Arctic". Environ Toxicol Chem, vol. 21, p. 575-83.

HOEKSTRA, P. F, C. S. Wong, T. M. O'Hara, K. R. Solomon, S. A. Mabury et D. C. Muir. 2002b. "Enantiomer-specific accumulation of PCB atropisomers in the bowhead whale (*Balaena mysticetus*)". Environ Sci Technol, vol. 36, p. 1419-25.

HOLSBEEK, L, U. Siebert et C. R. Joiris. 1998. "Heavy metals in dolphins stranded on the French Atlantic coast". Science of the Total Environment, vol. 217, p. 241-9.

HOLT, S. J. 2004. "Counting whales in the North Atlantic". Science, vol. 303, p. 39-40; author reply 39-40.

HONDA, K. et R. Tatsukawa. 1983. "Distribution of cadmium and zinc in tissues and organs, and their age-related changes in striped dolphins, *Stenella coeruleoalba*". Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 12, p. 543-50.

HONDA, K, R. Tatsukawa, K. Itano, N. Miyazaki et T. Fujiyama. 1982. "Heavy metal concentration in muscle, liver and Kidney tissue of striped dolphin and their variations with body length, weight, age and sex.". Agricultural and Biological Chemistry, vol. 47, p. 1219-1983.

HOPE, B, S. Scatolini, E. Titus et J. Cotter. 1997. "Distribution patterns of polychlorinated biphenyl congeners in water, sediment and biota from Midway Atoll (north pacific ocean)". Marine Pollution Bulletin, vol. 34, p. 548-563.

JEPSON, P. D, M. Arbelo, R. Deaville, I. A. Patterson, P. Castro, J. R. Baker, E. Degollada, H. M. Ross, P. Herraez, A. M. Pocknell, F. Rodriguez, F. E. Howie, A. Espinosa, R. J. Reid, J. R. Jaber, V. Martin, A. A. Cunningham et A. Fernandez. 2003. "Gas-bubble lesions in stranded cetaceans". Nature, vol. 425, p. 575-6.

JONES, G. R. 1989. "Polychlorinated biphenyls: where do we stand now?". Lancet, vol. 2, p. 791-4.

JONSGARD, A. 1969. "Age determination of marine mammals". Andersen, vol. 1-30.

KARLSEDER, J, A. Smogorzewska et T. de Lange. 2002. "Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss". Science, vol. 295, p. 2446-9.

KIPLING, D. et R. G. Faragher. 1999. "Telomeres. Ageing hard or hardly ageing?". Nature, vol. 398, p. 191, 193.

LANSDORP, P. M. 2000. "Repair of telomeric DNA prior to replicative senescence". Mechanisms of Ageing and Development, vol. 118, p. 23-34.

LAVOIE, J, M. Bronsard, M. Lebel et R. Drouin. 2003. "Mouse telomere analysis using an optimized primed in situ (PRINS) labeling technique". Chromosoma, vol. 111, p. 438-44.

LAWSON, N. M. et R. P. Mason. 2001. "Concentration of mercury, methylmercury, cadmium, lead, arsenic, and selenium in the rain and stream water of two contrasting watersheds in western Maryland". Water Res, vol. 35, p. 4039-52.

- LEARISH, R. D, J. Shultz, S. Ho et R. F. Bulet. 2002. "Small-scale telomere repeat sequence content assay using pyrophosphorolysis coupled with ATP detection". Biotechniques, vol. 33, p. 1349-53.
- LEE, S. K, Y. C. Ou et R. S. Yang. 2002. "Comparison of pharmacokinetic interactions and physiologically based pharmacokinetic modeling of PCB 153 and PCB 126 in nonpregnant mice, lactating mice, and suckling pups". Toxicological Sciences, vol. 65, p. 26-34.
- LEONZIO, C, S. Focardi et C. Fossi. 1992. "Heavy metals and selenium in stranded dolphins of the northern Tyrrhenian (NW Mediterranean)". Science of the Total Environment, vol. 119, p. 77-84.
- LEWIS, N. L, M. Mullaney, K. F. Mangan, T. Klumpp, A. Rogatko et D. Broccoli. 2004. "Measurable immune dysfunction and telomere attrition in long-term allogeneic transplant recipients". Bone Marrow Transplantation, vol. 33, p. 71-78.
- LINDSEY, J, N. I. McGill, L. A. Lindsey, D. K. Green et H. J. Cooke. 1991. "In vivo loss of telomeric repeats with age in humans". Mutation Research, vol. 256, p. 45-8.
- LUBICK, N. 2003. "Ecology. New count of old whales adds up to big debate". Science, vol. 301, p. 451.
- MARIEB, E. N. "Anatomie et physiologie humaine". ERPI, vol. 142-63.
- MARTINEAU, D, S. De Guise, M. Fournier, L. Shugart, C. Girard, A. Lagace et P. Beland. 1994a. "Pathology and toxicology of beluga whales from the St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada. Past, present and future". Science of the Total Environment, vol. 154, p. 201-15.
- MARTINEAU, D, S. De Guise, M. Fournier, L. Shugart, C. Girard, A. Lagacé et P. Béland. 1994b. "Pathology and toxicology of beluga whales from the St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada. Past, present and future". The science of the total environment, vol. 154, p. 201-215.
- MARTINEAU, D, K. Lembeger, A. Dallaire, P. Michel, P. Beland, P. Labelle et T. P. Lipscomb. 2002a. "St. Lawrence beluga whales, the river sweepers?". Environmental Health Perspectives , vol. 110, p. A562-4.
- MARTINEAU, D, K. Lemberger, A. Dallaire, P. Labelle, T. P. Lipscomb, P. Michel et I. Mikaelian. 2002b. "Cancer in wildlife, a case study: beluga from the St. Lawrence estuary, Quebec, Canada". Environmental Health Perspectives, vol. 110, p. 285-92.
- MEADOR, K. J, D. W. Loring, B. B. Gallagher, D. W. King, A. M. Murro, E. E. Thompson, G. P. Lee, H. F. Flanigin, J. R. Smith, J. Dushku et a. l. et. 1992. "Differential effects of left versus right seizure focus on human hippocampal evoked responses".

International Journal of Neuroscience, vol. 66, p. 87-91.

MENON, G. K, S. Grayson, B. E. Brown et P. M. Elias. 1986. "Lipokeratinocytes of the epidermis of a cetacean (*Phocena phocena*). Histochemistry, ultrastructure, and lipid composition". Cell and Tissue Research, vol. 244, p. 385-94.

METCALFE, C., T. Metcalfe, S. Ray, G. Paterson and B. Koenig. 1999. "PCBs and organochlorine compounds in brain, liver and muscle of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the Arctic and St. Lawrence estuary". Mar Environ Research, vol. 47, p. 1-15.

METCALFE, C., B. Koenig, T. Metcalfe, G. Paterson et R. Sears. 2004. "Intra- and inter-species differences in persistent organic contaminants in the blubber of blue whales and humpback whales from the Gulf of St. Lawrence, Canada". Mar Environ Research, vol. 57, p. 245-60.

MEYNE, J, R. L. Ratliff et R. K. Moyzis. 1989. "Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 86, p. 7049-53.

MITCHELL, E. D. 2004. "Counting whales in the North Atlantic". Science, vol. 303, p. 39-40; author reply 39-40.

MORRISON, S. J, K. R. Prowse, P. Ho et I. L. Weissman. 1996. "Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential". Immunity, vol. 5, p. 207-16.

MOYZIS, R. K, J. M. Buckingham, L. S. Cram, M. Dani, L. L. Deaven, M. D. Jones, J. Meyne, R. L. Ratliff et J. R. Wu. 1988. "A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 85, p. 6622-6.

MUIR, D, B. Braune, B. DeMarch, R. Norstrom, R. Wagemann, L. Lockhart, B. Hargrave, D. Bright, R. Addison, J. Payne et K. Reimer. 1999. "Spatial and temporal trends and effects of contaminants in the Canadian Arctic marine ecosystem: a review". Science of the Total Environment, vol. 230, p. 83-144.

MUIR, D. C, C. A. Ford, B. Rosenberg, R. J. Norstrom, M. Simon et P. Beland. 1996. "Persistent organochlorines in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St Lawrence River estuary-I. Concentrations and patterns of specific PCBs, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans". Environ Pollut, vol. 93, p. 219-34.

MUIR, D. C, R. Wagemann, N. P. Grift, R. J. Norstrom, M. Simon et J. Lien. 1988. "Organochlorine chemical and heavy metal contaminants in white-beaked dolphins (*Lagenorhynchus albirostris*) and pilot whales (*Globicephala melaena*) from the coast of Newfoundland, Canada". Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 17, p. 613-29.

MUIR, D. C, R. Wagemann, B. T. Hargrave, D. J. Thomas, D. B. Peakall et R. J. Norstrom. 1992. "Arctic marine ecosystem contamination". Science of the Total Environment, vol. 122, p. 75-134.

NAKAMURA, K. I, N. IzumiyamaShimomura, M. Sawabe, T. Arai, Y. Aoyagi, M. Fujiwara, E. Tsuchiya, Y. Kobayashi, M. Kato, M. Oshimura, K. Sasajima, K. Nakachi et K. Takubo. 2002. "Comparative analysis of telomere lengths and erosion with age in human epidermis and lingual epithelium". Journal of Investigative Dermatology, vol. 119, p. 1014-1019.

NAWROT, T. S, J. A. Staessen, J. P. Gardner et A. Aviv. 2004. "Telomere length and possible link to X chromosome". Lancet, vol. 363, p. 507-10.

NIELSEN, J. B, F. Nielsen, P. Jorgesen et Grandjean P. 2000. "Toxic metals and selenium in blood from pilot whales and sperm whale". Marin pollution bulletin, vol. 40, p. 348-351.

O'SHEA, T. J. et R. L. Brownell Jr. 1994. "Organochlorine and metal contaminants in baleen whales: a review and evaluation of conservation implications". Science of the Total Environment, vol. 154, p. 179-200.

OGOSHI, M, T. Le, J. W. Shay et R. S. Taylor. 1998. "In situ hybridization analysis of the expression of human telomerase RNA in normal and pathologic conditions of the skin". Journal of Investigative Dermatology, vol. 110, p. 818-23.

PALSBOLL, P. J, J. Allen, M. Berube, P. J. Clapham, T. P. Feddersen, P. S. Hammond, R. R. Hudson, H. Jorgensen, S. Katona, A. H. Larsen, F. Larsen, J. Lien, D. K. Mattila, J. Sigurjonsson, R. Sears, T. Smith, R. Spomer, P. Stevick et N. Oien. 1997. "Genetic tagging of humpback whales". Nature, vol. 388, p. 767-9.

PALSBOLL, P. J, F. Larsen et E. Sigurd Hansen. 1991. "Sampling of skin biopsies from free-ranging large cetaceans in West Greenland : Development of new biopsy tips and bolt designs." Rep. Int. Whaling Commiss. vol. 71-79.

PALUDAN-MULLER C. 1993. Polar Biology, vol. 13, p. 311-320.

PERRIN, W. F. et A. C. Myrick. 1980. "Age determination of toothed whales and sirenians". Journal of Cetacean Research and Management, vol.

PFEIFFER, C. J. et V. J. Rowntree. 1996. "Epidermal ultrastructure of the southern right whale calf (*Eubalaena australis*)". Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, vol. 28, p. 277-86.

PROWSE, K. R. et C. W. Greider. 1995. "Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length". Proceedings of the National Academy of

Sciences of the United States of America, vol. 92, p. 4818-22.

PRUDENTE, M, S. Tanabe, M. Watanbe, A. Subramnian, N. Miyazki, P. Suarez et R. Tatsukawa. 1997. "Organochlorine contamination in some odontoceti species from the North Pacific and Indian Ocean". Marine environmental Research, vol. 44, p. 415-427.

REIJNDERS, P. J. H, A. Aguilar et G. P. Donovan. 1999. "Chemical pollutants and cetaceans". Journal of Cetacean Research and Management, vol.

RHODES, D, L. Fairall, T. Simonsson, R. Court et L. Chapman. 2002. "Telomere architecture". EMBO Rep, vol. 3, p. 1139-45.

ROMAN, J. et S. R. Palumbi. 2003. "Whales before whaling in the North Atlantic". Science, vol. 301, p. 508-10.

ROSS, P. S, M. G. Ellis, L. G. Barrett-Lennard et R. F. Adisson. 2000 . "High PCB concentrations in free-ranging pacific killer whales: effects of age, sex and dietary Preference". Marine Pollution Bulletin, vol. 40, p. 504-515.

RUFER, N, T. H. Brummendorf, S. Kolvraa, C. Bischoff, K. Christensen, L. Wadsworth, M. Schulzer et P. M. Lansdorp. 1999. "Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood". Journal of Experimental Medicine, vol. 190, p. 157-67.

SCHNEIDER, V. et D. Pearce. 2004. "What saved the whales? An economic analysis of 20th century whaling". Biodiversity and Conservation, vol. 13, p. 543-562.

SHIELS, P. G, A. J. Kind, K. H. Campbell, D. Waddington, I. Wilmut, A. Colman et A. E. Schnieke. 1999. "Analysis of telomere lengths in cloned sheep". Nature, vol. 399, p. 316-7.

SIDOROV, I. A, D. Gee et D. S. Dimitrov. 2004. "A kinetic model of telomere shortening in infants and adults". Journal of Theoretical Biology, vol. 226, p. 169-175.

SIMMONDS, M. P, K. Haraguchi, T. Endo, F. Cipriano, S. R. Palumbi et G. M. Troisi. 2002. "Human health significance of organochlorine and mercury contaminants in Japanese whale meat". J Toxicol Environ Health A, vol. 65, p. 1211-35.

TANABE, S. 2002. "Contamination and toxic effects of persistent endocrine disrupters in marine mammals and birds". Mar Pollut Bull, vol. 45, p. 69-77.

TANABE, S, H. Iwata et R. Tatsukawa. 1994. "Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals". Science of the Total Environment, vol. 154, p. 163-77.

TARPLEY, R. J, D. J. Hillmann, W. G. Henk et J. C. George. 1997. "Observations on the external morphology and vasculature of a fetal heart of the bowhead whale, *Balaena mysticetus*". Anatomical Record, vol. 247, p. 556-81.

TAYLOR, R. S, R. D. Ramirez, M. Ogoshi, M. Chaffins, M. A. Piatyszek et J. W. Shay. 1996. "Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin conditions". Journal of Investigative Dermatology, vol. 106, p. 759-65.

TILSON, H. A, G. J. Davis, J. A. McLachlan et G. W. Lucier. 1979. "The effects of polychlorinated biphenyls given prenatally on the neurobehavioral development of mice". Environmental Research, vol. 18, p. 466-74.

THIERAULT, G., G. GIBBS et C. TREMBLAY. 2002. "Cancer in belugas from the St. Lawrence estuary". Environ Health Perspect, vol. 10, p. A562.

VLECK, C. M, M. F. Haussmann et D. Vleck. 2003. "The natural history of telomeres: tools for aging animals and exploring the aging process". Experimental Gerontology, vol. 38, p. 791-5.

WAGEMANN, R. et B. Hobden. 1986. "Low-molecular weight metalloproteins in tissues of the narwhal (*Monodon monoceros*)". Comparative Biochemistry and Physiology. C: Comparative Pharmacology and Toxicology, vol. 84, p. 325-44.

WAGEMANN, R, S. Innes et P. R. Richard. 1996a. "Overview and regional and temporal differences of heavy metals in Arctic whales and ringed seals in the Canadian Arctic". Science of the Total Environment, vol. 186, p. 41-66.

WAGEMANN, R, S. Innes et P. R. Richard. 1996b. "Overview and regional and temporal differences of heavy metals in Arctic whales and ringed seals in the Canadian Arctic". Science of the Total Environment, vol. 186, p. 41-66.

WAGEMANN, R, E. Trebacz, G. Boila et W. L. Lockhart. 1998a. "Methylmercury and total mercury in tissues of arctic marine mammals". Science of the Total Environment, vol. 218, p. 19-31.

WAGEMANN, R, E. Trebacz, G. Boila et W. L. Lockhart. 1998b. "Methylmercury and total mercury in tissues of arctic marine mammals". Science of the Total Environment, vol. 218, p. 19-31.

WEISS, H. V, M. Koide et E. D. Goldberg. 1971. "Mercury in a Greenland ice sheet: evidence of recent input by man". Science, vol. 174, p. 692-4.

WELLINGER, R. J. et D. Sen. 1997. "The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes". European Journal of Cancer, vol. 33, p. 735-49.

YASUMOTO, S, C. Kunimura, K. Kikuchi, H. Tahara, H. Ohji, H. Yamamoto, T. Ide et T. Utakoji. 1996. "Telomerase activity in normal human epithelial cells". Oncogene, vol. 13, p. 433-9.

ZEH, J, D. Poole, G. Miller, W. Koski, L. Baraff et D. Rugh. 2002. "Survival of bowhead whales, *Balaena mysticetus*, estimated from 1981-1998 photoidentification data". Biometrics, vol. 58, p. 832-40.

ZEICHNER, S. L, P. Palumbo, Y. Feng, X. Xiao, D. Gee, J. Sleasman, M. Goodenow, R. Biggar et D. Dimitrov. 1999. "Rapid telomere shortening in children". Blood, vol. 93, p. 2824-30.

