

Suivi de l'alimentation des phoques :
Utilisation du metabarcoding en complément de
l'analyse des pièces dures retrouvées dans les fèces.

– Rapport final pour le GIS Eolien en Mer –



Jérôme Spitz^{1,2}, Stephen Mulero³, Benoit Simon-Bouhet¹, Cécile Vincent¹, Yann Planque^{1,2}

¹ Centre d'Études Biologiques de Chizé, CEBC, UMR 7372 CNRS / La Rochelle Université.

² Observatoire Pelagis, UAR 3462 CNRS / La Rochelle Université.

³ Laboratoire d'Écologie Alpine, UMR 5553 CNRS / UGA / USMB.

– Avril 2023 –



Le présent document constitue le rapport final du contrat TRE_LEM-DVE042 numéro 3549 qui lie le Centre d'Etudes Biologiques de Chizé (CEBC, UMR 7372 CNRS / La Rochelle Université) et l'Observatoire Pelagis (UAR 3462 CNRS / La Rochelle Université) à Eoliennes en Mer Dieppe – Le Tréport (EMDT), financeur du projet, mandaté par le Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) Eolien en Mer.

Citation du document : Spitz, J., Mulero S., Simon-Bouhet B., Vincent, C., Planque, Y. 2023. Suivi de l'alimentation des phoques : Utilisation du metabarcoding en complément de l'analyse des pièces dures retrouvées dans les fèces. Rapport final. Avril 2023. 38 PP.

Contacts : jerome.spitz@univ-lr.fr / yann.planque01@gmail.com

Sommaire

Remerciements	4
1 Contexte et objectifs	5
2 Matériels et Méthodes	6
2.1 Collecte de fèces et protocoles de préparation pour metabarcoding	6
2.2 Approches moléculaires.....	9
2.2.1 Extraction de l'ADN.....	10
2.2.2 Amplification de l'ADN et séquençage.....	10
2.2.3 Analyses des données de séquençage	11
2.3 Approche traditionnelle (analyse des pièces dures diagnostiques).....	12
2.4 Analyse des données.....	13
3 Résultats & Discussion	15
3.1 Diversité taxonomique.....	15
3.2 Richesse taxonomique	19
3.3 Occurrence en proies par famille	22
3.4 Occurrence en proies par groupes fonctionnels	26
3.5 Résultats semi-quantitatifs préliminaires	29
4 Conclusion et recommandations pour les futures études d'identification du régime alimentaire des phoques veaux-marins et gris.....	32
5 Références bibliographiques	34

Remerciements

Merci au Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) Eolien en Mer pour la suggestion de cette étude sur l'utilisation d'approches de biologie moléculaire pour évaluer le régime alimentaire de phoques veaux-marins et de phoques gris, et merci à Eoliennes en Mer Dieppe – Le Tréport (EMDT), financeur du projet, mandaté par le GIS Eolien en Mer.

Ce travail a bénéficié du support et de l'expertise de la plateforme AnaEE eDNA (UMR CNRS-USMB-UGA 5553 au sein du Laboratoire d'Écologie Alpine - LECA) incluse dans l'infrastructure nationale AnaEE-France.

Merci à l'ensemble des personnes qui ont pris part à la collecte des fèces de phoques veaux-marins et gris, qui serviront aux analyses, et qui sont issues de différentes structures : Picardie Nature, Association Découverte Nature (ADN), GDEAM-62 et le Parc naturel marin des Estuaires picards et de la mer d'Opale.

1 Contexte et objectifs

Dans le cadre de l'établissement de l'état de référence du parc éolien en mer de Dieppe Le Tréport, le régime alimentaire des phoques a été suivi à partir de l'analyse des pièces dures diagnostiques (os de poissons, becs de céphalopodes, etc.) retrouvées dans des fèces de phoques (Planque et al., 2023). Ces analyses permettent d'identifier non seulement les espèces ou familles de proies consommées par les phoques, mais également d'estimer les tailles individuelles des proies et les biomasses consommées. Cette approche est traditionnellement utilisée chez les pinnipèdes, et elle permet l'obtention des données les plus détaillées pour la description quantitative de l'alimentation de ces espèces (Ridoux et al., 2007a; Spitz et al., 2015a; Trites & Spitz, 2017). Néanmoins, cette technique souffre de limites dues à la récupération de pièces dures, ainsi certaines espèces proies peuvent être sous-estimées voir non-retrouvées dans cette approche par exemple quand le prédateur ne s'alimente que de la chair de ces proies ou bien quand les espèces proies ne possèdent pas de pièces résistantes à la digestion (espèces cartilagineuses ou gélatineuses).

Le développement d'approches moléculaires peut permettre de combler en partie ces limites. La caractérisation de la biodiversité à partir d'ADN issu d'un échantillon de fèces est devenue accessible grâce aux nouvelles technologies de séquençage et permet d'obtenir un inventaire des espèces proies présentes dans l'alimentation d'un prédateur (Sousa et al., 2019). La robustesse de ces approches et son application en routine pour des prédateurs marins restent encore imparfaites mais son application a déjà démontré une plus-value certaine notamment lorsqu'elle était couplée avec l'approche traditionnelle sur les restes durs (Jeanniard-du-Dot et al., 2017; McInnes et al., 2017).

L'objectif ici est d'explorer l'apport du metabarcoding dans la description de l'alimentation des phoques en baie de Somme en complément de l'approche traditionnelle dans le cadre du suivi de l'implantation du parc éolien en mer de Dieppe Le Tréport. L'utilisation des approches moléculaires dans l'étude du régime alimentaire des phoques étant encore émergente, une première tâche avait été la production d'une analyse bibliographique (Planque & Spitz, 2022), et la proposition d'un protocole pour explorer la sensibilité de la méthode à la stratégie d'échantillonnage et une comparaison entre les espèces identifiées à partir des pièces dures d'une part, et du metabarcoding d'autre part. En effet, les fèces sont des échantillons non-homogènes, différentes stratégies de sous-

échantillonnages ont été testées : extraction de l'ADN directement à partir de la matière fécale en phase solide (soit d'un prélèvement d'un seul sous-échantillon par fèces, soit de trois sous-échantillons), ou extraction de l'ADN à partir d'un prélèvement en phase liquide après mise en suspension/dilution d'une partie de l'échantillon. La question de la représentativité du prélèvement dédié aux analyses d'ADN est cruciale, les différentes approches sont testées sur un lot de fèces pour comparer leur performance (*i.e.*, leur capacité à maximiser le nombre d'espèces détectées), ainsi les mêmes échantillons de fèces ont été analysés par différentes approches. La liste d'espèces identifiées par la présence d'ADN et leur occurrence au travers les échantillons testés a été comparée avec la liste d'espèces et leur occurrence disponible à travers les analyses menées sur les restes durs. Il était également attendu de cette phase d'essai, une recommandation quant à la stratégie de sous-échantillonnage des fèces pour l'extraction d'ADN permettant de standardiser ce type d'analyse lors des phases suivantes du projet de construction du parc éolien.

2 Matériels et Méthodes

2.1 Collecte de fèces et protocoles de préparation pour metabarcoding

L'ensemble de ces analyses sont réalisées sur 17 fèces de phoques veaux-marins et 15 de phoques gris collectées en baie de Somme (sur des reposoirs sableux) de mai à juillet 2022 pour les phoques veaux-marins et aux printemps-étés de 2021 et 2022 pour les phoques gris (Figure 1). L'ensemble de ces fèces ont été congelées à -20°C le jour même de leur collecte, et ont été conservées jusqu'à préparation. Les fèces les mieux constituées (solides), ayant le plus de matière fécale possible, et ayant été le moins possible mélangées avec du sédiment (sable), ont ici été sélectionnées.

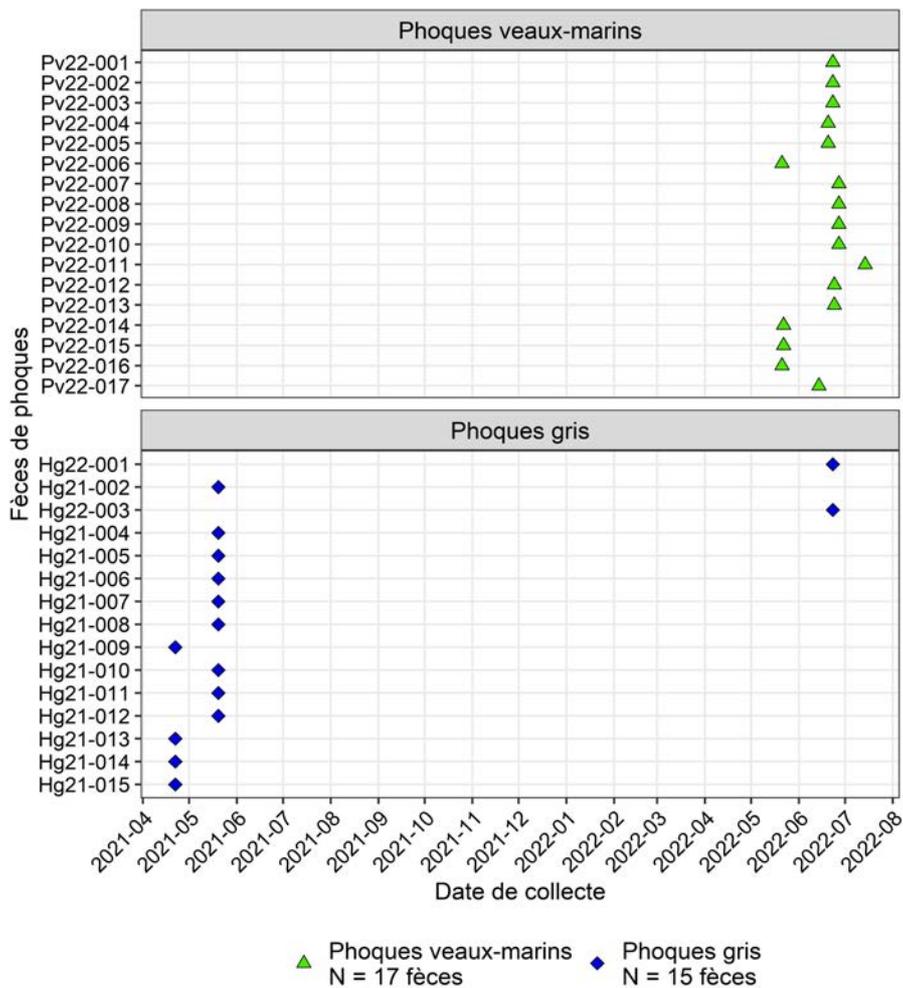


Figure 1 – Distribution temporelle des 17 fèces de phoques veaux-marins et des 15 fèces de phoques gris collectées en baie de Somme en 2021 et 2022 afin d’être analysées pour évaluer le régime alimentaire par approche moléculaire (metabarcoding) et par approche traditionnelle (analyse des pièces dures diagnostiques de proies).

La littérature scientifique souligne de nombreuses incertitudes qui subsistent concernant l’influence des méthodes de préparation des fèces sur les résultats de metabarcoding (Planque & Spitz, 2022). Trois protocoles d’échantillonnage ont été testés sur chacune des fèces (nommés protocoles A, B et C). Dans la continuité de précédentes études (Gosselin et al., 2017), nous avons ici choisi d’effectuer des sous-échantillonnages sur différentes localisations de la fèces, en partant de l’hypothèse que l’ADN de proies est réparti de façon hétérogène dans la fèces. Pour appliquer ces protocoles, nous avons réalisé des sous-échantillons de matière fécale prélevés au centre de la fèces (afin d’éviter le possible contact avec du sable et l’environnement extérieur, et donc une contamination) à trois localisations éloignées : (2) et (3) à des extrémités opposées de la fèces, (1) vers le milieu de la fèces. Ces

protocoles sont présentés schématiquement en Figure 2. Pour le protocole (A), environ 20-25 mg de matière fécale ont été prélevées à la localisation (2) exclusivement. Pour le protocole (B) et (C), environ 20-25 mg de matière fécale ont été prélevées aux trois localisations (1, 2 et 3) et ont été mélangées. Enfin, des techniques de conservation différentes ont été utilisées. Les échantillons préparés pour les protocoles (A) et (B) ont été lyophilisés. Pour le protocole (C), les 20-25 mg de matière fécale prélevées aux trois localisations ont été mélangées à 25 ml solution de Longmire, qui est une solution permettant la préservation d'échantillons pour analyses d'ADN environnemental (e.g. Williams et al., 2016).

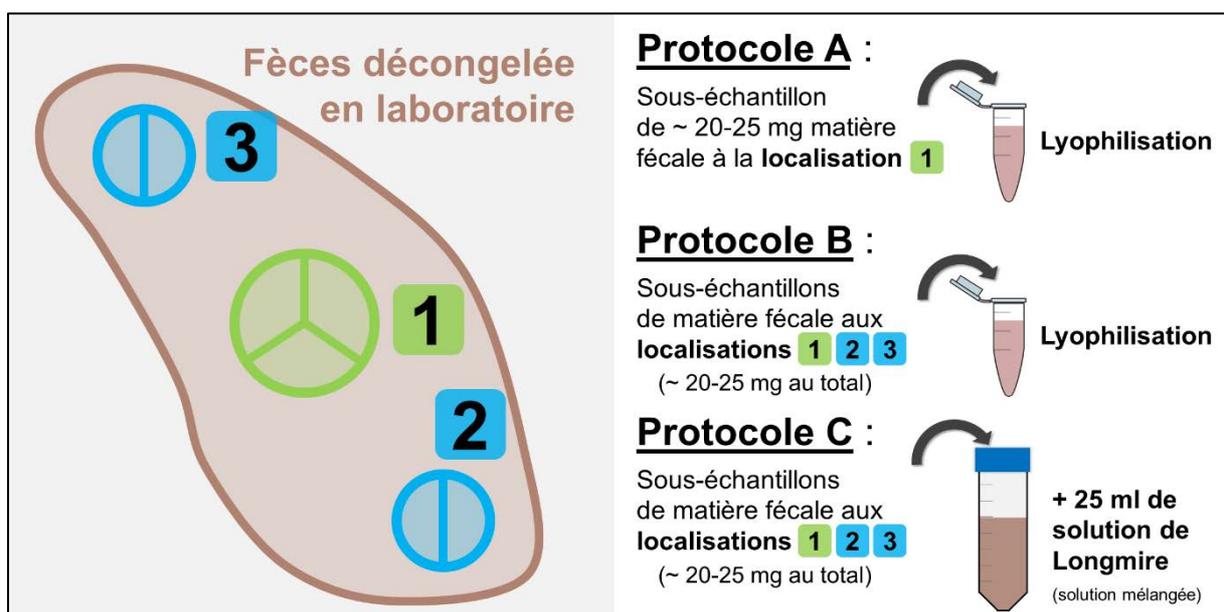


Figure 2 – Représentation schématique des trois protocoles de préparation de fèces de phoques veaux-marins et gris appliqués dans la présente étude, pour analyse du contenu en ADN par metabarcoding (protocoles A, B et C). Les sous-échantillonnages sont réalisés aléatoirement sur trois localisations distinctes de chaque fèces (1 vers le centre, 2 et 3 vers des extrémités). Ces échantillonnages sont réalisés sur de la matière fécale au cœur de chaque fèces, afin d'éviter au maximum le contact avec le substrat (sable). Ces préparations sont effectuées en laboratoire, après décongélation.

Au total, 96 analyses de metabarcoding ont donc été réalisées (trois protocoles testés par fèces). L'objectif est d'identifier l'efficacité de ces protocoles de préparation dans la détection des espèces proies (tester si l'un d'entre eux permet la détection d'une plus haute diversité de proies).

Le reste de chaque fèces, non sous-échantillonné pour les analyses moléculaires, a été conservé afin d'effectuer l'analyse de son contenu suivant l'approche traditionnelle (analyse des pièces dures diagnostiques de proies non digérées).

2.2 Approches moléculaires

L'ensemble des analyses de metabarcoding des fèces de phoques veaux-marins et gris de la présente étude seront réalisées par l'une des plateformes techniques AnaEE¹, spécialisée dans la réalisation d'études d'ADN environnemental (eDNA), et qui est rattachée au Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA, CNRS – Université Grenoble Alpes – Université Savoie Mont-Blanc). Sur la base des connaissances préalables des proies potentielles des deux espèces de phoques sur la zone d'étude, nous avons déterminé que les analyses seraient effectuées avec différentes amorces qui ciblent les téléostéens, les chondrichthyens, les élasmobranches, les arthropodes et les mollusques. Ces analyses devraient alors permettre d'identifier un large spectre d'espèces proies potentielles de phoques. Les essais réalisés avec les amorces chondrichthyens et mollusques n'étant pas satisfaisant, ces deux amorces ont été écartées. Enfin, il était également prévu de détecter la présence d'ADN de phoques veaux-marins, de phoques gris et de marsouins communs (*Phocoena phocoena*) dans les fèces préparées. Ce dernier choix méthodologique a deux objectifs : confirmer l'espèce productrice de la fèces (cf. dans la continuité des techniques moléculaires utilisées précédemment ; (Spitz et al., 2015b)) et d'évaluer toute potentielle consommation d'un mammifère marin par le phoque qui a produit la fèces (consommation de phoques veaux-marins ou gris par des phoques gris, (van Neer et al., 2015, 2019, 2021) ; consommation de marsouins communs par des phoques gris, (Leopold et al., 2015)). Ce choix a conduit à ne pas utiliser d'amorce bloquante pour les phoques au risque d'être moins performant sur la détection d'espèces rares. Néanmoins pour un prédateur généraliste, il a pu être montré un impact limité de l'absence d'amorce bloquante sur la détection des espèces proies (Günther et al., 2021).

¹ <https://www.anaee-france.fr/> et <https://leca.osug.fr/eDNA-AnaEE-France-272>

Toutes les expérimentations de biologie moléculaire ont été réalisées en conditions stériles, chaque surface de travail a été décontaminée avant et après chaque manipulation par l'utilisation d'une solution de javel 5% et de l'éthanol 70%. Le matériel réutilisable a été systématiquement stérilisé par flamme et décontaminé en utilisant le même protocole que ci-dessus.

2.2.1 Extraction de l'ADN

L'ADN extracellulaire total des échantillons de fèces a été extrait en utilisant le kit NucleoSpin® Soil kit (Macherey-Nagel) en suivant un protocole adapté pour les sols et échantillons de fèces (Taberlet, PRUD'HOMME, et al., 2012). Brièvement, les échantillons conditionnés en tubes Falcon de 50 mL ont été centrifugés 15 minutes à 11 000 RPM, le surnageant a ensuite été délicatement retiré et le reste de l'extraction a été réalisé sur le culot. Les culots d'échantillons conservés en Longmire et les échantillons lyophilisés ont ensuite été resuspendus dans 15 mL de tampon phosphate saturé (Na_2HPO_4 ; 0.12 M; pH \approx 8), en respectant dans la mesure du possible une équivalence entre la quantité de matière fécale et le volume de tampon (*i.e.* 15 ml pour 15 g) sauf pour les échantillons lyophilisés qui ont été ajustés à 15 g avant lyophilisation. Une fois en tampon phosphate, les échantillons ont été agités 15 minutes sur un agitateur orbital, 2 ml du mélange résultant a ensuite été récupéré puis placé dans un tube microcentrifuge de 2 mL. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 12 000 RPM pour 10 minutes, 400 μ l de surnageant a été délicatement prélevé puis placé dans un autre tube microcentrifuge contenant 500 μ l de tampon SB. Les étapes suivantes du protocole ont été réalisées en suivant le protocole du fabricant avec une élution finale dans 100 μ l de tampon SE.

2.2.2 Amplification de l'ADN et séquençage

La totalité des échantillons ont été amplifiés en quadruplicats en utilisant trois ensembles de marqueurs moléculaires tagués ciblant le gène 12S des élasmobranches (Elas02) et des téléostéens (Tele04) et le gène 16S des arthropodes (Arth02) (Taberlet, Coissac, et al., 2012). Les séquences des tags associés aux marqueurs ont été déterminées en utilisant la fonction oligoTag disponible sur le package OBITools (Boyer et al., 2016). Pour éviter les biais communs

qui apparaissent pendant l'amplification d'ADN, tous les réplicas de PCR ont été placés aléatoirement sur les plaques 96 afin de limiter les contaminations puit à puit, et les pertes de séquences liées aux tag-jumps (Schnell et al., 2015).

Les réactions PCR ont été effectuées dans un mix PCR contenant 1 unité d'AmpliTaQ Gold Polymerase (Applied Biosystems), 1 X de mix TaqGold, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de chaque dNTPs, 0.5 μM de chaque amorce tagués (forward et reverse) et 0,2 mg/mL d'albumine de sérum bovin (BSA, Roche Diagnostics) dans un volume réactionnel final de 20 μl incluant 2 μl d'ADN extrait. Le programme PCR utilisé incluait une dénaturation initiale de 3 minutes à 95°C, suivie de 50 cycles de 30 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 30 secondes à 60°C (Tele04), 59°C (Elas02) et 49°C (Arth02), une étape d'élongation de 1 minute à 72°C, et une élongation finale de 7 minutes à 72°C. Les amplicons obtenus ont été visualisés en électrophorèse capillaire sur un QIAxcel Advanced (Qiagen) et quantifiés avec un Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher). La purification des ADN et la préparation des bibliothèques ont été effectuées par Fasteris (Genève, Suisse) en utilisant le protocole sans PCR MetaFast². Trois bibliothèques ont ainsi été séquencées en *forward* et *reverse* sur un NextSeq (2x150 bp, 120m, Illumina, San Diego, USA).

2.2.3 Analyses des données de séquençage

Les données de séquençage ont été analysées sur les serveurs de calculs de l'infrastructure GRICAD³ supportée par la communauté de chercheurs de Grenoble. Le prétraitement des données a été effectué en utilisant le package OBITools3 v. 3.0.1b21 pour l'assemblage et demultiplexing des séquences brutes, le filtrage des séquences selon plusieurs critères (*i.e.* la taille d'amplicon, l'intégrité de la séquence, la présence/absence de la séquence des amorces) et pour l'assignation taxonomique via les bases de données publiques GenBank. Le tutoriel OBITools sur les loups⁴ reprend la totalité des étapes utilisées dans cette étape de l'analyse ainsi que les codes utilisés. Le traitement des données a ensuite été raffiné en utilisant le package R (version 4.0.5) MetabaR (version 1.0.0 (Zinger et al., 2021) cette étape

² www.fasteris.com/en-us/NGS/DNA-sequencing/Metabarcoding/Metagenomics-16S-18S-ITS-or-custom-PCR-amplicons

³ <https://gricad.univ-grenoble-alpes.fr>

⁴ <https://git.metabarcoding.org/obitools/obitools3/-/wikis/Wolf-tutorial-with-the-OBITools3>

permet d'effectuer des filtrages supplémentaires basés sur le contexte de l'expérimentation (plan de plaque, composition en ADN des contrôles positifs et négatifs, etc.). Brièvement, ces filtres permettent de trier les regroupements de séquences ou MOTUs (Molecular Taxonomic UnitS) selon divers critères : (i) le retrait des séquences uniques et double dans l'ensemble du jeu de données (*i.e.* singletons et doubletons), (ii) le retrait des MOTUs avec un score d'assignation inférieur à 97% avec la séquence assignée (iii) le retrait des MOTUs dans un échantillon si ces derniers ne sont pas présent dans au moins deux des quatre répliques techniques d'un même échantillon, et (iv) le retrait des échantillons dont la composition en MOTUs et nombre de séquences associées est identique à celle d'un contrôle positif. Un protocole reprenant les étapes de filtrages et codes présentées dans le tutoriel Let's metabar⁵.

2.3 Approche traditionnelle (analyse des pièces dures diagnostiques)

L'analyse traditionnelle des restes durs de proies a été réalisée sur les mêmes échantillons. Les résultats issus de cette analyse peuvent alors être comparés à ceux obtenus par metabarcoding afin d'évaluer les apports de chacune des approches testées. Les résultats de régime alimentaire par approche traditionnelle ont été obtenus en suivant une procédure classique d'analyse du contenu des fèces de pinnipèdes en restes de proies (Pierce & Boyle, 1991; Ridoux et al., 2007b; Spitz et al., 2010). Les fèces de phoques veaux-marins et gris ont été collectées sur leurs reposoirs, puis congelées à -20°C jusqu'aux analyses ultérieures.

Chaque fèces a ensuite été décongelée puis filtrée sur un tamis en nylon de fine maille (0.2 mm), afin d'analyser son contenu en « parties dures diagnostiques ». Les parties dures diagnostiques étudiées sont des os de poissons, des otolithes de poissons et des becs de céphalopodes. Ces pièces dures ont finalement été inspectées afin d'identifier les espèces proies consommées, en fonction de critères distinctifs (forme et taille des pièces), en utilisant des guides d'identification (Härkönen, 1986; Tuset et al., 2008) et avec le matériel de référence disponible à l'Observatoire Pelagis (UAR CNRS – La Rochelle Université). L'identification taxonomique des proies a été réalisée jusqu'à l'échelle de l'espèce lorsque cela

⁵ <https://metabarfactory.github.io/metabaR/articles/metabaRF-vignette.html>

été possible, ou à défaut à l'échelle de plusieurs espèces proches regroupées (*e.g.* soles communes *Solea solea* et soles poles *Pegusa lascaris*), voire à l'échelle de la famille.

La masse et de taille relative des individus des proies « mesurables » ont été estimées par application de relations allométriques sur des mesures de certaines pièces diagnostiques mesurables. Ces mesures sont : la largeur ou la longueur des otolithes de poisson (selon l'espèce), et la mesure de la longueur rostrale inférieure des becs inférieurs de céphalopodes. Les relations allométriques appliquées ont été trouvées dans la littérature (*e.g.* (Clarke, 1986; Härkönen, 1986; Lundström et al., 2007)), ou sont issues de données non publiées de l'Observatoire Pelagis (la majorité de ces relations sont présentées en annexe de (Planque et al., 2021)). Les valeurs estimées de masse et de taille des proies sont « minimales » puisque nous n'avons ici pas pris en compte l'érosion des pièces dures liée à la digestion.

La majorité des résultats de régime alimentaire sont ici présentés à l'échelle taxonomique la plus fine possible (échelle des espèces ou groupes d'espèces proies). Chacune de ces proies a également été associée à des groupes fonctionnels, ces derniers permettant de décrire plus justement les interactions écologiques proies-prédateurs que les groupes taxonomiques classiques (Smith et al., 2015; Spitz et al., 2018). Les groupes fonctionnels choisis ici ont déjà été utilisés précédemment sur le même contexte d'étude (écologie trophique des phoques veaux-marins et gris en baie de Somme ; (Planque et al., 2021)). Les groupes fonctionnels regroupant les espèces proies sont : poissons plats benthiques, poissons benthiques non-plats, poissons démersaux, poissons pélagiques, encornets pélagiques, céphalopodes démersaux et crustacés.

2.4 Analyse des données

Pour l'approche traditionnelle, les résultats de régime alimentaire sont présentés suivant trois différents indices :

- La fréquence d'**occurrence** de chacune des proies, qui correspond à la proportion de toutes les fèces qui incluent au moins une trace de cette espèce proie (ou groupe d'espèces) ;
- L'**abondance relative** des espèces proies, qui correspond au nombre d'individus estimés par espèce proie (ou groupe d'espèces). Le nombre d'individus est estimé sur la base du nombre de pièces diagnostiques appariées de la proie (otolithes, opercules,

dentaires, prémaxillaires, ou autres os caractéristiques pairés) ou du nombre de pièces diagnostiques non-appariées (e.g. parasphénoïde de poisson, partie supérieure ou inférieure d'un bec de céphalopode). Ce nombre d'individus correspond alors au nombre de pièces appariées divisé par deux ou au nombre absolu de pièces non-appariées, selon la valeur des deux qui est la plus grande. L'abondance est exprimée en nombre et pourcentage d'individus estimés par espèce, parmi tous les individus détectés dans toutes les fèces ;

- Le pourcentage de **biomasse reconstruite** de proies ingérées. Celle-ci est présentée par espèce proie (ou groupe d'espèces), parmi toutes les proies détectées dans toutes les fèces. Cette masse a été uniquement reconstruite pour les espèces dites « mesurables », c'est-à-dire pour lesquelles il était possible de déterminer la masse relative des individus par applications de relations allométriques. La masse moyenne de tous les individus détectés dans une fèces (ou à défaut dans toutes les fèces) a été appliquée lorsque la masse d'un individu d'une espèce mesurable ne pouvait être reconstruite.

Pour l'approche moléculaire, les résultats de régime alimentaire sont présentés suivant trois différents indices :

- La fréquence d'**occurrence** de chacune des proies, qui correspond à la proportion de toutes les fèces qui incluent la détection de cette espèce proie (ou groupe d'espèces) retrouvé dans un moins un des réplicats d'analyses.
- **L'abondance relative de reads** (RRA), le nombre de *read* (ou fragment de séquence) détecté dans un échantillon peut être utilisé comme informant de la quantité relative d'ADN de l'espèce dans cet échantillon.

Les résultats de régime alimentaire, en occurrence (nombre de fèces incluant la proie) et en nombre de « *reads* » de séquences d'ADN (metabarcoding) et en masse reconstruite (analyse des pièces dures), ont été calculée en pourcentage pour chaque espèce proie (à l'échelle taxonomique ou fonctionnelle) lorsqu'ils ont été évalués à l'échelle de l'espèce de phoque et/ou du protocole appliqué (*i.e.* lorsqu'ils incluent plusieurs fèces). Un intervalle de confiance à 95% (IC95%) a été estimé autour de ces pourcentages en appliquant une méthode d'inférence statistique de bootstrap (Reynolds & Aebischer, 1991) avec un code personnalisé

sous R (script disponible sur GitHub⁶). L'ensemble des N fèces utilisées pour déterminer le régime alimentaire ont été rééchantillonnées N fois avec remise, et ce procédé a été relancé 1000 fois pour générer 1000 compositions aléatoires de régime alimentaire. Les bornes inférieures et supérieures de l'IC95% ont ainsi été définies par les quantiles à 2.5% et à 97.5% des valeurs générées.

3 Résultats & Discussion

3.1 Diversité taxonomique

L'une des questions centrales sur la combinaison des différentes approches de détermination du régime alimentaire repose sur la capacité à détecter et identifier les espèces ingérées. Dans les deux approches l'enjeu majeur repose sur l'identification des restes, soit des restes durs non-digérés, soit les fragments de séquences d'ADN amplifiées. Dans les deux cas, la précision taxonomique va dépendre de l'état des restes (durs ou d'ADN). Pour les analyses de metabarcoding, seuls les MOTUs attribués à une espèce avec une probabilité supérieure à 80% ont été conservés. Il en résulte qu'à l'échelle spécifique, 18% des séquences (*reads*) restent sans assignation, ce pourcentage diminue lorsque des niveaux taxonomiques supérieurs sont considérés (10% à l'échelle du genre, 1% à l'échelle de la famille). De ce fait, il est fort probable qu'un certain d'espèces dont l'ADN est présent mais trop dégradé ou trop peu spécifique soit incluses dans les 18% des séquences non attribuées à une espèce. Les listes d'espèces sont donc des minimums.

Pour les poissons osseux, 31 identifications d'espèces ont été proposées par metabarcoding sur les 32 échantillons analysés (Tableau 1). Sur ces assignations, il faut noter que 25% se révèlent être des espèces non présentes dans la zone. Néanmoins, les genres ou familles associées sont cohérentes avec des espèces proies des phoques. Par exemple, des os orphies ont été observés dans les restes durs mais le metabarcoding identifie une seule espèce de belonidés *Ablennes hians*, espèce tropicale, non présente dans les eaux françaises. Notons également des espèces dont d'autres espèces du même genre ou de la même famille ont

⁶ *Identifying diet clusters and interspecific overlap*. Script écrit en langage R, disponible depuis GitHub : https://github.com/YannPlanque/Diet_Cluster_and_Overlap

identifiés par metabarcoding est qui pourraient être des erreurs d'assignation, soit des séquences appartenant à une espèce déjà identifiées ou soit à des nouvelles espèces du même genre ou de la même famille mais mal identifiée comme par exemple *Platyichthys stellatus*, *Solea ovata*, *Atherina hepsetus*, *Thunnus thynnus*. La moitié des espèces identifiées correspondent à des espèces connues à travers les pièces dures, mais confirme ou précise les identifications faites à partir des otolithes ou des os de poissons, comme par exemple pour un certain nombre de poissons plats, les lançons, les tacauds ou les callionymes. Nous pouvons noter aussi dans les apports de précision du metabarcoding comparé aux pièces dures, le cas d'*Agonus cataphractus*, un poisson de la famille des Agonidés, une famille proche de celle des Cottidés pour laquelle quelques restes érodés ont été attribué probablement à tort à cette famille. Quelques espèces connues du régime alimentaire des phoques mais non détectées dans les restes digérés des 32 échantillons ont été identifiées par metabarcoding comme le bar et le mulot. En termes de diversité taxonomique, un des résultats les plus marquant est les 25% restant qui correspondent à des espèces encore jamais identifiées dans les restes durs et dont la présence dans la zone et l'alimentation des phoques sont cohérentes comme la truite (*Salmo trutta*), le maquereau (*Scomber scombrus*), les atherines (*Atherina* spp.) ou les sparidés (même si l'espèce assignée est douteuse, *P. bogaravero*) et dont le nombre de séquences ou la fréquence d'occurrence suggèrent une contribution à considérer dans l'alimentation de ces prédateurs. A l'inverse, il faut noter l'absence majeure des différentes espèces de soleidés observés dans les restes durs et notamment les espèces de petites soles (*Buglossidium luteum* ou *Microchirus variegatus*). Ces espèces majeures dans l'alimentation du phoque n'ont pas été détectées malgré de nombreux restes alimentaires retrouvés dans les crottes, cette absence pourrait être due à des difficultés ou conflits d'assignation ou d'amplification avec d'autres poissons plats, un ADN plus dégradé ou plus difficilement amplifiable. Une recherche spécifique par PCR pour ces deux espèces notamment serait pertinente.

Pour les autres groupes d'espèces, la consommation de raies est confirmée par l'ADN, leur présence avait été identifiée par quelques écailles placoïdes retrouvées dans les fèces. Pour les céphalopodes, les difficultés d'amplification liées à ce groupe nécessitent de poursuivre le travail. Leur représentativité par l'analyse traditionnelle peut être sous-estimée car identifiée le plus souvent par leur bec. Ici, il est intéressant de noter qu'une espèce la seiche commune (*Sepia officinalis*) a été identifiées en metabarcoding, sans que cette espèce ne soit retrouvée

dans les pièces dures ; au contraire des becs d'encornet (*Loligo* spp.) ont eux été retrouvés dans les pièces dures sans que l'espèce soit identifiée par son ADN. Une recherche spécifique des différentes espèces majeures de céphalopodes est en cours pour tester des problèmes d'amplification liés aux amorces utilisées. Enfin, quelques espèces de petits à très petits crustacés ont été identifiés mais dont la présence n'est très certainement pas due à une ingestion ciblée par les phoques (contamination, ingestion « collatérale », ou proies de proies). Aucune trace d'ingestion d'un autre mammifère n'a été détecté.

Les analyses comparatives suivantes sont effectuées sur les assignations à la famille afin d'être le plus comparatif possible.

Tableau 1 – Inventaire taxonomique des espèces proies détectées par approche moléculaire (metabarcoding) et par approche traditionnelle (analyse des pièces dures diagnostiques) dans tous les échantillons de fèces de phoques veaux-marins (N = 17) et de phoques gris (N = 15) analysées (collectées en baie de Somme ; analyse de chaque échantillon en metabarcoding selon trois protocoles).

Proies détectées par metabarcoding et par analyse des pièces dures Proies communes : détectées par metabarcoding et avec les pièces dures sur les 32 échantillons analysés Proies communes : détectées par metabarcoding et avec des pièces dures issus de travaux antérieurs Proies détectés uniquement par metabarcoding Proies détectés uniquement par metabarcoding mais espèces non présente dans les eaux de la Manche - Mer du Nord Proies détectées avec les pièces dures uniquement				
Groupe fonctionnel	Famille	Genre	Nom scientifique	Nom vernaculaire
Poissons plats benthiques	Pleuronectidae	<i>Pleuronectes</i>	<i>Pleuronectes platessa</i>	Plies communes
		<i>Platichthys</i>	<i>Platichthys flesus</i>	Flets communs
			<i>Platichthys stellatus</i>	Flets étoilés
		<i>Limanda</i>		Limandes NI
	Soleidae	<i>Solea</i>	<i>Solea solea</i>	Soles communes
		<i>Solea ovata</i>	Soles ovates	
		<i>Pegusa lascaris</i>	Soles poles	
		<i>Buglossidium luteum</i>	Petites soles jaunes	
		<i>Microchirus variegatus</i>	Soles perdrix	
	Bothidae	<i>Arnoglossus</i>	<i>Arnoglossus laterna</i>	Arnoglosses lanternes
	Scophthalmidae	<i>Scophthalmus</i>	<i>Scophthalmus maximus</i>	Turbots
Poissons non-plats benthiques	Callionymidae	<i>Callionymus</i>	<i>Callionymus lyra</i>	Dragonnets lyres
	Gobiidae	<i>Gobius</i>	<i>Gobius niger</i>	Gobies noirs
			<i>Gobius cobitis</i>	Gobies céphalotes
		<i>Pomatoschistus</i>	<i>Pomatoschistus minutus</i>	Gobies des sables
			<i>Pomatoschistus knerii</i>	Gobies de Kner
		<i>Zosterisessor</i>	<i>Zosterisessor ophiocephalus</i>	Gobies lotes
				Gobidés NI
	Trachinidae	<i>Trachinus</i>	<i>Trachinus draco</i>	Grandes vives
		<i>Echiichthys</i>	<i>Echiichthys vipera</i>	Petites vives
	Triglidae			
Cottidae			Cottidés NI	
Agonidae	<i>Agonus</i>	<i>Agonus cataphractus</i>	Souris de mer	
Anguillidae	<i>Anguilla</i>		Anguilles NI	
Poissons demersaux	Gadidae	<i>Trisopterus</i>	<i>Trisopterus luscus</i>	Tacauds communs
		<i>Merlangius</i>	<i>Merlangius merlangus</i>	Merlans
	Ammodytidae	<i>Ammodytes</i>		Laçons NI
	Moronidae	<i>Dicentrarchus</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Bars communs
	Mugilidae	<i>Chelon</i>	<i>Chelon auratus</i>	Mulets dorés
	Labridae	<i>Symphodus</i>	<i>Symphodus cinereus</i>	Clavières
				Labridés NI
	Merlucciidae	<i>Merluccius</i>	<i>Merluccius merluccius</i>	Merlus communs
	Sparidae	<i>Pagellus</i>	<i>Pagellus bogaraveo</i>	Dorades roses
	Syngnathidae	<i>Syngnathus</i>	<i>Syngnathus typhle</i>	Siphonostomes
Argentinidae	<i>Argentina</i>	<i>Argentina silus</i>	Grandes argentines	
Congridae	<i>Conger</i>		Congres NI	
Poissons pélagiques	Clupeidae	<i>Sardina</i>	<i>Sardina pilchardus</i>	Sardines
	Belonidae	<i>Ablennes</i>	<i>Ablennes hians</i>	Orphies plates
				Orphies NI
Carangidae	<i>Trachurus</i>	<i>Trachurus trachurus</i>	Chinchards	

	Scombridae	<i>Scomber</i> <i>Thunnus</i>	<i>Scomber scombrus</i> <i>Thunnus thynnus</i>	Maquereaux communs Thons rouges de l'ATL
	Salmonidae	<i>Salmo</i>	<i>Salmo trutta</i>	Truites communes
	Atherinidae	<i>Atherina</i>	<i>Atherina boyeri</i> <i>Atherina hepsetus</i>	Athérines Cabassons
	Telmatherinidae	<i>Telmatherina</i>	<i>Telmatherina celebensis</i>	Arc-en-ciels des Célèbes
Poissons cartilagineux	Rajidae	<i>Raja</i>		Raies NI
Encornets pélagiques	Loliginidae	<i>Loligo</i>		Encornets NI
Céphalopodes démersaux	Sepiidae	<i>Sepia</i>	<i>Sepia officinalis</i>	Seiches communes
Céphalopodes NI			Und. Cephalopods	Céphalopodes NI
Crustacés	Archaeobalanidae	<i>Semibalanus</i>	<i>Semibalanus balanoides</i>	Balanes
	Paguridae	<i>Pagurus</i>		Bernards-l'ermites
	Daphniidae	<i>Megafenestra</i>	<i>Megafenestra aurita</i>	(Crustacés copépodes)
	Polybiidae			
	Cerithiidae	<i>Cacozeliana</i>	<i>Cacozeliana lacertina</i>	(Gastéropodes)

3.2 Richesse taxonomique

En termes de nombre de familles différentes par échantillon, le metabarcoding permet de détecter en moyenne plus de familles (de 4 à 5 par fèces) que l'approche traditionnelle (moins de 3 par fèces). Entre les trois protocoles d'échantillonnage pour le metabarcoding, aucune différence n'a par contre été observée, le nombre moyen de famille détectées est très proche (respectivement pour les protocoles A, B, C : $5,0 \pm 2,1$; $4,9 \pm 2,4$; $5,3 \pm 2,2$).

A l'échelle de l'échantillon (Figure 3), aucun patron ne se dégage en termes de performance de détection d'espèce, il est même intéressant de voir qu'à cette échelle le nombre de famille détectées peut être supérieur par l'approche par la pièce dure que par metabarcoding.

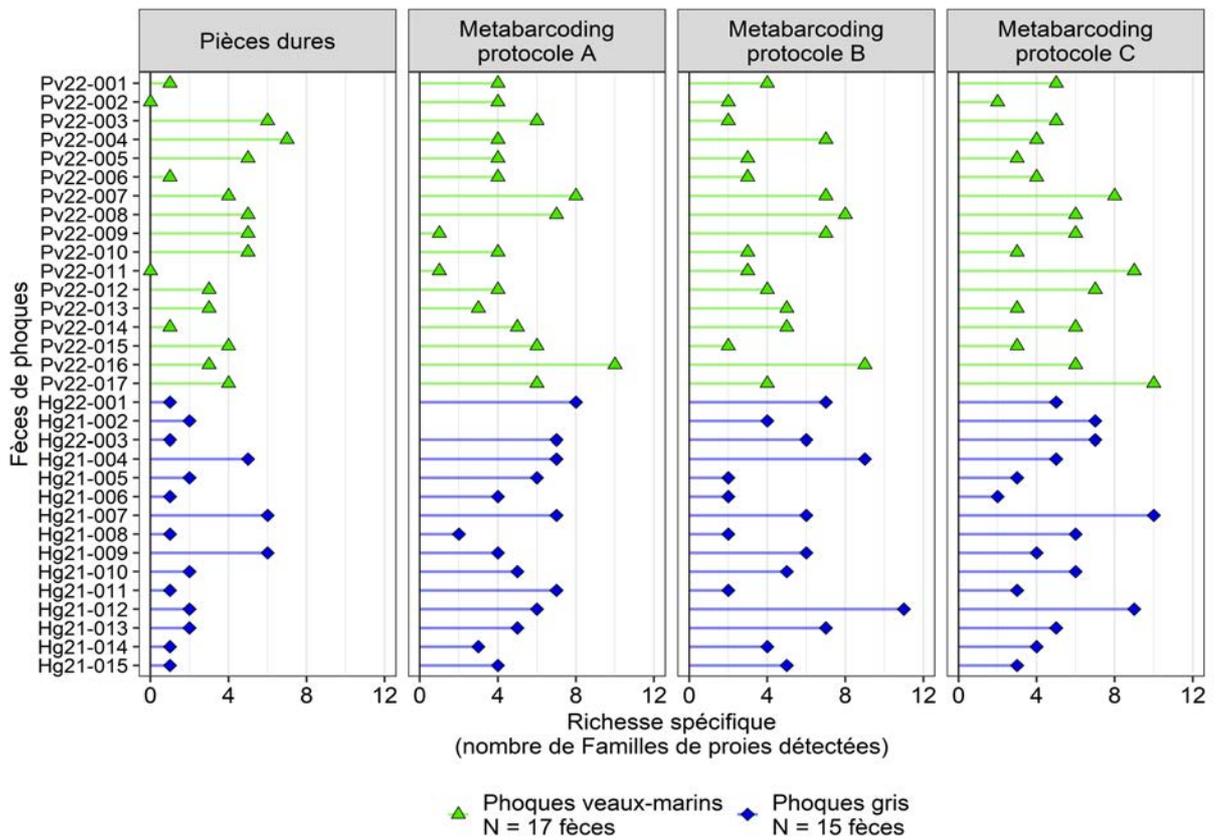


Figure 3 – Nombres de familles de proies (richesse spécifique) détectées dans les fèces de phoques veaux-marins et gris par analyse traditionnelle de leur contenu (analyse des pièces dures diagnostiques) et par approche de metabarcoding selon les trois protocoles de préparation testés (A, B et C).

A l'échelle de l'échantillon, aucun des différents protocoles A, B ou C ne semble ni maximiser, ni minimiser le nombre de famille identifiées (Figure 4).

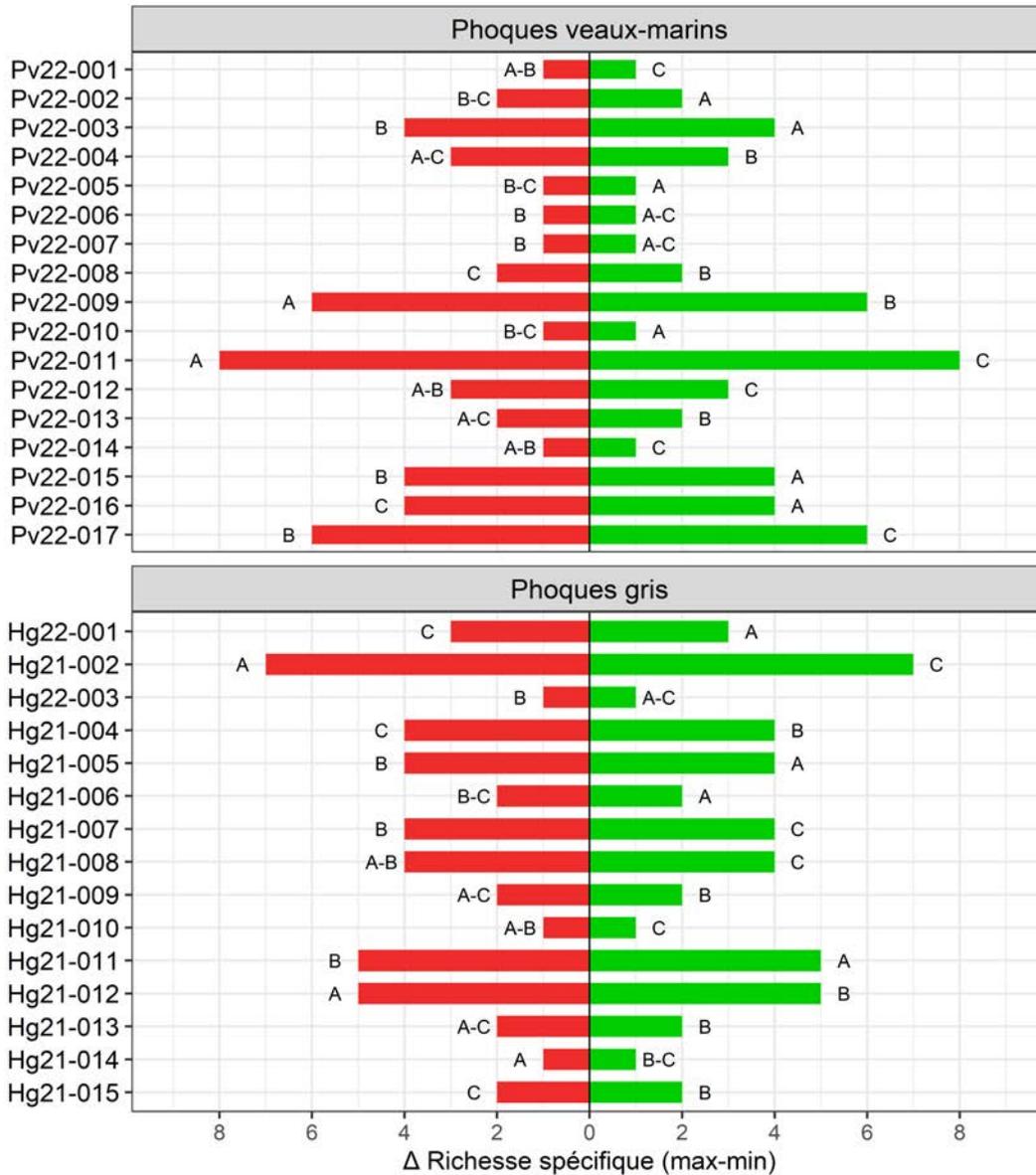


Figure 4 – Différence minimale-maximale de richesse spécifique (nombre de familles de proies) détectée par metabarcoding dans les fèces de phoques veaux-marins et gris entre les trois protocoles testés (A, B et C). Les barres vertes et rouges indiquent toutes deux la différence (Δ) de richesse spécifique. Les lettres au niveau des barres vertes indiquent le/les protocole(s) pour lesquels la richesse spécifique détectée est maximale, pour chaque fèces. Inversement, les lettres au niveau des barres rouges indiquent le/les protocole(s) pour lesquels la richesse spécifique détectée est minimale, pour chaque fèces.

A l'échelle de l'ensemble des familles détectées par metabarcoding, protocoles A, B et C confondus pour tous les échantillons, aucun protocole ne permet significativement de détecter plus de familles (Figure 5 ; pour le phoque veau marin, bien que non-significatif le protocole C semblerait plus performant que le protocole A). Chaque protocole permet en moyenne de détecter au moins la moitié de l'ensemble des familles retrouvées sur l'ensemble des résultats des trois protocoles mais aucun ne permet d'atteindre au moins les $\frac{3}{4}$ des familles détectées sur l'ensemble des analyses.

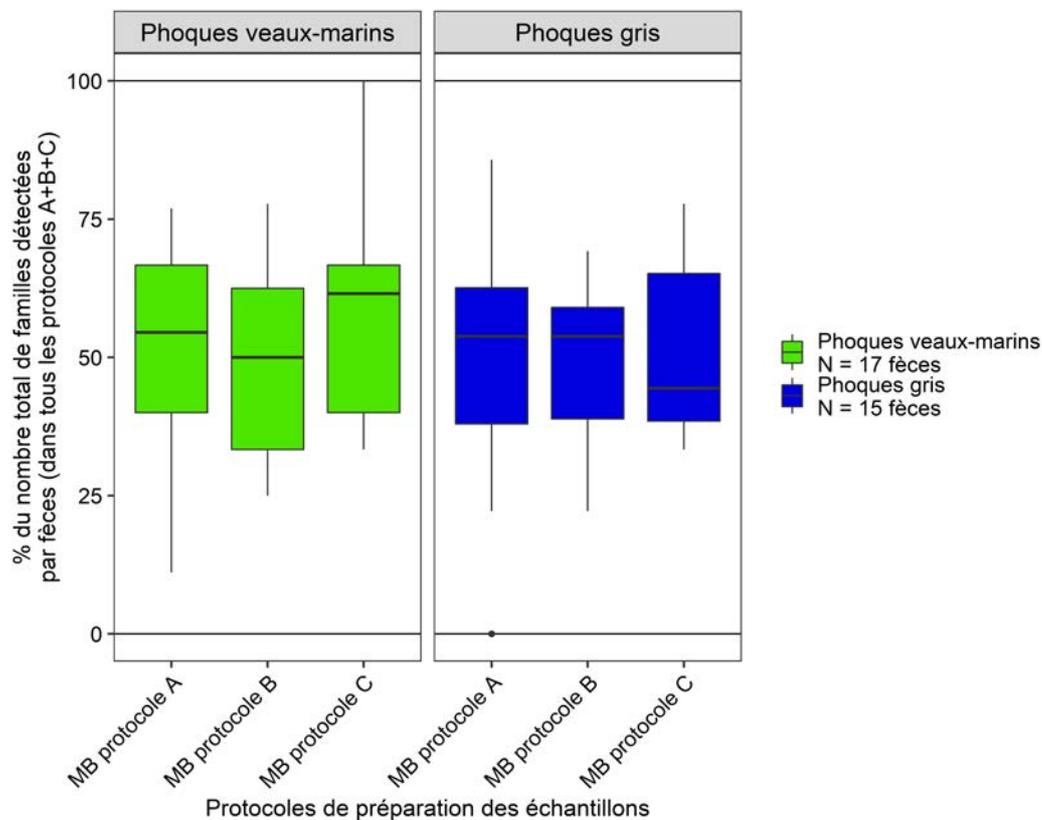


Figure 5 – Pourcentage du nombre total cumulé (avec les trois protocoles A + B + C) de familles de proies détectées par approche de metabarcoding dans chaque fèces de phoques veaux-marins et gris selon les trois protocoles de préparation testés (A, B et C).

3.3 Occurrence en proies par famille

Si l'inventaire des espèces détectées par les différents protocoles peut informer une facette de la diversité du régime alimentaire, ces listes d'espèces peuvent parfois mal refléter

l'importance relative de chacune dans l'écologie du prédateur, notamment par détection plus sensible par metabarcoding d'espèces rares. Les fréquences d'occurrence permettent en partie de pondérer l'importance des espèces identifiées, dans l'hypothèse où les espèces fréquemment rencontrées peuvent être d'une importance supérieure dans l'alimentation du prédateur. Une nouvelle fois, des espèces rares en termes biomasse contributive à l'alimentation du prédateur peuvent être ingérées fréquemment. Un seuil autour de 25% d'occurrence peut être utilisé pour considérer les espèces significatives en termes de fréquence d'apparition. Ici la comparaison des deux approches fournit des visions assez contrastées de la prédation des phoques.

Pour le phoque veau-marin (Figure 6), les poissons plats et de lançons sont plus fréquemment rencontrés dans l'échantillonnage étudié à travers les restes durs qu'à travers leur ADN. Au contraire, un assez grand nombre de familles peu ou pas représentées par leurs pièces dures diagnostiques ont été fréquemment identifiées par leur ADN. Les scombridés (e.g. maquereaux), les sparidés (e.g. dorades) et les moronidés (e.g. bars) sont détectés dans près d'un échantillon sur deux, les gobiidés (e.g. gobies), les mugilidés (e.g. mulets) et les atherinidés (e.g. prêtres) dans plus d'un tiers des échantillons.

Pour le phoque gris (Figure 7), la représentativité des poissons plats apparaît équilibrée entre les deux approches. Les poissons plats ont été moins fréquemment trouvés chez le phoque gris comparativement au phoque veau marin. Les lançons et les gadidés sont plus fréquemment rencontrés dans l'échantillonnage étudié à travers que les restes durs qu'à travers leur ADN. Pour les familles peu ou pas représentées par leurs pièces dures diagnostiques mais fréquemment identifiées par leur ADN, les mêmes tendances que pour le phoque veaux marins sont retrouvées avec les scombridés (e.g. maquereaux), les sparidés (e.g. dorades), les moronidés (e.g. bars), les gobiidés (e.g. gobies), les mugilidés (e.g. mulets) et les atherinidés (e.g. prêtres) retrouvés dans un tiers à la moitié des échantillons.

Pour aucune des deux espèces des différences majeures n'ont été détectées entre les trois protocoles de sous-échantillonnage pour les analyses moléculaires.

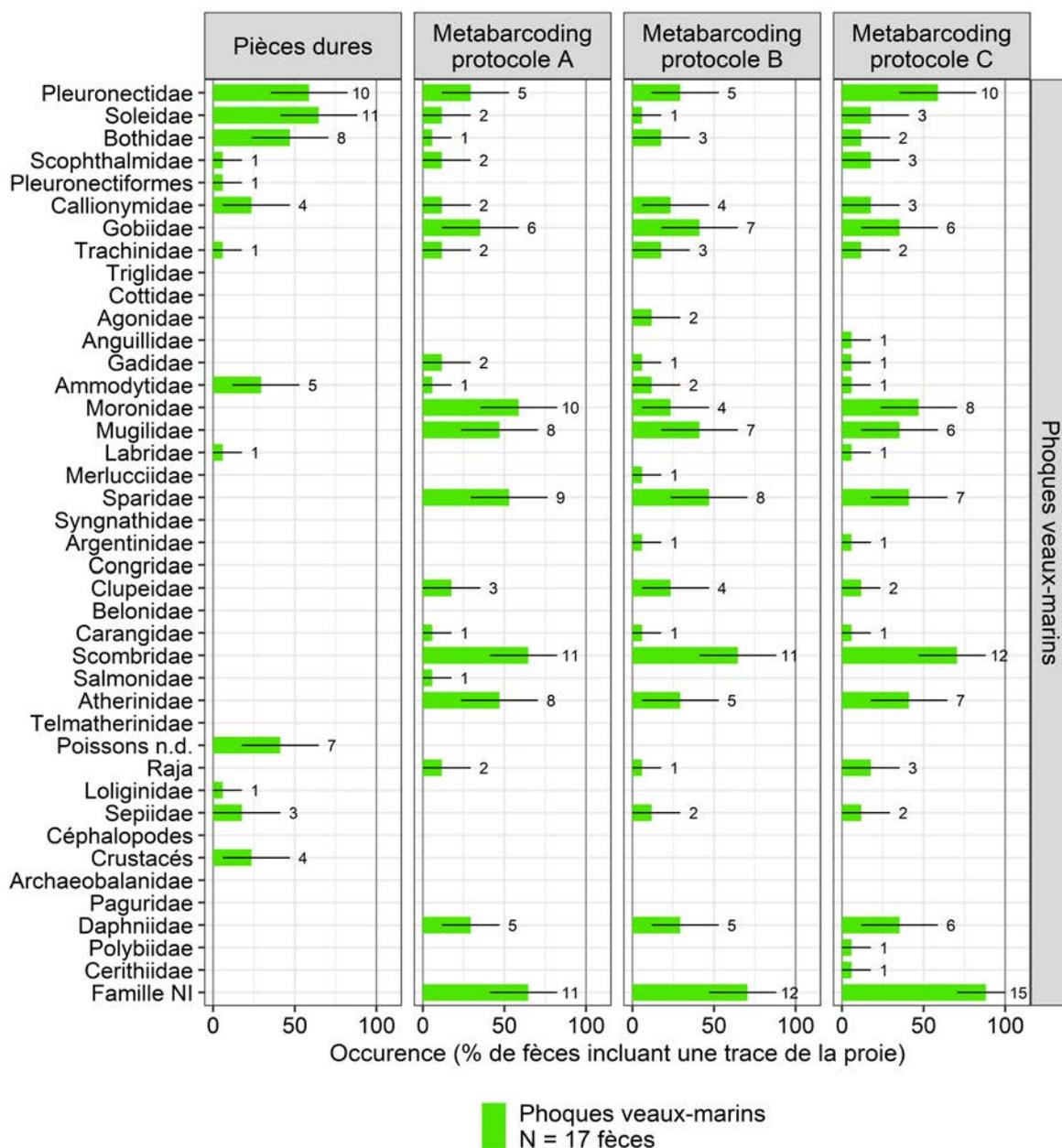


Figure 6 – Occurrence (en pourcentage du nombre) de fèces incluant une trace de la famille de proie détectée soit par analyse traditionnelle du contenu de fèces (analyse des pièces dures diagnostiques) soit par approche de metabarcoding selon les trois protocoles de préparation testés (A, B et C) pour le phoque veau-marin. Les barres d'erreur indiquent l'incertitude à 95% générée par processus de bootstrap.

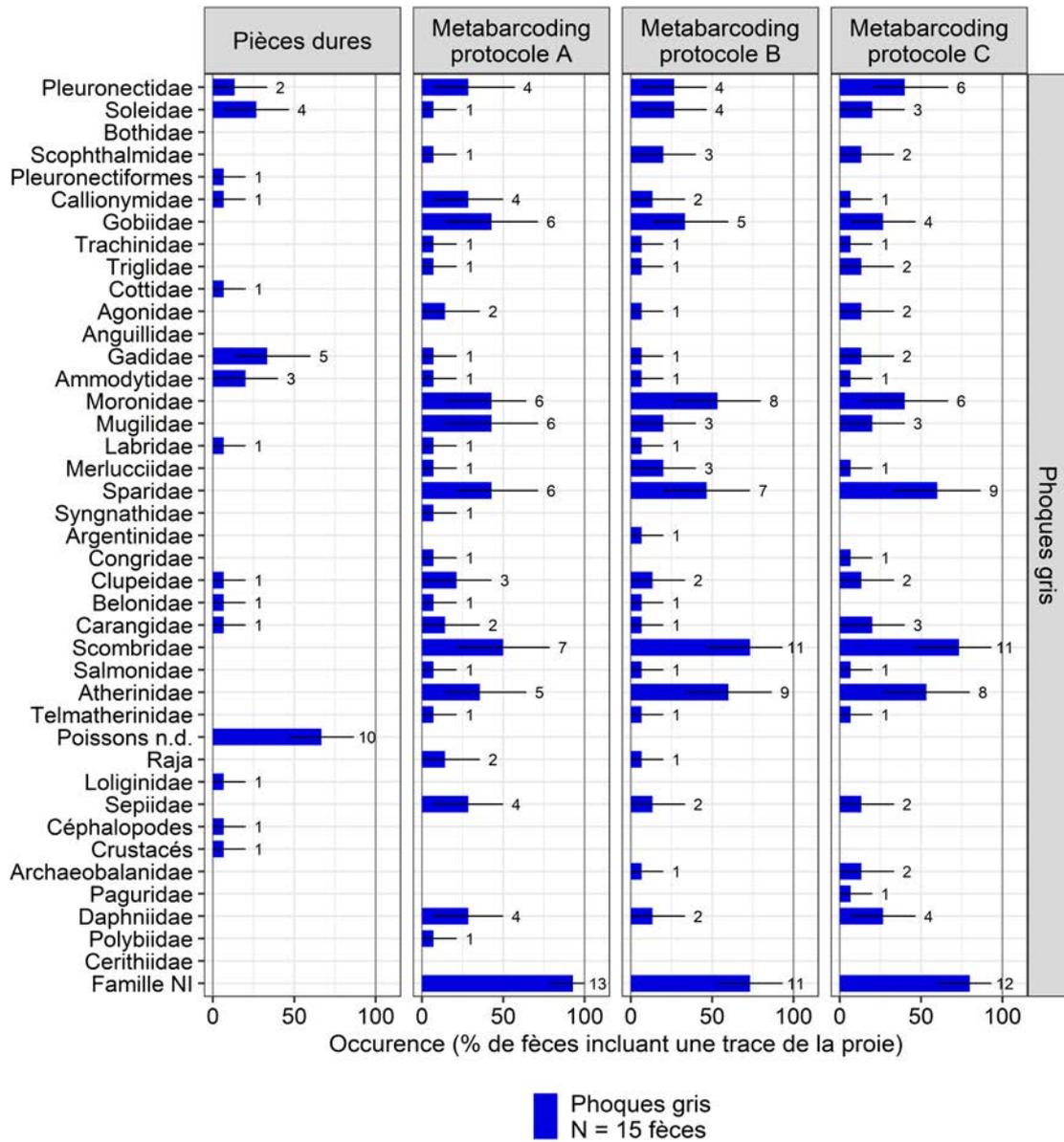


Figure 7 – Occurrence (en pourcentage du nombre) de fèces incluant une trace de la famille de proie détectée soit par analyse traditionnelle du contenu de fèces (analyse des pièces dures diagnostiques) soit par approche de metabarcoding selon les trois protocoles de préparation testés (A, B et C) pour le phoque gris. Les barres d’erreur indiquent l’incertitude à 95% générée par processus de bootstrap.

3.4 Occurrence en proies par groupes fonctionnels

Au-delà de la vision taxonomique du régime alimentaire, la compréhension de l'écologie trophique passe le plus souvent par une approche fonctionnelle des proies recherchées (Spitz et al., 2014). Ici exprimée en fréquences d'occurrence pondérée ou non (Figure 8 et 9), la prédominance des poissons plats dans l'analyse reposant sur les restes durs est très nettement diminuée par l'approche moléculaire où la part des autres groupes fonctionnels de poissons (non-plats benthiques, démersaux et pélagiques) est régulièrement significative.

A l'échelle de l'échantillon, chaque analyse, que ce soit traditionnelle vs moléculaire ou bien entre les protocoles de sous-échantillonnage, peut produire des résultats fort différents. Ainsi certains groupes détectés à partir des pièces dures peuvent être absents des analyses moléculaires et de même entre les différents protocoles testés pour le metabarcoding. Si une nouvelle fois les résultats peuvent différer entre ces trois protocoles, il ne semble pas y avoir ici de protocole qui sur- ou sous-identifierait un (ou des) groupe(s) de proies par rapport aux autres protocoles testés.

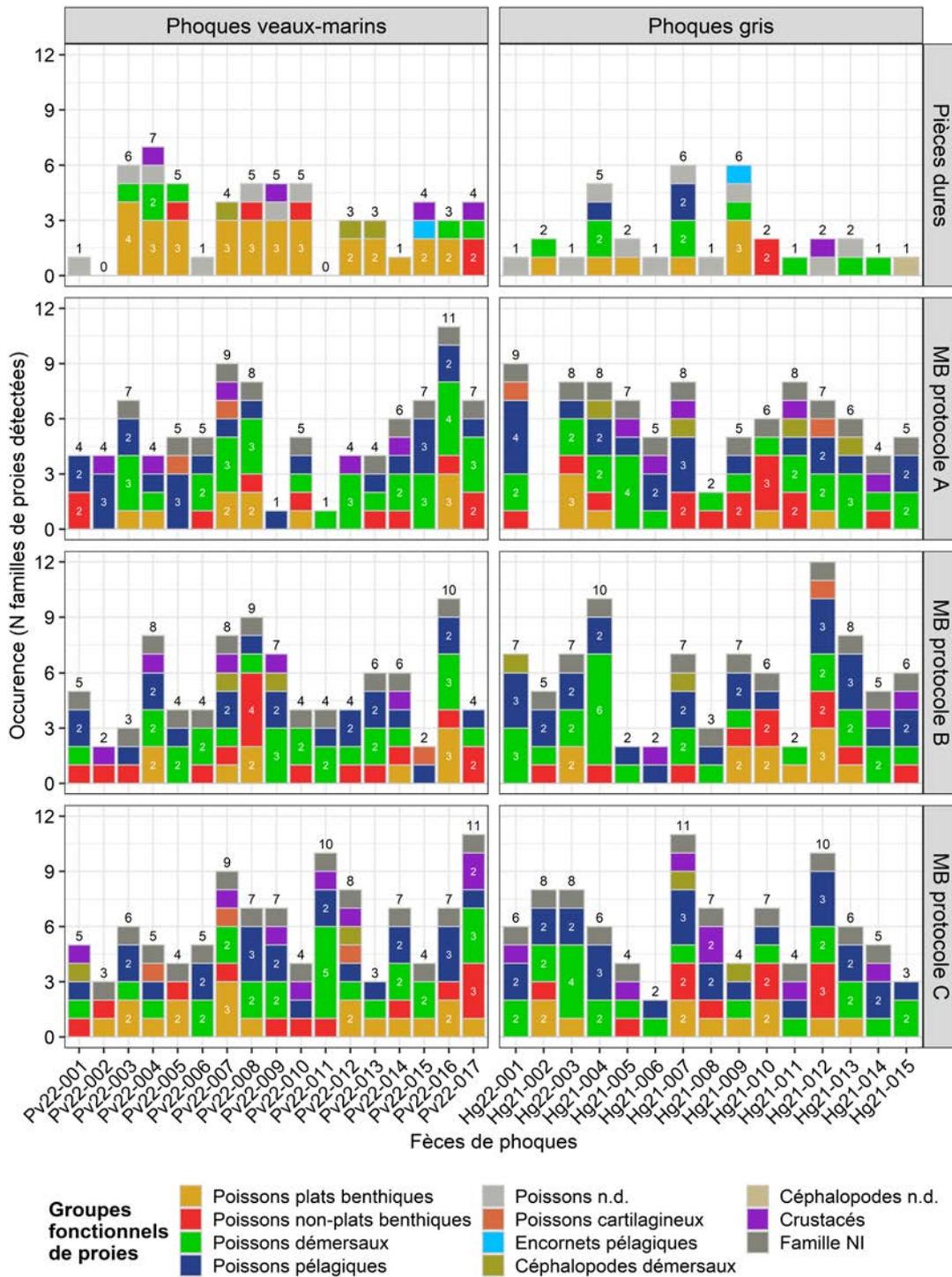


Figure 8 – Occurrence (en nombre) de familles de proies détectées dans chaque fèces de phoques veaux-marins et gris par analyse traditionnelle de leur contenu (analyse des pièces dures diagnostiques) et par approche de metabarcoding selon les trois protocoles de préparation testés (A, B et C) présentée par groupe fonctionnel de proies. Les chiffres en noir correspondent aux nombres totaux de familles de proies détectées dans chaque fèces. Les chiffres en blanc correspondent aux nombres de familles de proies associées à un groupe fonctionnel.

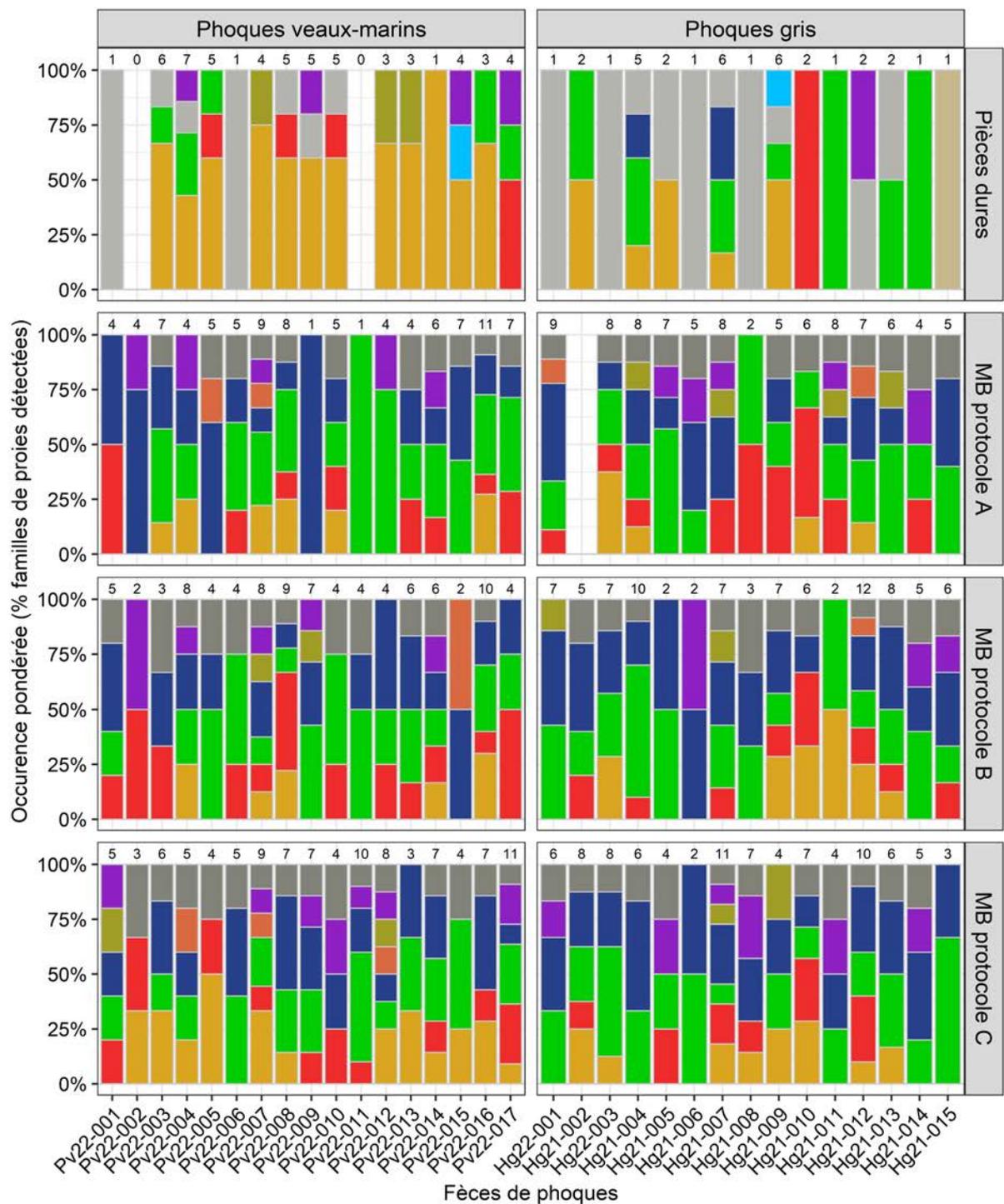


Figure 9 – Occurrence pondérée (nombre total rapporté à 100%) de familles de proies détectées dans chaque fèces de phoques veaux-marins et gris par analyse traditionnelle de leur contenu (analyse des pièces dures diagnostiques) et par approche de metabarcoding selon les trois protocoles de préparation testés (A, B et C) présentée par groupe fonctionnel de proies.

3.5 Résultats semi-quantitatifs préliminaires

La quantification du nombre de séquences comme indicateurs de la quantité d'ADN présent peut permettre de tester une approche semi-quantitative, en faisant l'hypothèse que le nombre relatif de séquences informe sur l'importance relative de l'espèce dans l'échantillon. Les résultats sont ici à prendre avec précaution car de fortes valeurs d'incertitudes à 95% ont été obtenues du fait de proies présentant de très importants nombres de séquences dans seulement un ou deux échantillons. Néanmoins, il est intéressant de noter que cette approche permet d'atténuer l'importance d'espèces faiblement détectées et limite ainsi le nombre de famille ayant une importance significative dans l'alimentation des prédateurs (Figure 10 et 11).

Chez le phoque veau-marin (Figure 10), les deux visions apportées par le metabarcoding et les restes durs apparaissent plus congruent pour les poissons plats et notamment la famille des pleuronectidés qui est majoritaire quelle que soit l'approche. Cependant la faible représentation des soleidés perdure dans les approches moléculaires comparativement à l'approche traditionnelle. L'importance des scombridés, des moronidés, des sparidés et des mugilidés est confirmée.

Chez le phoque gris (Figure 11), les différences entre les deux approches sont plus marquées avec pour l'approche traditionnelle une alimentation dominée par les poissons plats, les gadidés et les lançons alors que pour les approches moléculaires les familles les plus abondantes sont les clupéidés, les agonidés, les salmonidés, les scombridés et les callionymidés.

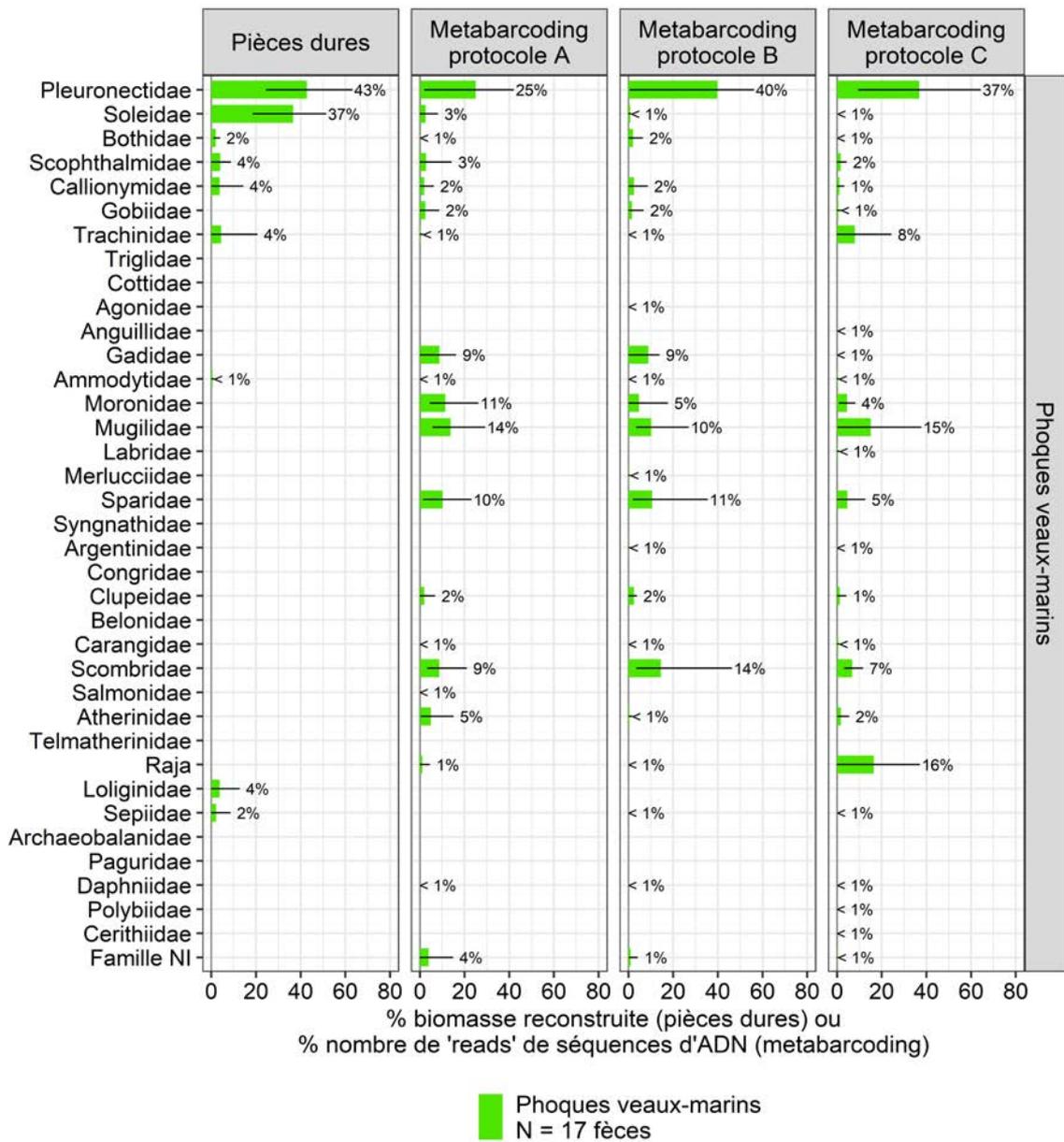


Figure 10 – Importance relative des différentes familles de proies détectées pour chaque approche, exprimé soit en pourcentage de biomasse totale reconstruite (pour l'analyse traditionnelle des pièces dures diagnostiques) soit en pourcentage du nombre total de « reads » de séquences d'ADN détectées (pour le metabarcoding) selon les trois protocoles de préparation testés (A, B et C) pour le phoque veau-marin. Les barres d'erreur indiquent l'incertitude à 95% générée par processus de bootstrap.

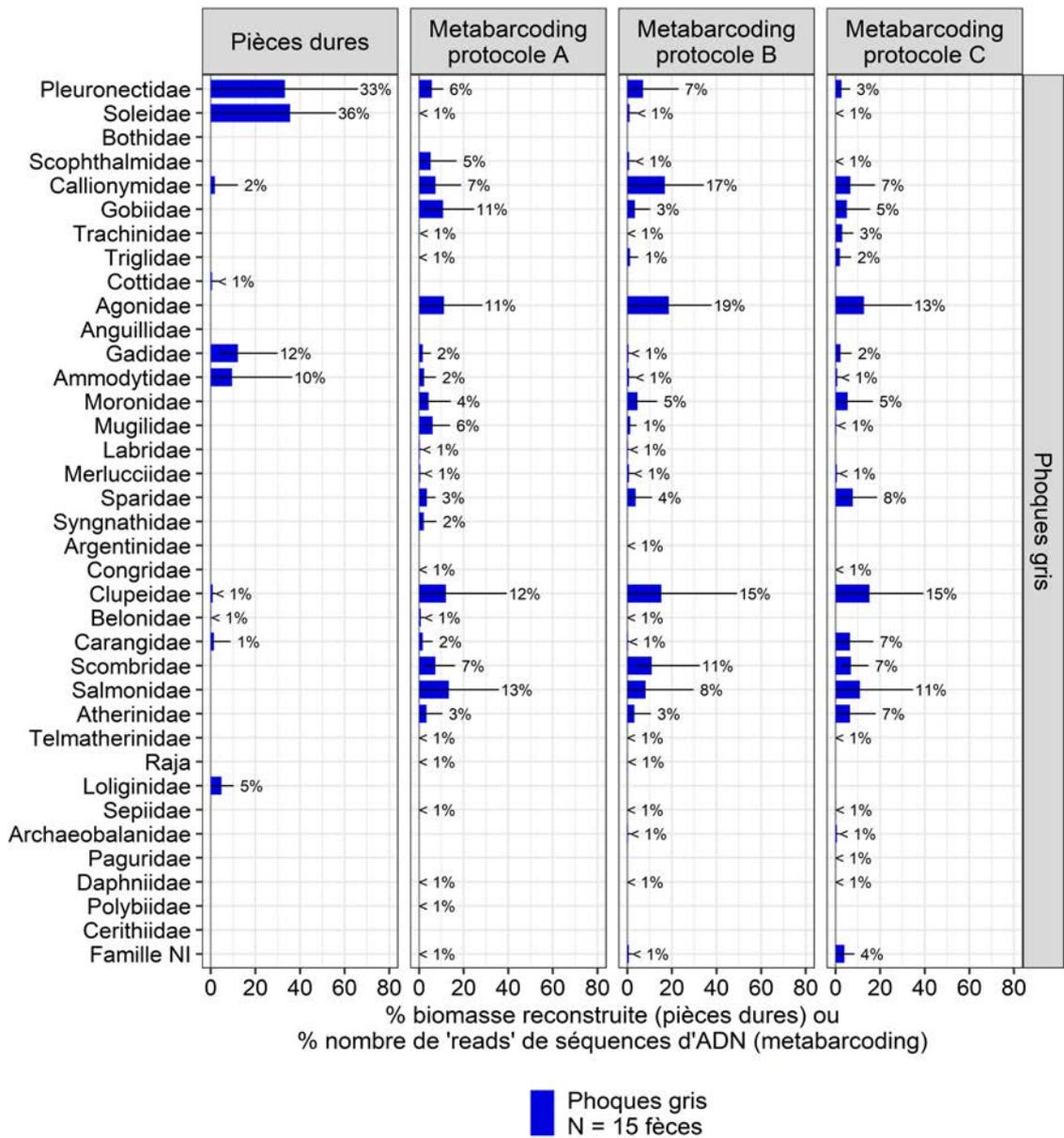


Figure 11 – Importance relative des différentes familles de proies détectées pour chaque approche, exprimé soit en pourcentage de biomasse totale reconstruite (pour l’analyse traditionnelle des pièces dures diagnostiques) soit en pourcentage du nombre total de « reads » de séquences d’ADN détectées (pour le metabarcoding) selon les trois protocoles de préparation testés (A, B et C) pour le phoque gris. Les barres d’erreur indiquent l’incertitude à 95% générée par processus de bootstrap.

4 Conclusion et recommandations pour les futures études d'identification du régime alimentaire des phoques veaux-marins et gris

La présente étude avait pour objectif de tester l'apport du metabarcoding sur la description de l'alimentation des phoques en Manche dans le cadre du suivi des travaux du parc éolien Dieppe-Le Tréport en complément des analyses reposant sur la récupération et l'identification des restes durs diagnostiques (os et otolithes de poissons, becs de céphalopodes, ...). Les résultats obtenus permettent d'ores et déjà de conclure sur les objectifs visés. Cependant, des analyses de données supplémentaires et des résultats complémentaires attendus viendront compléter le travail initié par cette première étude.

Les essais méthodologiques sur les effets du sous-échantillonnage de chaque fèces, n'ont pas mis en évidence un effet significatif du protocole sur les résultats de metabarcoding. Des différences à l'échelle de chaque échantillon ont été mis en évidence, confirmant le côté hétérogène de l'échantillon, mais à l'échelle d'un lot de fèces étudiés l'impact semble contenu. Le prélèvement à plusieurs endroit pourrait néanmoins être privilégié.

L'approche moléculaire a permis d'augmenter la liste des espèces proies ingérées par les phoques en baie de Somme, bénéfice souvent documenté pour le metabarcoding dans de telles études (e.g. Casper et al., 2007; Deagle et al., 2009; Granquist et al., 2018). La fréquence d'occurrence et le nombre de séquences détectées suggèrent que certaines espèces peu ou pas détectées par la méthode traditionnelle pourraient avoir une contribution significative dans l'alimentation des deux espèces de phoques (notamment les mullets, les dorades ou les maquereaux). A l'inverse, l'approche moléculaire présente différentes limites à l'échelle de l'identification spécifique avec une part importante d'identification peu ou pas cohérente (e.g. espèces non atlantiques) et certaines espèces majeures non assignées (comme les petites espèces de soleidés). Sans opposer les méthodes, le metabarcoding apporte un éclairage complémentaire au savoir fourni par l'analyse traditionnelle du régime alimentaire à partir de fèces. Il reste difficile de combiner les deux approches directement, le metabarcoding ne fournissant pas de données quantitatives sur les proportions des différentes espèces ingérées (Deagle et al., 2019; Massey et al., 2021). Si les analyses moléculaires apparaissent difficiles à utiliser seules pour une description et un suivi quantitatif de l'alimentation de tels prédateurs, la vision complémentaire apportée est indéniable. La combinaison de différentes méthodes

comme l'analyse des restes durs et de l'ADN dans les fèces, les signatures isotopiques dans différents tissus et les données de télémétrie permet une meilleure compréhension de l'écologie trophique des prédateurs supérieurs marins comme les phoques (Jeanniard-du-Dot et al., 2017) ; chaque approche apportant un éclairage sur les limites des autres méthodes. Il apparaîtrait ainsi fort profitable de pouvoir combiner les différentes approches dans les prochaines phases de suivi de la mise en place du parc éolien Dieppe-Le Tréport.

5 Références bibliographiques

Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P., & Coissac, E. (2016). obitools: A unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, *16*(1), 176–182.

Casper, R. M., Jarman, S. N., Deagle, B. E., Gales, N. J., & Hindell, M. A. (2007). Detecting prey from DNA in predator scats: A comparison with morphological analysis, using Arctocephalus seals fed a known diet. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *347*(1–2), 144–154.

Clarke, M. R. (1986). *A handbook for the identification of cephalopod beaks* (Clarendon). Clarendon Press.

Deagle, B. E., Kirkwood, R., & Jarman, S. N. (2009). Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces. *Molecular Ecology*, *18*(9), 2022–2038.

Deagle, B. E., Thomas, A. C., McInnes, J. C., Clarke, L. J., Vesterinen, E. J., Clare, E. L., Kartzinel, T. R., & Eveson, J. P. (2019). Counting with DNA in metabarcoding studies: How should we convert sequence reads to dietary data? *Molecular Ecology*, *28*(2), 391–406.

Gosselin, E. N., Lonsinger, R. C., & Waits, L. P. (2017). Comparing morphological and molecular diet analyses and fecal DNA sampling protocols for a terrestrial carnivore. *Wildlife Society Bulletin*, *41*(2), 362–369. <https://doi.org/10.1002/wsb.749>

Granquist, S. M., Esparza-Salas, R., Hauksson, E., Karlsson, O., & Angerbjörn, A. (2018). Fish consumption of harbour seals (*Phoca vitulina*) in north western Iceland assessed by DNA metabarcoding and morphological analysis. *Polar Biology*, *41*(11), 2199–2210. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2354-x>

Günther, B., Fromentin, J.-M., Metral, L., & Arnaud-Haond, S. (2021). Metabarcoding confirms the opportunistic foraging behaviour of Atlantic bluefin tuna and reveals the importance of gelatinous prey. *PeerJ*, *9*, e11757. <https://doi.org/10.7717/peerj.11757>

Härkönen, T. (1986). *Guide to the otoliths of the bony fishes of the Northeast Atlantic*. 256 pp. Danbiu ApS. Biological Consultants. <https://doi.org/10.1017/S0025315400057131>

Jeanniard-du-Dot, T., Thomas, A. C., Cherel, Y., Trites, A. W., & Guinet, C. (2017). Combining hard-part and DNA analyses of scats with biologging and stable isotopes can reveal

different diet compositions and feeding strategies within a fur seal population. *Marine Ecology Progress Series*, 584, 1–16. <https://doi.org/10.3354/meps12381>

Leopold, M. F., Begeman, L., van Bleijswijk, J. D. L., IJsseldijk, L. L., Witte, H. J., & Gröne, A. (2015). Exposing the grey seal as a major predator of harbour porpoises. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1798), 20142429. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2429>

Lundström, K., Hjerne, O., Alexandersson, K., & Karlsson, O. (2007). Estimation of grey seal (*Halichoerus grypus*) diet composition in the Baltic Sea. *NAMMCO Scientific Publications*, 6, 177–196. <https://doi.org/10.7557/3.2733>

Massey, A. L., Roffler, G. H., Vermeul, T., Allen, J. M., & Levi, T. (2021). Comparison of mechanical sorting and DNA metabarcoding for diet analysis with fresh and degraded wolf scats. *Ecosphere*, 12(6), e03557.

McInnes, J. C., Jarman, S. N., Lea, M.-A., Raymond, B., Deagle, B. E., Phillips, R. A., Catry, P., Stanworth, A., Weimerskirch, H., Kusch, A., Gras, M., Cherel, Y., Maschette, D., & Alderman, R. (2017). DNA Metabarcoding as a Marine Conservation and Management Tool: A Circumpolar Examination of Fishery Discards in the Diet of Threatened Albatrosses. *Frontiers in Marine Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00277>

Pierce, G. J., & Boyle, P. R. (1991). A Review of Methods for Diet Analysis in Piscivorous Marine Mammals. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 29(29), 409–486.

Planque, Y., & Spitz, J. (2022). *Apport des approches moléculaires dans l'étude du régime alimentaire de phoques dans des restes alimentaires (fèces): État de l'art et présentation du protocole* (Rapport CEBC Pour Le GIS Eolien En Mer, p. 80).

Planque, Y., Spitz, J., Authier, M., Guillou, G., Vincent, C., & Caurant, F. (2021). Trophic niche overlap between sympatric harbour seals (*Phoca vitulina*) and grey seals (*Halichoerus grypus*) at the southern limit of their European range (Eastern English Channel). *Ecology and Evolution*, 11(15), 10004–10025. <https://doi.org/10.1002/ece3.7739>

Planque, Y., Spitz, J., Caurant, F., Monnet, S., Fremau, M.-H., Leviez, F., Everard, A., Guillou, G., & Vincent, C. (2023). *Suivis télémétriques des phoques gris et veaux-marins avant, pendant la construction, pendant l'exploitation du parc éolien en mer de Dieppe – Le Tréport, et suivi des colonies de baie d'Authie et de baie de Somme. Suivi du régime alimentaire et de*

l'écologie trophique des phoques: Rapport final sur l'état de référence. (Rapport CEBC/Picardie Nature/ADN/GDEAM-62 Pour EMDT, p. 60).

Reynolds, J. C., & Aebischer, N. J. (1991). Comparison and quantification of carnivore diet by faecal analysis: A critique, with recommendations, based on a study of the Fox *Vulpes vulpes*. *Mammal Review*, 21(3), 97–122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1991.tb00113.x>

Ridoux, V., Spitz, J., Vincent, C., & Walton, M. J. (2007a). Grey seal diet at the southern limit of its European distribution: Combining dietary analyses and fatty acid profiles. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87(1), Article 1.

Ridoux, V., Spitz, J., Vincent, C., & Walton, M. j. (2007b). Grey seal diet at the southern limit of its European distribution: Combining dietary analyses and fatty acid profiles. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87(1), 255–264. <https://doi.org/10.1017/S002531540705463X>

Schnell, I. B., Bohmann, K., & Gilbert, M. T. P. (2015). Tag jumps illuminated—reducing sequence-to-sample misidentifications in metabarcoding studies. *Molecular Ecology Resources*, 15(6), 1289–1303.

Smith, L. A., Link, J. S., Cadrin, S. X., & Palka, D. L. (2015). Consumption by marine mammals on the Northeast U.S. continental shelf. *Ecological Applications*, 25(2), 373–389. <https://doi.org/10.1890/13-1656.1>

Sousa, L. L. de, Silva, S. M., & Xavier, R. (2019). DNA metabarcoding in diet studies: Unveiling ecological aspects in aquatic and terrestrial ecosystems. *Environmental DNA*, 1(3), 199–214. <https://doi.org/10.1002/edn3.27>

Spitz, J., Dupuis, L., Becquet, V., Dubief, B., & Trites, A. W. (2015a). Diet of the harbour seal *Phoca vitulina*: Implication for the flatfish nursery in the Bay of Somme (English Channel, France). *Aquatic Living Resources*, 28(1), Article 1.

Spitz, J., Dupuis, L., Becquet, V., Dubief, B., & Trites, A. W. (2015b). Diet of the harbour seal *Phoca vitulina*: Implication for the flatfish nursery in the Bay of Somme (English Channel, France). *Aquatic Living Resources*, 28(1), 11–19. <https://doi.org/10.1051/alr/2015001>

Spitz, J., Mariotti, L., Ridoux, V., Caillot, E., & Elder, J. F. (2010). The diet of harbour seals (*Phoca vitulina*) at the southern limit of its European distribution (Normandy, France).

NAMMCO Scientific Publications, 8(0), 313–328. <https://doi.org/10.7557/3.2696>

Spitz, J., Ridoux, V., & Brind'Amour, A. (2014). Let's go beyond taxonomy in diet description: Testing a trait-based approach to prey-predator relationships. *Journal of Animal Ecology*, 83(5), Article 5.

Spitz, J., Ridoux, V., Trites, A. W., Laran, S., & Authier, M. (2018). Prey consumption by cetaceans reveals the importance of energy-rich food webs in the Bay of Biscay. *Progress in Oceanography*, 166, 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2017.09.013>

Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental dna. *Molecular Ecology*, 21(8), 1789–1793.

Taberlet, P., PRUD'HOMME, S. M., Campione, E., Roy, J., Miquel, C., Shehzad, W., Gielly, L., Rioux, D., Choler, P., & CLÉMENT, J.-C. (2012). Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Molecular Ecology*, 21(8), 1816–1820.

Trites, A. W., & Spitz, J. (2017). Diet. In *Encyclopedia of Marine Mammals, 3rd Edition* (Academic press, Academic press, pp. 255–259). Perrin, Wursig, Thewissen.

Tuset, V. M., Lombarte, A., & Assis, C. A. (2008). Otolith atlas for the western Mediterranean, north and central eastern Atlantic. *Scientia Marina*, 72(S1), 7–198. <https://doi.org/10.3989/scimar.2008.72s17>

van Neer, A., Gross, S., Kesselring, T., Grilo, M. L., Ludes-Wehrmeister, E., Roncon, G., & Siebert, U. (2021). Assessing seal carcasses potentially subjected to grey seal predation. *Scientific Reports*, 11(1), 694. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80737-9>

van Neer, A., Gross, S., Kesselring, T., Wohlsein, P., Leitzen, E., & Siebert, U. (2019). Behavioural and pathological insights into a case of active cannibalism by a grey seal (*Halichoerus grypus*) on Helgoland, Germany. *Journal of Sea Research*, 148–149(February), 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2019.03.004>

van Neer, A., Jensen, L. F., & Siebert, U. (2015). Grey seal (*Halichoerus grypus*) predation on harbour seals (*Phoca vitulina*) on the island of Helgoland, Germany. *Journal of Sea Research*, 97, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2014.11.006>

Williams, K. E., Huyvaert, K. P., & Piaggio, A. J. (2016). No filters, no fridges: A method for

preservation of water samples for eDNA analysis. *BMC Research Notes*, 9(1), 1–5.
<https://doi.org/10.1186/s13104-016-2104-5>

Zinger, L., Lionnet, C., Benoiston, A.-S., Donald, J., Mercier, C., & Boyer, F. (2021). metabar: An R package for the evaluation and improvement of DNA metabarcoding data quality. *Methods in Ecology and Evolution*, 12(4), 586–592.