

# 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 intermédiaire pour le GIS Eolien en Mer –



Yann Planque<sup>1,2\*</sup>, Jérôme Spitz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centre d'Études Biologiques de Chizé, CEBC, UMR 7372 CNRS / La Rochelle Université, 5 allée de l'Océan, 17000 La Rochelle, France

<sup>2</sup> Observatoire Pelagis, UAR 3462 CNRS / La Rochelle Université, 5 allée de l'Océan, 17000 La Rochelle, France

\*Contact : [yann.planque@univ-lr.fr](mailto:yann.planque@univ-lr.fr) / [yann.planque@hotmail.fr](mailto:yann.planque@hotmail.fr)

– Septembre 2022 –



Le présent document constitue le rapport intermédiaire 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.

# Sommaire

Remerciements .....	1
<b>1 Contexte : l'étude du régime alimentaire de prédateurs supérieurs par l'utilisation de différentes méthodes .....</b>	<b>2</b>
1.1 L'étude du régime alimentaire de prédateurs cryptiques : quels enjeux ? .....	2
1.2 Quelques méthodologies « traditionnelles » et leurs apports.....	3
1.3 Limites de la méthode d'analyse des pièces dures diagnostiques.....	5
1.4 L'utilisation d'approches de biologie moléculaire : objectifs de ce rapport.....	7
<b>2 L'utilisation d'approches de biologie moléculaire pour évaluer le régime alimentaire : concepts généraux et avantages.....</b>	<b>8</b>
2.1 Approches pour détecter et séquencer l'ADN de proies .....	9
2.2 Le choix des amorces ( <i>primers</i> ) .....	11
2.3 Des résultats qualitatifs précis .....	13
2.4 Des résultats semi-quantitatifs obtenus par des méthodes de quantification de l'ADN .....	16
<b>3 Analyse de fèces : échantillonnage et protocoles de préparation pour analyses du contenu en ADN de proies.....</b>	<b>17</b>
3.1 L'utilisation de fèces pour étudier le régime alimentaire .....	17
3.2 Collecte des échantillons et implications (état de dégradation, contamination, etc.) .....	18
3.3 Stockage et préparation des échantillons pour extraction d'ADN de proies..	20
<b>4 Les apports de l'utilisation d'approches de biologie moléculaire dans l'analyse du régime alimentaire de phoques à partir de fèces.....</b>	<b>25</b>
4.1 Comparaison entre l'analyse traditionnelle des pièces dures diagnostiques et l'analyse de l'ADN de proies, et limites des approches moléculaires .....	25
4.2 L'importance du multi-approches pour évaluer le régime alimentaire.....	29
<b>5 Recommandations pour effectuer des analyses de biologie moléculaire sur des fèces de phoques veaux-marins et gris et protocole choisi .....</b>	<b>34</b>
Références bibliographiques .....	38
Annexes.....	54

## **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.

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 : l'étude du régime alimentaire de prédateurs supérieurs par l'utilisation de différentes méthodes

## 1.1 L'étude du régime alimentaire de prédateurs cryptiques : quels enjeux ?

L'obtention d'informations sur le régime alimentaire de prédateurs tels que les mammifères marins, vise à mieux connaître leur écologie trophique, et notamment leurs interactions de prédation et de compétition avec les autres espèces partageant un même écosystème (Stephens et Krebs 1986). Cette connaissance de leur régime alimentaire peut permettre de mieux répondre à des enjeux de gestion et de conservation de ces prédateurs en comprenant mieux leur rôle au sein des écosystèmes et des réseaux trophiques (*e.g.* Costa 1993; Croll et al. 1998). En effet, la survie des individus d'une population animale, et leur bon état de santé, dépendent en grande partie de leur capacité à s'alimenter sur des ressources en quantité et en qualité suffisante (Pianka 1976; Stearns 1992). La composition du régime alimentaire d'un prédateur, évaluée à l'échelle d'une population, peut alors être un des indicateurs de l'état écologique de cette population (Bowen 1997). Tout changement du régime alimentaire d'un prédateur au cours du temps pourrait alors refléter une modification écologique, à des changements dans le comportement de recherche alimentaire du prédateur (*e.g.* changement de zones d'alimentation), ou encore à des modifications affectant la base des réseaux trophiques (*e.g.* Frederiksen et al. 2006).

Évaluer le régime alimentaire d'une espèce animale le plus précisément possible est donc un enjeu technique crucial pour mieux comprendre son écologie, mais dont le suivi peut également éclairer des changements environnementaux (*e.g.* Chambellant et al. 2013). Le comportement d'alimentation de prédateurs cryptiques tels que les mammifères marins, est, par définition, généralement très difficilement observable *in situ*. Il est alors nécessaire d'utiliser différentes techniques d'analyses indirectes pour évaluer le régime alimentaire de telles espèces, à l'échelle d'une population (Trites et Spitz 2018).

## 1.2 Quelques méthodologies « traditionnelles » et leurs apports

Des traceurs écologiques sont couramment utilisés pour étudier les habitudes alimentaires de prédateurs supérieurs, tels que les isotopes stables (*e.g.* rapports isotopiques du carbone  $\delta^{13}\text{C}$  et de l'azote  $\delta^{15}\text{N}$  qui sont les plus fréquemment utilisés) (Post 2002; Fry 2006), les acides gras à longues chaînes (Dalsgaard et al. 2003; Budge et al. 2006) ou les éléments traces non essentiels (*e.g.* mercure) (Furness et Camphuysen 1997; Catry et al. 2008). L'avantage de ces traceurs est d'apporter une information intégrée sur les tendances générales alimentaires d'un prédateur, à une échelle spatio-temporelle intermédiaire correspondant à celle du renouvellement des tissus biologiques analysés (de quelques heures avant le prélèvement pour du sang, jusqu'à plusieurs mois pour des tissus kératineux à croissance [poils, plumes, vibrisses], *e.g.* Bearhop et al. 2002; Newsome et al. 2009). Cependant, ces techniques permettent difficilement d'avoir des résultats hautement qualitatifs sur la composition du régime alimentaire en termes d'espèces proies consommées. Elles peuvent donc s'avérer limitantes si l'objectif est d'arriver à un haut degré taxonomique d'identification du régime alimentaire, pour répondre à certains enjeux (cf. de gestion et de conservation).

Les approches reposant sur l'analyse des restes alimentaires non-digérés contenus dans le tractus digestif, les fèces ou pelotes de réjections, permettent de déterminer les espèces proies ingérées par les prédateurs (*e.g.* Hyslop 1980; Pierce et Boyle 1991). Ces méthodes ont ainsi été traditionnellement utilisées pour évaluer le régime alimentaire de mammifères marins à l'échelle populationnelle, durant les dernières décennies, et ont permis d'acquérir des résultats qualitatifs et quantitatifs (Pierce et Boyle 1991; Bowen et Iverson 2013). Ces dernières sont basées sur le tri mécanique de pièces dures diagnostiques non digérées, voire de proies (entières ou de parties de proies) non digérées. L'analyse de contenus issus du tractus digestif peut se faire couramment sur certaines espèces, en analysant des contenus alimentaires obtenus par régurgitation forcée (*e.g.* sur des oiseaux marins, Wilson 1984), par prélèvement d'individus sacrifiés (*e.g.* échantillonnage de contenus stomacaux sur des poissons, Hyslop 1980), ou sur des individus trouvés morts (*e.g.* échantillonnage de contenus stomacaux sur des

mammifères marins échoués morts, Spitz et al. 2011, 2018). Cependant, de tels échantillonnages peuvent s'avérer difficiles à mettre en place et à contrôler (*e.g.* lorsqu'ils sont dépendants d'animaux trouvés morts) ou sont jugés trop invasifs (lorsqu'ils nécessitent le sacrifice d'individus ou la régurgitation forcée), pour étudier le régime alimentaire d'espèces protégées telles que les mammifères marins. Des méthodes non-invasives, basées sur l'analyse du contenu de fèces trouvées en milieu naturel, ont alors été développées pour évaluer le régime alimentaire de certaines espèces – essentiellement chez les pinnipèdes pour les mammifères marins (Pierce et Boyle 1991; Ridoux et al. 2007; Spitz et al. 2010; Wilson et Hammond 2019; Planque et al. 2021).

De très nombreuses études du régime alimentaire d'espèces de pinnipèdes ont été réalisées sur le contenu de fèces, car cette méthode possède plusieurs avantages : l'échantillonnage non-intrusif sur les zones de repos à terre, la collecte d'un nombre important d'échantillons pouvant être produits par une grande diversité d'individus, l'obtention d'un échantillonnage potentiellement conséquent à différentes périodes (saisons/années). La méthodologie classique qui a été généralement utilisée est l'analyse du contenu de ces fèces en restes de proies non digérés (Pierce et Boyle 1991; Ridoux et al. 2007; Spitz et al. 2010). Cette analyse porte sur l'identification des pièces dures diagnostiques non (ou peu) digérées trouvées dans les fèces, telles que les os et otolithes de poissons ou sur les becs de céphalopodes, pour des espèces de pinnipèdes principalement piscivores, par exemple. Le protocole classique d'analyse du contenu de fèces consiste généralement en la filtration de ces échantillons, puis en l'analyse morphologique de ces pièces diagnostiques, en utilisant des guides et clés d'identification (Härkönen 1986; Tuset et al. 2008) ou du matériel de référence, afin d'arriver à une identification taxonomique des proies consommées. Certaines pièces diagnostiques telles que les otolithes de poissons ou les becs de céphalopodes peuvent également permettre de reconstruire la taille et la masse relatives des proies consommées, en appliquant des relations allométriques sur les mesures de ces pièces (Clarke 1986; Härkönen 1986; Coull et al. 1989; Brown et Pierce 1998; Lundström et al. 2007). L'ensemble de ces analyses permettent finalement d'estimer le régime

alimentaire d'espèces de phoques en termes d'occurrence, d'abondance et/ou de masse reconstruite. Cependant, ces méthodes présentent de nombreuses limites.

### **1.3 Limites de la méthode d'analyse des pièces dures diagnostiques**

La technique la plus « traditionnelle » et courante d'étude du régime alimentaire de mammifères marins, basée sur l'analyse des pièces dures diagnostiques dans des restes alimentaires (fèces ou estomacs), présente de nombreuses limites méthodologiques qui peuvent avoir une influence non négligeable sur les résultats (*e.g.* Pierce et Boyle 1991; Bowen 2000; Phillips et Harvey 2009; Bowen et Iverson 2013).

L'un des principaux biais de cette méthode sur les résultats est l'impact de l'érosion des parties dures trouvées dans les restes alimentaires, liée à la digestion, et ce plus particulièrement dans les fèces. Cette érosion est inégale selon les espèces proies et/ou les types de pièces diagnostiques concernées, ce qui a un impact sur la reconstruction du régime alimentaire en terme de masse relative (basé sur la reconstruction des tailles/masses des proies par mesures des pièces et application de relations allométriques ; Tollit et al. 1997; Grellier et Hammond 2006). Ceci peut alors mener, par exemple, à la sous-estimation de certaines proies pour lesquelles leurs pièces dures fragiles résistent peu (ou pas) à la digestion le long du tractus digestif. Des facteurs de corrections ont donc été proposés pour palier à la possible digestion partielle ou complète des restes de certaines espèces proies (Bowen 2000; Tollit et al. 2003; Grellier et Hammond 2006), mais ces facteurs peuvent eux-mêmes être problématiques puisqu'ils impliquent de faire des choix qui peuvent parfois impacter les résultats (*e.g.* choisir entre différents facteurs proposés pour une même espèce ; choisir le facteur au taxon le plus proche) (Hernández-Milián 2014). Ce choix méthodologique peut donc ajouter un degré de biais supplémentaire, ce qui amène parfois à choisir de ne pas utiliser de tels facteurs, dans un souci d'uniformité des résultats entre études, tout en admettant que certaines espèces proies puissent être sous-estimées (*e.g.* Spitz et al. 2015; Planque et al. 2021).

Un autre biais inhérent à ces méthodes d'analyse est que le temps de résidence des restes de proies dans le tractus digestif peut varier selon les espèces proies et/ou selon le type de pièces diagnostiques (Harvey 1989; Casper et al. 2006). Par exemple, les becs de céphalopodes sont des pièces robustes connues pour s'accumuler longtemps dans les estomacs et pouvant ensuite être régurgités, ce qui induit finalement une sous-représentation de ces proies dans les fèces (Richardson et Gales 1987; Pierce et Boyle 1991). Certaines espèces proies peuvent donc être sous- ou sur-représentées dans le régime alimentaire de phoques, en utilisant cette méthodologie. Enfin, sachant le temps de résidence variable des pièces dures dans le tractus digestif, ces dernières peuvent caractériser un ou plusieurs événements d'alimentation qui ont eu lieu de plusieurs heures à plusieurs jours avant la production de la fèces.

Un biais complémentaire de ce type d'analyse est que, pour certains types de proies de taille importante, les prédateurs étudiés ne consommeraient pas systématiquement l'entièreté de la proie. En effet, un phoque peut par exemple ne pas consommer la tête d'un poisson si elle est trop grande, trop dure ou avec des pointes, ce qui empêche de détecter ces proies avec des pièces diagnostiques typiques telles que les otolithes (localisés au niveau de l'oreille interne). Enfin, certaines proies ne possèdent pas de pièces dures résistantes à la digestion (*e.g.* espèces gélatineuses ou chondrichthyens). Ceci peut alors amener à la sous-estimation de ces proies dans le régime alimentaire de phoques, et c'est ce qui a été récemment suggéré pour certaines espèces de poissons plats (Dufault et al. 2021).

Enfin, l'analyse visuelle de restes de proies a l'inconvénient de nécessiter de hautes compétences en taxonomie. La possibilité d'une mauvaise assignation d'espèce reste toujours possible, et ce particulièrement lorsque les restes de proies taxonomiquement proches sont très similaires. C'est le cas par exemple avec les otolithes de poissons plats, fortement similaires entre eux, ce qui amène souvent à effectuer des regroupements d'espèces proies, voire à sous-estimer certaines espèces (*e.g.* Bowen et Harrison 1994).

L'ensemble de ces limites soulèvent alors la nécessité de pouvoir compléter l'analyse du régime alimentaire de ces prédateurs marins avec d'autres méthodologies afin d'avoir une vision la plus juste et exhaustive possible.

#### **1.4 L'utilisation d'approches de biologie moléculaire : objectifs de ce rapport**

Sachant les contraintes et limites associées aux méthodes « traditionnelles » d'analyse du régime alimentaire, de nombreux chercheurs ont testé des approches de biologie moléculaire, depuis le début du 21<sup>e</sup> siècle, pour identifier l'ADN de proies dans des contenus alimentaires : dans des estomacs d'animaux sacrifiés (vertébrés ou invertébrés) (Symondson 2002; Agustí et al. 2003; Kasper et al. 2004), et dans des fèces de vertébrés pour avoir une méthode moins invasive (Jarman et al. 2002; Purcell et al. 2004; Deagle et al. 2005). Différentes techniques, basées sur la méthode de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), ont alors été utilisées pour détecter l'ADN de proies à l'état dégradé/semi-digéré. Ces techniques peuvent alors présenter plusieurs avantages, permettant parfois de s'affranchir de certaines limites des méthodes d'analyses des pièces dures diagnostiques, tels que l'identification des espèces proies à un plus haut niveau taxonomique (Tollit et al. 2009; Thomas et al. 2017).

Le présent rapport est une synthèse bibliographique de diverses études scientifiques qui ont porté sur l'évaluation du régime alimentaire de prédateurs, et plus particulièrement de pinnipèdes, par l'application de méthodes de biologie moléculaire sur des échantillons de contenus en restes de proies. Ici, nous nous intéresserons plus spécifiquement aux analyses qui ont été effectuées sur des fèces de pinnipèdes. L'objectif est alors d'établir un état de l'art sur les protocoles possibles à appliquer, sur les types de résultats attendus, sur les apports de différents types de méthodes, et sur les limites qu'elles impliquent. Cette synthèse bibliographique se focalise ici en grande partie sur la faisabilité d'appliquer ce type d'étude sur des fèces de pinnipèdes, et se concentre principalement sur l'application de méthode de séquençage d'ADN de restes en proies par méthode de « metabarcoding » – cette dernière approche est l'une des plus

couramment utilisée, à l'heure actuelle, pour identifier les espèces proies présentes dans des fèces.

Cette synthèse bibliographique a été réalisée dans l'optique de préparer la mise en œuvre d'une étude pilote d'une analyse de metabarcoding pour identifier les espèces proies présentes dans des fèces de phoques veaux-marins (*Phoca vitulina*) et de phoques gris (*Halichoerus grypus*), et d'évaluer la plus-value d'une telle approche sur la connaissance du régime alimentaire de ces deux espèces en Manche Nord-Est, sur des colonies à proximité du lieu de construction future d'éoliennes en mer (Eoliennes en Mer Dieppe – Le Tréport, EMDT). En effet, les connaissances de régime alimentaire de phoques veaux-marins et gris sur ce secteur ont jusque-là été obtenues par analyse des pièces dures diagnostiques dans des fèces (Spitz et al. 2015; Planque 2021; Planque et al. 2021), et ont été étayées par l'analyse d'isotopes stables dans des vibrisses (Planque 2021; Planque et al. 2021). Cependant, les approches moléculaires n'ont pas encore été testées dans des fèces de phoques sur ce secteur. La présente étude a été initiée sur suggestion du Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) Eolien en Mer, dans le contexte du projet d'Eoliennes en Mer Dieppe – Le Tréport (EMDT). Une majorité des articles scientifiques cités dans ce rapport bibliographique portent donc sur ces deux espèces de phoques, ainsi que sur d'autres espèces (phoques, autres pinnipèdes, ou autres vertébrés) qui ont fait l'objet d'études similaires (analyse du contenu de fèces). Enfin, le rapport s'achève sur des recommandations méthodologiques pour effectuer une telle étude, et sur la présentation du protocole choisi dans le cas présent.

## **2 L'utilisation d'approches de biologie moléculaire pour évaluer le régime alimentaire : concepts généraux et avantages**

Pour combler certaines limites inhérentes aux techniques traditionnelles d'identification du régime alimentaire de pinnipèdes (cf. limites de l'analyse des pièces dures diagnostiques dans des fèces), de nombreuses études ont tenté d'identifier de l'ADN de proies dans des fèces par différentes techniques (Deagle et al. 2005, 2009; Parsons et al. 2005; Deagle et Tollit 2007; Casper et al. 2007; Tollit et al. 2009; Thomas

et al. 2014). Ces types d'analyses sont particulièrement adaptées aux espèces cryptiques telles que les pinnipèdes, mais elles ont aussi été testées et utilisées sur des fèces d'autres prédateurs carnivores terrestres ou marins (de canidés, Gosselin et al. 2017; Massey et al. 2021; Kim et al. 2022 ; de félidés, Farrell et al. 2000 ; d'ursidés, Mumma et al. 2016; Michaux et al. 2021 ; de mustélidés, Jang-Liaw 2021), sur des fèces de chauves-souris (Clare et al. 2009), sur des fèces de poissons (Guillerault et al. 2017), ou dans des fientes ou pelotes d'oiseaux (Oehm et al. 2011; Jarman et al. 2013; Parker et al. 2022) (voir les revues de King et al. 2008 et Monterroso et al. 2019 pour plus d'exemples d'utilisation d'outils de biologie moléculaire dans des fèces de carnivores). Différents défis méthodologiques se sont alors posés sur le choix des techniques de biologie moléculaire à appliquer, ce qui a mené à de nombreux développements depuis le début des années 2000 (*e.g.* Deagle et al. 2005, 2013, 2019; Deagle et Tollit 2007; Tollit et al. 2009 et voir la revue de Pompanon et al. 2012 pour quelques exemples).

## **2.1 Approches pour détecter et séquencer l'ADN de proies**

Les premières études ayant utilisé des outils moléculaires pour identifier le régime alimentaire de prédateurs se sont basées sur des méthodes d'extraction puis d'amplification de l'ADN mitochondrial de proies (contenu dans des restes alimentaires, cf. fèces), par réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), en utilisant des amorces spécifiques de groupes de proies (Höss et al. 1992; Jarman et al. 2004; Deagle et al. 2005). Certaines amorces assez universelles ont pu être classiquement utilisées (cf. basées sur l'ADN ribosomique 16S) pour détecter de nombreuses proies telles que des espèces de poissons, mais l'utilisation d'amorces plus spécifiques a permis de préciser la détection de certains groupes de proies spécifiques non détectées par les amorces plus classiques (*e.g.* amorces spécifiques basées sur l'ADN ribosomique 28S pour détecter des groupes de céphalopodes) (*e.g.* Deagle et al. 2005) (voir plus de détails en **section 2.2**). Elles permettent alors de se focaliser sur des courtes séquences de l'ADN, caractéristiques des espèces en question. Dans les premières études, les produits d'ADN amplifié, codant spécifiquement pour certains groupes de proies (selon les amorces utilisées), ont pu alors être migrés sur des gels

d'électrophorèse pour détecter la présence/absence de proies spécifiques (Jarman et al. 2004; Deagle et al. 2005). Ce type d'étude de séquençage s'est alors inscrit dans une optique de « barcoding » des espèces proies possibles, ce qui passe aussi par l'aide à la production robuste de séquences d'ADN de référence de ces espèces dans des bases de données (Jarman et al. 2004). Ces premières applications d'approches moléculaires ont ainsi permis d'acquérir des résultats hautement qualitatifs pour la recherche d'espèces proies ciblées, consommées par les prédateurs. Enfin, des travaux réalisés en milieu contrôlé, sur des pinnipèdes en captivité avec des régimes alimentaires précis, avaient permis de confirmer à cette étape, l'intérêt d'application de telles approches sur des échantillons de fèces pour évaluer le régime alimentaire (Deagle et al. 2005).

Des techniques de séquençage de type « metabarcoding » ont rapidement émergé ces dernières années, dans de nombreuses études d'identification du régime alimentaire de pinnipèdes dont l'objectif est d'identifier simultanément de multiples espèces proies possibles dans des échantillons (fèces), en utilisant des marqueurs/amorces standards (*e.g.* Deagle et al. 2013, 2019; Thomas et al. 2016, 2022; Jeanniard-du-Dot et al. 2017; Granquist et al. 2018; McCosker et al. 2020; Flanders et al. 2020; Salinger 2021; Schiønning et al. 2021; Jimbo et al. 2021; Boyi et al. 2022). Cette méthode est aussi plus généralement utilisée pour évaluer le régime alimentaire de prédateurs généralistes qui s'alimentent sur une grande diversité d'espèces (voir la revue de Pompanon et al. 2012). Cette technique est basée sur la comparaison des séquences d'ADN amplifié (par groupes spécifiques, selon les sets d'amorces testés) avec des bases de données de référence de « barcodes » d'espèces (bases de données publiques telles que GenBank, MARES, ou bases de données constituées par les expérimentateurs), et permet alors une identification assez précise des espèces à l'origine de ces séquences. Cette technique donne l'opportunité d'identifier de très nombreuses espèces en simultanément dans un même échantillon et sans *a priori*, et est particulièrement utilisée en ADN environnemental (eDNA) pour évaluer la biodiversité globale au sein de composantes des écosystèmes (*e.g.* échantillons d'eau marine ou dulcicole, de substrat) (Cristescu 2014). Au-delà du haut apport qualitatif de ce type de méthodologies, ces dernières permettent aussi

d’acquérir des informations quantitatives sur le régime alimentaire (*e.g.* Deagle et al. 2013; Thomas et al. 2016), dont nous discutons en **section 2.3**. Ces techniques de metabarcoding ont été les plus fréquemment utilisées, au cours des dernières années, pour évaluer le régime alimentaire de pinnipèdes par analyse de fèces, mais aussi pour un nombre conséquent d’études sur le régime alimentaire de prédateurs d’autres taxons (*e.g.* Mumma et al. 2016; Gosselin et al. 2017; Salinger 2021; Massey et al. 2021; Díaz-Abad et al. 2022; Kim et al. 2022).

## **2.2 Le choix des amorces (*primers*)**

L’un des enjeux d’utilisation des méthodes de séquençage (metabarcoding) pour identifier les proies de pinnipèdes dans des fèces repose sur le choix des amorces utilisées pour amplification de l’ADN de proies (Deagle et al. 2005, 2009; Binladen et al. 2007; Casper et al. 2007; Tollit et al. 2009; Granquist et al. 2018; Piñol et al. 2019; Cuff et al. 2022). De nombreuses proies potentielles peuvent être ciblées avec des amorces universelles, basées sur l’ADN ribosomique 16S. Cependant, certaines proies telles que les céphalopodes nécessitent l’utilisation d’autres amorces, telles que l’ADN ribosomique 28S (*e.g.* Casper et al. 2007). Les amorces utilisées par Deagle et al. (2009) dans leur étude sur des fèces d’otaries à fourrure d’Afrique du Sud (*Arctocephalus pusillus doriferus*) sont ici présentées à titre d’exemple, pour illustrer la possible diversité de choix (**Tableau 1**).

**Tableau 1** – Exemples d’amorces choisies dans une étude (Deagle et al. 2009) pour effectuer le pyroséquençage de l’ADN de proies contenu dans des fèces d’otaries à fourrure d’Afrique du Sud (tableau d’après Deagle et al. 2009).

Sequences of primers used to amplify Australian fur seal faecal DNA samples for pyrosequencing. Adapter sequences necessary in the GS-FLX sequencing process are shown at the bottom of the table. The grey highlighted regions are tags used to differentiate between identical forward primers used in different PCR amplifications							
PCR Primer Set	Target amplicon	Gene	Primer name	Primer sequence (5’-3’)*	Approximate product size (bp)†	Predator blocker used	Annealing temperature (°C)
A	Chord/Ceph	mtDNA 16S	Chord_16S_F_TagB	Primer A <b>GATCGAGAAGACCCTRTGGAGCT</b>	~260-310	Yes	52
A	Chord/Ceph	"	Ceph_16S_F	Primer A GACGAGAAGACCCTAWTGAGCT	"	Yes	52
A	Chord/Ceph	"	Chord_16S_R	Primer B GGATTGCGCTGTTATCCCT	"	Yes	52
A	Chord/Ceph	"	Ceph_16S_R	Primer B AAATTACGCTGTTATCCCT	"	Yes	52
B	Chordata	mtDNA 16S	Chord_16S_F_TagA	Primer A <b>ATGCGAGAAGACCCTRTGGAGCT</b>	~155	Yes	57
B	Chordata	"	Chord_16 s_R_Short	Primer B CCTNGGTGCCCCAAC	"	Yes	57
C	Cephalopod	Nuclear 28S	Ceph28S_F	Primer A AAAAGAAACCAACCGGGATT	~280	No	55
C	Cephalopod	"	Ceph28S_R	Primer B CAAGCAACCCGACTCTCG	"	No	55
D	Bilateria	Nuclear 18S	BilSSU1100_F	Primer B AGAGGTGAAATTSTTGGAYCG	~285	No	57
D	Bilateria	"	BilSSU1300_R	Primer A CCTTTAAGTTTCAGCTTTGCA	"	No	57

\*Primer A = GCCTCCCTCGCGCCATCAG; Primer B GCCTTGCCAGCCCGCTCAG.  
†Includes primer sequence.

Dans certains contextes d’étude, il est parfois nécessaire de choisir une amorce particulière, propre à un taxon précis, pour lequel il peut exister des difficultés de différenciation entre séquences de différentes espèces proches si on utilisait des amorces plus classiques. C’est ce qui a été réalisé, par exemple, dans l’étude de Tollit et al. (2009) où il a été nécessaire de choisir une amorce spécifique aux salmonidés, afin de différencier les espèces de saumons pouvant être consommées par les otaries de Steller (*Eumetopias jubatus*), sur le secteur de la Colombie Britannique (Canada Ouest) et de l’Alaska (États-Unis). Dans cette étude, la détection d’espèces de saumons dans les fèces d’otarie à une très fine résolution taxonomique a été réalisée dans l’optique d’étayer les possibles interactions entre activités humaines (fermes aquacoles de saumons) et ces prédateurs, qui représentent un enjeu sur ce secteur. Ce choix d’une amorce secondaire, en complément d’une amorce 16S plus classique, a été également fait dans l’étude de Thomas et al. (2017), afin de mieux différencier les espèces de saumons consommées par des phoques veaux-marins, sur le même secteur que l’étude précédente (Colombie Britannique). Des choix similaires d’amorces spécifiques ont été faits par Schiønning et al. (2021), qui ont cherché à identifier au mieux la présence d’espèces de salmonidés (*Salmo* spp.) et de baudroies (*Lophius* spp.) dans des fèces de

phoques gris collectées en Irlande. Ils ont alors mis en évidence que ces espèces proies étaient bien plus détectés par approches moléculaires qu'elles ne l'étaient avec les approches traditionnelles (identification des pièces dures dans les fèces). Dans leur cas d'étude, l'utilisation d'amorces spécifiques a alors permis d'étayer les possibles interactions entre phoques gris et activités de pêche (cf. déprédation par les phoques) sur ces deux types de proies. Ces exemples illustrent que le choix d'amorces effectués par les expérimentateurs sont aussi dépendants des enjeux d'étude spécifiques et des connaissances *a priori* des proies potentielles des pinnipèdes sur ce secteur. On distingue alors les études dont l'objectif est de couvrir le plus largement le spectre de proies d'un prédateur, et celles visant à être le plus quantitatif possible sur quelques espèces proies présentant un intérêt particulier dans le contexte de l'étude.

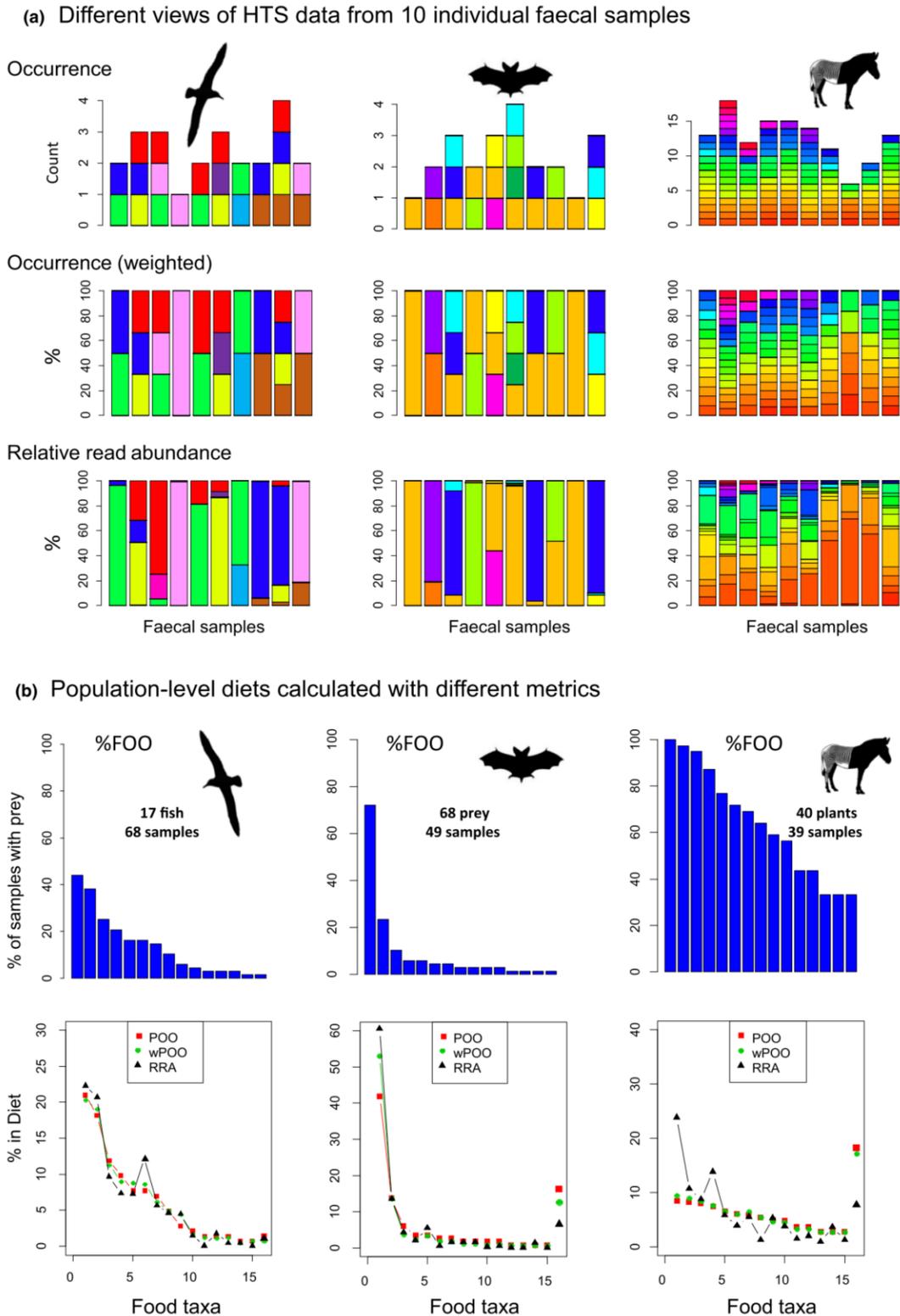
Des amorces de « blocage » (*blocking primers*) sont également utilisées, usuellement, dans les études impliquant un séquençage d'ADN de proies dans des fèces, afin d'éviter une trop forte amplification de l'ADN du prédateur et favoriser l'amplification des proies les plus rares (*e.g.* Deagle et al. 2009; McInnes et al. 2017b). Cette technique peut ainsi s'avérer très utile pour bloquer facilement une partie de l'ADN non ciblée lors d'une amplification, et est facilement réalisable (méthode présentée par Vestheim et Jarman 2008). Dans des fèces de pinnipèdes, l'ADN de l'individu producteur peut ainsi s'avérer prépondérant, et est issu de cellules épithéliales naturellement arrachées le long du tractus digestif. Son blocage permet alors de techniquement mieux amplifier des traces d'ADN plus rares (de proies).

### **2.3 Des résultats qualitatifs précis**

Les méthodes de biologie moléculaire, utilisées dans des fèces de pinnipèdes, ont pour principal avantage d'apporter des résultats qualitatifs du régime alimentaire de ces prédateurs (à l'échelle des espèces proies consommées) plus précis que ceux obtenus par les méthodes d'étude traditionnelles (basées sur l'identification des pièces dures diagnostiques), sous réserve de bases de références fiables et complètes (Casper et al. 2007). Outre une simple liste de présence/absence, ces méthodes fournissent quelques indices quantitatifs sur l'importance de proies détectées. La composition relative du

régime alimentaire est alors usuellement exprimée en fréquence d'occurrence (ou fréquence de détection, *Frequency Of Occurrence*, FOO), c'est-à-dire en pourcentage de toutes les fèces qui incluent la proie détectée par ADN. Cette métrique est similairement utilisée dans les études basées sur l'identification des pièces dures (Olesiuk et al. 1990; Trites et Joy 2005), permettant alors d'effectuer une comparaison de résultats entre les deux types de méthodes utilisées (*e.g.* Casper et al. 2007; Jeanniard-du-Dot et al. 2017).

D'autres métriques (résumées par Deagle et al. 2019) telles que le pourcentage d'occurrence des proies (*Percent Of Occurrence*, POO), qui correspond à une remise à l'échelle de la FOO pour que la somme de toutes les détections de proies soit à 100%, permettent aussi d'étayer la contribution relative de chaque proie au régime alimentaire (Xiong et al. 2017). Une métrique qui a pu être proposée est le POO pondéré (*Weighted POO*, wPOO), qui, plutôt que donner le même poids à toutes les occurrences, pondère l'occurrence en fonction du nombre d'espèces proies dans chaque échantillon (si un échantillon contient 5 espèces proies, alors cet échantillon sera associé à un poids de 1/5) (Deagle et al. 2019). Contrairement au POO qui donne plus de poids aux échantillons avec un grand nombre d'espèces proies, cette dernière métrique (le wPOO) donne le même poids à chaque échantillon, ce qui lui permet d'apporter une information probablement plus cohérente écologiquement (*e.g.* Tollit et al. 2017). Les résultats attendus avec ces différents types de métriques ont été graphiquement représentés à titre illustratif par Deagle et al. (2019), sur la base de trois études de régime alimentaire réalisées par metabarcoding dans des fèces d'albatros (*Thalassarche cauta*) (McInnes et al. 2017a), de chauves-souris insectivores (Vesterinen et al. 2016) et de zèbres de Grévy (*Equus grevyi*) (Kartzinel et al. 2015), soit résumés à l'échelle des individus (**Figure 1.a**) soit résumés à l'échelle populationnelle (**Figure 1.b**).



**Figure 1** – Exemple de résultats obtenus à l’issue d’analyse de metabarcoding effectuées dans des échantillons de fèces, à l’échelle individuelle (a) et à l’échelle populationnelle (b). La figure de résultats est issue de Deagle et al. (2019) et est basée sur les données de régime alimentaire obtenues sur des albatros (McInnes et al. 2017a), des chauves-souris insectivores (Vesterinen et al. 2016) et des zèbres de Grévy (Kartzinel et al. 2015). Chaque couleur représente un taxon d’alimentation différent.

## 2.4 Des résultats semi-quantitatifs obtenus par des méthodes de quantification de l'ADN

Le développement des méthodes de séquençage haut-débit (*high-throughput sequencing*, HTS), et les baisses des coûts associés, ont permis ensuite de tester la quantification de l'ADN de proies présentes, et ainsi dépasser la seule détection qualitative d'ADN de proies (présence/absence) (Deagle et Tollit 2007; Matejusová et al. 2008; Tollit et al. 2009; Bowles et al. 2011; Deagle et al. 2013, 2019; Thomas et al. 2014, 2016 ; et voir la revue de Pompanon et al. 2012). La majorité de ces études ont utilisé une méthode de séquençage quantitatif en temps réel, dite de « qPCR », pour mesurer la quantité d'ADN dans un échantillon de fèces par lecture de séquences et estimation de leur nombre. Cette avancée a alors ouvert la possibilité de travailler sur des méthodes pour estimer la contribution de chaque espèce proie au régime alimentaire, sur la base de l'ADN quantifié. C'est ce qui a été initié sur les pinnipèdes, par exemple, par Deagle et Tollit (2007) qui ont évalué la quantité d'ADN de trois espèces proies par qPCR dans des fèces d'otaries de Steller en captivité, alimentés avec ces trois types proies dans des conditions contrôlées (proportions contrôlées). Une certaine concordance a été observée dans cette étude entre la quantité d'ADN mitochondriale dans les tissus des proies choisies (contrôle), et leur quantité mesurée dans les fèces (par qPCR). Cependant des variations non négligeables sont observées dans ce type d'étude, entre la proportion de biomasse de proies donnée à un pinnipède en milieu contrôlé et la quantité d'ADN estimée dans des fèces, ce qui suggère l'existence de différents biais méthodologiques sur cette quantification (Deagle et Tollit 2007; Thomas et al. 2016). L'un des biais pourrait être une persistance différenciée de l'ADN dans le tractus, en fonction des espèces proies consommées (Deagle et Tollit 2007), sur le même schéma que le biais d'érosion des pièces dures diagnostiques lors des analyses « traditionnelles » du régime alimentaire. Il existe également des biais méthodologiques qui peuvent impacter la lecture du nombre de séquences d'ADN, (voir Deagle et al. 2013). Des travaux ont alors été réalisés afin de déterminer des facteurs de correction par espèces proies (évalués sur la base de matériel contrôle) dans l'optique

d'avoir une quantification plus juste du régime alimentaire de pinnipèdes par des techniques de séquençage haut-débit et par metabarcoding (*e.g.* Thomas et al. 2014, 2016). C'est ce qu'ont réussi à effectuer Thomas et al. (2014) dans leur étude en effectuant un séquençage Ion Torrent sur des fèces de phoques veaux-marins nourris en milieu captif (contrôlé), et où ils ont pu générer des facteurs de correction de tissus (en comparant l'ADN dans les poissons consommés avec l'ADN dans les fèces). Une conclusion de ces travaux mettait ainsi en évidence que, par rapport au régime alimentaire réel, les estimations fournies par une analyse des pièces dures ou par une analyse par séquençage de l'ADN fournissaient l'une et l'autre des contributions relatives des espèces proies sur- ou sous estimées en fonction des espèces et des approches.

Même si les méthodes de quantification de l'ADN de proies ont encore été peu réalisées sur des fèces de pinnipèdes et qu'elles peuvent comporter plusieurs biais méthodologiques, elles sont d'intérêt croissant pour étudier le régime alimentaire de ces prédateurs (Pompanon et al. 2012; Deagle et al. 2019), et permettent d'acquérir des données complémentaires aux résultats issus de metabarcoding (Thomas et al. 2022). L'utilisation de l'abondance relative du nombre de séquences d'ADN lues (*Relative Read Abundance*, RRA) pourrait alors s'avérer une métrique intéressante du régime alimentaire (Deagle et al. 2019), et mériterait d'être utilisée comme un indice complémentaire aux résultats d'occurrence.

### **3 Analyse de fèces : échantillonnage et protocoles de préparation pour analyses du contenu en ADN de proies**

#### **3.1 L'utilisation de fèces pour étudier le régime alimentaire**

L'utilisation d'échantillons de fèces pour évaluer le régime alimentaire par analyses d'ADN est une technique largement répandue, et qui a été appliquée sur de nombreuses espèces animales (*e.g.* Höss et al. 1992; Farrell et al. 2000; Clare et al. 2009; Oehm et al. 2011; Bowen et Iverson 2013). Les revues de King et al. (2008) et de Monterroso et

al. (2019) discutent des implications de l'utilisation de ce type d'échantillons pour effectuer des analyses de biologie moléculaire. L'avantage de cette technique d'échantillonnage est d'avoir des informations sur les événements d'alimentation, concentrés dans la matière fécale (« matrice molle » de la fèces), et qui présente moins de limites de représentativité que les parties dures non digérées dont la présence peut être drastiquement influencée par différents paramètres (digestion, taille des proies consommées, techniques de consommation). Chez les pinnipèdes, la matrice molle des fèces représente seulement des événements d'alimentation très récents, de 24 à 48 heures avant leur production (Deagle et al. 2005; Casper et al. 2007), alors que la période d'intégration est globalement plus importante pour les parties dures (jusqu'à sept jours pour des gadidés, et pour une période encore plus longue pour les céphalopodes, Tollit et al. 2003). La variabilité interspécifique du taux de passage des proies dans le tractus digestif devrait également être plus faible dans la matrice molle que dans les parties dures, ce qui favoriserait une meilleure représentativité du régime alimentaire (Tollit et al. 2009). Comme expliqué précédemment, l'ADN partiellement dégradé de proies peut cependant être digéré de façon différenciée selon les espèces proies, ce qui peut avoir un impact sur la détectabilité de ces proies (*e.g.* Thomas et al. 2014), cependant, cette limite est généralement considérée comme inférieure à l'influence de la digestion sur les parties dures. L'utilisation de fèces pour ce type d'analyses de régime alimentaire présente de nombreux enjeux pour leur collecte sur le terrain et pour leur préparation en laboratoire, avant extraction de l'ADN et analyses de séquençage.

### **3.2 Collecte des échantillons et implications (état de dégradation, contamination, etc.)**

La technique de collecte des fèces sur le terrain peut avoir un effet conséquent sur la qualité des résultats de régime alimentaires obtenus par analyse de l'ADN de proies (voir la revue de King et al. 2008 qui détaille les nombreux enjeux associés). Les étapes de collectes d'échantillons doivent donc être effectuées dans les meilleures conditions possibles, afin d'obtenir de l'ADN en qualité et en quantité suffisante pour appliquer des approches moléculaires (King et al. 2008).

L'état de fraîcheur des fèces collectées sur le terrain a un effet très important sur la capacité à en extraire de l'ADN. En effet, l'ADN contenu dans une fèces peut être dégradé par action enzymatique à l'air libre, dès les premières heures après sa production, (Tollit et al. 2009), et il est alors fortement conseillé de ne se concentrer que sur des fèces très fraîches produites il y a moins de 24 heures (*e.g.* Zaidi et al. 1999). C'est ce qu'ont testé Tollit et al. (2009), par exemple, sur des fèces d'otaries de Steller, où ils ont observé que le succès d'extraction de l'ADN était plus élevé dans les fèces fraîches que dans les fèces dégradées. Une autre étude, réalisée par Oehm et al. (2011) sur des pelotes fécales d'oiseaux, a mis en évidence que de l'ADN d'insectes (proies consommées) pouvait être aussi bien détecté sur des échantillons frais (produites il y a moins de cinq heures) que plus anciens (de cinq jours), mais que cet ADN s'avérait plus dégradé et moins détectable dans le second cas. Ils ont alors mis en évidence que la détectabilité de l'ADN était significativement plus faible lorsque les fèces étaient exposées à la lumière du soleil et à la pluie. Il apparaît alors important de collecter des fèces fraîche dans ce type d'étude, afin d'éviter des « faux-négatifs » de détection des proies, c'est-à-dire lorsqu'elles étaient bien consommées mais non détectable par ADN (à cause d'une dégradation) (King et al. 2008) ; cet enjeu semble d'autant plus important pour des analyses reposant sur une quantification de l'ADN.

La qualité et la quantité d'ADN obtenues dans une fèces de prédateur peuvent aussi être affectées par les conditions environnementales externes (*e.g.* Murphy et al. 2007; Nakamura et al. 2011; Oehm et al. 2011). En effet, une fèces peut être contaminée *in situ* par l'ADN présente dans son environnement (McInnes et al. 2017b), et plus particulièrement depuis les substrats sableux ou rocheux pour les fèces de pinnipèdes présentes sur les reposoirs. Une telle contamination pourrait aussi avoir lieu par la présence d'autres espèces sur les lieux de collectes (*e.g.* possible contamination de fèces de pinnipèdes par des fientes d'oiseaux). Ce type de contamination pourrait mener à la présence de « faux-positifs », c'est-à-dire d'espèces non consommées mais présentes dans l'ADN extrait. Il est alors généralement suggéré d'éviter d'analyser la matière fécale en contact direct avec le substrat (King et al. 2008), voire avec l'eau de mer dans

certains cas d'étude (Jarman et al. 2004). L'une des solutions appliquées dans certaines études a été de prélever la matière fécale à analyser la plus fraîche possible de la fèces, en son cœur, et d'éviter la surface externe qui pouvait être dégradée/séchée et/ou contaminée par l'environnement (*e.g.* Gosselin et al. 2017), mais ceci peut s'avérer plus complexe pour des phocidés où du sable peut parfois s'agglomérer à la fèces.

Enfin, les collectes de fèces destinées à des analyses moléculaires doivent toujours être collectées dans les conditions les plus soigneuses possibles (*e.g.* utilisation de contenants dépourvus d'ADN, utilisation de gants) afin d'éviter toute contamination avec le matériel utilisé, et entre chaque échantillon (contamination croisée), qui pourrait compromettre la fiabilité des résultats de régime alimentaire (King et al. 2008).

### **3.3 Stockage et préparation des échantillons pour extraction d'ADN de proies**

Une fois qu'une fèces a été prélevée pour des analyses moléculaires ultérieures, il est nécessaire de la stocker le plus rapidement possible afin de préserver au mieux l'ADN (en qualité et en quantité) (King et al. 2008), puis d'appliquer un protocole adapté de préparation de l'échantillon avant extraction de l'ADN et analyses moléculaires (*e.g.* metabarcoding). Les nombreuses études qui ont analysé le contenu en ADN de proies dans des fèces pinnipèdes ou d'autres prédateurs (terrestres ou marins) ont utilisé une grande diversité de techniques différentes, dont nous présentons ici quelques exemples dans le tableau synthétique en **Annexe 1** (méthodes de collecte, de stockage, de préparation et d'analyses moléculaires ; 28 études sont ici présentées en exemple de façon synthétique, sur des pinnipèdes [**1 à 15**], sur d'autres espèces [**18 à 28**], et deux revues scientifiques portant sur les méthodes de préparation [**16 et 17**]).

Les auteurs de ce type d'étude recommandent largement de stocker les fèces très rapidement après leur collecte (dans les heures qui suivent), afin de conserver au mieux l'ADN. Dans la majorité des cas d'étude, les expérimentateurs ont congelé les échantillons (à -20°C ou à -80°C) immédiatement après leur collecte pour stockage jusqu'à analyse ultérieure (*e.g.* Parsons et al. 2005; Thomas et al. 2014; Mumma et al.

2016; Jeanniard-du-Dot et al. 2017; Keszka et al. 2020; Jimbo et al. 2021). Un stockage à  $-80^{\circ}\text{C}$  permet sûrement une meilleure conservation mais est techniquement plus contraignante, ce qui amène généralement à favoriser une congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$ . La qualité de l'ADN peut cependant se dégrader au fil du temps (par dégradation enzymatique), même congelé, et il est alors conseillé d'effectuer l'extraction d'ADN peu de temps après sa congélation (dans les mois qui suivent) (King et al. 2008). D'autres auteurs ont choisi de stocker les fèces à étudier dans de l'éthanol (de  $70^{\circ}$  à  $100^{\circ}$ ), dans un bocal par exemple, et ont trouvé que cette méthode s'avérait efficace pour préserver l'ADN (*e.g.* Deagle et al. 2005; Deagle et Tollit 2007). Ce type de technique peut s'avérer avantageuse pour stabiliser l'ADN lorsque les conditions d'accès à un congélateur sont compliquées (collectes sur le terrain sur plusieurs jours de suite), par exemple. Certaines études telles que celles de Thomas et al. (2022) incluent d'ailleurs des fèces stockées soit par éthanol soit par congélation, en fonction des conditions de collecte sur le terrain (possibilité de congeler le soir même ou non). Enfin, d'autres études ont combiné le stockage des échantillons dans de l'éthanol avec une congélation (*e.g.* Emami-Khoyi et al. 2016; McInnes et al. 2017a; McCosker et al. 2020; Jang-Liaw 2021). Cependant, malgré la diversité de protocoles utilisés, il existe peu d'informations dans la littérature permettant de confirmer si l'une de ces méthodes est plus efficace que les autres pour conserver de l'ADN. En l'absence de réelles analyses comparatives, il s'avère difficile de conclure sur l'efficacité d'une technique par rapport à une autre, mais le succès d'extraction d'ADN dans toutes ces études suggère qu'elles pourraient toutes être relativement efficaces pour optimiser les rendements d'extraction.

L'étape de préparation et/ou de sous-échantillonnage des fèces pourrait aussi avoir une influence critique sur les résultats obtenus (King et al. 2008). Cependant, nous pouvons constater dans la littérature scientifique qu'il existe une très grande diversité de techniques de préparation des échantillons (**Annexe 1**), chaque étude apportant ses propres spécificités protocolaires, tout en justifiant assez rarement les choix effectués et leur possible influence sur les résultats. Cette diversité de protocole est observée à la fois sur les études portant sur des pinnipèdes (*e.g.* Deagle et al. 2005, 2009; Parsons et

al. 2005; Deagle et Tollit 2007; Matejusová et al. 2008; Tollit et al. 2009; Thomas et al. 2014, 2022; Emami-Khoyi et al. 2016; Jeanniard-du-Dot et al. 2017; Keszka et al. 2020; McCosker et al. 2020; Flanders et al. 2020; Dufault et al. 2021; Jimbo et al. 2021), et sur celles portant sur d'autres vertébrés (oiseaux, mammifères terrestres, poissons) (*e.g.* Clare et al. 2009; Oehm et al. 2011; Jarman et al. 2013; Mumma et al. 2016; McInnes et al. 2017a; Guillerault et al. 2017; Gosselin et al. 2017; Monterroso et al. 2019; Jang-Liaw 2021; Massey et al. 2021; Parker et al. 2022; Kim et al. 2022).

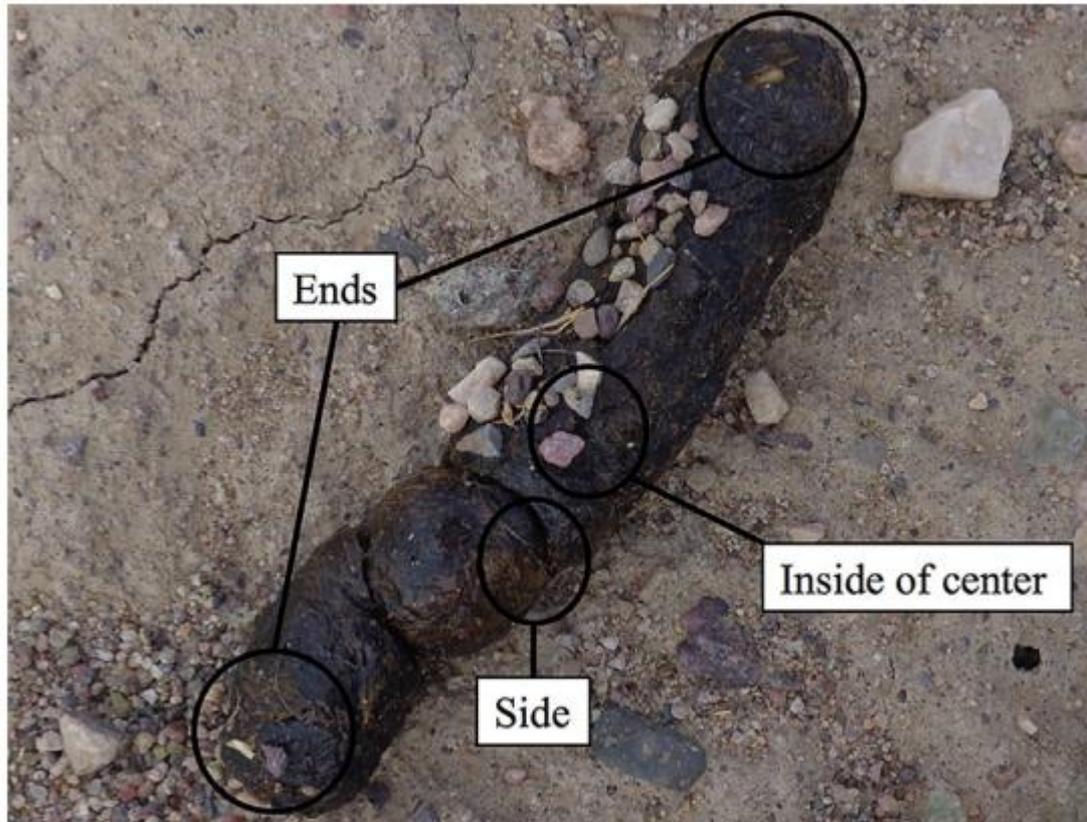
Les études portant sur l'analyse moléculaire de fèces de pinnipèdes ont généralement effectué un ou plusieurs sous-échantillonnage(s) aléatoire(s) de matière fécale. Ainsi, certains ont fait un unique sous-échantillonnage (*e.g.* environ 2-3 ml de la matrice molle, Tollit et al. 2009 ; forage de 6 mm de diamètre dans la fèces congelée, Keszka et al. 2020 ; 5 ml de la matrice molle préalablement mélangée, Flanders et al. 2020 ; environ 20 mg du sédiment de la fèces sans parties dures Thomas et al. 2014), alors que d'autres ont combiné un sous-échantillonnage de plusieurs parties de la fèces (*e.g.* deux sous-échantillons sur chaque fèces congelée, Parsons et al. 2005 ; environ 50 ml de matière fécale sous-échantillonnée aux lobes de la fèces Deagle et al. 2009). Ces protocoles de prélèvements sont ainsi appliqués soit après le stockage, soit avant le stockage (par congélation ou par éthanol) et/ou les analyses, en fonction des pratiques de chacun. Ils ont l'avantage d'être faciles d'application, et de permettre de conserver une part importante de la fèces pour d'autres analyses (dont l'analyse des pièces dures diagnostiques, comme autre méthode du régime alimentaire) (*e.g.* McCosker et al. 2020).

L'ADN de proies est cependant considéré comme étant plutôt hétérogène au sein d'un échantillon de fèces (Matejusová et al. 2008), ce qui suggère que prélever un sous-échantillon pourrait sous-représenter toutes les proies présentes dans toute la fèces. Le protocole de préparation pourrait alors mener à de « faux négatifs ». D'autres études ont proposé des protocoles où les fèces de pinnipèdes sont préalablement mixées (voire diluées dans de l'éthanol ou une solution tampon), avant d'être envoyées en extraction d'ADN. L'une des techniques proposées a été de diluer la fèces avec de l'éthanol dans

un bac et d'homogénéiser, tout en effectuant ceci sur un filtre de taille fine (pour conserver les pièces dures diagnostiques), puis de sous-échantillonner la matrice fèces-éthanol pour les analyses génétiques (Jeanniard-du-Dot et al. 2017). D'autres études, telles que celle de Jimbo et al. (2021) ont proposé de mixer fortement la partie molle de la fèces (pour homogénéiser au mieux) avant d'effectuer un sous-échantillon à envoyer en analyses moléculaires (0.15-0.43 g de la partie molle).

La même diversité de protocoles de préparation de fèces est observée sur les études portant sur d'autres taxons que les pinnipèdes. Les techniques de sous-échantillonnage d'une partie de l'échantillon (*e.g.* 20 mg sur des fèces de poissons chats *Silurus glanis*, Guillerault et al. 2017 ; 200-500 mg sur des fèces de loups gris *Canis lupus ligoni* Massey et al. 2021), ou de combinaison de plusieurs sous-échantillons (*e.g.* environ 0.5 ml de matière fécale prélevée à de multiples endroits de l'extérieur de chaque fèces d'ours noirs *Ursus americanus* et de coyotes *Canis latrans*, Mumma et al. 2016), apparaissent assez répandues. Les techniques de dilution de ces sous-échantillons dans une solution tampon (*e.g.* solution saline de diméthylsulfoxyde, tampon DET) sont également proposées pour conserver/préparer les échantillons (*e.g.* Monterroso et al. 2019). Très peu d'études ont cependant testé l'influence de chacun de ces protocoles de préparation des fèces sur les résultats de séquençage d'ADN de proies obtenus. Sur des fèces de coyotes, cinq différents protocoles de sous-échantillonnage ont été testés en comparant différentes zones de prélèvements sur chaque fèces (environ 500-600  $\mu$ l pour chaque sous-échantillon) : aux deux extrémités de la fèces, sur le côté de la fèces (en surface), au milieu de la partie centrale de la fèces, et en homogénéisant environ 125-150  $\mu$ l de chacune des quatre précédentes localisations dans un même échantillon (Gosselin et al. 2017). Les quatre localisations de sous-échantillonnage de fèces de coyotes choisies dans cette étude sont présentées en **Figure 2**. Ils ont finalement mesuré la détectabilité d'un type de proies (les Léporidés) par ADN (et par analyse des pièces diagnostiques en complément) pour chacun des cinq protocoles, et ont constaté de fortes différences de résultats suivant les protocoles : ceux qui incluaient toutes les localisations de prélèvements, ou ceux qui étaient issus du croisement de résultats de plusieurs

protocoles, permettaient d'avoir une plus haute détectabilité des proies. Ainsi, dans cette étude, certaines localisations uniques de sous-échantillonnage amenaient à une plus faible détectabilité des proies par ADN.



**Figure 2** – Différentes localisations de sous-échantillonnages de fèces de coyotes réalisées dans l'étude de Gosselin et al. (2017) pour tester l'influence de différents protocoles sur la détection de proies (Léporidés) par analyse de l'ADN.

Les résultats de séquençage d'ADN pourraient donc être sensiblement affectés par les choix de sous-échantillonnage et/ou de préparation des fèces (Gosselin et al. 2017), bien qu'à l'heure actuelle aucune approche ne semble faire consensus. Les contraintes opérationnelles liés à la collecte, à la taille et l'état des échantillons, au temps et au coût de préparation, et à la mutualisation éventuelle avec d'autres analyses peuvent également conduire à des compromis différents en fonction des études et de leurs objectifs. Il apparaît néanmoins utile de mieux tester quantitativement les conséquences de ces choix méthodologiques dans le cadre de futures études.

## **4 Les apports de l'utilisation d'approches de biologie moléculaire dans l'analyse du régime alimentaire de phoques à partir de fèces**

### **4.1 Comparaison entre l'analyse traditionnelle des pièces dures diagnostiques et l'analyse de l'ADN de proies, et limites des approches moléculaires**

L'un des enjeux principaux quand on cherche à évaluer le régime alimentaire de prédateurs tels que les pinnipèdes est de savoir quelle est la méthodologie la plus appropriée pour caractériser la réalité écologique (*e.g.* Bowen et Iverson 2013). Pour les études du régime alimentaire de pinnipèdes, il est généralement attendu que les approches de biologie moléculaire puissent préciser les connaissances, et s'affranchir d'une partie des biais inhérents aux approches « traditionnelles » (basées sur l'analyse des pièces diagnostiques) (Deagle et al. 2005; Casper et al. 2007; Tollit et al. 2009). Certaines études ont donc comparé les résultats de régime alimentaire obtenus par analyses des pièces diagnostiques avec ceux obtenus par le séquençage d'ADN de proies (Casper et al. 2007; Deagle et al. 2009, 2019; Tollit et al. 2009). De manière générale, ces études ont mis en évidence une certaine similarité entre les résultats obtenus par les deux types de méthodes, mais avec une diversité de proies détectées plus importante par méthodes de séquençage de l'ADN que par l'identification physique des restes alimentaires (*e.g.* Casper et al. 2007; Deagle et al. 2009; Tollit et al. 2009). Ceci peut facilement s'expliquer par la plus grande difficulté à détecter de nombreuses espèces avec les méthodes traditionnelles, où les biais associés ne permettent pas toujours d'arriver à un détail taxonomique aussi élevé que les techniques moléculaires (*e.g.* érosion des pièces diagnostiques qui permet difficilement d'identifier une proie à l'échelle de l'espèce). Les techniques de séquençage ont donc un apport qualitatif indéniable sur l'évaluation du régime alimentaire de pinnipèdes, et permettent de détecter plus systématiquement les proies, comme testé en milieu contrôlé/captif par Casper et al. (2007). Cependant, ces tests réalisés sur des animaux captifs ont soulevé

aussi la difficulté des deux types de méthodes (séquençage de l'ADN et pièces dures) à correctement reconstruire la quantité de biomasse réellement consommée (Casper et al. 2007).

Une limite majeure dans la comparabilité des résultats de régime alimentaire obtenus par biologie moléculaire avec ceux obtenus par pièces diagnostiques repose sur les temps de digestion différents entre les parties molles et dures de la fèces (Casper et al. 2007; Tollit et al. 2009). Le taux de résidence des pièces dures dans le tractus digestif peut être plus important que celui de la matière organique (quelques jours contre quelques heures ; voir **section 1.3** pour rappel), et il est alors possible que les deux méthodes d'analyses puissent représenter des événements d'alimentation différents. Ce type de comparaison s'avère néanmoins utile pour évaluer la pertinence de différentes approches dans l'évaluation du régime alimentaire, et ce plus particulièrement s'il on suppose que les événements d'alimentation d'un individu producteur sont assez similaires au cours du temps (à l'échelle de quelques jours).

Bien que les approches de séquençage de l'ADN permettent d'identifier une plus haute diversité de proies que les approches traditionnelles (apport qualitatif), elles présentent aussi des limites qui pourraient avoir une influence non négligeable sur les résultats de régime alimentaire. En effet, cette diversité pourrait parfois être surestimée par metabarcoding si, par exemple, un échantillon a été contaminé par l'environnement extérieur (substrat, eau de mer ou déjection d'autres animaux à proximité) ou par un autre échantillon (contamination croisée) (King et al. 2008). La dégradation de l'ADN dans les échantillons de fèces (liée à l'état des échantillons avant leur collecte et/ou à leurs conditions de stockage) peut aussi limiter la taille des fragments qui peuvent être amplifiés par PCR (Symondson 2002; Deagle et al. 2006), ce qui peut avoir un impact non négligeable sur la diversité estimée (Deagle et al. 2019). La détectabilité de proies secondaires par approches moléculaires peut aussi être une limite entre différentes études, surtout si l'ADN de ces proies est uniquement présent sous forme de traces dans les fèces. En effet, leur prise en considération dans les résultats dépend de choix de seuils de détectabilité, dont le choix s'avère généralement assez arbitraire d'une étude

à une autre (Pompanon et al. 2012; Deagle et al. 2019). De tels seuils sont choisis pour écarter les séquences potentiellement issues de contaminations, mais, si la diversité de proies secondaires s'avère élevée, un choix de seuil trop élevé amènera à sous-estimer la diversité en espèces proies. Ainsi, un seuil de 1% du nombre de lectures de séquences s'est avéré approprié dans de nombreuses situations (voir Deagle et al. 2019), mais certaines études ont choisi un seuil plus réduit lorsque le régime alimentaire de l'espèce est connu pour être naturellement diversifié (*e.g.* seuil de 0.01% chez des chauves-souris, Alberdi et al. 2018). Dans ce second cas, il est alors admis qu'une part de cette diversité puisse être aussi issue de contaminations (elle reste considérée comme négligeable dans ce type de cas).

Les résultats de séquençage par metabarcoding de l'ADN peuvent également être soumis à certains types d'erreurs (*e.g.* Pompanon et al. 2012). La qualité des résultats obtenus peut être fortement dépendante de la qualité et du succès d'extraction de l'ADN. Elle peut aussi être affectée par la qualité et/ou de la spécificité de chacune des amorces choisies pour effectuer un séquençage (*e.g.* Deagle et al. 2009; Pompanon et al. 2012 ; et voir **section 2.2**). Un choix peu adapté de certaines amorces pourrait alors sous-estimer artificiellement la diversité réelle de proies consommées par le prédateur. Des erreurs de lecture peuvent également avoir lieu au cours d'un séquençage d'ADN amplifié, menant ainsi à une mauvaise identification du taxon (Huse et al. 2007). Ces dernières pourraient être le fruit, par exemple, d'erreurs affectant la séquence de « barcode » entre deux différentes amorces. Un autre biais possible, en utilisant ce type d'approche moléculaire, est la présence possible de « séquences chimères » à l'issue de PCR, correspondant à des séquences erronées (des artefacts) (Qiu et al. 2001) qui peuvent être produites lorsque l'on amplifie de l'ADN dégradé (Pääbo et al. 1990). Dans ce type de cas, ces séquences chimères peuvent alors être assignées à des taxons supérieurs qui incluent les deux taxons les composant. L'assignation d'une séquence à un taxon peut également s'avérer critique, et peut être influencée par le choix de banques de données de références de séquences d'ADN (voir la revue de Pompanon et al. 2012 discutant de ces limites). En effet, ces bases de données publiques (GenBank

par exemple) peuvent parfois intégrer des séquences erronées et/ou de mauvaises assignations taxonomiques (Harris 2003). Bien que ces erreurs soient assez rares, elles pourraient quand même avoir une influence sur certaines assignations ; le choix des bases de données de référence et le travail de correction associé sont donc importants pour limiter les biais associés. Enfin, l'étape d'alignement entre des séquences pour trouver des régions de similarités, nommée BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), qui permet d'identifier les taxons associés à la séquence (par détermination d'une Unité Taxonomique Opérationnelle, OTU, *Operational Taxonomic Unit*), repose aussi sur un seuil de similarité défini par l'opérateur ; un seuil bas peut augmenter le nombre d'espèces retenues bien que leur identification reste incertaine (*e.g.* Thomas et al. 2017; McInnes et al. 2017a).

La quantification de l'ADN par approches moléculaires est un outil pertinent pour quantifier le régime alimentaire d'un prédateur, mais ces méthodes de quantification sont soumises à des biais qui pourraient influencer significativement les résultats (Pompanon et al. 2012; Deagle et al. 2019). Les limites associées à la quantification s'inscrivent dans la continuité des limites précédemment présentées (*e.g.* possibles erreurs d'assignation, erreurs pendant l'amplification), mais elles peuvent aussi découler d'autres facteurs. La digestion de l'ADN de différentes proies peut être différenciée selon les espèces, ce qui peut avoir une influence critique sur la représentativité du régime alimentaire dans des fèces par l'ADN. Des facteurs de correction ont donc été calculés pour que ces résultats quantifiés puissent être de meilleurs indices du régime alimentaire (Thomas et al. 2014). Il convient alors de garder une certaine prudence sur les résultats de tests de quantification de l'ADN, et de considérer tous les potentiels biais associés (*e.g.* Pompanon et al. 2012).

Des comparaisons méthodologiques (approches moléculaires *vs* approches traditionnelles) ont également été effectuées dans des études portant sur le régime alimentaire d'autres taxons que les pinnipèdes (*e.g.* Mumma et al. 2016; Guillerault et al. 2017; Gosselin et al. 2017; Massey et al. 2021; Parker et al. 2022). Similairement aux études effectuées sur les pinnipèdes, celles effectuées sur d'autres espèces montrent

souvent un chevauchement entre les résultats de régime alimentaire obtenus par tri mécanique des restes non digérés et ceux obtenus par analyses moléculaires. Cependant, ces mêmes études suggèrent que la plus haute diversité d'espèces proies détectées par séquençage de l'ADN soutient la forte utilité de cette méthode (*e.g.* Guillerault et al. 2017; Massey et al. 2021).

Les résultats de régime alimentaire obtenus par méthodes traditionnelles et par approches moléculaires ont finalement été rarement comparés, ou manquent parfois d'une comparaison formelle (quantitative) sur des métriques précises du régime alimentaire, selon certains auteurs (Deagle et al. 2019; Massey et al. 2021). Il persiste donc encore des incertitudes sur les différences que peuvent produire ces méthodes, et il est probable que le degré de différences dépende du contexte d'étude (cf. prédateurs étudiés, espèces proies consommées). Un exemple, à considérer pour les espèces d'intérêt de la présente étude, est la consommation de poissons plats qui semble être sous-estimée dans le régime alimentaire de phoques par analyses des pièces diagnostiques, par rapport aux analyses moléculaires (Dufault et al. 2021), ce qui s'expliquerait peut-être par un comportement d'alimentation spécifique à ces proies (cf. non-consommation des têtes qui entraînerait une faible représentation par les otolithes).

## **4.2 L'importance du multi-approches pour évaluer le régime alimentaire**

Un nombre très restreint d'études ont proposé de combiner les résultats de différentes méthodes d'analyse du contenu de fèces (analyse des pièces dures et analyse de l'ADN de proies) pour arriver à une compréhension intégrée du régime alimentaire (*e.g.* Gosselin et al. 2017; Jeanniard-du-Dot et al. 2017). Suivre un cadre d'étude par multi-approches permet en écologie trophique d'arriver à des conclusions plus étayées, chacune des méthodologies pouvant alors préciser une partie des éléments écologiques non fournis par les autres (Jeanniard-du-Dot et al. 2017; Costa-Pereira et al. 2019; Planque 2021; Planque et al. 2021). L'étude présentée par Jeanniard-du-Dot et al. (2017) sur des otaries à fourrures du Nord (*Callorhinus ursinus*) est un bon exemple d'étude où il a été nécessaire d'appliquer plusieurs approches (analyse de l'ADN de proies et des parties dures dans les fèces, analyses isotopiques et suivis biologging) pour

arriver à des conclusions écologiques les plus complètes possibles. Dans leur étude, les résultats des deux méthodes d'analyse des fèces ont été comparés, puis combinés, ce qui a permis d'améliorer l'évaluation du régime alimentaire de cette espèce (obtention d'une image plus diverse et complète du régime alimentaire). Ainsi, par exemple, les analyses d'ADN permettaient d'avoir un résultat plus qualitatif, à l'échelle de l'espèce des proies (salmonidés et céphalopodes), alors que les pièces dures permettaient uniquement d'évaluer la famille de ces proies. Cet exercice de combinaison permet aussi de corriger partiellement les biais des deux méthodes, ce qui s'est traduit dans l'étude de Jeanniard-du-Dot et al. (2017) par une importance intermédiaire des céphalopodes dans le régime alimentaire combiné (évaluée par la métrique *Split Sample Frequency of Occurrence*, SSFO) : plus faible que dans le régime alimentaire par analyse des pièces dures uniquement (ce qui s'explique par la surestimation de ce type de proies avec cette méthode) et plus forte que dans le régime alimentaire par analyse ADN uniquement (où les céphalopodes sont vraisemblablement sous-estimés). Les différentes approches d'analyses du régime alimentaire ne devraient donc pas être opposées mais combinées. Chaque méthode fournit une image de l'alimentation sous un prisme différent avec chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Conduire différentes méthodes et réussir à combiner l'ensemble des résultats pour fournir une image cohérente du régime alimentaire d'un prédateur doit être un axe de recherche qui devrait guider les études futures en écologie trophique.

Les différents avantages et inconvénients propres à l'application d'approches traditionnelles (analyse des pièces dures diagnostiques) et d'approches moléculaires (séquençage par metabarcoding) dans des fèces de phoques sont présentés de façon synthétique en **Tableau 2**. Ceci permet alors de mettre en évidence les apports possibles de chacune des approches et les contraintes associées à ces approches, afin de mettre en place un protocole adéquat dans le cas d'étude présent.

**Tableau 2** – Synthèse des avantages et inconvénients propres à l'application d'approches traditionnelles et d'approches moléculaires dans des fèces de phoques pour évaluer leur régime alimentaire.

	<b>Approches « traditionnelles »</b> (Analyse des pièces dures diagnostiques dans les fèces)	<b>Approches moléculaires</b> (Séquençage de l'ADN de proies dans la matrice molle de fèces par metabarcoding)
<b>Obtention de résultats qualitatifs</b>	<p><b>Avantages :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Identification des proies à l'échelle des espèces, ou à défaut à l'échelle de groupes d'espèces.</li> </ul> <p><b>Inconvénients :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessite de bonnes connaissances taxonomiques (expérimentateur).</li> <li>• Risque de mauvaise assignation d'espèces pour des pièces dures semblables.</li> <li>• Résultats à l'échelle du taxon le plus raisonnable.</li> <li>• Faux négatifs possibles (sous-estimation de la diversité) à cause de plusieurs facteurs : <ul style="list-style-type: none"> <li>- espèces proies sans pièces diagnostiques (<i>e.g.</i> espèces gélatineuses ou chondrichthyens)</li> <li>- consommation d'une partie des proies sans pièces diagnostiques (<i>e.g.</i> non consommation de la tête)</li> <li>- pièces diagnostiques fortement ou complètement digérées, voire régurgitées (cf. becs céphalopodes).</li> </ul> </li> </ul>	<p><b>Avantages :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Identification des proies à une échelle taxonomique plus précise (espèces proies).</li> <li>• Détection d'une plus haute diversité taxonomique que par approche traditionnelle.</li> </ul> <p><b>Inconvénients :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Possibilité d'avoir des erreurs d'assignation d'espèces liées à : <ul style="list-style-type: none"> <li>- présence possible de séquences erronées dans les banques de données utilisées</li> <li>- possibles erreurs de lecture des séquences</li> <li>- possibles erreurs lors de l'amplification de l'ADN</li> </ul> </li> <li>• Facteurs pouvant mener à une <i>sur-</i> ou <i>sous-estimation</i> des espèces présentes : <ul style="list-style-type: none"> <li>- risque de dégradation de l'ADN selon l'état de l'échantillon à la récolte et sa méthode de stockage (<i>sous-estimation</i>)</li> <li>- risque de contamination par environnement ou de contamination croisée (<i>surestimation</i>)</li> <li>- choix arbitraire d'un seuil de détectabilité (<i>sur-</i> ou <i>sous-estimation</i>)</li> <li>- qualité et succès d'extraction de l'ADN (dépendant de l'état de l'échantillon) (<i>sous-estimation</i>)</li> <li>- qualité et/ou spécificité des amorces choisies (<i>sous-estimation</i>) (<i>e.g.</i> risque de sous-estimer proies non ciblées par certaines amorces).</li> </ul> </li> </ul>

	<b>Approches « traditionnelles »</b> (Analyse des pièces dures diagnostiques dans les fèces)	<b>Approches moléculaires</b> (Séquençage de l'ADN de proies dans la matrice molle de fèces par metabarcoding)
<b>Obtention de résultats quantitatifs</b>	<p><b>Avantages :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Permet une quantification du régime en fréquence de biomasse et d'abondance pour la majorité des espèces proies identifiées.</li> <li>• Accès aux tailles et masses relatives individuelles des proies ingérées par la mesure de pièces diagnostiques et par l'application de relations allométriques issues de la littérature.</li> <li>• Facile d'usage et transposable entre différentes études.</li> </ul> <p><b>Inconvénients :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Impact de l'érosion des pièces dures diagnostiques (à cause de la digestion) sur la biomasse reconstruite (érosion différenciée selon les espèces proies et les types de pièces).</li> </ul> <p>→ des facteurs de correction proposés, mais qui peuvent aussi présenter des limites (choix des facteurs par espèce, choix au taxon le plus proche, etc.)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Temps de résidence des restes de proies différents selon les espèces proies et les types de pièces dures (<i>e.g. surestimation</i> des céphalopodes par rapport aux téléostéens ; <i>sous-estimation</i> des poissons plats).</li> </ul>	<p><b>Avantages :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Développements récents et encourageants de méthodes de séquençage haut-débit (HTS) pour quantifier l'ADN de proies et avoir des contributions relatives des différentes espèces dans l'image du régime alimentaire.</li> <li>• Permet d'avoir une information quantitative, complémentaire aux informations qualitatives.</li> </ul> <p><b>Inconvénients :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Digestion différenciée de l'ADN le long du tractus digestif, selon les espèces proies (cf. digestibilité de différents tissus).</li> </ul> <p>→ des facteurs de correction proposés, mais peu nombreux dans la littérature. Possibles biais associés à l'utilisation de ces facteurs.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proportions d'ADN dans les fèces qui ne correspondraient pas systématiquement aux proportions de proies ingérées.</li> <li>• Pas d'informations sur la taille et la masse des proies ingérées.</li> <li>• Nécessité de considérer ces résultats, issus de développements récents, avec précautions.</li> </ul>

	<b>Approches « traditionnelles »</b> (Analyse des pièces dures diagnostiques dans les fèces)	<b>Approches moléculaires</b> (Séquençage de l'ADN de proies dans la matrice molle de fèces par metabarcoding)
<b>Conditions de collecte des échantillons et de stockage</b>	<p><u>Avantages :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ne nécessite pas de précautions particulières d'échantillonnages, hormis une individualisation de chacune des fèces collectées. Pas de contraintes de stockage précis si seule l'analyse des pièces dures diagnostiques est effectuée.</li> </ul>	<p><u>Inconvénients :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessite de nombreuses précautions lors de leur collecte sur le terrain : <ul style="list-style-type: none"> <li>- collecte d'échantillons pas ou peu contaminés par le substrat (<i>e.g.</i> sable)</li> <li>- collecte selon les conditions les plus soigneuses possibles afin d'éviter les contaminations environnementales ou les contaminations croisées (entre échantillons) (utilisation de contenants dépourvus d'ADN, de gants, etc.).</li> </ul> </li> <li>• Collecte de fèces fraîches afin d'éviter toute dégradation de l'ADN (collecte dans les 24 h après production).</li> <li>• Nécessite de stocker l'échantillons rapidement (éthanol ou à -20°C / -80°C).</li> <li>• Nécessite d'effectuer l'analyse quelques mois après la collecte (risque de dégradation de l'ADN au cours du temps).</li> <li>• Nécessite des conditions de transport frigorifique si transfert.</li> </ul>
<b>Conditions d'analyses en laboratoire et de préparation des échantillons</b>	<p><u>Avantages :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Protocole de filtration et d'analyse des pièces dures diagnostiques qui peuvent être facilement mis en œuvre. Pas d'équipement de laboratoire lourd.</li> <li>• Tout l'échantillon est analysé, et il n'y a donc pas de protocole précis de préparation (ou de sous-échantillonnage).</li> </ul>	<p><u>Inconvénients :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessite de travailler dans des conditions très soigneuses pour éviter toute contamination des échantillons.</li> <li>• Protocoles de préparation des fèces (<i>e.g.</i> sous-échantillonnages à différentes localisations, mise en solution de toute la fèces) qui pourraient avoir une influence non négligeable sur les résultats de régime alimentaire.</li> <li>• Nécessite de disposer et d'avoir accès à des moyens analytiques spécifiques en biologie moléculaire.</li> </ul>
<b>Temps d'analyses en laboratoire</b>	<p><u>Inconvénients :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Analyse des fèces en laboratoire qui peut prendre plusieurs semaines pour quelques dizaines d'échantillons.</li> <li>• Travail fastidieux si les échantillons contiennent de très nombreuses pièces diagnostiques.</li> </ul>	<p><u>Avantages :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Préparation des échantillons en quelques heures.</li> <li>• Analyse des échantillons qui peut être réalisée par des plateformes de biologie moléculaires (quelques mois pour obtenir des résultats).</li> </ul>

	<b>Approches « traditionnelles »</b> (Analyse des pièces dures diagnostiques dans les fèces)	<b>Approches moléculaires</b> (Séquençage de l'ADN de proies dans la matrice molle de fèces par metabarcoding)
<b>Analyse des données et compétences requises</b>	<p><u>Avantage :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Données ayant une structure assez facile à prendre en main.</li> <li>• Analyses assez standards, mais pouvant être plus poussées selon les questions posées.</li> </ul>	<p><u>Inconvénient :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Obtention de résultats propres aux analyses de biologie moléculaire (si traitements bio-informatiques réalisés en amont par une plateforme de biologie moléculaire).</li> <li>• Maîtrise de ce type de données et des métriques associées.</li> </ul>

## 5 Recommandations pour effectuer des analyses de biologie moléculaire sur des fèces de phoques veaux-marins et gris et protocole choisi

Comme précédemment présenté dans l'ensemble de ce rapport, l'application de méthodes de biologie moléculaire dans des fèces apparaît pertinente pour acquérir des informations sur le régime alimentaire de pinnipèdes tels que les phoques veaux-marins et les phoques gris. Réalisées en complément des analyses plus traditionnelles (analyses des pièces dures diagnostiques dans les fèces), elles permettraient de compléter les connaissances actuelles.

Dans le contexte d'étude des populations de phoques, à proximité du projet d'Eoliennes en Mer Dieppe – Le Tréport (EMDT), seules des analyses des pièces dures diagnostiques ont été réalisées pour évaluer le régime alimentaire des deux espèces de phoques à ce stade (fèces collectées uniquement en baie de Somme ; Spitz et al. 2015; Planque 2021; Planque et al. 2021). Ces précédentes études apportent des premières informations sur les préférences alimentaires des phoques sur ce secteur, et sur le chevauchement alimentaire entre ces espèces. L'application de méthodes de biologie moléculaire sur les fèces, qui nous apparaît pertinente au regard de la littérature, permettrait sûrement de préciser ces connaissances. Le séquençage de l'ADN par metabarcoding est l'une des méthodes qui a été la plus fréquemment utilisée au cours

de la dernière décennie pour détecter les proies de phoques dans des fèces (*e.g.* Granquist et al. 2018; McCosker et al. 2020; Salinger 2021; Thomas et al. 2022), et celle-ci a donc été choisie dans le cas présent. Sachant les différentes incertitudes qui existent sur les protocoles à appliquer pour obtenir des résultats robustes qualitativement et quantitativement par ADN (cf. diversité de protocoles suivant les études ; voir **section 3.3**), nous avons choisi d'intégrer des tests protocolaires dans la présente étude.

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 AnaEE<sup>1</sup>, 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). Il est ainsi prévu que cette plateforme effectue les analyses de metabarcoding environnemental dans les échantillons de fèces de phoques (préalablement préparées). Sur la connaissance préalable des potentielles proies des deux espèces de phoques sur la zone d'étude, nous avons déterminé que les analyses seront effectuées avec cinq marqueurs différents (cf. choix des amorces en **section 2.2**), qui ciblent les téléostéens, les chondrichthyens, les élasmobranches, les arthropodes et les mollusques (voir les fiches techniques des marqueurs choisis en **Annexe 2**). Ces analyses devraient alors permettre d'identifier un large spectre d'espèces proies potentielles de phoques. Des développements de méthode de séquençage quantitatif en temps réel, dite de « qPCR », seront également testées, en amont du séquençage. Ils permettront alors d'acquérir peut-être des évaluations quantitatives. Enfin, il est également prévu d'effectuer le séquençage en utilisant un marqueur mammifères marins afin 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. 2015) et d'évaluer toute potentielle consommation d'un mammifère marin par le phoque qui a

---

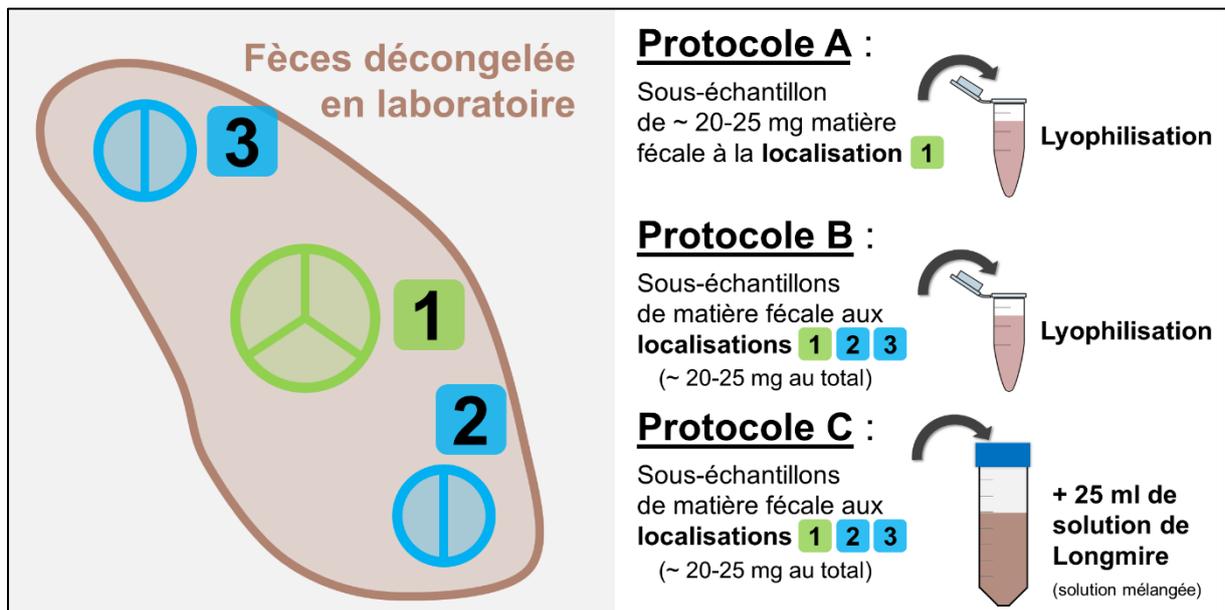
<sup>1</sup> <https://www.anaee-france.fr/> et <https://leca.osug.fr/eDNA-AnaEE-France-272>

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).

L'ensemble de ces analyses sont réalisées sur 32 fèces de phoques veaux-marins ( $N = 17$ ) et de phoques gris ( $N = 15$ ) 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). L'ensemble de ces fèces ont été congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$  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.

L'état de l'art présenté dans ce rapport a souligné de nombreuses incertitudes qui subsistent concernant l'influence des méthodes de préparation des fèces sur les résultats de metabarcoding. Après discussion avec différents scientifiques utilisant ces méthodes, et après analyse bibliographique, nous avons décidé de tester trois protocoles d'échantillonnage et de conservation sur chacune des fèces (nommés **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 prélevées 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 3**. 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 3** – 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 plus le contact avec le substrat (sable). Ces préparations sont effectuées en laboratoire, après décongélation.

Au total, 96 analyses de metabarcoding seront donc réalisées (trois protocoles testés par fèces). Par le test de différents protocoles, nous espérons alors pouvoir identifier leur efficacité dans la détection des espèces proies (cf. tester si l'un d'entre eux permet la détection d'une plus haute diversité de proies), afin de les calibrer au mieux pour de futures études.

L'ensemble des échantillons ont été préparés et envoyés à la plateforme eDNA d'AnaEE France, et seront prochainement analysés. Nous espérons ainsi obtenir des premiers résultats courant décembre 2022 / janvier 2023.

## Références bibliographiques

- Agustí N, Shayler SP, Harwood JD, Vaughan IP, Sunderland KD, Symondson WOC (2003) Collembola as alternative prey sustaining spiders in arable ecosystems: prey detection within predators using molecular markers. *Mol Ecol* 12:3467-3475. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02014.x>
- Alberdi A, Aizpurua O, Gilbert MTP, Bohmann K (2018) Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods Ecol Evol* 9:134-147. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12849>
- Bearhop S, Waldron S, Votier SC, Furness RW (2002) Factors That Influence Assimilation rates and fractionation of nitrogen and carbon stable isotopes in avian blood and feathers. *Physiol Biochem Zool* 75:451-458. <https://doi.org/10.1086/342800>
- Binladen J, Gilbert MTP, Bollback JP, Panitz F, Bendixen C, Nielsen R, Willerslev E (2007) The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of multiple homolog amplification products by 454 parallel sequencing. *PLoS One* 2:e197. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000197>
- Bowen W (1997) Role of marine mammals in aquatic ecosystems. *Mar Ecol Prog Ser* 158:267-274. <https://doi.org/10.3354/meps158267>
- Bowen WD (2000) Reconstruction of pinniped diets: Accounting for complete digestion of otoliths and cephalopod beaks. *Can J Fish Aquat Sci* 57:898-905. <https://doi.org/10.1139/f00-032>
- Bowen WD, Harrison GD (1994) Offshore diet of grey seals *Halichoerus grypus* near Sable Island, Canada. *Mar Ecol Prog Ser* 112:1-11.
- Bowen WD, Iverson SJ (2013) Methods of estimating marine mammal diets: A review of validation experiments and sources of bias and uncertainty. *Mar Mammal Sci* 29:719-754. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2012.00604.x>
- Bowles E, Schulte PM, Tollit DJ, Deagle BE, Trites AW (2011) Proportion of prey

- consumed can be determined from faecal DNA using real - time PCR. *Mol Ecol Resour* 11:530-540. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02974.x>
- Boyi JO, Heße E, Rohner S, Säurich J, Siebert U, Gilles A, Lehnert K (2022) Deciphering Eurasian otter (*Lutra lutra* L.) and seal (*Phoca vitulina* L.; *Halichoerus grypus* F.) diet: Metabarcoding tailored for fresh and saltwater fish species. *Mol Ecol*. <https://doi.org/10.1111/mec.16635>
- Brown E, Pierce G (1998) Monthly variation in the diet of harbour seals in inshore waters along the southeast Shetland (UK) coastline. *Mar Ecol Prog Ser* 167:275-289. <https://doi.org/10.3354/meps167275>
- Budge SM, Iverson SJ, Koopman HN (2006) Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: A primer on analysis and interpretation. *Mar Mammal Sci* 22:759-801. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2006.00079.x>
- Casper RM, Gales NJ, Hindell MA, Robinson SM (2006) Diet estimation based on an integrated mixed prey feeding experiment using *Arctocephalus* seals. *J Exp Mar Bio Ecol* 328:228-239. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.07.009>
- Casper RM, Jarman SN, Deagle BE, Gales NJ, Hindell MA (2007) Detecting prey from DNA in predator scats: A comparison with morphological analysis, using *Arctocephalus* seals fed a known diet. *J Exp Mar Bio Ecol* 347:144-154. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.04.002>
- Catry T, Ramos JA, Le Corre M, Kojadinovic J, Bustamante P (2008) The role of stable isotopes and mercury concentrations to describe seabird foraging ecology in tropical environments. *Mar Biol* 155:637-647. <https://doi.org/10.1007/s00227-008-1060-6>
- Chambellant M, Stirling I, Ferguson S (2013) Temporal variation in western Hudson Bay ringed seal *Phoca hispida* diet in relation to environment. *Mar Ecol Prog Ser* 481:269-287. <https://doi.org/10.3354/meps10134>
- Clare EL, Fraser EE, Braid HE, Fenton MB, Hebert PDN (2009) Species on the menu of a generalist predator, the eastern red bat (*Lasiurus borealis*): using a molecular

- approach to detect arthropod prey. *Mol Ecol* 18:2532-2542.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04184.x>
- Clarke MR (1986) A handbook for the identification of cephalopod beaks, Clarendon. Clarendon Press, UK.
- Costa-Pereira R, Araújo MS, Souza FL, Ingram T (2019) Competition and resource breadth shape niche variation and overlap in multiple trophic dimensions. *Proc R Soc B Biol Sci* 286:20190369. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0369>
- Costa DP (1993) The secret life of marine mammals. Novel tools for studying their behavior and biology at sea. *Oceanography* 6:120-128.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5670/oceanog.1993.07>
- Coull KA, Jermyn AS, Newton AW, Henderson GI, Hall WB (1989) Length/weight relationships for 88 species of fish encountered in the North East Atlantic.
- Cristescu ME (2014) From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends Ecol Evol* 29:566-571. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.08.001>
- Croll DA, Tershy BR, Hewitt RP, Demer DA, Fiedler PC, Smith SE, Armstrong W, Popp JM, Kiekhefer T, Lopez VR, Urban J, Gendron D (1998) An integrated approach to the foraging ecology of marine birds and mammals. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* 45:1353-1371. [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(98\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(98)00031-9)
- Cuff JP, Kitson JJN, Hemprich - Bennett D, Tercel MPTG, Browett SS, Evans DM (2022) The predator problem and PCR primers in molecular dietary analysis: swamped or silenced; depth or breadth? *Mol Ecol Resour* 0-3.  
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.13705>
- Dalsgaard J, St. John M, Kattner G, Müller-Navarra D, Hagen W (2003) Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv Mar Biol* 46:225-340.  
[https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(03\)46005-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(03)46005-7)

- Deagle BE, Tollit DJ (2007) Quantitative analysis of prey DNA in pinniped faeces: potential to estimate diet composition? *Conserv Genet* 8:743-747. <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9197-7>
- Deagle BE, Tollit DJ, Jarman SN, Hindell MA, Trites AW, Gales NJ (2005) Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. *Mol Ecol* 14:1831-1842. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02531.x>
- Deagle BE, Eveson JP, Jarman SN (2006) Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples – a case study on DNA in faeces. *Front Zool* 3:11. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-3-11>
- Deagle BE, Kirkwood R, Jarman SN (2009) Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces. *Mol Ecol* 18:2022-2038. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04158.x>
- Deagle BE, Thomas AC, Shaffer AK, Trites AW, Jarman SN (2013) Quantifying sequence proportions in a DNA - based diet study using Ion Torrent amplicon sequencing: which counts count? *Mol Ecol Resour* 13:620-633. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12103>
- Deagle BE, Thomas AC, McInnes JC, Clarke LJ, Vesterinen EJ, Clare EL, Kartzinel TR, Eveson JP (2019) Counting with DNA in metabarcoding studies: How should we convert sequence reads to dietary data? *Mol Ecol* 28:391-406. <https://doi.org/10.1111/mec.14734>
- Díaz-Abad L, Bacco-Mannina N, Madeira FM, Neiva J, Aires T, Serrao EA, Regalla A, Patrício AR, Frade PR (2022) eDNA metabarcoding for diet analyses of green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Mar Biol* 169:18. <https://doi.org/10.1007/s00227-021-04002-x>
- Dufault MN, Olson ZH, Mellone DM, Flanders KR, Ono KA (2021) Flatfish may be underestimated in the diet of gray seals (*Halichoerus grypus*). *Can J Zool* 99:227-234. <https://doi.org/10.1139/cjz-2020-0145>

- Emami-Khoyi A, Hartley DA, Paterson AM, Boren LJ, Cruickshank RH, Ross JG, Murphy EC, Else T-A (2016) Identifying prey items from New Zealand fur seal (*Arctocephalus forsteri*) faeces using massive parallel sequencing. *Conserv Genet Resour* 8:343-352. <https://doi.org/10.1007/s12686-016-0560-9>
- Farrell LE, Roman J, Sunquist ME (2000) Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Mol Ecol* 9:1583-1590. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01037.x>
- Flanders K, Olson Z, Ono K (2020) Utilizing next-generation sequencing to identify prey DNA in western North Atlantic grey seal *Halichoerus grypus* diet. *Mar Ecol Prog Ser* 655:227-240. <https://doi.org/10.3354/meps13520>
- Frantzen MAJ, Silk JB, Ferguson JWH, Wayne RK, Kohn MH (1998) Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Mol Ecol* 7:1423-1428. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00449.x>
- Frederiksen M, Edwards M, Richardson AJ, Halliday NC, Wanless S (2006) From plankton to top predators: bottom-up control of a marine food web across four trophic levels. *J Anim Ecol* 75:1259-1268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2006.01148.x>
- Fry B (2006) *Stable Isotope Ecology*, Springer. Springer New York, New York, NY
- Furness R, Camphuysen K (1997) Seabirds as monitors of the marine environment. *ICES J Mar Sci* 54:726-737. <https://doi.org/10.1006/jmsc.1997.0243>
- Gosselin EN, Lonsinger RC, Waits LP (2017) Comparing morphological and molecular diet analyses and fecal DNA sampling protocols for a terrestrial carnivore. *Wildl Soc Bull* 41:362-369. <https://doi.org/10.1002/wsb.749>
- Granquist SM, 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 Biol* 41:2199-2210. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2354-x>

- Greenstone MH, Rowley DL, Weber DC, Payton ME, Hawthorne DJ (2007) Feeding mode and prey detectability half-lives in molecular gut-content analysis: an example with two predators of the Colorado potato beetle. *Bull Entomol Res* 97:201-209. <https://doi.org/10.1017/S000748530700497X>
- Grellier K, Hammond PS (2006) Robust digestion and passage rate estimates for hard parts of grey seal (*Halichoerus grypus*) prey. *Can J Fish Aquat Sci* 63:1982-1998. <https://doi.org/10.1139/F06-092>
- Guillerault N, Bouletreau S, Iribar A, Valentini A, Santoul F (2017) Application of DNA metabarcoding on faeces to identify European catfish *Silurus glanis* diet. *J Fish Biol* 90:2214-2219. <https://doi.org/10.1111/jfb.13294>
- Härkönen T (1986) Guide to the otoliths of the bony fishes of the Northeast Atlantic. 256 pp. Danbiu ApS. Biological Consultants, Hellerup, Denmark.
- Harris JD (2003) Can you bank on GenBank? *Trends Ecol Evol* 18:317-319. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00150-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00150-2)
- Harvey JT (1989) Assessment of errors associated with harbour seal (*Phoca vitulina*) faecal sampling. *J Zool* 219:101-111. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1989.tb02569.x>
- Harwood JD, Desneux N, Yoo HJS, Rowley DL, Greenstone MH, Obrycki JJ, O'Neil RJ (2007) Tracking the role of alternative prey in soybean aphid predation by *Orius insidiosus*: a molecular approach. *Mol Ecol* 16:4390-4400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03482.x>
- Hernández-Milián G (2014) Trophic role of small cetaceans and seals in Irish waters. University College Cork, Ireland. Thèse de doctorat. 404 pp. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.11845.24803>
- Höss M, Kohn M, Pääbo S, Knauer F, Schröder W (1992) Excrement analysis by PCR. *Nature* 359:199-199. <https://doi.org/10.1038/359199a0>
- Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch D (2007) Accuracy and quality

- of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biol* 8:R143. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-7-r143>
- Hyslop EJ (1980) Stomach contents analysis-a review of methods and their application. *J Fish Biol* 17:411-429. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1980.tb02775.x>
- Jang-Liaw NH (2021) A barcoding-based scat-analysis assessment of Eurasian otter *Lutra lutra* diet on Kinmen Island. *Ecol Evol* 11:8795-8813. <https://doi.org/10.1002/ece3.7712>
- Jarman SN, Gales NJ, Tierney M, Gill PC, Elliott NG (2002) A DNA-based method for identification of krill species and its application to analysing the diet of marine vertebrate predators. *Mol Ecol* 11:2679-2690. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01641.x>
- Jarman SN, Deagle BE, Gales NJ (2004) Group-specific polymerase chain reaction for DNA-based analysis of species diversity and identity in dietary samples. *Mol Ecol* 13:1313-1322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02109.x>
- Jarman SN, McInnes JC, Faux C, Polanowski AM, Marthick J, Deagle BE, Southwell C, Emmerson L (2013) Adélie Penguin Population Diet Monitoring by Analysis of Food DNA in Scats. *PLoS One* 8:e82227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082227>
- Jeanniard-du-Dot T, Thomas A, Cherel Y, Trites A, 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. *Mar Ecol Prog Ser* 584:1-16. <https://doi.org/10.3354/meps12381>
- Jimbo M, Kita YF, Kobayashi M, Mitani Y (2021) Intraspecific differences in the diet of Kuril harbor seals (*Phoca vitulina stejnegeri*) in Erimo, Hokkaido, using DNA barcoding diet analysis. *Mammal Res* 66:553-563. <https://doi.org/10.1007/s13364-021-00586-3>
- Kartzinel TR, Chen PA, Coverdale TC, Erickson DL, Kress WJ, Kuzmina ML, Rubenstein DI, Wang W, Pringle RM (2015) DNA metabarcoding illuminates

- dietary niche partitioning by African large herbivores. Proc Natl Acad Sci U S A 112:8019-8024. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503283112>
- Kasper ML, Reeson AF, Cooper SJB, Perry KD, Austin AD (2004) Assessment of prey overlap between a native (*Polistes humilis*) and an introduced (*Vespula germanica*) social wasp using morphology and phylogenetic analyses of 16S rDNA. Mol Ecol 13:2037-2048. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02193.x>
- Keszka S, Panicz R, Stepanowska K, Biernaczyk M, Wrzecionkowski K, Zybala M (2020) Characteristics of the grey seal (*Halichoerus grypus*) diet in the Vistula River mouth (Mewia Łacha Nature Reserve, southern Baltic Sea), based on the osteological and molecular studies of scat samples. Oceanologia 62:387-394. <https://doi.org/10.1016/j.oceano.2020.04.005>
- Kim J, Lee WY, Park S (2022) Trophic relations based on fecal DNA in tundra terrestrial food webs near Kongsfjorden, Svalbard, Norway. Polar Biol 45:615-625. <https://doi.org/10.1007/s00300-022-03022-7>
- King RA, Read DS, Traugott M, Symondson WOC (2008) Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. Mol Ecol 17:947-963. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03613.x>
- Leopold MF, Begeman L, van Bleijswijk JDL, IJsseldijk LL, Witte HJ, Gröne A (2015) Exposing the grey seal as a major predator of harbour porpoises. Proc R Soc B Biol Sci 282:20142429. <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 Sci Publ 6:177-196. <https://doi.org/10.7557/3.2733>
- Martin D, Ross R, Quetin L, Murray A (2006) Molecular approach (PCR-DGGE) to diet analysis in young Antarctic krill *Euphausia superba*. Mar Ecol Prog Ser 319:155-165. <https://doi.org/10.3354/meps319155>
- Massey AL, Roffler GH, Vermeul T, Allen JM, Levi T (2021) Comparison of mechanical sorting and DNA metabarcoding for diet analysis with fresh and degraded wolf

- scats. *Ecosphere*. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3557>
- Matejusová I, Doig F, Middlemas SJ, Mackay S, Douglas A, Armstrong JD, Cunningham CO, Snow M (2008) Using quantitative real-time PCR to detect salmonid prey in scats of grey *Halichoerus grypus* and harbour *Phoca vitulina* seals in Scotland - an experimental and field study. *J Appl Ecol* 45:632-640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.01429.x>
- McCosker C, Flanders K, Ono K, Dufault M, Mellone D, Olson Z (2020) Metabarcoding Fecal DNA Reveals Extent of *Halichoerus grypus* (Gray Seal) Foraging on Invertebrates and Incidence of Parasite Exposure. *Northeast Nat* 27:681-700. <https://doi.org/10.1656/045.027.0409>
- McInnes JC, Jarman SN, Lea M-A, Raymond B, Deagle BE, Phillips RA, Catry P, Stanworth A, Weimerskirch H, Kusch A, Gras M, Cherel Y, Maschette D, Alderman R (2017a) DNA Metabarcoding as a Marine Conservation and Management Tool: A Circumpolar Examination of Fishery Discards in the Diet of Threatened Albatrosses. *Front Mar Sci* 4:1-22. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00277>
- McInnes JC, Alderman R, Deagle BE, Lea M, Raymond B, Jarman SN (2017b) Optimised scat collection protocols for dietary DNA metabarcoding in vertebrates. *Methods Ecol Evol* 8:192-202. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12677>
- Michaux J, Dyck M, Boag P, Loughheed S, Van Coeverden de Groot P (2021) new insights on polar bear (*Ursus maritimus*) diet from faeces based on next-generation sequencing technologies. *Arctic* 74:87-99. <https://doi.org/10.14430/arctic72239>
- Monterroso P, Godinho R, Oliveira T, Ferreras P, Kelly MJ, Morin DJ, Waits LP, Alves PC, Mills LS (2019) Feeding ecological knowledge: the underutilised power of faecal DNA approaches for carnivore diet analysis. *Mamm Rev* 49:97-112. <https://doi.org/10.1111/mam.12144>
- Mumma MA, Adams JR, Zieminski C, Fuller TK, Mahoney SP, Waits LP (2016) A comparison of morphological and molecular diet analyses of predator scats. *J*

- Mammal 97:112-120. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyv160>
- Murphy MA, Kendall KC, Robinson A, Waits LP (2007) The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification. *Conserv Genet* 8:1219-1224. <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9264-0>
- Nakamura I, Watanabe Y, Papastamatiou Y, Sato K, Meyer C (2011) Yo-yo vertical movements suggest a foraging strategy for tiger sharks *Galeocerdo cuvier*. *Mar Ecol Prog Ser* 424:237-246. <https://doi.org/10.3354/meps08980>
- Newsome SD, Tinker MT, Monson DH, Oftedal OT, Ralls K, Staedler MM, Fogel ML, Estes JA (2009) Using stable isotopes to investigate individual diet specialization in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Ecology* 90:961-974. <https://doi.org/10.1890/07-1812.1>
- Oehm J, Juen A, Nagiller K, Neuhauser S, Traugott M (2011) Molecular scatology: how to improve prey DNA detection success in avian faeces? *Mol Ecol Resour* 11:620-628. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03001.x>
- Olesiuk PF, Bigg MA, Ellis GM, Crockford SJ, Wigen RJ (1990) An assessment of the feeding habits of harbour seals (*Phoca vitulina*) in the Strait of Georgia, British Columbia, Based on Scat Analysis, Nanaimo, B.
- Orr AJ, Laake JL, Dhruv ML, Banks AS, DeLong RL, Huber HR (2003) Comparison of processing pinniped scat samples using a washing machine and nested sieves. *Wildl Soc Bull* 31:253-257. <https://www.jstor.org/stable/3784381>
- Pääbo S, Irwin DM, Wilson AC (1990) DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *J Biol Chem* 265:4718-4721. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)39621-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)39621-8)
- Panasci M, Ballard WB, Breck S, Rodriguez D, Densmore LD, Wester DB, Baker RJ (2011) Evaluation of fecal DNA preservation techniques and effects of sample age and diet on genotyping success. *J Wildl Manage* 75:1616-1624. <https://doi.org/10.1002/jwmg.221>

- Parker LD, Quinta JD, Rivera I, Cypher BL, Kelly EC, Campana MG, Fleischer RC, Boarman R, Boarman WI, Maldonado JE (2022) Genetic analyses are more sensitive than morphological inspection at detecting the presence of threatened Mojave desert tortoise (*Gopherus agassizii*) remains in canid scat and raven pellets. *Conserv Sci Pract* 1-11. <https://doi.org/10.1111/csp2.12689>
- Parsons KM, Piertney SB, Middlemas SJ, Hammond PS, Armstrong JD (2005) DNA - based identification of salmonid prey species in seal faeces. *J Zool* 266:275-281. <https://doi.org/10.1017/S0952836905006904>
- Passmore AJ, Jarman SN, Swadling KM, Kawaguchi S, McMinn A, Nicol S (2006) DNA as a Dietary Biomarker in Antarctic Krill, *Euphausia superba*. *Mar Biotechnol* 8:686-696. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-6088-8>
- Phillips EM, Harvey JT (2009) A captive feeding study with the Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardii*): Implications for scat analysis. *Mar Mammal Sci* 25:373-391. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2008.00265.x>
- Pianka ER (1976) Natural Selection of Optimal Reproductive Tactics. *Am Zool* 16:775-784. <https://doi.org/10.1093/icb/16.4.775>
- Pierce GJ, Boyle PR (1991) A Review of Methods for Diet Analysis in Piscivorous Marine Mammals. *Oceanogr Mar Biol An Annu Rev* 29:409-486.
- Piñol J, Senar MA, Symondson WOC (2019) The choice of universal primers and the characteristics of the species mixture determine when DNA metabarcoding can be quantitative. *Mol Ecol* 28:407-419. <https://doi.org/10.1111/mec.14776>
- Planque Y (2021) Écologie trophique de deux espèces sympatriques de phoques en périphérie de leur aire de répartition. La Rochelle Université (France). Thèse de doctorat. 368 pp. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03720984/>
- 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). *Ecol Evol* 11:10004-10025. <https://doi.org/10.1002/ece3.7739>

- Pompanon F, Deagle BE, Symondson WOC, Brown DS, Jarman SN, Taberlet P (2012) Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Mol Ecol* 21:1931-1950. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05403.x>
- Post DM (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: Models, methods, and assumptions. *Ecology* 83:703-718. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[0703:USITET\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[0703:USITET]2.0.CO;2)
- Purcell M, Mackey G, LaHood E, Huber H, Park L (2004) Molecular methods for the genetic identification of salmonid prey from Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*) scat. *Fish Bull* 102:213-220. <http://hdl.handle.net/1834/30897>
- Qiu X, Wu L, Huang H, McDonel PE, Palumbo A V., Tiedje JM, Zhou J (2001) Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Environ Microbiol* 67:880-887. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.880-887.2001>
- Read DS, Sheppard SK, Bruford MW, Glen DM, Symondson WOC (2006) Molecular detection of predation by soil micro-arthropods on nematodes. *Mol Ecol* 15:1963-1972. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02901.x>
- Richardson K, Gales N (1987) Functional-morphology of the alimentary-tract of the Australian sea-lion, *Neophoca-Cinerea*. *Aust J Zool* 35:219. <https://doi.org/10.1071/ZO9870219>
- Ridoux V, Spitz J, Vincent C, Walton M j. (2007) Grey seal diet at the southern limit of its European distribution: combining dietary analyses and fatty acid profiles. *J Mar Biol Assoc United Kingdom* 87:255-264. <https://doi.org/10.1017/S002531540705463X>
- Salinger A (2021) Feeding ecology of harbor seals (*Phoca vitulina*) in the outer Oslofjord quantified by DNA metabarcoding of scat soft-matrix and morphological analysis of hard prey remains. The Arctic University of Norway. Thèse de Master. 83 pp. <https://munin.uit.no/handle/10037/22480>
- Schiønning MK, Gosch M, Dillane E, Cronin M, Jessopp MJ (2021) Genetic evidence

- for seasonal consumption of monkfish (*Lophius* spp.) and salmonids (*Salmo* spp.) by gray seals. *Mar Mammal Sci* 37:533-545. <https://doi.org/10.1111/mms.12768>
- Seutin G, White BN, Boag PT (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Can J Zool* 69:82-90. <https://doi.org/10.1139/z91-013>
- Sheppard SK, Henneman ML, Memmott J, Symondson WOC (2004) Infiltration by alien predators into invertebrate food webs in Hawaii: a molecular approach. *Mol Ecol* 13:2077-2088. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02216.x>
- Spitz J, Mariotti L, Ridoux V, Caillot E, Elder JF (2010) The diet of harbour seals (*Phoca vitulina*) at the southern limit of its European distribution (Normandy, France). *NAMMCO Sci Publ* 8:313-328. <https://doi.org/10.7557/3.2696>
- Spitz J, Cherel Y, Bertin S, Kiszka J, Dewez A, Ridoux V (2011) Prey preferences among the community of deep-diving odontocetes from the Bay of Biscay, Northeast Atlantic. *Deep Sea Res Part I Oceanogr Res Pap* 58:273-282. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2010.12.009>
- Spitz J, Dupuis L, Becquet V, Dubief B, Trites AW (2015) Diet of the harbour seal *Phoca vitulina*: implication for the flatfish nursery in the Bay of Somme (English Channel, France). *Aquat Living Resour* 28:11-19. <https://doi.org/10.1051/alr/2015001>
- Spitz J, Ridoux V, Trites AW, Laran S, Authier M (2018) Prey consumption by cetaceans reveals the importance of energy-rich food webs in the Bay of Biscay. *Prog Oceanogr* 166:148-158. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2017.09.013>
- Stearns SC (1992) *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Stenglein JL, De Barba M, Ausband DE, Waits LP (2010) Impacts of sampling location within a faeces on DNA quality in two carnivore species. *Mol Ecol Resour* 10:109-114. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02670.x>
- Stephens DW, Krebs JR (1986) *Foraging Theory*. Princeton University Press, USA.

<https://doi.org/10.1515/9780691206790>

Sutherland RM (2000) Molecular analysis of avian diet. University of Oxford, UK.

Symondson WOC (2002) Molecular identification of prey in predator diets. *Mol Ecol* 11:627-641. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01471.x>

Thomas AC, Jarman SN, Haman KH, Trites AW, Deagle BE (2014) Improving accuracy of DNA diet estimates using food tissue control materials and an evaluation of proxies for digestion bias. *Mol Ecol* 23:3706-3718. <https://doi.org/10.1111/mec.12523>

Thomas AC, Deagle BE, Eveson JP, Harsch CH, Trites AW (2016) Quantitative DNA metabarcoding: improved estimates of species proportional biomass using correction factors derived from control material. *Mol Ecol Resour* 16:714-726. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12490>

Thomas AC, Nelson BW, Lance MM, Deagle BE, Trites AW (2017) Harbour seals target juvenile salmon of conservation concern. *Can J Fish Aquat Sci* 74:907-921. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2015-0558>

Thomas AC, Deagle B, Nordstrom C, Majewski S, Nelson BW, Acevedo-Gutiérrez A, Jeffries S, Moore J, Louden A, Allegue H, Pearson S, Schmidt M, Trites AW (2022) Data on the diets of Salish Sea harbour seals from DNA metabarcoding. *Sci Data* 9:68. <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01152-5>

Tollit D, Fritz L, Joy R, Miller K, Schulze A, Thomason J, Walker W, Zeppelin T, Gelatt T (2017) Diet of endangered steller sea lions (*Eumetopias jubatus*) in the aleutian islands: New insights from DNA detections and bioenergetic reconstructions. *Can J Zool* 95:853-868. <https://doi.org/10.1139/cjz-2016-0253>

Tollit DJ, Wong M, Winship AJ, Rosen DAS, Trites AW (2003) Quantifying errors associated with using prey skeletal structures from fecal samples to determine the diet of Steller's sea lion (*Eumetopias jubatus*). *Mar Mammal Sci* 19:724-744. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2003.tb01127.x>

- Tollit DJ, Schulze AD, Trites AW, Olesiuk PF, Crockford SJ, Gelatt TS, Ream RR, Miller KM (2009) Development and application of DNA techniques for validating and improving pinniped diet estimates. *Ecol Appl* 19:889-905. <https://doi.org/10.1890/07-1701.1>
- Tollit DU, Steward MJ, Thompson PM, Pierce GJ, Santos MB, Hughes S (1997) Species and size differences in the digestion of otoliths and beaks: Implications for estimates of pinniped diet composition. *Can J Fish Aquat Sci* 54:105-119. <https://doi.org/10.1139/f96-264>
- Trites AW, Joy R (2005) Dietary Analysis from Fecal Samples: How Many Scats are Enough? *J Mammal* 86:704-712. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2005\)086\[0704:DAFFSH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2005)086[0704:DAFFSH]2.0.CO;2)
- Trites AW, Spitz J (2018) Prey Consumption. In: *Encyclopedia of marine mammals*, (Third Edition) Academic Press, London, England, UK. p783-785. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804327-1.00208-9>
- Tuset VM, Lombarte A, Assis CA (2008) Otolith atlas for the western Mediterranean, north and central eastern Atlantic. *Sci Mar* 72:7-198. <https://doi.org/10.3989/scimar.2008.72s17>
- van Neer A, Jensen LF, Siebert U (2015) Grey seal (*Halichoerus grypus*) predation on harbour seals (*Phoca vitulina*) on the island of Helgoland, Germany. *J Sea Res* 97:1-4. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2014.11.006>
- 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. *J Sea Res* 148-149:12-16. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2019.03.004>
- van Neer A, Gross S, Kesselring T, Grilo ML, Ludes-Wehrmeister E, Roncon G, Siebert U (2021) Assessing seal carcasses potentially subjected to grey seal predation. *Sci Rep* 11:694. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80737-9>
- Vesterinen EJ, Ruokolainen L, Wahlberg N, Peña C, Roslin T, Laine VN, Vasko V,

- Sääksjärvi IE, Norrdahl K, Lilley TM (2016) What you need is what you eat? Prey selection by the bat *Myotis daubentonii*. *Mol Ecol* 25:1581-1594. <https://doi.org/10.1111/mec.13564>
- Vestheim H, Jarman SN (2008) Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples – a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Front Zool* 5:12. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-5-12>
- Williams KE, Huyvaert KP, Piaggio AJ (2016) No filters, no fridges: A method for preservation of water samples for eDNA analysis. *BMC Res Notes* 9:1-5. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2104-5>
- Wilson LJ, Hammond PS (2019) The diet of harbour and grey seals around Britain: Examining the role of prey as a potential cause of harbour seal declines. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 29:71-85. <https://doi.org/10.1002/aqc.3131>
- Wilson RP (1984) An improved stomach pump for penquins and other seabirds. *J F Ornithol* 55:109-112. <https://doi.org/10.2307/4512864>
- Xiong M, Wang D, Bu H, Shao X, Zhang D, Li S, Wang R, Yao M (2017) Molecular dietary analysis of two sympatric felids in the Mountains of Southwest China biodiversity hotspot and conservation implications. *Sci Rep* 7:41909. <https://doi.org/10.1038/srep41909>
- Zaidi RH, Jaal Z, Hawkes NJ, Hemingway J, Symondson WOC (1999) Can multiple-copy sequences of prey DNA be detected amongst the gut contents of invertebrate predators? *Mol Ecol* 8:2081-2087. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00823.x>

## Annexes

**Annexe 1** – Exemples de protocoles utilisés dans différentes études pour analyser l’ADN contenu dans des fèces, avec des approches de biologie moléculaire, pour évaluer le régime alimentaire de prédateurs (exemples sur des pinnipèdes des articles **1** à **15**, sur d’autres espèces des articles **18** à **28**, et deux revues discutant des protocoles possibles aux articles **16** et **17**).

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l’échantillon	Principaux objectifs de l’étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
<b>1</b>	<b>Deagle et al. (2005)</b> [Otaries de Steller ( <i>Eumetopias jubatus</i> )]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fèces d’animaux captifs, échantillonnées sur le reposoir à sec, ou récupérées dans le réservoir à vidange du bassin.</li> <li>• 4 fèces à chaque collecte.</li> </ul>	<p>Pour chaque fèces collectée, <b>trois petits sous-échantillons</b> (2–3 ml de matière fécale) obtenus à partir de <b>lobes fécaux distincts</b>.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Reste du fèces</u> (ou des portions aléatoires de plusieurs lobes quand volume de la fèces élevé, &gt; 250 ml) → <b>mixé</b> pour former un mix final de l’échantillon.</li> <li>• Fèces préservées dans un <b>volume d’éthanol</b> (95%) de trois à cinq fois plus grand que le volume de l’échantillon.</li> </ul> <p><u>Préparation pour extraction de l’ADN :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Échantillons re-suspendus dans éthanol et ensuite 1.5 ml de l’éthanol/fèces prélevé et centrifugé.</li> <li>• Éthanol supprimé par évaporation.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Tests effectués sur des animaux en captivité (régime alimentaire contrôlé).</li> <li>○ Tests pour identifier les proies détectées dans les fèces d’otaries par analyses de l’ADN, et pour comparer les résultats au régime alimentaire réel donné aux animaux (alimentation contrôlée).</li> <li>● Extraction ADN avec QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).</li> <li>● Séquençage (16S ADN ribosomal) → cible PCR.</li> </ul>

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
2	<b>Parsons et al. (2005)</b> [Phoques gris ( <i>Halichoerus grypus</i> )]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fèces d'un animal en captivité, collectées lorsque les bassins sont nettoyés.</li> <li>Fèces prélevées avec une spatule en bois stérile et préservées dans une solution de Diméthylsulfoxyde DMSO/NaCl (pour un volume égal à 20% de DMSO/NaCl).</li> <li>Fèces en solution stockées à -20°C ou à -80°C.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Deux sous-échantillons prélevés aléatoirement sur chaque fèces congelée.</b></li> <li>ADN total extrait de chaque sous-échantillon.</li> <li>Environ 0.30 g de matière fécale congelée utilisé pour l'extraction de chaque fèces, et ADN génomique diluée dans un volume final de 100 µL en utilisant un tampon d'éluion (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique)).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Développement et validation de marqueurs (amorces) de détection des salmonidés par ADN, afin d'aider à leur détection dans des fèces de pinnipèdes.</li> <li>○ Tests effectués sur un phoque gris en captivité (régime alimentaire contrôlé, exclusivement nourri d'espèces de salmonidés).</li> <li>● Extraction ADN avec un kit DNACe spin stool (Bioline cat. BIO-28050).</li> </ul>
3	<b>Deagle et Tollit (2007)</b> [Otaries de Steller ( <i>Eumetopias jubatus</i> )]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fèces d'animaux captifs, échantillonnées sur le reposoir à sec, ou récupérées dans le réservoir à vidange du bassin.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Fèces mixées</b> et préservées dans de l'éthanol (95%).</li> <li>Idem <b>Deagle et al. (2005) [1]</b>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Tests effectués sur des animaux en captivité (régime alimentaire contrôlé).</li> <li>○ Quantification à partir de l'ADN de proies dans les fèces de pinnipèdes → tests pour voir si cela permet une bonne estimation du régime alimentaire.</li> <li>● PCR en temps réel qPCR pour quantification de l'ADN mitochondrial (mtDNA) dans les tissus non digérés.</li> </ul>
4	<b>Matejusová et al. (2008)</b> [Phoques veaux-marins ( <i>Phoca vitulina</i> ) et	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fèces de phoques veaux-marins et gris collectées sur les reposoirs, au moment où un pic de présence de salmonidés est attendu dans ce secteur.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Deux méthodes de sous-échantillonnage et de stockage</b>, en fonction des années d'échantillonnage :</li> <li><b>2003</b> → un sous-échantillon de 2g conservé dans de l'éthanol absolu (100%) pour extraction d'ADN</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Détection des proies de salmonidés dans le régime alimentaire de phoques, par utilisation d'une méthode de PCR quantitative en temps réel (qPCR) dans les fèces.</li> </ul>

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
	Phoques gris ( <i>Halichoerus grypus</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>Comptages du nombre de phoques effectués avant collecte. Si plus de 90% des individus du reposoir étaient attribués à une espèce, les fèces étaient attribuées à cette espèce. Pour les groupes d'individus mixés, et sur les zones où les phoques ont pu bouger auparavant, les fèces ont été associées à une espèce indéterminée de phoques.</li> <li>Chaque fèces individuelle a été placée dans un sac en polyéthylène scellé, afin d'éviter toute contamination croisée.</li> </ul>	<p>ultérieure. Le reste de la fèces a été <u>congelé à -20°C</u> pour des analyses ultérieures des parties dures.</p> <p><b>2005</b> → pour conserver une plus grande quantité de matière fécale, les parties dures ont été retirées manuellement avec une pince. Le reste de la fèces a été <u>stockées à -80°C pour extraction ultérieure</u> de l'ADN.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><b>2003</b> → <u>Sous-échantillonnage d'environ 350 mg</u>, lavé dans de l'eau distillée avant extraction d'ADN.</li> <li><b>2005</b> → décongélation jusqu'à ce qu'il soit possible de <u>mixer la crotte</u>, avant extraction, pour <u>compenser l'erreur possible due au sous-échantillonnage</u>.</li> </ul> <p>3 sous-échantillons de 200 mg environ, transférés dans un unique tube de centrifugeuse de 2 ml. Ajout de tampon ASL (suivant le kit d'extraction de Qiagen) et broyage des tissus pendant 2 min à 20 Hz (avec un <i>TissueLyser</i>, Qiagen).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Extraction de l'ADN avec QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen)</li> <li>qPCR.</li> </ul>
5	<b>Deagle et al. (2009)</b> [Otaries à fourrure]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fèces humides collectées sur les reposoirs pour analyses des pièces dures</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>L'ensemble des dépôts de matière fécale ont été collectés pour l'analyse des parties dures.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Estimation du régime alimentaire de pinnipèdes par l'analyse de l'ADN de proies dans les fèces.</li> </ul>

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
	d'Afrique du Sud-Australie ( <i>Arctocephalus pusillus doriferus</i> )	diagnostiques et pour analyse de l'ADN.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pour l'extraction de l'ADN, <b><u>environ 50 ml de matière fécale ont été sous-échantillonnées aux lobes de la fèces.</u></b></li> <li>• Le prélèvement a ensuite été <b><u>totalemtent mixé dans 50 ml d'éthanol (95%).</u></b> Le total de 100 ml a été stocké dans un bouchon à vis.</li> <li>• ADN extrait à partir de la forme amorphe de la matrice souple des sous-échantillons (50-100 mg) dans les 60 jours de collection.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Comparaison du régime alimentaire obtenu par ADN avec celui obtenu avec les pièces dures diagnostiques.</li> <li>→ résultats similaires entre les deux techniques, mais diversité moindre avec les pièces dures.</li> <li>• Même procédé d'extraction de l'ADN que <a href="#">Deagle et al. (2005)</a>.</li> <li>• Approche par pyroséquençage (remarque : rapide et à moindre coût que la méthode de Sanger)</li> </ul>
6	<b>Tollit et al. (2009)</b> [Otaries de Steller ( <i>Eumetopias jubatus</i> )]	• Collecte de fèces (essentiellement fraîches) sur les reposoirs. Quelques fèces plus « anciennes ».	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b><u>Sous-échantillons de la partie molle préservés dans les 24 heures</u></b> en pressant délicatement la matière fécale à travers un plastique de maille de 0.5 mm, avec une spatule. <b><u>2-3 ml de la matrice molle</u></b> (sans parties dures) ont été <b><u>placés dans ~ 15 ml d'éthanol (95%)</u></b> puis mélangés.</li> <li>• Reste des fèces nettoyé en machine à laver, pour analyse des pièces dures diagnostiques.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Méthode de PCR-DGGE (voir <a href="#">King et al. 2008</a>).</li> <li>• Séquençage ADN (16S).</li> </ul>
7	<b>Thomas et al. (2014)</b> [Phoques veaux-marins]	• Fèces d'animaux captifs, collectées dans la piscine ou sur le reposoir à terre (pour information, aucune différence de régime	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extraction de l'ADN effectuée sur environ <b><u>20 mg du sédiment de fèces</u></b> (dont les parties dures ont été enlevées).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Améliorer la précision dans l'évaluation du régime alimentaire par l'analyse de l'ADN dans les fèces.</li> <li>○ Phoques élevés en <u>captivités</u> et nourris avec un régime alimentaire</li> </ul>

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
	( <i>Phoca vitulina</i> )	<p>alimentaire estimé n'a été identifiée entre les deux méthodes, <a href="#">Bowles et al. 2011</a>).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fèces généralement collectées dans les 2-4h après leur production, et immédiatement congelées à -20°C.</li> </ul>		<p>contrôlé, afin de le comparer à celui évalué à partir des fèces (analyses d'ADN).</p> <p>○ Générer des facteurs de correction de la dégradation des tissus liés à la digestion, en fonction des proies (<i>Tissue Correction Factors</i>, TCFs). Basés sur la comparaison entre l'alimentation contrôlée et les résultats issus des analyses ADN.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Extraction de l'ADN avec le kit QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen). Élué dans 100 µL de buffer (voir <a href="#">Deagle et al. 2005</a>).</li> <li>• Séquençage (Ion OneTouch™ System).</li> </ul>
8	<p><a href="#">Emami-Khoyi et al. (2016)</a></p> <p>[Otaries à fourrure (<i>Arctocephalus forsteri</i>)]</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fèces fraîches collectées sur les reposoirs.</li> <li>• Les fèces ont été collectées si elles étaient espacées à plus de 2 mètres l'une de l'autre, afin de minimiser la probabilité d'échantillonner deux fois les excréments d'un même individu.</li> <li>• Les fèces entières ont été transférées immédiatement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'ADN de proies est considéré comme étant <b><u>hétérogène au sein d'un échantillon de fèces</u></b> (<a href="#">Matejusová et al. 2008</a>).</li> <li>• Ainsi, les fèces ont été <b><u>mixées rigoureusement en utilisant un agitateur à peinture jetable monté sur une perceuse électrique</u></b>.</li> <li>• L'ADN génomique a été extrait dans un <b><u>sous-échantillon de 5 à 10 g de coulis de fèces</u></b> (<i>scat slurry</i>).</li> </ul>	<p>○ Évaluation du régime alimentaire d'otaries : identification de leurs proies dans des contenus de fèces par utilisation de « séquençages parallèles massifs ».</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Extraction de l'ADN effectué avec le kit MO BIO Power Max Soil (Catalogue number 12988-10).</li> <li>• Séquençages parallèles massifs.</li> </ul>

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
		dans de l'éthanol (99%), puis congelées à -4°C avant une future extraction de l'ADN (environ 1 mois après la collecte).	• ADN extrait, puis <b>préservé à -20°C</b> jusqu'aux analyses ultérieures.	
9	<b>Jeanniard-Dot et al. (2017)</b> [Otaries à fourrure du Nord ( <i>Callorhinus ursinus</i> )]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Collecte de fèces d'otaries (principalement femelles) sur les reposoirs.</li> <li>• Congélation à -20°C avant de futures analyses.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Fèces décongelées et transférées sur un filtre en nylon</b> d'une maille de « filtre à peinture », sur un bac de 500 ml.</li> <li>• Solution d'<b>éthanol (95%) ajoutée aux échantillons</b>, et la matrice molle de la fèces séparée des pièces dures diagnostiques par <b>homogénéisation manuelle</b>. → parties dures écartées et analysées.</li> <li>• La <b>matrice matière fécale + éthanol</b>, précédemment préservée, a été sous-échantillonnées pour analyses génétiques.</li> <li>• Extraction de l'ADN effectuée selon le protocole proposé par <b>Thomas et al. (2014)</b> sur environ <b>20 mg du sédiment de matière fécale</b> de la même fèces.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Identifier les stratégies alimentaires à l'échelle populationnelle avec différentes approches complémentaires (contenu de fèces par analyse des pièces dures diagnostiques, par analyse de l'ADN de reste de proies dans les fèces, et par analyse d'isotopes stables).</li> <li>○ Combinaison des différents résultats (pièces dures et ADN) pour avoir une compréhension intégrée du régime alimentaire.</li> <li>• Extraction de l'ADN avec le kit QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen).</li> <li>• Metabarcoding de l'ADN.</li> </ul>
10	<b>Flanders et al. (2020)</b>	• Fèces collectées sur les reposoirs.	• <b>Sous-échantillonnage d'environ 5 ml sur chaque fèces</b> , pour analyses de biologie moléculaire.	○ Utiliser une nouvelle génération de séquençage pour identifier l'ADN de proies dans le régime alimentaire de phoques gris.

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
	[Phoques gris ( <i>Halichoerus grypus</i> )]	• Placées dans des sacs, et dans de la glace jusqu'à l'arrivée en laboratoire.	→ <b>pris aléatoirement dans un mix de la fèces</b> , mélangée manuellement avec une spatule en bois.  • Placés dans de l' <b>éthanol à 100%</b> , et <b>stockés à -20°C</b> avant extraction.  • Préparation des échantillons pour extraction :  (1) décanter l'excès d'éthanol (2) absorber les résidus d'éthanol dans l'échantillon avec une lingette sèche pour fibre optique (Kimwipe®) (3) laisser évaporer l'éthanol restant à l'air ambiant, jusqu'à ce que l'échantillon soit visuellement sec (4) isoler environ <b>200 mg de l'échantillon pour extraction</b> .	• Extraction de l'ADN effectuée avec le DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)  • Séquençage de nouvelle génération.
11	<b>Keszka et al. (2020)</b> [Phoques gris ( <i>Halichoerus grypus</i> )]	• Fèces collectées sur les reposoirs.  • Fèces stockées à -20°C.	• <b>Sous-échantillons</b> pour analyses de biologie moléculaire → récupérés par un <b>forage de 6 mm de diamètre dans la fèces congelée</b> .	○ Identification du régime alimentaire par analyse des pièces dures de proies non digérées et par ADN.  • Extraction de l'ADN et amplification par PCR. Séquençage de Sanger.
12	<b>McCosker et al. (2020)</b>	• Fèces collectées sur les reposoirs. Uniquement des fèces fraîches (environ 12h max depuis la production)	• Directement au retour de terrain, au laboratoire, chaque échantillon a été <b>manuellement homogénéisé</b> .	○ Étudier le régime alimentaire de phoques gris, et y mesurer la présence d'invertébrés, par analyses de l'ADN de proies dans des fèces (metabarcoding).

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
	[Phoques gris ( <i>Halichoerus grypus</i> )]	pour avoir la meilleure qualité d'ADN possible. • Chaque fèces a été placée dans un sac avec une spatule en bois ou une cuillère en plastique à usage unique • Stockées dans de la glace jusqu'à l'arrivée au laboratoire.	• Environ <b>5 ml de chaque fèces</b> a été <b>sous-échantillonné</b> , préservé dans de l' <b>éthanol (70%)</b> , et <b>stockés à -20°C</b> pour extraction ultérieure de l'ADN. • Reste de l'échantillon congelé à -20°C pour analyses ultérieures (analyse des pièces dures diagnostiques). • Analyse des pièces diagnostiques faite suivant un protocole classique, mais avec également avec des tamis successifs de mailles différentes (plus grandes à plus petites).	Mesure également de l'incidence d'exposition aux parasites. ○ Résultats combinés avec l'analyse des pièces dures diagnostiques dans les fèces. • Extraction de l'ADN avec le DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) • Metabarcoding.
13	<b>Dufault et al. (2021)</b> [Phoques gris ( <i>Halichoerus grypus</i> )]	• Fèces collectées sur les repositoires. • Une fois arrivées au laboratoire, placées dans de la glace, et les étapes suivantes effectuées immédiatement.	• Réalisation d'un <b>sous-échantillon sur chaque fèces</b> . • Sous-échantillons placés dans de l' <b>éthanol à 70%</b> , puis <b>congelés à -20°C</b> jusqu'à analyses ultérieures.	○ Quantifier la présence de poissons plats dans le régime alimentaire de phoques gris par analyse d'ADN de proies dans des fèces. ○ Enjeu autour des poissons plats qui pourraient être sous-représentés dans les analyses de traditionnelles (pièces dures diagnostiques). • Analyses d'ADN dans des individus proies et dans des restes de fèces de phoques. • qPCR.

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
14	<b>Jimbo et al. (2021)</b> [Phoques veaux-marins ( <i>Phoca vitulina stejnegeri</i> )]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• "Fèces" collectées sur des individus capturés (à 15 cm du colon, à la partie anale). Collectées dans les 12h après la mort.</li> <li>• Échantillons congelés à -20°C pour analyses ultérieures.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Fèces mixées fortement.</b></li> <li>• <b>0.15-0.43g de partie molle</b> de la fèces (sans pièces dures non digérées) prélevée pour analyses.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Évaluer le régime alimentaire des phoques veaux-marins, et sa variabilité intraspécifique pour identifier si certains individus sont plus à l'origine d'une compétition avec la pêche au saumon.</li> <li>• Extraction de l'ADN effectuée avec le DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)</li> <li>• Metabarcoding de l'ADN.</li> </ul>
15	<b>Thomas et al. (2022)</b> [Phoques veaux-marins ( <i>Phoca vitulina</i> )]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fèces collectées sur les reposoirs.</li> <li>• Chaque fèces a été transférée dans un bocal de collection à usage unique de 500 ml, ou dans un sac ziplock doublé d'un filtre à peinture en nylon d'une maille de 126 µm (méthode de <a href="#">Orr et al. 2003</a>). Transfert avec spatule en bois.</li> <li>• Les échantillons ont été préservés selon deux protocoles possibles (selon les conditions de collecte) : - soit par ajout de 300 ml d'éthanol (95%) dans le bocal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Échantillons décongelés</b> (pour ceux congelés), et <b>ajout d'éthanol.</b></li> <li>• <b>Homogénéisation manuelle des échantillons dans l'éthanol</b> avec une spatule en bois, à l'intérieur du filtre à peinture, afin de séparer la matrice fécale des pièces dures de proies.</li> <li>• Filtre à peinture enlevé du bocal, et recongelé pour analyse morphologique des parties dures ultérieurement.</li> <li>• La <b>matrice fécale</b> de chaque échantillon a été <b>sous-échantillonnée (environ 20 mg)</b>, centrifugée, puis séchée pour enlever l'éthanol, avant d'effectuer l'extraction d'ADN.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Identification du régime alimentaire de phoques veaux-marins par metabarcoding de l'ADN.</li> <li>○ Analyses ADN et également des pièces dures diagnostiques.</li> <li>• Extraction de l'ADN avec le DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)</li> <li>• Metabarcoding de l'ADN (marqueurs, 16S de l'ADN mitochondrial).</li> </ul>

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
		- soit par congélation à -20°C dans les 6h suivant la collecte.		
16	<p><b>King et al. (2008)</b></p> <p><b>Revue scientifique</b> sur les bonnes pratiques pour appliquer des approches de biologie moléculaire (ADN) dans des fèces pour évaluer un régime alimentaire.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les fèces doivent être collectées fraîches pour éviter l'activité enzymatique. Les fèces les plus dégradées pourraient générer de faux-négatifs.</li> <li>• Les fèces collectées sur le substrat doivent être évitées, et celles collectées en mer (Jarman et al. 2004) ou en eau douce pourraient être contaminées par des organismes planctoniques.</li> <li>• La préservation se fait essentiellement par congélation (e.g. Read et al. 2006; Martin et al. 2006; Harwood et al. 2007).</li> <li>• D'autres études ont montré que la préservation par éthanol peut aussi être efficace (Kasper et al. 2004;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• De nombreuses études ont montré qu'il était important d'effectuer à la fois une analyse visuelle des restes de proies (i.e. des pièces non digérées) <b>et</b> une PCR, pour mieux évaluer le régime alimentaire (e.g. Casper et al. 2007). Il est alors ici recommandé de conserver la majorité de la part des fèces pour les analyses de parties dures, et <b>une petite quantité pour l'extraction de l'ADN</b> (sous-échantillon(s)).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Une partie de la revue porte sur la collecte d'échantillons de fèces.</li> <li>• De nombreux kits existent pour l'extraction de l'ADN (e.g. Deagle et Tollit 2007; Casper et al. 2007).</li> <li>• La majorité se sont focalisés sur l'ADN mitochondrial pour leurs analyses.</li> <li>• Présentation des différentes méthodes pour détecter (voire quantifier) l'ADN de proies (e.g. séquençage, pyroséquençage, qPCR).</li> </ul>

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
		<p>Sheppard et al. 2004; Greenstone et al. 2007).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Certaines études ont fait les deux (éthanol 70% + congélation) (Sutherland 2000) → efficace. D'autres ont dit que c'était équivalent (Sheppard et al. 2004).</li> <li>• Passmore et al. (2006) → préservation à l'éthanol (80%) supérieure à la congélation.</li> </ul>		
17	<p><b>Monterrosso et al. (2019)</b></p> <p><b>Revue scientifique</b> d'études de régime alimentaire de Carnivores terrestres, effectuées par approches d'ADN dans des fèces.</p>	<p><i>Voir Figure 4 de la revue</i></p> <p><u>Option 1</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Collecter la fèces dans un sac zip-lock propre (ou un flacon) avec un volume de substrat qui n'excède pas celui de la fèces.</li> <li>• Transférer l'échantillon dans un flacon avec de l'alcool éthylique (ETOH) (96%), pour un volume de 1/5<sup>e</sup> (échantillon/ETOH)</li> <li>• Stocker (idéalement à -20°C) pour analyses de</li> </ul>	<p>La <b>fèces entière</b> (<u>option 1</u>) ou <b>une seule partie de la fèces</b> (<u>option 2</u>). Les deux options sont présentées comme possibles, sans information complémentaire sur l'efficacité possible de chacune des méthodes dans l'amplification et la détection d'ADN de proies.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>Revue scientifique</b> sur l'application d'approches d'ADN dans les fèces de carnivores pour évaluer leur régime alimentaire.</li> <li>○ Proposer un résumé des <b>pratiques d'échantillonnage</b>, des analyses possibles, et des enjeux.</li> </ul>

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
		<p>biologie moléculaire ultérieures.</p> <p><u>Option 2</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Prendre un échantillon de la partie externe de la fèces et le mettre dans un tube de 2 ml avec une solution saline de diméthylsulfoxyde (tampon DET).</li> <li>• Le reste de la fèces peut être conservé pour d'autres analyses de régime alimentaire (cf. pièces dures diagnostiques).</li> <li>• Stockage du tube de 2 ml à air ambiant.</li> </ul>		
18	<p><b>Clare et al. (2009)</b> [Chauves-souris rousses (<i>Lasiurus borealis</i>)]</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Echantillons de guano (<i>amas d'excréments</i>) congelés dans les 10h après leur collecte.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b><u>Échantillons entiers</u></b></li> <li>• Chaque échantillon <b><u>trempe 12h dans de l'éthanol (95%)</u></b>.</li> <li>• <b><u>Ethanol évaporé</u></b> à 56°C pendant 1h (incubateur) avant que 45 µL de tampon de lyse + 5 µL de protéinase K soient ajoutés aux échantillons.</li> <li>• Incubation à 56°C pendant 12-18h.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Évaluer le régime alimentaire par analyses de biologie moléculaire (stratégies alimentaires).</li> <li>• Extraction de l'ADN.</li> <li>• Séquençage.</li> </ul>

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
19	<b>Oehm et al. (2011)</b> [Cinq espèces d'oiseaux]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Échantillons congelés après la collecte (-28°C).</li> <li>• Stockés dans de l'éthanol (70%).</li> </ul>	Extraction ADN sur <b><u>trois sous-échantillons d'approximativement 0.1 g.</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Tests sur l'influence des conditions de stockage (éthanol → homogénéisés, aliquots de 900µL incubés toute une nuit à -28°C).</li> <li>○ Test des résultats pour des échantillons conservés suivant : Éthanol vs Congelés.</li> <li>• Échantillons congelés homogénéisés et extraits avec protocole CTAB.</li> <li>• Séquençage / PCR.</li> </ul>
20	<b>Jarman et al. (2013)</b> [Manchots d'Adélie ( <i>Pygoscelis adeliae</i> )]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fèces collectées à proximité des colonies et préservées dans de l'éthanol (70-80%).</li> <li>• Échantillons préservés stockés à -20°C pendant le transport depuis l'Antarctique (jusqu'en Australie).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas de protocole précis détaillé. L'extraction est vraisemblablement faite sur toute la fèces.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Suivi du régime alimentaire en analysant les restes d'ADN des restes alimentaires dans les fèces.</li> <li>• Extraction ADN avec un Promega 'Maxwell 16' DNA extraction robot, et avec un kit 'Tissue DNA Purification'.</li> <li>• Amplification par PCR.</li> <li>• Séquençage parallèle. Réalisé avec un séquenceur de nouvelle génération Ion Torrent et une plateforme de préparation de librairie semi-automatisée (<i>Life Technology</i>).</li> </ul>
21	<b>Mumma et al. (2016)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fèces collectées le long de routes et de zones adjacentes à l'aide d'un chien entraîné à la détection de fèces.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Avant les analyses de laboratoire, les fèces ont été décongelées.</li> <li>• Environ <b><u>0.5 ml de matière fécale a été prélevée à de multiples endroits de</u></b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Effectuer une comparaison du régime alimentaire évalué par <u>deux méthodes</u> : une analyse morphologique du contenu alimentaire dans des fèces (pièces dures</li> </ul>

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
	[Ours noirs ( <i>Ursus americanus</i> )] [Coyotes ( <i>Canis latrans</i> )]	• Fèces placées dans un sac plastique. Congélation à la fin de chaque session de terrain.	<b>l'extérieur de chaque fèces</b> (Stenglein et al. 2010). Enfin, ces sous-échantillons ont été placés dans des tubes de 2 ml contenant une <b>solution tampon DETS</b> pour prévenir de la dégradation de l'ADN (Frantzen et al. 1998).	de proies) et une analyse de biologie moléculaire (ADN de proies). • Extraction de l'ADN avec le DNA Stool Mini Kit (QIAGEN). • Séquençage de l'ADN de proies (ADN mitochondrial).
22	<b>Gosselin et al. (2017)</b> [Coyotes ( <i>Canis latrans</i> )]	• Fèces collectées le long de transects établis pour le suivi des canidés. Échantillonnage uniquement sur la partie latérale (Stenglein et al. 2010).	• Différents types de <b>sous-échantillonnages</b> ont été réalisés sur chaque fèces ; <b>4 localisations</b> : aux 2 extrémités, au milieu à l'intérieur, sur le côté (voir <b>Figure 1</b> de l'article ; <b>Figure 2</b> du présent rapport). Environ <b>500-600 µl de matière fécale collectée sur ces localisations</b> . Mis dans un tube avec <b>1.4 ml de tampon DETS</b> (Seutin et al. 1991). Donc volume total d'environ 2 ml. Conservation dans du DETS, supérieure ou similaire aux autres techniques, chez les canidés (Panasci et al. 2011).  • Un <b>sous-échantillon supplémentaire, homogénéisé sur la base des 4 localisations collectées</b> (et mixées), a été collecté. Environ 125-150 µl. Ajout de tampon DETS jusqu'à avoir 2 ml.  • Complément : mesure de la fèces, et score de fraîcheur attribué (de 1 à 5).	○ Analyse du régime alimentaire de carnivores terrestres dans des fèces. ○ Comparaison des résultats par analyses morphologiques (e.g. parties dures) avec ceux par analyses de l'ADN de proies. ○ Tests sur le protocole d'échantillonnage. • Extraction avec le QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). • Séquençage. <b>Quelques résultats :</b> → Échantillon homogénéisé a un plus haut taux de détection des proies que les sous-échantillons. Cependant, moins pratique. → Meilleures solutions : jusqu'à 5 sous-échantillons par fèces (à différentes localisations), combinés et analysés. OU

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
			<p>Des fèces de tailles similaires ont été choisies.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Conservation à air ambiant. Puis extraction et analyse ADN.</li> <li>• À la suite de l'échantillonnage pour analyses d'ADN, le reste de la fèces a été utilisée pour l'analyse morphologique des pièces dures non digérées.</li> </ul>	<p>2 sous-échantillons (sur côté + homogénéisé) → une bonne alternative.</p> <p>→ Analyses moléculaires avec un plus haut taux de détection de proies que les résultats issus d'analyses morphologiques, lorsque les échantillons de plusieurs localisations (5) sont combinés. <u>Cependant</u>, moins élevé si une seule localisation d'échantillonnage (→ inverse des résultats des autres études).</p> <p>➔ La détection de l'ADN de proies est <b><u>inéquitable selon les localisations d'échantillonnage</u></b>. Faire plusieurs localisations d'échantillonnages permet d'optimiser les résultats. Intérêt de faire des <b>études pilotes sur les techniques d'échantillonnage</b>.</p> <p>Suggère que <b><u>l'ADN ne doit pas être uniformément distribué dans les fèces</u></b> (Mumma et al. 2016).</p>
23	<p><b>Guillerault et al. (2017)</b> [Poissons chats (<i>Silurus glanis</i>)]</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poissons chats capturés et manipulés manuellement pour extraire les fèces et les contenus stomacaux.</li> <li>• Fèces congelées à -20°C pour analyses ultérieures.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b><u>Sous-échantillonnage de 20 mg de chaque fèces</u></b> pour effectuer une extraction de l'ADN.</li> </ul> <p>(• Contenus stomacaux analysés en laboratoire, pour voir les restes en os de poissons).</p>	<p>○ Évaluation du régime alimentaire de poissons chats par deux méthodes : <b>1)</b> analyses morphologiques de contenus stomacaux (<i>approche conventionnelle</i>) et <b>2)</b> analyses du contenu de fèces par metabarcoding de l'ADN.</p>

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
				<p>→ Comparaison des résultats obtenus</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Extraction de l'ADN avec le DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen).</li> <li>• Deux extractions négatives (contrôles) effectuées pour vérifier toute potentielle contamination.</li> </ul>
24	<p><b>McInnes et al. (2017a)</b> [Albatros (<i>Thalassarche cauta</i>)]</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fèces collectées de jour là où des albatros venaient juste d'être observés en train de déféquer.</li> <li>• Petit fragment de la portion non-urique acide des fèces (partie noir) collecté en utilisant des pinces ou des pailles en plastique.</li> <li>• Les échantillons ont été préservés dans de l'éthanol (80%), et secoués pour avoir un mix fèces-éthanol.</li> <li>• Ils ont enfin été stockés à 5-10°C pendant une semaine sur le terrain, puis à -20°C.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extraction effectuée dans les 2 semaines après la collecte.</li> <li>• Avant extraction, <b><u>échantillons vortexés, et 30 mg de chaque échantillon ont été utilisés</u></b> (<i>i.e.</i> sous-échantillonnage). La quantité était homogène entre les échantillons.</li> <li>• Concentrations d'inhibiteurs de PCR réduites dans l'ADN en <b><u>mixant les sous-échantillons dans 250 µl de solution tampon TSAR</u></b> (Roche Diagnostics), avant extraction.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Optimiser la collecte de fèces pour avoir une évaluation la plus juste possible du régime alimentaire de vertébrés par metabarcoding de l'ADN.</li> <li>○ Tests pour voir comment l'amplification de l'ADN est influencée (ou non) par les paramètres environnementaux ou physiologiques.</li> </ul> <p>→ Variations selon la fraîcheur des fèces, le substrat de collecte, en fonction de si l'animal est en période de jeûne et le stade de développement du consommateur.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cas d'études → albatros.</li> <li>• Extraction de l'ADN avec le Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit (Madison).</li> <li>• Metabarcoding de l'ADN.</li> </ul>

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
25	<b>Jang- Liaw et al. (2021)</b> [Loutres eurasiennes ( <i>Lutra lutra</i> )]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fèces les plus fraîches possibles collectées.</li> <li>• Certaines fèces peuvent contenir des pièces non digérées (poils, plumes, os d'oiseaux, etc.).</li> <li>• Les fèces ont été préservées individuellement dans de l'alcool (99%), et congelées à -80°C jusqu'à leur analyse ultérieure.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protocole non détaillé.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Évaluer le régime alimentaire de loutres par analyses de metabarcoding dans des fèces.</li> <li>• Extraction de l'ADN avec le DNeasy Blood &amp; Tissue Extraction Kit (QIAGEN).</li> </ul>
26	<b>Massey et al. (2021)</b> [Loups gris ( <i>Canis lupus ligoni</i> )]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fèces de loups collectées le long de routes. Catégorisées selon leur état (fraîches/dégradées).</li> <li>• Échantillons stockés à -20°C.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Échantillons utilisés pour méthode de tri mécanique (analyse du contenu en poils, os et autres pièces dures non digérés).</li> <li>• Sur chacun d'entre eux, <b><u>un sous-échantillon pour analyses de biologie moléculaire</u></b> (sous-échantillon vers le <b><u>centre de la fèces pour minimiser l'ADN de loups</u></b>).</li> <li>• ADN extrait sur <b><u>200-500 mg de chaque sous-échantillon de fèces</u></b>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Comparaison du régime alimentaire évalué selon la méthode de « tri mécanique » (parties dures) ou par <u>metabarcoding de l'ADN</u>. Voir quelle méthode produit la plus grande diversité de proies.</li> <li>○ Voir impact de la dégradation de la fèces sur les résultats de metabarcoding.</li> <li>• Amplification de l'ADN (Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Allemagne))</li> <li>• Metabarcoding.</li> </ul>
27	<b>Kim et al. (2022)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fèces collectées sur le terrain. Espèce productrice</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Fèces broyées</b> en utilisant de <b>billes d'accès inoxydables de 5 mm</b>, ajoutés dans l'étape de lyse du protocole du kit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Évaluer le régime alimentaire des grands animaux terrestres de ce secteur (herbivores et carnivores) par analyse de</li> </ul>

	Article [Espèce(s)]	Collecte des fèces et stockage (protocole)	Méthodes de préparation de l'échantillon	Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)
	[Rennes de Svalbaard ( <i>Rangifer tarandus platyrhynchus</i> ), Bernaches nonettes ( <i>Branta leucopsis</i> ), Renards arctiques ( <i>Vulpes lagopus</i> ), Lagopèdes alpins ( <i>Lagopus muta</i> )]	déterminée à l'œil et par odorat. • Fèces stockées à -20°C jusqu'aux analyses ultérieures.	d'extraction. Broyage avec un broyeur à boulets pendant 2 min à 26 Hz.	l'ADN contenu dans leurs fèces (de végétaux, ou de proies animales). • Extraction de l'ADN avec le QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen). • Séquençage.
28	<a href="#">Parker et al. (2022)</a> [Coyotes ( <i>Canis latrans</i> )] [Renards véloces ( <i>Vulpes macrotis arsipus</i> )]	• Fèces et pelotes régurgitées collectées <i>in situ</i> , de façon opportuniste. • Échantillons collectés dans des sacs plastiques.	• <b><u>Sous-échantillonnage de 1.5 cm<sup>3</sup> sur chaque échantillon individuel.</u></b> • Sous-échantillon stocké dans un tube de collection de 15 ml, avant une future extraction de l'ADN. • Reste de l'échantillon gardé pour analyse « morphologique » du contenu (restes de proies non digérés).	○ Évaluer la présence de tortues du désert ( <i>Gopherus agassizii</i> ) dans les fèces ou pelotes de trois prédateurs (canidés et corvidés), par analyses de biologie moléculaire et par inspection morphologique (restes non digérés). → Comparaison entre les résultats des deux méthodes. • Extraction de l'ADN avec un MagBind® Stool DNA kit (Omega Bio-Tek).

	<b>Article [Espèce(s)]</b>	<b>Collecte des fèces et stockage (protocole)</b>	<b>Méthodes de préparation de l'échantillon</b>	<b>Principaux objectifs de l'étude (○), approches moléculaires utilisées (●)</b>
	[Grands corbeaux ( <i>Corvus corax</i> )]			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Test de qPCR (PCR quantitative).</li> <li>• Séquençage haut débit.</li> </ul>

**Annexe 2** – Fiches techniques des cinq marqueurs moléculaires (amorces) choisis pour effectuer le séquençage de l'ADN de proies par metabarcoding dans les fèces de phoques veaux-marins et gris. Marqueur « mollusques » ci-dessous.

## Moll01

**Target taxonomic group:** Mollusca (mollusks)

**NCBI taxid:** 6447

**Forward primer:** CCAACATCGAGGTCRYAA

**Reference:** De Barba *et al.* (2014)

**Reverse primer:** ARYTACINYAGGGATAACAG

**Reference:** this book

**Recommended annealing temperature:** 48°C

**Target gene:** 16S mitochondrial rDNA

**Coverage for the target group:** 97.90% (233 species amplified in silico out of 238)

**Min. length:** 14 bp

**Mean length:** 30 bp

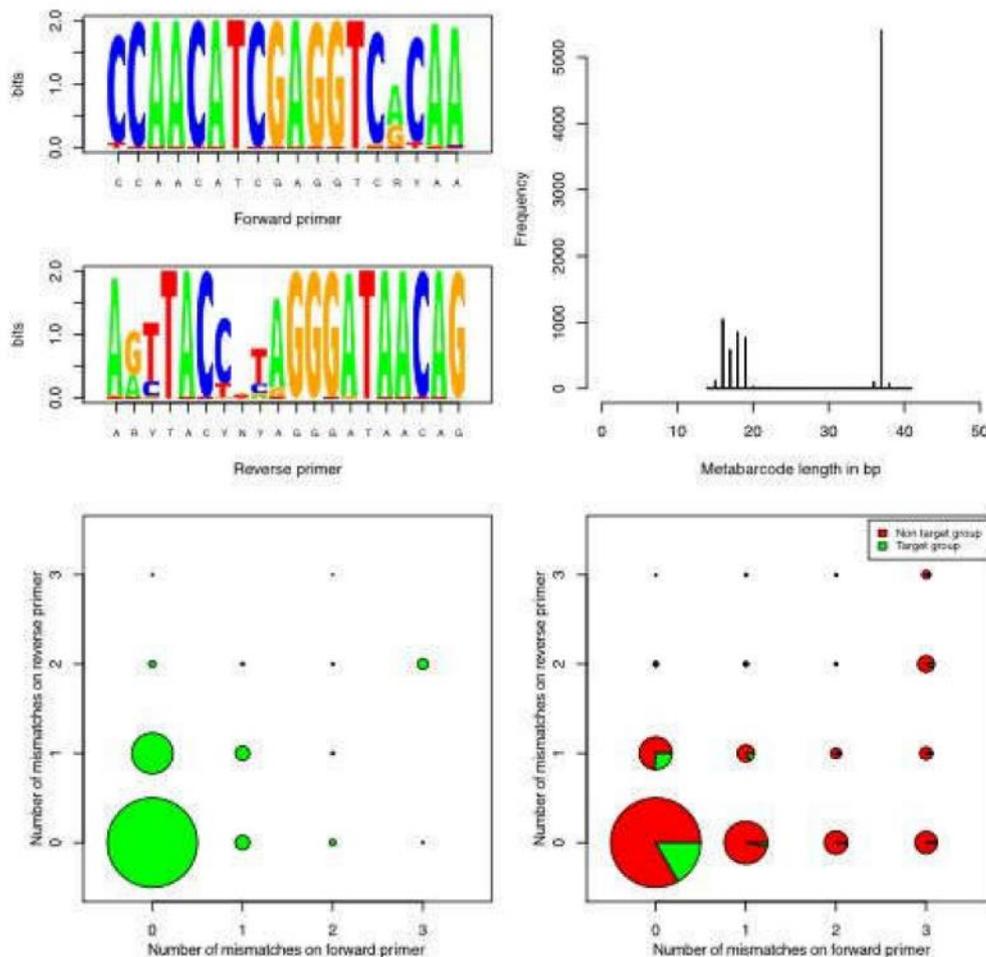
**Max. length:** 41 bp

**Taxonomic resolution in the target group:**

Species	Genus	Family	Order
42.8% (9107)	55.3% (2191)	61.7% (439)	72.7% (33)

**Comments:** Reverse primer modified from De Barba *et al.* (2014). Same forward primer primer than Arth01, reverse primer slightly different. Also amplify a lot of other eukaryotes, including mollusks and vertebrates. Mammalian blocking primer:

agggataacagCGCAATCCTATT-C3. Do not amplify birds. Not empirically tested.



## Arth02

**Target taxonomic group:** Arthropoda (arthropods)

**Forward primer:** GATAGAAACCRACCTGGYT

**Reverse primer:** AARTTACYTTAGGGATAACAG

**Recommended annealing temperature:** 49°C

**Target gene:** 16S mitochondrial rDNA

**Coverage for the target group:** 95.87% (1069 species amplified in silico out of 1115)

**Min. length:** 76 bp

**Mean length:** 142 bp

**NCBI taxid:** 6656

**Reference:** this book

**Reference:** this book

**Taxonomic resolution in the target group:**

Species

Genus

Family

Order

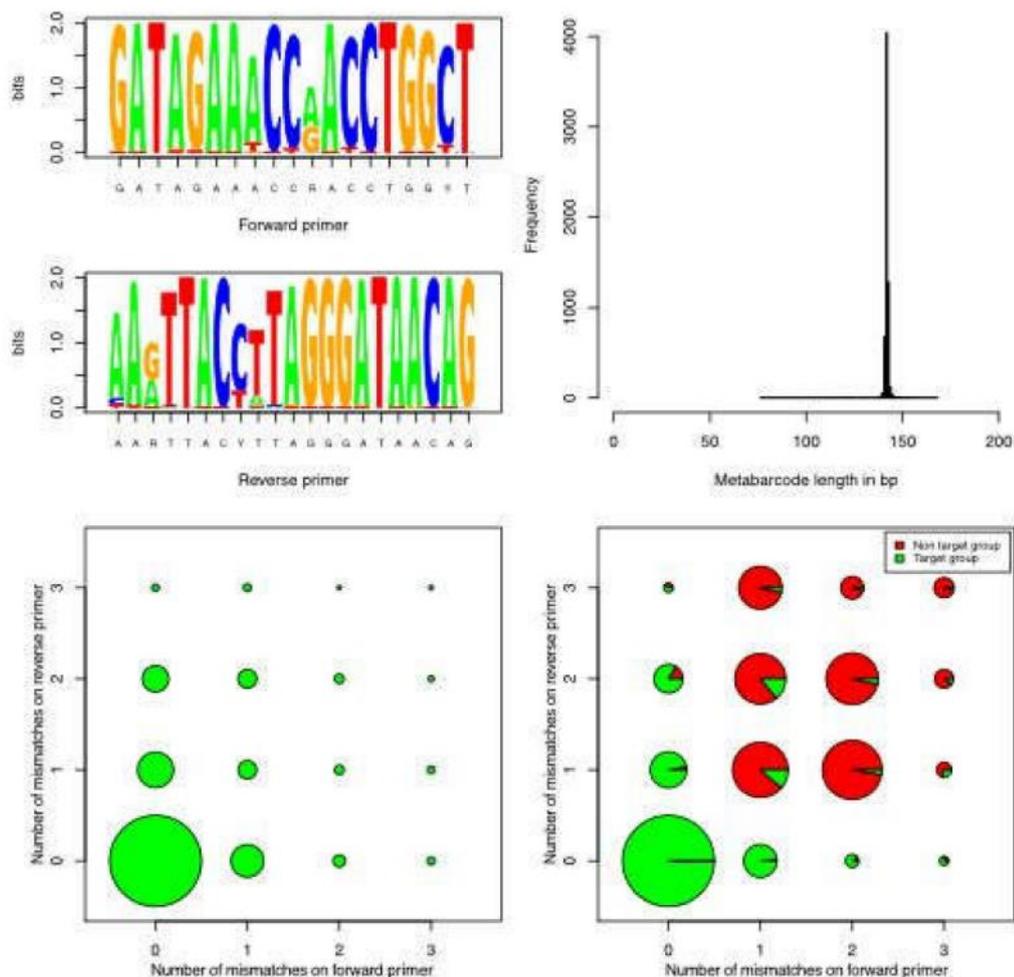
68.6% (6294)

89.6% (2400)

97.5% (599)

100.0% (80)

**Comments:** Taxonomic resolution lower than the Insec primer pair, but targets all arthropods with a relatively good coverage. Not empirically tested.



# Chon01

**Target taxonomic group:** Chondrichthyes (cartilaginous fishes) **NCBI taxid:** 7777  
**Forward primer:** ACACCGCCCGTCACTCTC **Reference:** this book  
**Reverse primer:** CATGTTACGACTTGCCCTCCTC **Reference:** this book

**Recommended annealing temperature:** 58°C

**Target gene:** 12S mitochondrial rDNA

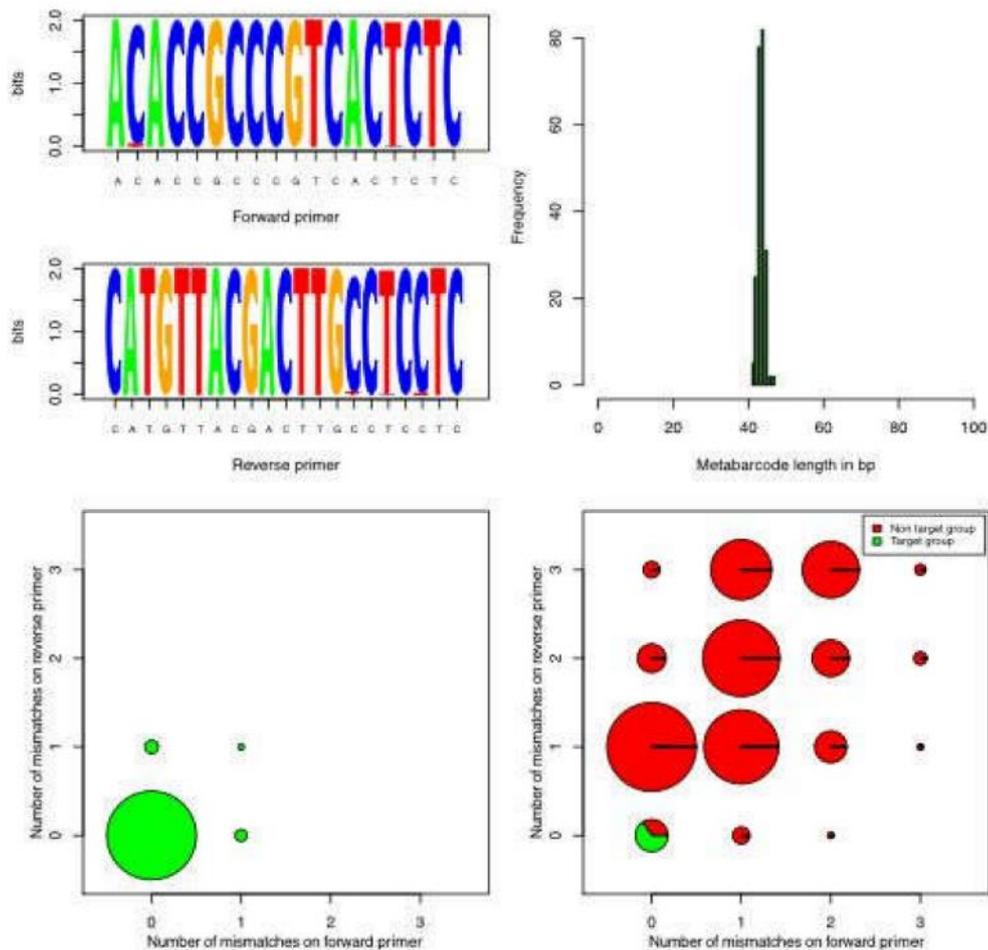
**Coverage for the target group:** 98.00% (98 species amplified in silico out of 100)

**Min. length:** 41 bp **Mean length:** 44 bp **Max. length:** 47 bp

**Taxonomic resolution in the target group:**

Species	Genus	Family	Order
78.7% (225)	93.8% (97)	100.0% (44)	100.0% (11)

**Comments:** Good taxonomic resolution for a very short metabarcode. A human blocking oligonucleotide (CACCTCCTCAAGTATACTTCAAAGG-C3) can be used if human contamination is a problem. Not empirically tested.



# Elas01

**Target taxonomic group:** Elasmobranchii (rays, sharks, skates) **NCBI taxid:** 7778  
**Forward primer:** GTTGGTAAATCTCGTGCCAGC **Reference:** Miya *et al.* (2015)  
**Reverse primer:** CATAGTGGGGTATCTAATCCTAGTTTG **Reference:** Miya *et al.* (2015)

**Recommended annealing temperature:** 59°C

**Target gene:** 12S mitochondrial rDNA

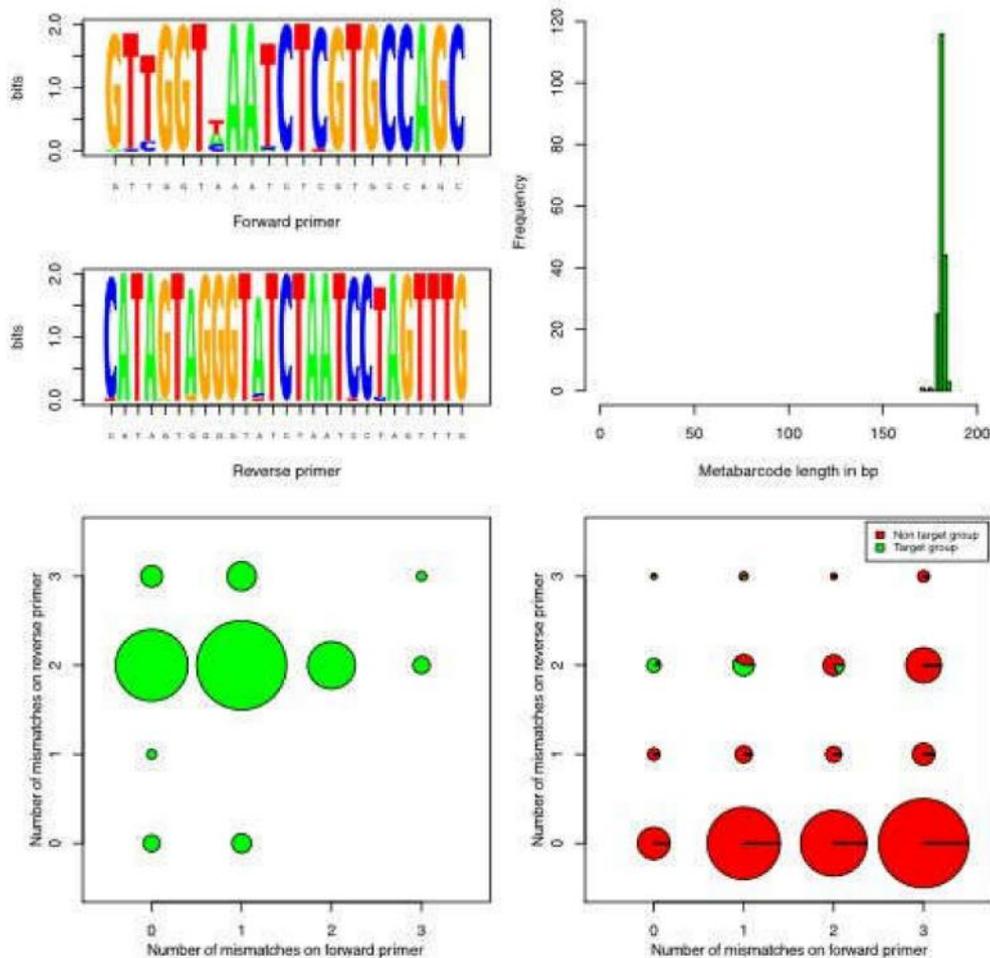
**Coverage for the target group:** 97.83% (90 species amplified in silico out of 92)

**Min. length:** 170 bp **Mean length:** 182 bp **Max. length:** 185 bp

**Taxonomic resolution in the target group:**

Species	Genus	Family	Order
82.6% (190)	97.7% (88)	100.0% (40)	100.0% (10)

**Comments:** This primer pair has not been fully optimized (see Elas02 for a slightly better primer pair for elasmobranches). Excellent taxonomic resolution.



Annexe 2 (suite) Marqueur « téléostéens » ci-dessous.

## Tele03

**Target taxonomic group:** Teleostei (teleost fishes)

**NCBI taxid:** 32443

**Forward primer:** GTCGGTAAACTCGTGCCAGC

**Reference:** Miya *et al.* (2015)

**Reverse primer:** CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG  
(2015)

**Reference:** Miya *et al.*

**Recommended annealing temperature:** 61°C

**Target gene:** 12S mitochondrial rDNA

**Coverage for the target group:** 95.80% (1667 species amplified in silico out of 1740)

**Min. length:** 133 bp

**Mean length:** 171 bp

**Max. length:** 213 bp

**Taxonomic resolution in the target group:**

Species	Genus	Family	Order
86.8% (2964)	93.8% (1474)	98.8% (341)	100.0% (59)

**Comments:** Very close to Tele02. Excellent taxonomic resolution.

