



Protocole de collecte d'excréments des oiseaux marins afin d'analyser l'ADN présent dans leur régime alimentaire

Julie McInnes

Institute for Marine and Antarctic Studies, University of Tasmania, et
Australian Antarctic Division, Australie

Décembre 2016

CONTEXTE

L'ADN alimentaire présent dans les excréments est un outil non-invasif qui permet d'étudier l'alimentation des oiseaux marins (par ex. Deagle et al. 2007, Bowser et al. 2013, Jarman et al. 2013, McInnes et al. 2016b). Le *métarbarcoding* de l'ADN alimentaire utilise un séquençage à haut débit (HTS pour high-throughput sequencing) sur des infimes parties d'ADN qui survivent à la digestion pour identifier les aliments consommés (Pompanon et al. 2012). Cette méthode comprend l'identification d'un aliment spécifique en utilisant des marqueurs propres à cet aliment (Jarman and Wilson 2004); à travers les marqueurs spécifiques de ce groupe, faire ressortir les aliments présents dans un groupe taxonomique (Jarman et al. 2004, Murray et al. 2011, Zeale et al. 2011); l'identification de tous les taxons alimentaires en utilisant des marqueurs de métazoaires universels (O'Rorke et al. 2012, Jarman et al. 2013); ou la combinaison de toutes ces approches (Deagle et al. 2009, Bowser et al. 2013). Cependant, la détermination de l'ensemble du régime alimentaire nécessite des marqueurs 'universels' qui sont en mesure d'amplifier l'ADN de tous les différents groupes d'aliments (King et al. 2008, Jarman et al. 2013).

Les amorces de réaction en chaîne de polymérase (PCR) du métazoaire universel amplifient tout ADN eucaryote, mais également l'ADN non désiré provenant des éléments non alimentaires (Deagle et al. 2009, O'Rorke et al. 2012). L'ADN non ciblé dans les excréments peut provenir de l'animal échantillonné, des parasites présents dans sa flore intestinale; ou de la contamination par des organismes externes tels que les insectes et la végétation. Ces sources d'ADN peuvent surcharger les séquences d'un échantillon amplifiées, la détection de l'ADN alimentaire peut être moins efficace de cette manière. La taille des échantillons doit donc être augmentée pour répondre aux questions sous-jacentes d'une étude, ce qui augmente les coûts de la préparation. Dans certains cas, l'amplification d'ADN non-ciblé peut être réduite en utilisant une amorce de blocage pour supprimer l'amplification de certains types d'ADN, tels que l'ADN présent chez l'animal ayant déféqué. (O'Rorke et al. 2012). Toutefois, le développement d'amorces de blocage peut être une opération délicate car à travers cette approche, les séquences alimentaires peuvent être bloquées par inadvertance. L'utilisation d'amorces devient plus complexe lorsqu'il y a plusieurs groupes d'ADN non-ciblés présents.

Afin d'améliorer la qualité et le nombre d'information sur le régime alimentaire obtenu à partir des échantillons d'excrément, ces protocoles de collecte optimisés ont été développés en utilisant l'Albatros timide (*Thalassarche cauta*). Ils constituent une base de données pour des futurs projets expérimentaux, permettant ainsi une collecte des échantillons alimentaires de meilleures qualités tout en réduisant l'amplification d'ADN non-ciblé. D'autres détails sont disponibles dans McInnes et al. (2016a).

LES OBSERVATIONS QUI PRÉCÈDE L'ÉCHANTILLONAGE

Pour que le projet dans l'ensemble soit un succès, une planification minutieuse sur le *métabarcoding* de l'ADN alimentaire est nécessaire. Les recherches doivent prendre en considération les questions alimentaires qu'ils ciblent et se focaliser sur le type d'échantillons qui leur donnera les informations requises. Cela comprend la sélection des marqueurs, les changements saisonniers, la période de jeûne et l'âge de l'animal.

La question scientifique détermine le choix du marquage. Les marquages spécifiques des groupes peuvent fournir une taxonomie de haute résolution de la proie présente au sein d'un groupe (par ex. les céphalopodes), cependant elles ne détecteront que cette proie (Deagle et al. 2009, Bowser et al. 2013). Un ensemble d'amorces métazoaires universelles permettra d'identifier tous les principaux groupes de proies, toutefois cette taxonomie sera de faible résolution (Deagle et al. 2009, Jarman et al. 2013, McInnes et al. 2016b). Si un marqueur métazoaire universel est choisi, des précautions supplémentaires seront nécessaires sur le terrain afin de réduire le risque de recueillir des ADN non alimentaire.

L'analyse nutritionnelle de l'ADN est un excellent outil pour identifier le régime alimentaire de la population animale. Mais l'utilisation de cette méthode pour identifier l'alimentation de chaque individu doit être traitée avec prudence. La période de digestion est souvent inconnue et selon la période d'approvisionnement, les excréments peuvent ne pas être directement lié au repas précédent.

LES FACTEURS CONTRIBUANT AU SUCCÈS DE L'ÉCHANTILLON

La fraîcheur de l'échantillon

Les échantillons fraîchement recueillis, où l'oiseau a été observé déféquant, fournissent nettement plus d'ADN sur leurs aliments que les échantillons secs (McInnes et al. 2016a). Les excréments secs sont davantage exposés à une contamination externe, provenant en particulier de la moisissure, et sont susceptibles de se dégrader en étant exposés aux rayons d'UV (Oehm et al. 2011). Les excréments ayant une texture molle et dont la période de défécation est inconnue, ont un succès mitigé. Les échantillons prélevés après une courte période indiquent généralement une amplification génétique inférieure face aux échantillons fraîchement recueillis. Cependant la proportion d'ADN alimentaire détecté dans les échantillons qui ont été amplifiés, n'est en aucun cas inférieure à ceux des échantillons frais. Par conséquent, le prélèvement des excréments à texture molle peut donner des informations sur le régime alimentaire de l'animal, mais pour se faire, des échantillons de dimension plus importants seraient nécessaires et utiliser que des petites quantités d'ADN pourrait réduire la qualité des données (Murray et al. 2015).

Si l'étude utilise des marqueurs nutritionnels spécifiques à un groupe, l'ADN des aliments peut être observé plus longtemps. Par exemple, dans le cas des Corneilles noires (*Corvus corone*), l'ADN des aliments peut être identifié pendant une durée prolongée de cinq jours lorsque l'échantillon est protégé des rayons d'UV et de la pluie (avec un taux de réussite de 68%), cependant, ce pourcentage est considérablement réduit quand les échantillons sont exposés aux éléments (avec un taux de réussite de 17%) (Oehm et al. 2011). De même nature, à travers les excréments du lion de mer de Steller (*Eumetopias jubatus*), les ADN de leurs proies ont pu être décelés en utilisant des marqueurs spécifiques de groupe et ce jusqu'à cinq jours dans certains échantillons. (Deagle et al. 2005).

La collecte de substrat

Les colonies d'oiseaux marins sont souvent entourées d'herbes à tussack et sont exposées aux impuretés, ces deux éléments peuvent à travers la végétation ou les organismes unicellulaires présents dans la terre contaminer l'ADN. Par conséquent le substrat sur lequel l'échantillon peut se trouver peut affecter la quantité d'ADN obtenue. Les excréments qui se déposent sur des substrats qui eux-mêmes contiennent d'autres sources d'ADN, telles que les plantes ou la terre, augmentent le risque de contamination (McInnes et al. 2016a). Les échantillons prélevés sur des rochers ou de la glace permettent de déceler plus grand nombre d'ADN alimentaire. Si les échantillons proviennent de la terre ou de la végétation, veillez à ce que la collecte d'autres particules de terres ou de plantes soit réduite au minimum. Prenez soin dans les colonies contenant plusieurs espèces d'oiseaux, surtout parce qu'ils peuvent être des proies éventuels. Par exemple si l'animal ciblé est connu pour se nourrir de Corneilles et se reproduisent autour des manchots et de phoques, assurez-vous que l'ADN obtenu ne soit pas contaminé.

Le stage de reproduction

Les longues périodes de jeûne pendant la période de fécondation ont pour effet de réduire la détection d'ADN alimentaire dans les excréments, tandis que pendant la période de couvée le prélèvement d'ADN peut être beaucoup plus élevé. Cela vraisemblablement dû au fait qu'à cette période les oiseaux font des voyages plus courts et fréquents pour se nourrir. Pendant les périodes de jeûne, l'ADN non ciblé est dominé par les endoparasites et l'ADN aviaire. En fonction de l'objectif de l'étude, essayez de prélever des échantillons provenant des oiseaux ayant le moins de temps entre leur dernière alimentation. Pendant la période de couvaison, ciblez les oiseaux qui sont de retour dans la colonie depuis moins d'un jour. Il peut s'agir d'observer les oiseaux qui sont revenus récemment dans la colonie ou de marquer un des oiseaux dans le nid pour surveiller la durée de couvaison et savoir quand est-ce qu'il y a un changement de partenaire. Les échantillons provenant des oiseaux qui dans la colonie ne sont pas en période de reproduction sont également faibles en teneur d'ADN alimentaire. Cela est attribué aux longues périodes passées dans la colonie et au jeûne.

Le stage de développement

La collecte d'ADN chez les jeunes animaux sont susceptible de poser des problèmes pour l'analyse alimentaire car moins d'aliments sont décelé dans leurs excréments (McInnes et al. 2016a). Comme les aliments leur sont livrés par régurgitation, les particules d'aliments sont susceptibles d'être partiellement digérés avant qu'ils ne soient donnés aux poussins. Par conséquent, ces processus de digestion peuvent dégrader de manière excessive l'ADN alimentaire présent dans les excréments des poussins. De plus, il y a vraisemblablement un croisement de l'ADN parental qui va se retrouver chez le poussin pendant la régurgitation qui peut provoquer une augmentation dans la quantité d'ADN aviaire, et de ce fait réduire l'ADN alimentaire de manière considérable. Si par contre une amorce de blocage est utilisé et de ce fait supprime l'ADN de l'oiseau, la quantité d'ADN alimentaire décelé chez le poussin peut être augmenté, mais prenez garde à ce que l'amorce ne bloque pas d'autres vertébrés tels que les poissons.

Les échantillons d'excréments provenant des poussins plus âgés permettent d'avoir une meilleure détection d'ADN alimentaire que chez les plus jeunes (McInnes et al. 2016a), ce qui peuvent refléter des repas plus conséquents ou une réduction de l'huile dans l'estomac. Ce liquide huileux peut contribuer jusqu'à 80% de la masse de l'échantillon dans l'estomac de certains albatros (Thompson 1992). Chez l'Albatros timide, la masse de liquide huileuse est plus importante chez les jeunes poussins que ceux qui sont plus âgés (Hedd & Gales 2001), qui peut ainsi diluer l'ADN alimentaire.

SOMMAIRE

Le métabarcoding de l'ADN fournit un précieux outil qui permet d'identifier les proies présentes dans les excréments des prédateurs. Cette méthode permet ainsi d'avoir des informations plus globale sur leur régime alimentaire, à travers de multiples taxons ou sur les résolutions spécifiques des différents des groupes de proies ciblés. L'analyse des parties dures présente certains bénéfices avec la possibilité de déceler des proies de corps mou et des proies de corps dures qui sont généralement retenus dans les estomacs, qui ne doit pas être surestimé. Les échantillons peuvent être prélevés durant tous les stades de reproduction et les différentes stades de la vie lorsque ceux-là sont disponibles (Bowser et al. 2013) cependant, les précautions sont de mise lors de certains stades de la reproduction comme on le verra dans ce document. Comme il n'est pas nécessaire de manipuler les oiseaux, cette méthode est idéale pour évaluer le régime alimentaire des espèces sensibles. Les limites sont que l'âge, la taille et la masse de la proie ne peut être évalués. Les excréments doivent également être disponible, de sorte que l'étude pour déterminer le régime alimentaire ne soit pas réalisée en dehors de la période de reproduction pour les espèces qui restent loin de la terre ferme. La méthode n'est pas actuellement commercialisée (2016), mais il existe de nombreux instituts de recherche qui utilisent cette méthode et comme la demande est grandissante, il est à espérer qu'elle devienne commercialement accessible dans le futur.

LA MÉTHODE DE COLLECTE

Les équipements

- Un flacon de 2ml a moitié rempli d'éthanol (70-80%)
- Une paille, une petite spatule ou une pincette
- Un marqueur permanent
- Des lingettes Kimwipes™ ou des mouchoirs en papier
- Un sac en plastique pour récupérer les lingettes utilisées
- Un cahier et un crayon

La taille de l'échantillon

Lors de l'utilisation de marqueurs universels de métazoaires, les échantillons prélevés au hasard peut avoir en moyenne un faible taux de réussite allant jusqu'à 15% même si ces derniers sont frais. Par contre en suivant les directives présentées, le succès des échantillons avoisinent les 50-60%. Ce taux de réussite est uniquement à titre indicatif et peut être utile pour déterminer la taille des échantillons nécessaire pour obtenir le nombre désiré de données. Dans les colonies à forte densité, il est généralement possible d'obtenir jusqu'à 10 d'excréments frais par personne et par heure. Néanmoins pendant la période d'incubation ce chiffre peut être revu à la baisse.

La collecte de l'échantillon

Asseyez-vous aux abords de la colonie et attendez qu'un oiseau ait déféqué. Cela peut être fastidieux, mais cela peut être plus rapide pour ceux qui connaissent les indices comportementaux. Il y a des comportements distincts avant la défécation. L'oiseau sur pied, se déplace pour se retrouver face au vent, avant de se pencher légèrement vers l'avant pour déféquer. Ceci est généralement suivi par un léger frémissement de la queue. Parfois il est possible d'entendre la défécation, alors cherchez rapidement l'oiseau qui frétille la queue et la direction dans la quelle se tourne leur postérieur afin de

retrouver le dépôt d'excrément. Pour les pétrels qui se mettent dans des terriers et où les observations ne sont pas possibles, posez une feuille à l'entrée du terrier pour prélever de nouveaux excréments.

Lorsqu'un échantillon est localisé, récupérez un petit fragment d'excrément ne contenant pas d'acide urique - (la partie sombre) en utilisant une pincette ou une paille. Seule une petite portion est nécessaire (30-50µl ou l'équivalent de la moitié d'une fève). Les échantillons d'oiseaux de mer sont généralement bien mélangés, mais si l'excrément est large, prenez une petite quantité de plusieurs parties pour vous assurer que la sélection est représentative de l'échantillon. Évitez de récupérer le liquide blanc car cela contient principalement de l'urée et aucun ADN alimentaire. Placez l'échantillon dans le flacon labélisé contenant 70-80% d'éthanol. Refermez le flacon soigneusement et secouez l'échantillon pour que l'ADN soit bien mélangé et préservé. Nettoyez la spatule ou la pincette entre chaque collecte d'excrément avec du Kimwipes™ ou une lingette ou utilisez une nouvelle pincette entre chaque échantillon et nettoyez-les à l'eau de Javel à la fin de journée.

Ciblez la partie sombre de l'excrément en évitant la partie blanche qui l'entoure



L'espace de rangement

Une fois que les échantillons ont été recueillis, gardez les à l'abri de la lumière du soleil et dans un endroit frais pour réduire toute dégradation. Même si à court terme ils peuvent être bien préservés dans l'éthanol, à long terme gardez-les dans un congélateur à -20°C ou si possible à -80°C.

Regardez la vidéo à https://www.youtube.com/watch?v=CQ_6bUX91Is

RECOMMANDATIONS

- Prélevez les échantillons frais où l'animal a été vu en train de déféquer. Si cela n'est pas possible essayez de recueillir uniquement les échantillons qui contiennent encore de l'humidité (des échantillons récemment déposés).
- À l'aide d'une paille, d'une spatule ou d'une pincette récupérez une petite portion dans la partie sombre de l'excrément (ne prenez pas le liquide blanc, qui contient principalement de l'urée et ne contient aucun ADN alimentaire);
- Placez l'échantillon dans un flacon de 2ml contenant 70-80% d'éthanol.
- Fermez hermétiquement le couvercle et mélangez l'excrément avec l'éthanol en secouant le flacon.
- Nettoyez la spatule et la pincette entre chaque prélèvement.
- Prenez en considération le comportement saisonnier et l'écologie alimentaire de l'animal à être étudié avant de prélever leurs échantillons.
- Considérez type de substrat présent dans les excréments, car la contamination du substrat peut submerger le signal d'ADN alimentaire. Idéalement, récupérez les excréments des surfaces ayant eu le moins de contamination d'ADN (par ex. des rochers ou de la glace). Si vous prélevez des échantillons de la terre ou de la végétation, essayez de limiter la collecte de matières étrangères et notez le substrat (et les espèces lorsque cela est possible) afin de faire les recoupements et valider les résultats.
- Prélevez les oiseaux susceptible de s'être nourri il y a peu. Par exemple, ne prélevez pas les échantillons des oiseaux qui jeûnent durant la période d'incubation ou lorsqu'ils défendent leurs nids ou territoires.
- Durant la période d'incubation, ciblez les oiseaux qui sont retournés dans la colonie au cours des dernières 24 heures.
- Les échantillons prélevés chez les jeunes poussins peuvent être problématiques en raison de l'ADN diminué qui leur a été transmis par les parents ou parce qu'ils contiennent trop d'ADN d'oiseau. Ciblez les excréments provenant des adultes ou de poussins plus âgés.
- Si une collecte est disponible et si le calendrier saisonnier ou le groupe ne font pas l'objet de la question alimentaire, ciblez la période d'approvisionnement où les cycles de voyage sont les plus courts et concentrez-vous sur les oiseaux nicheurs.
- Le prélèvement d'excrément le matin peu réduire la dégradation de l'ADN car elles sont moins exposées aux rayons d'UV.
- Si vous utilisez plusieurs zones d'étude, conservez les protocoles de collecte et un emploi du temps régulier d'une zone à l'autre.

RECOMMENDED CITATION

McInnes, J. 2016. *Protocole de collecte d'excréments des oiseaux marins afin d'analyser l'ADN présent dans leur régime alimentaire*. Accord sur la conservation des albatros et des pétrels. <https://acap.aq/fr/ressources/directives-de-conservation-d-acap/3302-protocole-de-collecte-d-excrements-des-oiseaux-marins-afin-d-analyser-l-adn-present-dans-leur-regime-alimentaire/file> Date viewed.

RÉFÉRENCES

- Bowser, A. K., A. W. Diamond, and J. A. Addison. 2013. From puffins to plankton: a DNA-based analysis of a seabird food chain in the northern Gulf of Maine. *PLOS ONE* **8**:e83152.
- Deagle, B. E., N. J. Gales, K. Evans, S. N. Jarman, S. Robinson, R. Trebilco, and M. A. Hindell. 2007. Studying seabird diet through genetic analysis of faeces: a case study on macaroni penguins (*Eudyptes chrysolophus*). *PLOS ONE* **2**:e831.
- Deagle, B. E., R. Kirkwood, and S. N. Jarman. 2009. Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces. *Molecular Ecology* **18**:2022-2038.
- Deagle, B. E., D. J. Tollit, S. N. Jarman, M. A. Hindell, A. W. Trites, and N. J. Gales. 2005. Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. *Molecular Ecology* **14**:1831-1842.
- Jarman, S. N., B. E. Deagle, and N. J. Gales. 2004. Group-specific polymerase chain reaction for DNA-based analysis of species diversity and identity in dietary samples. *Molecular Ecology* **13**:1313-1322.
- Jarman, S. N., J. C. McInnes, C. Faux, A. M. Polanowski, J. Marthick, B. E. Deagle, C. Southwell, and L. Emmerson. 2013. Adélie penguin population diet monitoring by analysis of food DNA in scats. *PLOS ONE* **8**:e82227.
- Jarman, S. N. and S. G. Wilson. 2004. DNA-based species identification of krill consumed by whale sharks. *Journal of Fish Biology* **65**:586-591.
- King, R. A., D. S. Read, M. Traugott, and W. O. C. Symondson. 2008. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular Ecology* **17**:947-963.
- McInnes, J. C., R. Alderman, B. E. Deagle, M.-A. Lea, B. Raymond, and S. N. Jarman. 2016a. Optimised scat collection protocols for DNA metabarcoding in vertebrates. *Methods in Ecology and Evolution*: DOI: 10.1111/2041-1210X.12677.
- McInnes, J. C., L. Emmerson, C. Southwell, C. Faux, and S. N. Jarman. 2016b. Simultaneous DNA-based diet analysis of breeding, non-breeding and chick Adélie penguins. *Royal Society Open Science* **3**:150443.
- Murray, D. C., M. Bunce, B. L. Cannell, R. Oliver, J. Houston, N. E. White, R. A. Barrero, M. I. Bellgard, and J. Haile. 2011. DNA-based faecal dietary analysis: A comparison of qPCR and high throughput sequencing approaches. *PLOS ONE* **6**:e25776.
- Murray, D. C., M. L. Coghlan, and M. Bunce. 2015. From benchtop to desktop: Important considerations when designing amplicon sequencing workflows. *PLOS ONE* **10**:e0124671.
- O'Rorke, R., S. Lavery, S. Chow, H. Takeyama, P. Tsai, L. E. Beckley, P. A. Thompson, A. M. Waite, and A. G. Jeffs. 2012. Determining the diet of larvae of western Rock Lobster (*Panulirus cygnus*) using high-throughput DNA sequencing techniques. *PLOS ONE* **7**:e42757.
- Oehm, J., A. Juen, K. Nagiller, S. Neuhauser, and M. Traugott. 2011. Molecular scatology: how to improve prey DNA detection success in avian faeces? *Molecular Ecology Resources* **11**:620-628.
- Pompanon, F., B. E. Deagle, W. O. Symondson, D. S. Brown, S. N. Jarman, and P. Taberlet. 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology* **21**:1931-1950.
- Zeale, M. R., R. K. Butlin, G. L. Barker, D. C. Lees, and G. Jones. 2011. Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. *Molecular Ecology Resources* **11**:236-244.