

Un fragment de boucle D de 178 pb (OvisCR) servant au diagnostic pour distinguer le mouton domestique (*Ovis aries*) du mouflon Européen (*Ovis musimon*) dans les études de métabarcoding alimentaire







Metabarcoding and Metagenomics 10: 191–215 (2026)

DOI: 10.3897/mbmg.10.172476

Research Article

A 178 bp diagnostic D-loop fragment (OvisCR) to discriminate domestic sheep (*Ovis aries*) and European mouflon (*Ovis musimon*) in diet metabarcoding studies

Agathe Pirog^{1,2}, Juliette Lavarec¹, Sabine Rousselot¹, Cécile Kaerle¹, Christophe Duchamp³, Guillaume Queney¹

¹ ANTAGENE, Animal Genomics Laboratory, 6 allée du Levant, 69890 La Tour de Salvagny (Lyon), France

² French Agency for Biodiversity, Department of Research and Expertise, Parc d'affaires La Rivière, 8 Boulevard Albert Einstein, CS 42355 44323 Nantes, France

³ French Agency for Biodiversity, Department of Research and Expertise, Parc Micropolis, F-05000 Gap, France

Corresponding author: Agathe Pirog (paper@antagene.com)

Résumé

Une identification précise des espèces est essentielle dans les études de métabarcoding sur le régime alimentaire, notamment pour distinguer les espèces domestiques des espèces sauvages, car celles-ci ont des implications écologiques et socio-économiques très différentes. Cela vaut tout particulièrement pour le **genre** *Ovis*, où le mouton domestique (*Ovis aries*) et le mouflon d'Europe (*Ovis musimon*) coexistent souvent, mais sont impossibles à distinguer à l'aide des marqueurs mitochondriaux courants en raison d'une variation insuffisante. Une identification erronée de ces taxons peut fausser les évaluations de la prédation par les carnivores, notamment pour des espèces comme le loup gris (*Canis lupus*), ce qui a un impact sur les efforts de conservation et de gestion de la faune sauvage.

Nous avons ici développé un fragment de la boucle D diagnostique qui différencie efficacement les **haplotypes** d'*O. aries* et d'*O. musimon* dans les études de métabarcoding alimentaire. À partir d'échantillons de référence provenant de 46 mouflons Européens et de 46 moutons domestiques collectés dans les Alpes Françaises, nous avons identifié un **fragment** de 178 pb (OvisCR) contenant 43 SNP, permettant de distinguer **quatre haplotypes de mouflon et 35 haplotypes de mouton**. Aucun haplotype n'était commun aux deux espèces, bien qu'un haplotype d'*O. musimon* fût étroitement apparenté à deux haplotypes d'*O. aries*.

Les performances du **fragment OvisCR** ont été testées à l'aide de 115 échantillons d'excréments de loup. Nous avons séquencé un marqueur de métabarcoding général (un **amplicon** de 60 à 140 pb de la région 12S) parallèlement au nouvel amplicon sur la plateforme Torrent afin d'évaluer la capacité de ce dernier à affiner l'identification des *Ovis*. Après le séquençage, deux pipelines bioinformatiques (DADA2 et OBITools) ont été utilisés

pour comparer leur efficacité dans la résolution des Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTUs) ou des variants de séquence d'amplicon (ASVs) d'*Ovis*.

Les deux pipelines ont démontré une précision similaire, le fragment OvisCR permettant une attribution au niveau de l'espèce *Ovis* pour plus de 81% des excréments dans lesquels des lectures *Ovis* ont été détectées, quel que soit le pipeline utilisé.

Ce **nouveau marqueur** constitue un outil robuste et pratique pour les applications de métabarcoding, améliorant les déductions écologiques dans les études trophiques sur les carnivores et soutenant les stratégies de gestion de la conservation de la biodiversité. Bien qu'efficace dans le contexte Français, son applicabilité géographique plus large nécessite une validation préalable à l'aide d'ensembles de données de référence spécifiques à chaque région, englobant la diversité des ovins domestiques, du mouflon européen et d'autres espèces d'*Ovis*.

Mots-clés : *Canis lupus*, métabarcoding alimentaire, région de contrôle mitochondriale, *Ovis aries*, *Ovis musimon*, discrimination des espèces

INTRODUCTION

Autrefois très répandu en Europe, le loup gris (*Canis lupus*) a été victime d'une **persécution intense** au cours des XIX^{ème} et XX^{ème} siècles, ce qui a entraîné son extinction dans certaines régions (Ripple et al. 2014). Depuis le début des années 1990, la protection juridique et l'évolution des mentalités ont permis le rétablissement des populations de loups, tant en termes d'aire de répartition que d'effectifs, dans toute l'Europe (Chapron et al. 2014). À mesure que les loups recolonisent des paysages dominés par l'homme, les conflits avec le pastoralisme s'intensifient, principalement en raison de la prédation du bétail (Morehouse et Boyce 2017 ; Bruns et al. 2020 ; Gervasi et al. 2021 ; Grente et al. 2022). **Par conséquent**, la compréhension du régime alimentaire de cette espèce est essentielle pour l'élaboration de stratégies efficaces de gestion et de conservation.

La détermination précise de la composition alimentaire repose sur des méthodologies robustes. Traditionnellement, on a recours à l'analyse des excréments, qui implique le tri mécanique des restes non digérés (Leopold et Krausman 1986 ; Spaulding et al. 2000). Bien que riche en informations, cette méthode est sujette à des biais bien documentés (Reynolds et Aebischer 1991 ; Ciucci et al. 1996 ; Spaulding et al. 2000 ; Casper et al. 2007). Le **métabarcoding** de l'ADN s'est imposé comme un outil puissant pour surmonter bon nombre de ces limites (Forin-Wiart et al. 2018 ; de Sousa et al. 2019 ; Jusino et al. 2019).

En bref, le **métabarcoding** de l'ADN implique : (i) l'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon contenant des restes de proies partiellement ou totalement digérés ; (ii) l'amplification par PCR de courts fragments d'ADN (généralement < 300 pb en raison de la dégradation de l'ADN) provenant de tous les organismes présents ; (iii) le séquençage à haut débit (HTS) des produits amplifiés et (iv) une analyse bioinformatique en aval pour déduire la composition taxonomique du régime alimentaire. **Pour ce processus, le choix des marqueurs moléculaires est crucial et l'ADN mitochondrial (ADNmt) est couramment ciblé en raison de son nombre élevé de copies, ce qui facilite l'amplification à partir d'échantillons dégradés, et de sa large représentation dans les bases de données de référence.** **De plus**, les régions mitochondriales combinent souvent une conservation suffisante pour permettre la conception d'amorces universelles présentant une variation de séquence suffisante pour distinguer les espèces (Simon et al. 2006 ; Yang et al. 2014).

Au sein de l'ADNmt, des régions telles que les gènes du cytochrome b et de l'ARNr 12S sont les plus couramment utilisées dans les études sur le régime alimentaire des carnivores, car elles permettent généralement une identification au niveau de l'espèce (Forin-Wart et al. 2018 ; Di Bernardi et al. 2021 ; Massey et al. 2021 ; Roffler et al. 2021 ; Shi et al. 2021 ; Buzan et al. 2024b). **Cependant**, ces marqueurs peuvent être trop conservés pour différencier des espèces étroitement apparentées, ce qui conduit à des classifications taxonomiques limitées au niveau du genre (Hacker et al. 2021 ; Shi et al. 2021 ; Buzan et al. 2024b). Cette limitation est particulièrement évidente avec *Ovis aries* et *O. musimon*, dont la grande similitude génétique et l'histoire évolutive complexe (Nadler et al. 1973 ; Rezaei et al. 2010 ; Meadows et al. 2011 ; Ciani et al. 2020) rendent les marqueurs standard inadéquats pour leur discrimination (Barbato et al. 2017 ; Chen et al. 2021).

Pourtant, il est crucial de distinguer *O. aries* et *O. musimon* dans les analyses du régime alimentaire des carnivores, car ces espèces ont des implications écologiques et socio-économiques nettement différentes. Alors que les moutons domestiques sont étroitement liés aux conflits entre l'homme et la faune sauvage, les mouflons sont une espèce sauvage importante pour la conservation et la gestion du gibier. Ne pas les distinguer peut conduire à des interprétations erronées des schémas de prédation et à des recommandations de gestion inadéquates.

Compte tenu de ces limites, la boucle D mitochondriale, une région non codante hautement variable, s'est imposée comme un candidat particulièrement prometteur pour distinguer les contributions d'*O. aries* et d'*O. musimon* au régime alimentaire des carnivores. Son utilité reconnue pour résoudre la phylogénie d'*Ovis* et distinguer les sous-espèces est bien établie (Hiendleder et al. 1998 ; Hiendleder et al. 2002 ; Feng et al. 2009 ; Buzan et al. 2024a). De plus, son application réussie dans les études sur le régime alimentaire des carnivores (Schroeder et al. 2021) et chez d'autres espèces étroitement apparentées d'*Ovis* et de *Capra* (Khalatbari et al. 2022) suggère en outre son potentiel pour surmonter le défi diagnostique actuel.

Pour relever ce défi crucial, la présente étude visait à développer et à valider un nouveau marqueur D-loop hautement discriminant pour l'identification au niveau de l'espèce d'*O. aries* et d'*O. musimon* dans le métabarcoding du régime alimentaire des carnivores. Nous y sommes parvenus en criblant les variations de la D-loop dans des échantillons de référence Français d'*O. aries* et d'*O. musimon* et en sélectionnant un **fragment de 178 pb**. Nous avons ensuite testé les performances de ce marqueur sur 115 échantillons d'excréments de loups collectés dans la même zone, comparé son efficacité à celle d'un marqueur de métabarcoding général (une portion du gène 12S) et évalué différentes approches bioinformatiques.

MATERIEL et METHODES

Zone d'étude

Cette étude a été menée en France dans plusieurs départements des Alpes Françaises. Cette région constitue le cœur de l'aire de répartition du loup gris en France (Duchamp et al. 2012). Dans ces paysages, le loup gris se nourrit principalement de chevreuils (*Capreolus capreolus*), de cerfs élaphe (*Cervus elaphus*) et de sangliers (*Sus scrofa*) dans les habitats de plaine, et de

chamois (*Rupicapra rupicapra*) et de mouflons d'Europe (*O. musimon*) dans les zones montagneuses. Cette région présente un défi particulier pour l'analyse alimentaire en raison de la coexistence de mouflons sauvages et de moutons domestiques.

Les populations de mouflons Européens en France sont issues d'introductions, soit directement à partir de la population Corse, soit par dispersion secondaire. Les Alpes constituent le cœur de l'aire de répartition nationale, représentant 63% de celle-ci. Des populations plus petites sont également présentes dans le Massif central (18%) et les Pyrénées (17%). En 2016, les mouflons occupaient environ 5 084 km² à travers le pays (Savouré-Soubelet et al. 2021).

De plus, environ 1,5 million de moutons sont élevés chaque année dans les Alpes Françaises, principalement pour la production de viande et de produits laitiers (IDELE 2018). En été, une part importante de ces troupeaux pratique la transhumance, migrant vers les alpages de haute altitude. Des prédateurs de loups sur le bétail sont signalées chaque année, avec des points chauds récurrents où les conflits peuvent entraîner des pertes économiques (Linnell et Cretois 2018 ; Gervasi et al. 2021 ; Grente et al. 2022).

La présence à la fois de mouflons sauvages et de moutons domestiques crée un paysage alimentaire complexe pour les loups, ce qui pose directement le défi de différencier ces deux espèces dans les analyses alimentaires.

Échantillonnage

Échantillons de référence *Ovis*

Un ensemble complet d'échantillons de référence est nécessaire pour développer un marqueur discriminant robuste.

Les premières recherches dans la base de données publique GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) concernant les séquences de la boucle D d'*Ovis aries* et d'*Ovis musimon* ont révélé des limites : aucune des séquences de la boucle D d'*O. musimon* disponibles ($n = 27$) ne provenait de populations Françaises, tandis qu'aucune des nombreuses séquences de la boucle D d'*O. aries* accompagnées d'informations géographiques ne correspondait à des races couramment élevées en France. **De plus**, aucun haplotype identifié dans la base de données n'était exclusif à l'une ou l'autre des espèces, soulignant le manque de résolution spécifique à l'espèce dans les données disponibles.

Pour combler cette lacune, nous avons prélevé des échantillons des deux espèces dans la zone d'étude. Plus précisément, pour *O. aries*, des échantillons de tissus ont été obtenus auprès de la principale usine de transformation de viande des Alpes, qui traite 88% de la production ovine de la région Alpes-Provence. Les échantillons comprenaient diverses races, telles que les Mérinos, les Lacaunes, les croisements Mérinos × Île-de-France, les Mourerous, les Préalpes et les croisements Préalpes × Mérinos (**Tableau 1**). Pour *O. musimon*, les échantillons ont été prélevés soit sur des animaux chassés ou capturés légalement (tissus, $n = 12$; sang, $n = 4$), soit de manière non invasive (crottes, $n = 20$; poils, $n = 10$) auprès de la population Corse et des quatre principales populations du sud-ouest de la France : Mercantour et Cadarache (Alpes), Caroux et Aigoual (Massif central) (**Tableau 1**).

Tableau 1. Échantillons de référence d'*Ovis musimon* et d'*Ovis aries* prélevés en France. N_{sample} : nombre d'échantillons prélevés au sein de chaque population ou race. IDF : Île-de-France

<i>Ovis musimon</i>		<i>Ovis aries</i>	
Population	N_{sample}	Breed	N_{sample}
Corse	10	Lacaune	1
Cadarache (Alps)	4	Merinos	11
Mercantour (Alps)	12	Merinos X IDF	1
Aigoual (Massif Central)	8	Mourerous	6
Caroux (Massif Central)	12	Préalpes X Merinos	1
		Préalpes	12
		Unknown	14

In total, 46 sheep and 46 European mouflon samples were collected. These samples were subsequently used to sequence the entire D-loop region to identify a short diagnostic fragment for species-level discrimination in metabarcoding studies.

Échantillons de crottes de loup

Depuis le retour du loup gris en France au début des années 1990, la population a fait l'objet d'une surveillance étroite de la part des autorités Françaises. Des échantillons non invasifs, principalement des crottes, ont été collectés pendant plus de 30 ans et analysés à l'aide de divers marqueurs moléculaires afin de confirmer l'identité de l'espèce et de procéder à l'identification individuelle selon un protocole standardisé de haute qualité (Pirog et al. 2025). Parmi ceux-ci, un sous-ensemble d'échantillons prélevés dans la même zone géographique que les échantillons de référence d'*Ovis* et précédemment analysés par metabarcoding a révélé la présence de proies *Ovis* spp. dans 115 cas (données non publiées). Ces 115 échantillons (Fig. 1) ont été sélectionnés pour la présente étude afin de : (i) confirmer la présence d'*Ovis* spp. par séquençage de metabarcoding d'une partie du gène 12S et (ii) évaluer le pouvoir discriminant du fragment D-loop diagnostique identifié à partir des échantillons de référence d'*Ovis*.

Procédures de laboratoire

Procédures générales de contrôle qualité

Pour toutes les procédures de laboratoire, c'est-à-dire le séquençage des échantillons de référence d'*Ovis* et le metabarcoding des échantillons de crottes de loup, un flux de travail unidirectionnel a été suivi, avec des espaces dédiés à l'ADN rare et dégradé à chaque étape. L'extraction de l'ADN a été réalisée séparément pour les tissus ou le sang et les échantillons non invasifs à l'aide d'un système de purification par lumière ultraviolette dans une salle dédiée aux échantillons non invasifs. Les échantillons d'ADN extraits ont été conservés à -20°C.

Les réactifs sensibles (enzymes et amorces d'ADN) utilisés pour l'amplification de l'ADN ont été préparés dans une salle blanche à pression d'air positive. L'ADN et les réactifs ont ensuite été assemblés (travail manuel et automatisé) dans une pièce séparée, tandis que l'amplification et le séquençage ont été effectués dans une autre pièce à pression d'air négative. Des outils stériles à usage unique ont été utilisés pour manipuler les échantillons et tous les postes de travail ont été nettoyés à l'eau de Javel après chaque étape (et pour chaque échantillon pendant l'extraction) afin d'éviter toute contamination croisée.

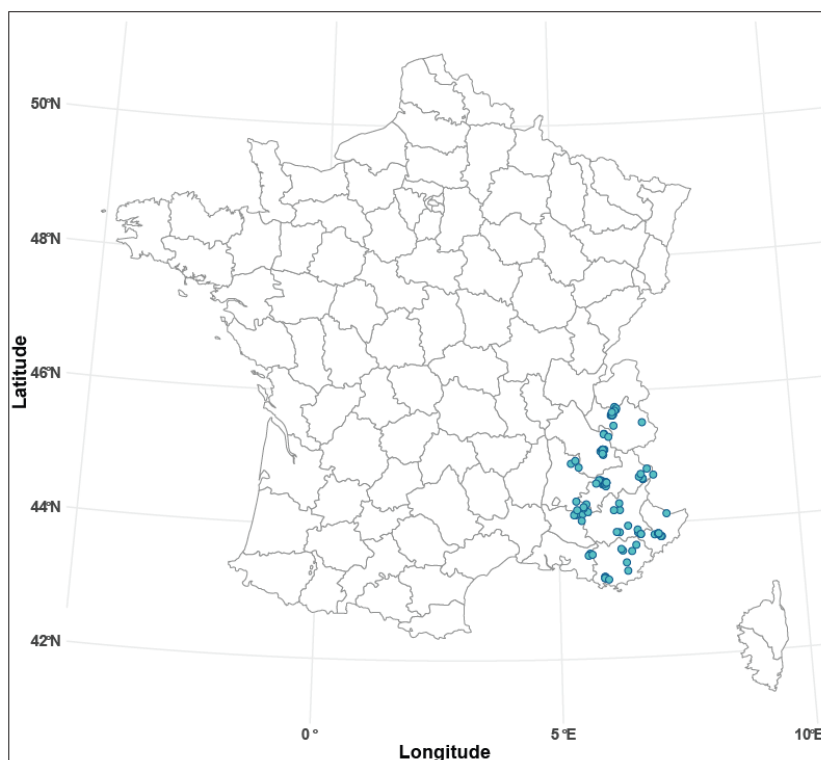


Figure 1. Répartition géographique des 115 échantillons d'excréments de loup utilisés pour le métabarcoding

Échantillons de référence Ovis

Chaque échantillon de tissu, de sang ou de bulbe pileux a été transféré dans un microtube stérile et étiqueté en vue de l'extraction de l'ADN. Pour les visages conservés dans l'éthanol, le surnageant a d'abord été transféré dans un microtube numéroté, centrifugé pour éliminer l'éthanol, puis l'ADN a été extrait du culot. Deux contrôles d'extraction négatifs (blancs) et un contrôle d'extraction positif (échantillon préalablement analysé et validé pour la qualité de l'ADN) ont été ajoutés à une plaque à 96 puits. Les échantillons ont été lysés avec les contrôles d'extraction positifs et négatifs conformément aux instructions du fabricant (NucleoSpin 96 Tissue Kit et NucleoSpin 96 Blood Kit ; Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). L'ADN a été isolé et purifié à l'aide de colonnes de purification et de méthodes de filtration sous vide.

La boucle D de l'ADNmt a ensuite été amplifiée et séquencée à l'aide d'amorces conçues en interne, Ovis-CR-longread-F (5' AAACCTCCCAAACATACAACACGG-3') et Ovis-CR-longread-R (5'-TGTATRTGACCCAGGTGCCT-3'), qui amplifient un fragment de 1 100 pb.

L'amplification par PCR a été réalisée dans une microplaque à 96 puits avec un volume final de 10 µl contenant 5 µl de LongAmp Hot Start Master Mix Taq (New England Biolabs, Ipswich, MA, États-Unis), 0,40 µM de paires d'amorces CR non fluorescentes et 2 µl d'ADN extrait. Le cycle thermique était le suivant : dénaturation initiale à 94°C pendant 30 s, suivie de 31 cycles à 94°C pendant 30 s, 61°C pendant 40 s et 65°C pendant 1 min, puis d'une extension finale à 65°C pendant 10 min. Trois blancs de contrôle PCR et trois échantillons d'ADN de contrôle positif ont été ajoutés à la microplaque.

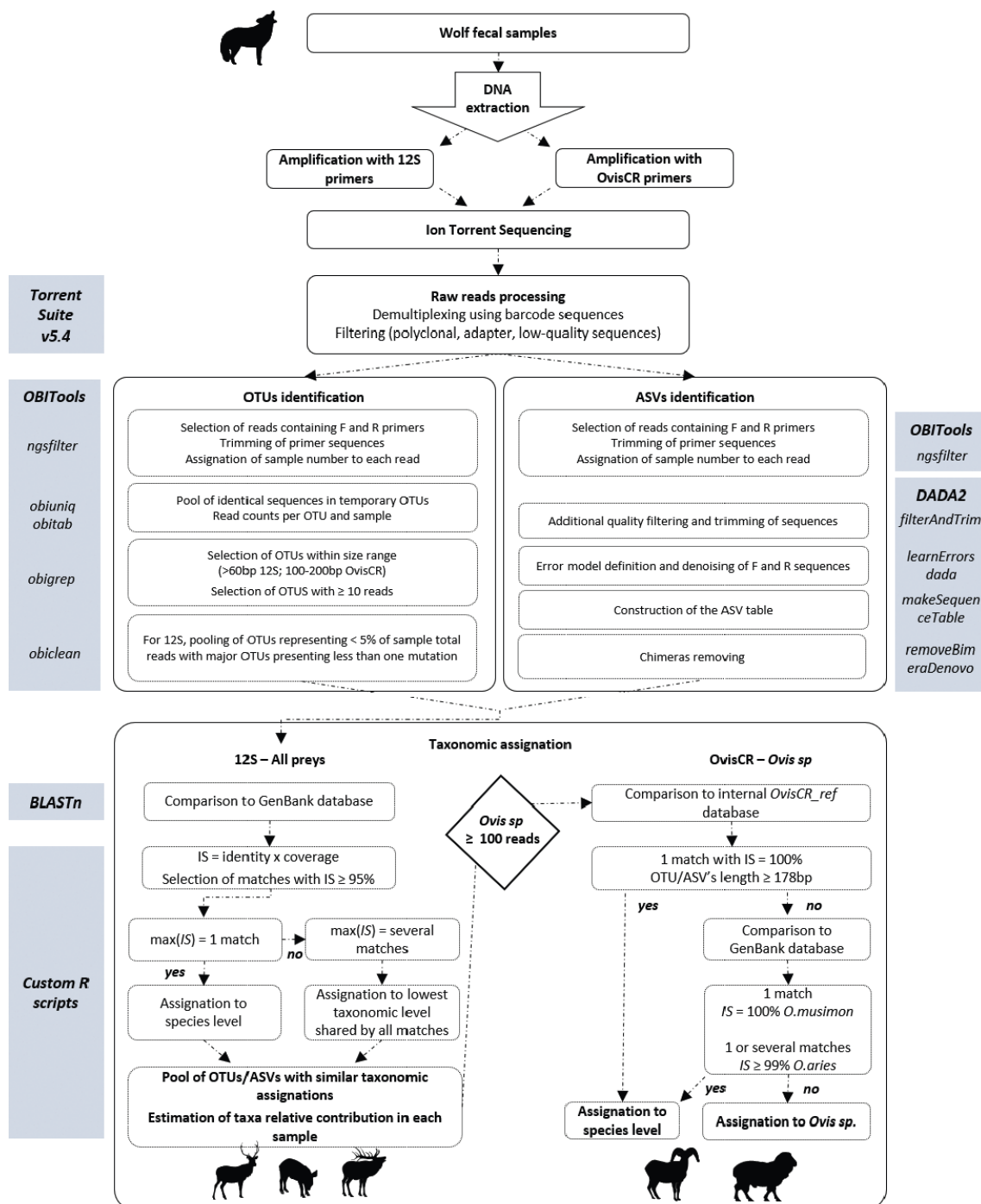


Figure 2. Processus de métabarcoding utilisé pour identifier les proies dans des échantillons de matières fécales de loups gris. Les encadrés gris indiquent les logiciels utilisés et les fonctions spécifiques sont indiquées en italique. OTU : unité taxonomique opérationnelle ; ASV : variante de séquence d'amplicon ; F : sens ; R : antisens ; IS : score d'identité

Les produits PCR ont été séquencés de manière bidirectionnelle selon la méthode Sanger à l'aide des mêmes amorces et d'un kit de séquençage par cycles BiDe Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, États-Unis).

Après purification, les séquences ont été analysées à l'aide d'un séquenceur capillaire ABI PRISM 3130 XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, États-Unis) et les électrophorogrammes ont été interprétés à l'aide du logiciel Geneious (Kearse et al. 2012).

Échantillons d'excréments de loup

Bien que la méthodologie générale du **métabarcoding** soit bien établie, les choix spécifiques concernant les protocoles de laboratoire et les pipelines bioinformatiques varient considérablement (Alberdi et al. 2018 ; Ando et al. 2020 ; Bohmann et al. 2022 ; Hakimzadeh et al. 2024), ce qui nécessite une réflexion approfondie. Nous expliquons donc les méthodes que nous avons choisies en suivant les lignes directrices relatives aux meilleures pratiques (Klymus et al. 2024) afin de garantir la clarté et la reproductibilité. Le déroulement du métabarcoding de l'ADN est illustré à la [Figure 2](#).

Afin d'optimiser l'allocation des ressources et compte tenu de notre objectif principal, qui est d'évaluer la capacité du marqueur à déterminer l'appartenance à l'espèce *Ovis* plutôt que d'évaluer le régime alimentaire individuel, nous avons donné la priorité aux réplicats biologiques plutôt qu'aux réplicats techniques pour chaque échantillon. Nous avons donc effectué un réplicat par échantillon afin de permettre le **métabarcoding** d'un plus grand nombre d'échantillons (Ando et al. 2020).

Tout d'abord, l'ADN a été extrait d'échantillons d'excréments de loups en suivant le protocole décrit par Pirog et al. (2025). **L'identification des espèces de prédateurs et des individus a été réalisée par séquençage de la région D-loop mitochondriale et par génotypage de 22 marqueurs microsatellites, comme détaillé dans la même référence.**

L'analyse par **métabarcoding** a ensuite été effectuée en amplifiant deux fragments : une portion de la séquence du gène 12S rRNA pour confirmer la présence de proies *Ovis* spp. à l'aide de ce marqueur, et le fragment D-loop diagnostique spécifique à l'espèce *Ovis*. Chaque région ciblée a été amplifiée dans des plaques à 96 puits distinctes afin d'éviter toute inversion ou erreur de codage. Des contrôles PCR négatifs ($n = 13$) ainsi que huit contrôles PCR positifs composés d'échantillons de poils d'ours brun (*Ursus arctos*) ont été ajoutés aux échantillons.

Pour la région 12S, les amorces Vert-NGS-12S-F (5'-GGATYAGATACCCYRY-TATG-3') et Vert-NGS-12S-R (5'-TRGRACAGGCTCCTCTRR-3'), adaptées des amorces 12S_V5 (Riaz et al. 2011), ont été utilisées. **De plus**, un bloqueur conçu en interne pour éviter l'amplification de l'ADN du loup gris a été utilisé (5'-CTATGCTTAGCCCTAAACATAGATAATT'TTACAACAAAATAATTC-3'*).

Les amorces pour le fragment de diagnostic D-loop (sens : 5'-CCYCAYGATATAAGCA-3' ; antisens : 5'-GTGAACAAGCTCGTGATC-3') ont été **nouvellement** conçues. Toutes les amorces ont été modifiées pour inclure des adaptateurs compatibles avec le système Lon Torrent et des codes-barres spécifiques à chaque échantillon, conformément à la méthode de préparation de bibliothèques d'amplicons par fusion Lon (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis), dans le cadre d'une PCR en une seule étape. **Bien qu'elle augmente les coûts, la PCR en une seule étape s'est avérée réduire le risque de contamination croisée et de sauts de marqueurs** (Bohmann et al. 2022). Les codes-barres spécifiques à chaque échantillon n'ont été ajoutés qu'en amont des amorces sens, le séquençage n'étant effectué que dans un seul sens. Bien que cela puisse potentiellement réduire la qualité des séquences en fin de lecture, les amplicons ciblés avaient une taille bien inférieure à la longueur seuil de 400 pb autorisée par le protocole de

séquençage de la bibliothèque, et le séquençage unidirectionnel ne devrait donc pas avoir d'impact sur la qualité des lectures en fin de séquence.

Les bibliothèques ont été préparées selon le protocole « Ion Amplicon Library Preparation Fusion Method » fourni par Thermo Fisher Scientific, avec quelques adaptations. L'amplification par PCR a été réalisée dans des réactions de 10 µl contenant 5 µl de NEB Next Ultra II Q5 Mastermix (New England Biolabs, Ipswich, MA, États-Unis), 0,25 µM de chaque amorce, 2,50 µM de l'inhibiteur du loup gris pour le fragment 12S et 3 µl d'ADN matrice. Les conditions de cyclage étaient les suivantes : dénaturation initiale à 98°C pendant 3 min ; 40 cycles à 98°C pendant 10 s, 53°C pendant 30 s et 72°C pendant 30 s ; et extension finale à 72 °C pendant 5 min.

Les produits de la PCR ont été quantifiés par qPCR (matériel supplémentaire 1), puis mis en pool de manière équimolaire entre les échantillons (les deux cibles incluses), puis purifiés à l'aide du système de billes Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) avec un rapport de 1,5× de billes.

Toutes les bibliothèques ont été qualifiées à l'aide d'un instrument QIAxcel Advanced en suivant le protocole du fabricant pour le kit haute résolution, et leurs concentrations ont été évaluées par PC numérique (matériel supplémentaire 1). Les bibliothèques ont été diluées et regroupées pour atteindre une concentration équimolaire de 35 pM pour les réactions de matrice. Ce processus consistait à fixer des fragments d'ADN à des particules Ion Sphere (ISP) en vue d'une amplification clonale par PCR en émulsion, réalisée à l'aide du système Ion Chef™ (Thermo Fisher, Waltham, MA, États-Unis). Après préparation, les échantillons ont été séquencés sur le système Ion S5™ XL à l'aide d'un kit Ion Chef 530 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis).

Analyses

Échantillons de référence Ovis

Les séquences de la boucle D obtenues à partir des échantillons de référence *Ovis* ont été traitées à l'aide de Geneious (Kearse et al. 2012). Les lectures sens et antisens ont été alignées pour chaque échantillon à l'aide de l'alignement Geneious afin de générer des séquences consensuelles de haute qualité.

Ces séquences consensuelles ont été alignées dans Seaview v.4 (Gouy et al. 2009) et tronquées aux extrémités 5' et 3' afin d'obtenir un fragment standardisé de 674 pb. Des haplotypes distincts ont été identifiés à l'aide de DNA Collapser (<https://us-ers-birc.au.dk/palle/php/fabox/dnacollapser.php>) et inspectés manuellement afin de localiser une région de 100 à 300 pb qui : (i) permettait de distinguer *O. aries* et *O. musimon* et (ii) contenait des régions flanquantes suffisamment conservées pour la conception d'amorces. Les indices de diversité des haplotypes ont été calculés dans R (R Core Team 2023) à l'aide du package pegas (Paradis 2010). Des courbes de raréfaction des haplotypes ont été générées pour chaque espèce à l'aide de 1 000 itérations.

Un réseau d'haplotypes TCS (Clement et al. 2000) a été construit à l'aide de PopArt v.1.7 (Leigh et al. 2015) afin de visualiser les relations génétiques entre les échantillons. Tous les haplotypes identifiés ont été compilés dans une base de données de référence (OvisCR_ref)

en vue d'une identification en aval et d'une comparaison avec des séquences accessibles au public.

Échantillons d'excréments de loup

Afin d'évaluer les performances du marqueur D-loop nouvellement développé et de le comparer au marqueur 12S sur des échantillons réels d'excréments de loup, nous avons traité les données de métabarcoding à l'aide de deux pipelines bioinformatiques distincts.

En effet, de nombreux pipelines ont été décrits pour analyser les données de métabarcoding, dont les étapes clés comprennent le démultiplexage des lectures brutes, le filtrage de qualité, la fusion des lectures appariées, le filtrage des artefacts, le regroupement des séquences en unités taxonomiques opérationnelles (OTU) ou la définition de variants de séquence d'amplicon (AS) et, enfin, les classifications taxonomiques (Hakimzadeh et al. 2024). Certaines études préconisent l'utilisation de seuils pour filtrer les lectures en faible nombre et regrouper les séquences restantes en OTU, mais la fixation de ces seuils reste arbitraire, sans méthode consensuelle entre les études (Drake et al. 2022 ; Littleford-Colguhoun et al. 2022 ; Tercel et Cuff 2022). En débruitant les séquences avant de construire les OTU, les méthodes AS ne reposent pas sur la définition de seuils de dissemblance et peuvent s'avérer plus précises dans l'identification des taxons (Callahan et al. 2017 ; Couton et al. 2021).

Ici, nous avons testé deux pipelines couramment utilisés pour définir : (i) des OTU à l'aide de seuils de dissemblance courants avec le package OBITools v. 1.01 (<https://python-hosted.org/OBITools/> ; Boyer et al. (2016)) et (ii) des AS à l'aide du package R DADA2 v. 1.26.0 (Callahan et al. 2016) afin d'évaluer leur impact sur les résultats. Les paramètres et les principales fonctions sont détaillés dans le matériel supplémentaire 2. Les fichiers FASTQ de lectures brutes sont disponibles dans la base de données European Nucleotide Archive (ENA) (numéro d'accès du projet PRJEB106338) afin de permettre aux lecteurs de tester d'autres pipelines. Toutes les analyses ont été réalisées avec R v. 4.2.2. Les OTU et les AS ont été identifiés selon la même approche pour les fragments 12S et D-loop diagnostiques (OvisCR).

Tout d'abord, les lectures brutes générées par le séquençage Ion Torrent ont été traitées à l'aide de Torrent Suite* v.5.4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis). Les lectures ont été démultiplexées en fonction des séquences de codes-barres et les séquences polyclonales, de mauvaise qualité et contaminées par des adaptateurs ont été filtrées à l'aide des paramètres de qualité par défaut. Un fichier FASTQ par échantillon a été généré, contenant toutes les séquences conservées pour les deux régions ciblées.

Pour définir les OTU, les lectures obtenues ont été analysées à l'aide du progiciel OBITools. Seules les séquences contenant les deux amorces (sens et antisens) pour chaque région ciblée ont été conservées, et les amorces ont été supprimées des séquences. Des numéros d'identification d'échantillon ont été attribués à chaque lecture. Les séquences strictement identiques ont été regroupées en OTU temporaires et fusionnées pour calculer le nombre de lectures par OTU. Par la suite, seules les OTU de la plage de taille attendue (> 60 pb pour 12S et 100-200 pb pour OvisCR) et comportant au moins 10 lectures ont été conservées pour une analyse plus approfondie. Ce seuil a été choisi sur la base des paramètres recommandés par OBITools (Royaux et al. 2022) et d'études antérieures sur le

métabarcoding (Drake et al. 2022), afin de réduire les variants de faible fréquence erronés tout en conservant les séquences de proies rares mais authentiques (Deagle et al. 2013). Pour la cible 12S, les OTU représentant moins de 5% du total des lectures dans un échantillon et ne différant que par une seule mutation (seuil de similarité de 97%, Alberdi et al. (2018)) d'une OTU majeure ont été fusionnées avec l'OTU majeure correspondante, car elles étaient considérées comme des artefacts probables. Cette étape n'a pas été appliquée à la cible OvisCR en raison de la grande similitude génétique entre les haplotypes d'*O. musimon* et d'*O. aries*. Une telle fusion risquait de masquer par inadvertance les différences diagnostiques que cette étude vise à mettre en évidence. Les ensembles de données finaux se composaient d'un tableau par cible, répertoriant toutes les OTU validées et leurs abondances relatives par échantillon.

En parallèle, les ASVs ont été définis à l'aide du package R DADA2. Tout d'abord, OBITools a été utilisé pour filtrer les séquences contenant les deux amorces (sens et antisens) pour chaque région ciblée et pour supprimer les amorces des séquences, car cette étape n'était pas effectuée par DADA2. Seules les lectures ne comportant aucune base incertaine (pas de N) et contenant moins de trois erreurs attendues ont été conservées. Nous avons ensuite utilisé l'algorithme DADA2 pour apprendre le modèle d'erreur à partir des données et l'avons appliqué aux données de séquences filtrées et tronquées. Aucun seuil supplémentaire de nombre de lectures n'a été appliqué pour ce pipeline, car l'algorithme de débruitage modélise explicitement les erreurs de séquençage. Enfin, un tableau d'ASV a été construit pour chaque cible avant de supprimer les chimères. Les ensembles de données finaux se composaient d'un tableau par cible, répertoriant tous les ASV validés et leurs abondances relatives dans chaque échantillon.

Enfin, les OTU ou ASVs identifiés ont été comparés à des bases de données de référence internes ou à la base de données publique GenBank pour l'attribution taxonomique à l'aide de BLAST et de scripts R personnalisés. L'approche variait en fonction du fragment cible.

Pour le fragment 12S, les OTU/ASVs ont été alignés avec la base de données publique GenBank. Pour chaque alignement, un score d'identité (*IS*), défini comme le produit de l'identité de séquence et de la couverture d'alignement, a été calculé. Seules les correspondances présentant un $IS \geq 95\%$ ont été prises en compte. L'attribution taxonomique a suivi une approche conservatrice : lorsqu'une seule meilleure correspondance était identifiée, l'OTU/ASV était attribué à cette espèce. Dans les cas où plusieurs correspondances principales présentant le même *IS* étaient identifiées, l'OTU/ASV était attribué au niveau taxonomique commun le plus bas parmi les correspondances. Enfin, les lectures provenant d'OTU/ASVs ayant des classifications taxonomiques identiques ont été regroupées afin d'estimer la contribution relative de chaque taxon dans chaque échantillon à la composition du régime alimentaire.

Pour les échantillons comportant plus de 100 lectures d'*Ovis* spp., basées sur le fragment 12S, les classifications taxonomiques ont été affinées à l'aide de l'ensemble de données OvisCR. Dans un premier temps, les OTU/ASVs OvisCR ont été alignés sur la base de données de référence interne (OvisCR_ref). Lorsqu'une correspondance parfaite d'au moins 178 pb (la longueur de l'OvisCR) était trouvée ($IS = 100\%$), l'haplotype était confirmé et l'espèce attribuée en conséquence. Dans un deuxième temps, les OTU/ASVs ne répondant pas à ces

critères ont été comparés aux séquences de GenBank. À ce stade, l'attribution au niveau de l'espèce a été acceptée si l'OTU/ASVs correspondait à une séquence d'*O. musimon* avec un $IS = 100\%$ ou à une séquence d'*O. aries* avec un $IS \geq 99\%$. Ce seuil tient compte de la plus grande diversité mitochondriale chez les ovins domestiques, résultat de la sélection artificielle, qui augmente la probabilité de rencontrer des haplotypes non référencés, mais authentiques. En revanche, la plus faible diversité génétique d'*O. musimon* rend les haplotypes non documentés moins probables. Par conséquent, les OTU/ASVs correspondant à *O. musimon* avec un $IS < 100\%$ ou correspondant à plusieurs espèces *Ovis* avec un $IS > 99\%$ ont été classés de manière prudente au niveau du genre.

RESULTATS

Échantillons de référence d' *Ovis*

Sur les 46 échantillons de moutons domestiques et les 46 échantillons de mouflons Européens, des séquences de haute qualité de la boucle D (674 pb) ont été obtenues pour 41 échantillons (89% des échantillons d'*O. aries* prélevés) et 30 échantillons (65% des échantillons d'*O. musimon* prélevés), respectivement. La plupart des échantillons d'*O. musimon* présentant des séquences de faible qualité ($n = 16$) étaient des échantillons non invasifs, comprenant 14 échantillons de crottes ou de poils, dont l'ADN était dégradé ou en faible quantité. Cela pourrait expliquer le taux de réussite de séquençage plus faible chez *O. musimon* par rapport à *O. aries*. Au total, **45 haplotypes distincts** (numéros d'accès GenBank PX219566-PX219610) ont été identifiés, avec 82 sites variables et aucun chevauchement entre les espèces. La diversité haplotypique (Hd) était nettement plus élevée chez les moutons domestiques, avec 40 haplotypes identifiés et une diversité haplotypique de 0,999, que chez le mouflon Européen, avec cinq haplotypes identifiés et une diversité haplotypique de 0,685. À partir de cet alignement, un fragment de 178 pb adapté au métabarcoding a été identifié (OvisCR), sans haplotypes communs aux deux espèces et avec des régions flanquantes suffisamment conservées pour concevoir des amorces avec un usage minimal de bases dégénérées. Il comprenait 43 sites variables et permettait de distinguer quatre haplotypes de mouflons Européens ($Hd = 0,669$) et 35 haplotypes de moutons domestiques ($Hd = 0,985$; Fig. 3 et matériel supplémentaire 3). **La plupart des haplotypes de mouflons Européens différaient des haplotypes de moutons domestiques par au moins trois sites de mutation.** Une exception était CR178_OM004 (partagé par deux individus et situé au centre du réseau d'haplotypes sur la Fig. 3), qui ne différait que par un seul site de mutation de deux haplotypes de moutons domestiques. Sur le fragment CR plus long (674 pb), cet haplotype différait par au moins six mutations de l'haplotype de mouton domestique le plus proche et ne se trouvait pas au centre du réseau (matériel supplémentaire 4).

La plus grande diversité génétique chez les moutons domestiques a également été mise en évidence par les courbes de raréfaction des haplotypes, le nombre d'haplotypes détectés augmentant de manière presque linéaire avec la taille de l'échantillon (Fig. 4). **En revanche, la courbe du mouflon Européen a atteint rapidement une asymptote, indiquant qu'un échantillonnage supplémentaire a peu de chances de révéler d'autres haplotypes.**

En raison de la grande diversité haplotypique observée chez *O. aries* et de la proximité génétique étroite entre les haplotypes des deux espèces, comme l'a révélé le réseau TCS utilisant le fragment OvisCR, nous avons effectué des recherches BLAST dans la base de données GenBank afin d'évaluer la spécificité taxonomique de chaque haplotype. Seules les

correspondances présentant une couverture de 100% de la requête et une identité de 100% ont été prises en compte.

Parmi les 35 haplotypes identifiés dans les échantillons d'*O. aries*, 19 présentaient des correspondances exactes dans GenBank, toutes correspondant exclusivement à des séquences d'*O. aries*.

Les quatre haplotypes détectés dans les échantillons d'*O. musimon* ont également donné lieu à des correspondances.

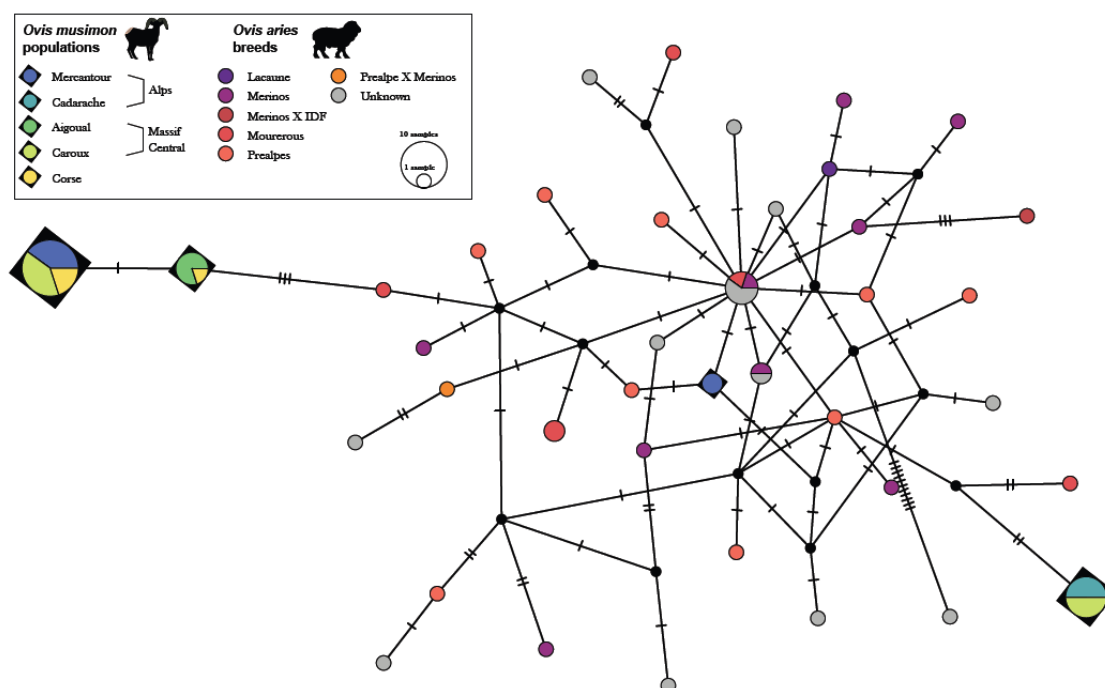


Figure 3. Réseau d'haplotypes TCS, basé sur un fragment diagnostique de la boucle D de 178 pb, établi à partir de 30 échantillons de référence d'*Ovis musimon* et de 41 échantillons de référence d'*Ovis aries* prélevés en France. Chaque haplotype est représenté par un cercle pour *O. aries* et par un carré à l'intérieur d'un carré pour *O. musimon*. Chaque trait sur les lignes reliant les haplotypes indique une mutation unique. La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus partageant cet haplotype et les couleurs indiquent les races d'*O. aries* et les populations d'*O. musimon*. Les points noirs représentent les haplotypes non échantillonnés. IDF, Île-de-France

Un haplotype (CR178_OM002) correspondait à des séquences d'*O. musimon*, d'*O. ammon* et d'*O. orientalis*. **Cependant**, comme ces deux dernières espèces ne sont pas présentes en France, cela ne compromet pas la capacité du fragment OvisCR à identifier les proies d'*O. musimon* dans notre zone d'étude. Un autre haplotype (CR178_OM004) correspondait à une séquence d'*O. ammon* et à 16 séquences d'*O. aries*, toutes provenant de races locales ou rares non présentes en France (par exemple d'Espagne, du Portugal, d'Italie, de Bulgarie, de Hongrie, de Pologne, de Russie, de Turquie, du Pakistan, de Chine et de Mongolie). **Néanmoins**, en raison de sa grande proximité avec d'autres haplotypes Français d'*O. aries* et de sa position centrale dans le réseau, nous avons classé de manière prudente l'haplotype CR178_OM004 détecté dans les excréments de loup comme provenant d'une proie du genre *Ovis*, sans préciser l'espèce. Les autres haplotypes d'*O. musimon* correspondaient exclusivement à des séquences d'*O. musimon*.

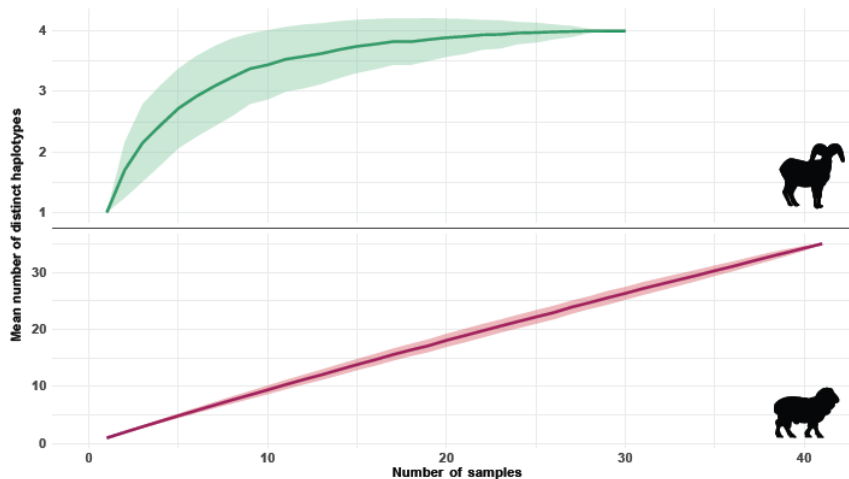


Figure 4. Courbes de raréfaction des haplotypes, basées sur un fragment diagnostique de la boucle D de 178 pb, généré à partir de 30 échantillons de référence d'*Ovis musimon* et de 41 échantillons de référence d'*Ovis aries* prélevés en France. Les courbes montrent l'accumulation d'haplotypes uniques à mesure que la taille des échantillons augmente pour chaque espèce. Les zones ombrées représentent les écarts-types calculés à partir de 1 000 itérations de rééchantillonnage. Vert : *Ovis musimon* ; violet : *Ovis aries*

Échantillons d'excréments de loup

Des contrôles négatifs et positifs ont été utilisés pour déterminer s'il fallait recourir à un filtrage supplémentaire utilisant des seuils de nombre de lectures lors de l'interprétation des résultats du métabarcoding.

En ce qui concerne le fragment 12S, seuls deux contrôles négatifs n'ont présenté aucune lecture, que ce soit avec le pipeline OBITools ou DADA2 (matériel supplémentaire 5). Les autres contrôles négatifs ont présenté entre 1 et 345 lectures, et les deux contrôles présentant le plus grand nombre de lectures (82 et 219 avec OBITools et 95 et 345 avec DADA2) étaient contaminés par de l'ADN humain. Les contrôles positifs ont présenté un nombre élevé de lectures *U. arctos* (entre 14 861 et 110 003 pour OBITools et entre 16 666 et 127 212 pour DADA2), comme prévu. D'autres espèces ont parfois été détectées avec un nombre de lectures variant de 1 à 77 avec OBITools et de 3 à 166 avec DADA2.

En ce qui concerne le fragment OvisCR, un contrôle négatif a présenté une lecture *Ovis* sp., tant avec OBITools qu'avec DADA2. Un contrôle positif a également présenté cinq lectures *O. aries* en utilisant le fragment CR et le pipeline DADA2.

Ces résultats soulignent la nécessité d'appliquer des seuils de nombre de lectures lors de l'interprétation des résultats de métabarcoding, en particulier pour le fragment 12S. Sur la base des échantillons témoins et des seuils couramment utilisés dans la littérature, nous avons appliqué un seuil de 100 lectures par échantillon pour considérer une OTU/AS comme un résultat valable et non comme un artefact ou une séquence parasite. Ce seuil a été appliqué à la fois avec OBITools et DADA2.

Pour le fragment OvisCR, un seuil moins restrictif peut être utilisé, car les échantillons témoins présentaient rarement des lectures d'*Ovis* spp. et, lorsque c'était le cas, le nombre ne dépassait jamais 10 lectures. Cette valeur est cohérente avec les seuils précédemment appliqués dans d'autres études de métabarcoding. **Ainsi**, nous discutons des résultats pour

ce fragment en utilisant à la fois des seuils de 10 et de 100 lectures par OTU/AS et par échantillon.

À l'aide du fragment 12S, la présence de proies *Ovis* spp. a été confirmée dans les 115 échantillons de loups, avec des nombres de lectures allant de 108 à 45 973 (moyenne : 4 294 lectures) avec OBITools et de 144 à 75 743 (moyenne : 10 380 lectures) avec DADA2 (matériel supplémentaire 5).

Avec le fragment OvisCR, des proies de l'espèce *Ovis* spp. ont été détectées avec plus de 10 lectures dans tous les échantillons sauf cinq (95,7%) avec OBITools et dans tous les échantillons sauf quatre (96,5%) avec DADA2, le nombre de lectures par échantillon variant de 1 à 54 161 (moyenne : 4 303 lectures) avec OBITools et de 1 à 6 478 (moyenne : 4 623 lectures) avec DADA2 (matériel supplémentaire 5). Tous les échantillons, à l'exception de 13 (88,7%) et 10 (91,3%), présentaient plus de 100 lectures d'*Ovis* spp. avec OBITools et DADA2, respectivement.

Les échantillons présentant moins de 100 lectures *Ovis* spp. avec le fragment OvisCR affichaient également un nombre significativement plus faible de lectures *Ovis* spp. dans l'ensemble de données 12S que les autres échantillons (OBITools : moyenne = 1 275 contre 4 679 ; test $t, p = 4,06 \times 10^{-4}$; DADA2 : moyenne = 2 213 contre 11 157 ; test $t, p = 2,84 \times 10^{-8}$), ce qui pourrait expliquer le faible taux de détection avec le fragment OvisCR.

En ne considérant que les échantillons comportant plus de 100 lectures d'*Ovis* spp. avec OvisCR, 85 et 91 ont été classés au niveau de l'espèce avec OBITools et DADA2, respectivement (Tableau 2). Les échantillons pour lesquels l'identification des proies *Ovis* spp. n'était possible qu'au niveau du genre présentaient un nombre de lectures significativement inférieur à ceux ayant fait l'objet d'une attribution au niveau de l'espèce (OBITools : moyenne = 1 917 contre 5 353 lectures ; test $t, p = 1,33 \times 10^{-3}$. DADA2 : moyenne = 2 394 contre 5 394 lectures ; test $t, p = 8,35 \times 10^{-3}$). **Enfin**, à ce seuil, les deux pipelines ont donné des classifications différentes pour huit échantillons, dont sept ont été classés au niveau de l'espèce avec DADA2, mais pas avec OBITools, et un a été classé au niveau de l'espèce avec OBITools, mais pas avec DADA2.

En considérant les échantillons comportant plus de 10 lectures *Ovis* spp. avec OvisCR, 96 et 100 ont été classés au niveau de l'espèce avec OBITools et DADA2, respectivement (Tableau 2). Les échantillons pour lesquels l'identification des proies *Ovis* n'était possible qu'au niveau du genre présentaient un nombre de lectures significativement inférieur à ceux ayant fait l'objet d'une classification au niveau de l'espèce (OBITools : moyenne = 1 508 contre 5 238 lectures ; test $t, p = 1,56 \times 10^{-4}$, DADA2 : moyenne = 1 603 contre 5 366 lectures ; test $t, p = 2,18 \times 10^{-4}$). **Enfin**, à ce seuil, les deux pipelines ont donné des classifications différentes pour 10 échantillons, dont sept ont été classés au niveau de l'espèce avec DADA2, mais pas avec OBITools, et trois ont été classés au niveau de l'espèce avec OBITools, mais pas avec DADA2. Parmi les échantillons présentant des classifications différentes, deux contenaient des AS des deux espèces avec DADA2 : l'un classé comme *O. musimon* par OBITools (contenant 1 508 lectures d'*O. musimon* et 11 lectures d'*O. aries* avec DADA2) et l'autre classé comme *Ovis* sp. par OBITools.

Tableau 2. Nombre et pourcentage d'échantillons d'excréments de loup ($n = 115$) pour lesquels l'identification de la proie du genre *Ovis* au niveau de l'espèce a été réalisée avec succès à l'aide du fragment OvisCR. Les résultats sont présentés pour deux pipelines bioinformatiques (OBITools et DADA2) et deux seuils de nombre de lectures (10 et 100 lectures). Les pourcentages sont exprimés par rapport au nombre total d'échantillons et par rapport aux échantillons présentant un nombre de lectures *Ovis* supérieur au seuil

Read count threshold	Pipeline	Number of samples assigned at species-level	% of total samples	% of samples with <i>Ovis</i> reads above threshold
100 reads	OBITools	83	72%	81%
	DADA2	91	79%	87%
10 reads	OBITools	96	83%	87%
	DADA2	100	87%	90%

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que la fiabilité de l'attribution au niveau de l'espèce augmente avec la profondeur de lecture et que des seuils plus bas affectent principalement les échantillons contenant peu d'ADN de proie, plutôt que d'introduire des erreurs d'attribution systématiques. De plus, DADA2 a systématiquement attribué un nombre légèrement plus élevé d'échantillons au niveau de l'espèce qu'OBITools, en particulier à des seuils de lecture plus bas, bien que les deux pipelines aient abouti à des conclusions similaires lorsque la profondeur de lecture était suffisante.

DISCUSSION

Nous avons mis au point et validé un nouveau **fragment mitochondrial** de la boucle D permettant de distinguer l'ovin domestique (*O. aries*) du mouflon Européen (*O. musimon*) dans le cadre d'études de **métabarcoding alimentaire**. Ce marqueur répond directement à une limitation critique des marqueurs de métabarcoding couramment utilisés (par exemple 12S ou cytochrome b), qui manquent souvent de résolution pour distinguer des espèces étroitement apparentées, en particulier au sein du genre *Ovis*, dans les régimes alimentaires des carnivores. Une discrimination précise entre ces espèces est particulièrement importante dans le contexte de l'écologie des grands carnivores, où une identification erronée peut conduire à des estimations biaisées des dégâts causés au bétail et à des décisions de gestion mal informées.

Identification d'un fragment diagnostique pour la discrimination des espèces *Ovis*

En séquençant l'intégralité de la région D-loop dans 92 échantillons de référence collectés en France, nous avons identifié un fragment de 178 pb, ici nommé OvisCR, capable de distinguer les deux espèces malgré leur proximité évolutive. La plupart des haplotypes étaient séparés par au moins trois sites de mutation, ce qui permet une discrimination fiable au niveau de l'espèce dans la majorité des cas. De rares cas de divergence minimale, tels que l'haplotype CR178_OM004 identifié chez *O. musimon*, mais ne présentant qu'une seule mutation par rapport à plusieurs haplotypes d'*O. aries*, soulignent à la fois la proximité évolutive des deux espèces (Barbato et al. 2017 ; Chen et al. 2021) et les limites inhérentes aux fragments courts de métabarcoding.

Le fragment OvisCR a également révélé une diversité génétique significativement plus élevée chez les moutons domestiques (35 haplotypes) par rapport au mouflon Européen (4 haplotypes), ce qui concorde avec des études antérieures (Lawson Handley et al. 2007 ; Rochus et al. 2018). Ce schéma reflète probablement la sélection artificielle et les origines géographiques diverses des races d'*Ovis aries* (Ryder 1991), contrairement aux effets de fondateur et au flux génétique restreint observés dans les populations introduites d'*Ovis*

musimon (Savouré-Soubelet et al. 2021 ; Portanier et al. 2022). Les courbes de raréfaction ont confirmé que tous les haplotypes CR de mouflons Européens dans notre zone d'étude ont été identifiés à partir d'un échantillon relativement petit, alors qu'un échantillonnage supplémentaire de moutons domestiques révélerait probablement une plus grande diversité haplotypique.

Enfin, certains haplotypes d'*O. musimon* correspondaient à des séquences d'autres espèces du genre *Ovis* et de races régionales spécifiques d'*O. aries*, ce qui doit être pris en compte dans les zones où ces espèces sont également présentes. De plus, 40% des haplotypes *O. aries* détectés dans notre étude n'étaient pas référencés dans les bases de données publiques, ce qui aurait conduit à une classification au niveau du genre si nous nous étions appuyés uniquement sur les ressources publiques. Cela peut s'expliquer par la spécificité génétique des races Françaises par rapport aux autres races Européennes ou asiatiques référencées dans les bases de données publiques (Rochus et al. 2018). Par conséquent, nous recommandons vivement que les études de métabarcoding tiennent compte de la diversité du bétail local et intègrent des ensembles de données de référence régionaux si nécessaire avant d'interpréter les correspondances.

Application du fragment OvisCR à des échantillons d'excréments de loup

L'application du fragment OvisCR à 115 échantillons d'excréments de loup a démontré sa valeur pratique dans un contexte empirique de métabarcoding. L'identification au niveau de l'espèce a été réalisée pour plus de 81% des échantillons avec des lectures *Ovis*, quel que soit le pipeline ou le seuil utilisé. Les échantillons classés uniquement au niveau du genre *Ovis* se caractérisaient par un nombre de lectures nettement inférieur, ce qui suggère que la résolution taxonomique était en partie limitée par la profondeur de séquençage. Afin de garantir la robustesse de cette application, nous avons évalué plus en détail les performances du fragment OvisCR pour différents seuils de nombre de lectures et différents pipelines bioinformatiques.

L'utilisation de seuils de nombre de lectures est une étape critique, mais souvent arbitraire, dans les analyses de métabarcoding (Drake et al. 2022 ; Littleford-Colquhoun et al. 2022 ; Tercel et Cuff 2022). Dans cette étude, nous avons supprimé toutes les OTUs représentées par moins de 10 lectures dans l'ensemble des échantillons lors de l'utilisation du pipeline OBITools, car cette approche est connue pour retenir les séquences parasites générées lors du PC ou du séquençage. Une telle étape de filtrage initiale n'était pas nécessaire pour DADA2, car son algorithme de débruitage modélise explicitement les erreurs de séquençage et supprime efficacement les séquences artificielles de faible abondance. Après les classifications taxonomiques, nous avons utilisé des échantillons témoins pour évaluer si un filtrage supplémentaire était nécessaire. Alors qu'un seuil prudent de 100 lectures par OTUs/AS par échantillon était justifié pour le marqueur universel 12S, d'après les données de contrôle, les niveaux de contamination pour le fragment OvisCR étaient systématiquement faibles, ce qui justifiait l'exploration d'un seuil inférieur de 10 lectures. L'abaissement de ce seuil a augmenté le nombre d'échantillons classés au niveau de l'espèce sans introduire d'erreurs de classification manifestes. Il est important de noter que l'impact des seuils de nombre de lectures dépendait davantage du marqueur moléculaire lui-même que du choix du pipeline bioinformatique. OBITools et DADA2 ont tous deux montré une sensibilité similaire à la variation des seuils pour un marqueur donné, tandis que les effets des

seuils différaient nettement entre le marqueur universel 12S et le fragment OvisCR spécifique au taxon. Cette tendance contraste avec la littérature sur le métabarcoding (Callahan et al. 2017 ; Couton et al. 2021) et justifie des recherches supplémentaires à l'aide d'ensembles de données supplémentaires.

La comparaison de deux pipelines bioinformatiques largement utilisés, OBITools et DADA2, a donné des résultats cohérents lorsque la profondeur de lecture était suffisante. DADA2 a systématiquement produit un nombre légèrement plus élevé d'attributions au niveau de l'espèce, en particulier à des seuils de lecture plus bas, probablement en raison de sa stratégie de débruitage et de sa modélisation explicite des erreurs (Callahan et al. 2017 ; Couton et al. 2021). **En revanche**, l'approche basée sur les OTU mise en œuvre dans OBITools est apparue plus conservatrice pour les échantillons présentant une profondeur de lecture limitée. Il est important de noter que les divergences entre les pipelines étaient rares et concernaient principalement des cas présentant un nombre limité de lectures OvisC, plutôt que des attributions d'espèces contradictoires. Cela souligne la robustesse du marqueur OvisCR dans différents cadres analytiques.

De plus, la classification de l'haplotype CR178_OM004 illustre l'importance d'une prise de décision prudente dans les inférences basées sur le métabarcoding. Bien que les données sur la boucle D complète soutiennent son affiliation à *Ovis musimon*, l'ambiguïté à l'échelle des fragments courts nous a conduits à attribuer délibérément cet haplotype à *Ovis* sp. plutôt qu'à une espèce. **Ce choix privilégie la robustesse et la transparence plutôt qu'une résolution maximale et évite de surestimer la consommation de proies sauvages dans un contexte sensible en matière de gestion.** De telles pratiques prudentes sont particulièrement importantes lorsque des taxons sauvages et domestiques étroitement apparentés coexistent. **Enfin**, bien que les résultats présentés ici démontrent l'efficacité du fragment OvisCR dans un contexte écologique et géographique spécifique, la prudence s'impose lors de l'extrapolation de ces résultats à d'autres espèces ou régions. Cette étude ne couvre pas l'ensemble de la diversité de la région de contrôle mitochondriale des ovins domestiques ou des mouflons Européens dans d'autres régions d'Europe et d'Asie, et la valeur diagnostique du fragment OvisCR ne doit donc pas être considérée comme directement transposable au-delà du contexte Français.

Conclusions

Du point de vue de la conservation et de la gestion, la capacité à distinguer la prédation sur *Ovis aries* de celle sur *Ovis musimon* est essentielle. La prédation sur les ovins domestiques est un facteur central du conflit entre l'homme et le loup en France et ailleurs (Linnell et Cretois 2018 ; Gervasi et al. 2021 ; Grente et al. 2022), tandis que la prédation sur le mouflon Européen, bien que pertinente pour la gestion cynégétique, a des implications différentes. Une classification erronée d'une espèce pour l'autre pourrait conduire à des estimations incorrectes des dégâts causés au bétail, à des stratégies d'atténuation des conflits mal informées et à des décisions de compensation ou d'abattage erronées.

Notre approche peut servir de modèle pour des développements similaires ciblant d'autres groupes de proies présentant des difficultés taxonomiques. Les travaux futurs devraient viser

à étendre la méthode à un ensemble plus large de taxons herbivores et à valider son applicabilité dans diverses régions géographiques.

Remerciements

Les auteurs remercient tous les bénévoles et coordinateurs du réseau Français Loup-Lynx pour la collecte des données et le travail de terrain. Nous remercions également les techniciens d'ANTAGENE qui ont effectué les travaux de laboratoire et la lecture des électrophérogrammes. Nous remercions Sophie Verzelloni pour son soutien administratif. Enfin, nous remercions Florence Quirié-Guimbard, Dominique Gauthier et Fanny Bastien des services vétérinaires pour leurs précieuses contributions à la collecte des données sur les ovins.

References

- Alberdi A, Aizpurua O, Gilbert MTP, Bohmann K (2018) Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods in Ecology and Evolution* 9: 134–147. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12849>
- Ando H, Mukai H, Komura T, Dewi T, Ando M, Isagi Y (2020) Methodological trends and perspectives of animal dietary studies by noninvasive fecal DNA metabarcoding. *Environmental DNA* 2: 391–406. <https://doi.org/10.1002/edn3.117>
- Barbato M, Hailer F, Orozco-terWengel P, Kijas J, Mereu P, Cabras P, Mazza R, Pirastru M, Bruford MW (2017) Genomic signatures of adaptive introgression from European mouflon into domestic sheep. *Scientific Reports* 7: 7623. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07382-7>
- Bohmann K, Elbrecht V, Carøe C, Bista I, Leese F, Bunce M, Yu DW, Seymour M, Dumbrell AJ, Creer S (2022) Strategies for sample labelling and library preparation in DNA metabarcoding studies. *Molecular Ecology Resources* 22: 1231–1246. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13512>
- Boyer F, Mercier C, Bonin A, Le Bras Y, Taberlet P, Coissac E (2016) OBITools: A unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* 16: 176–182. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12428>
- Bruns A, Waltert M, Khorozyan I (2020) The effectiveness of livestock protection measures against wolves (*Canis lupus*) and implications for their co-existence with humans. *Global Ecology and Conservation* 21: e00868. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00868>
- Buzan E, Pokorny B, Urzi F, Duniš L, Bončina A, Iacolina L, Šprem N, Stipoljev S, Mereu P, Leoni G, Pirastru M, Safner T (2024a) Genetic variation of European mouflon depends on admixture of introduced individuals. *Mammal Research* 69: 145–158. <https://doi.org/10.1007/s13364-023-00726-x>
- Buzan E, Potočnik H, Pokorny B, Potušek S, Iacolina L, Gerič U, Urzi F, Kos I (2024b) Molecular analysis of scats revealed diet and prey choice of grey wolves and Eurasian lynx in the contact zone between the Dinaric Mountains and the Alps. *Frontiers in Zoology* 21: 9. <https://doi.org/10.1186/s12983-024-00530-6>
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13: 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP (2017) Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal* 11: 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>

- 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. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 347: 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.04.002>
- Chapron G, Kaczensky P, Linnell JDC, von Arx M, Huber D, Andr n H, L pez-Bao JV, Adamec M,  lvares F, Anders O, Bal ciauskas L, Balys V, Bed  P, Bego F, Blanco JC, Breitenmoser U, Br seth H, Bufka L, Bunikyte R, Ciucci P, Dutsov A, Engleder T, Fuxj ger C, Groff C, Holmala K, Hoxha B, Iliopoulos Y, Ionescu O, Jeremi  J, Jerina K, Kluth G, Knauer F, Kojola I, Kos I, Krofel M, Kubala J, Kunovac S, Kusak J, Kutal M, Liberg O, Maji  A, M nnil P, Manz R, Marboutin E, Marucco F, Melovski D, Mersini K, Mertzanis Y, Myslajek RW, Nowak S, Odden J, Ozolins J, Palomero G, Paunovi  M, Persson J, Poto nik H, Quenette P-Y, Rauer G, Reinhardt I, Rigg R, Ryser A, Salvatori V, Skrbin ek T, Stojanov A, Swenson JE, Szemethy L, Traj e A, Tsingarska-Sedefcheva E, V na M, Veeroja R, Wabakken P, W fl M, W fl S, Zimmermann F, Zlatanova D, Boitani L (2014) Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes. *Science* 346: 1517–1519. <https://doi.org/10.1126/science.1257553>
- Chen Z-H, Xu Y-X, Xie X-L, Wang D-F, Aguilar-G mez D, Liu G-J, Li X, Esmailizadeh A, Rezaei V, Kantanen J, Ammosov I, Nosrati M, Periasamy K, Coltman DW, Lenstra JA, Nielsen R, Li M-H (2021) Whole-genome sequence analysis unveils different origins of European and Asiatic mouflon and domestication-related genes in sheep. *Communications Biology* 4: 1307. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02817-4>
- Ciani E, Mastrangelo S, Da Silva A, Marroni F, Feren akovi  M, Ajmone-Marsan P, Baird H, Barbato M, Colli L, Delvento C, Dovenski T, Gorjanc G, Hall SJG, Hoda A, Li M-H, Markovi  B, McEwan J, Moradi MH, Ruiz-Larra aga O, Ru i -Musli  D,  salamon D, Sim i  M, Stepanek O, Curik I, Cubric-Curik V, Lenstra JA, Econogene C, Sheephapmap C (2020) On the origin of European sheep as revealed by the diversity of the Balkan breeds and by optimizing population-genetic analysis tools. *Genetics, Selection, Evolution : GSE* 52: 25. <https://doi.org/10.1186/s12711-020-00545-7>
- Ciucci P, Boitani L, Pelliccioni ER, Rocco M, Guy I (1996) A comparison of scat-analysis methods to assess the diet of the wolf *Canis lupus*. *Wildlife Biology* 2: 37–48. <https://doi.org/10.2981/wlb.1996.006>
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1659. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>
- Couton M, Baud A, Daguin-Thi baut C, Corre E, Comtet T, Viard F (2021) High-throughput sequencing on preservative ethanol is effective at jointly examining infraspecific and taxonomic diversity, although bioinformatics pipelines do not perform equally. *Ecology and Evolution* 11: 5533–5546. <https://doi.org/10.1002/ece3.7453>
- de Sousa LL, Silva SM, Xavier R (2019) DNA metabarcoding in diet studies: Unveiling ecological aspects in aquatic and terrestrial ecosystems. *Environmental DNA* 1: 199–214. <https://doi.org/10.1002/edn3.27>
- 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? *Molecular Ecology Resources* 13: 620–633. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12103>
- Di Bernardi C, Wikenros C, Hedmark E, Boitani L, Ciucci P, Sand H,  kesson M (2021) Multiple species-specific molecular markers using nanofluidic array as a tool to detect prey DNA from carnivore scats. *Ecology and Evolution* 11: 11739–11748. <https://doi.org/10.1002/ece3.7918>
- Drake LE, Cuff JP, Young RE, Marchbank A, Chadwick EA, Symondson WOC (2022) An assessment of minimum sequence copy thresholds for identifying and reducing the prevalence of artefacts in dietary metabarcoding data. *Methods in Ecology and Evolution* 13: 694–710. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13780>
- Duchamp C, Boyer J, Briaudet P-E, Leonard Y, Moris P, Bataille A, Dahier T, Delacour G, Millisher G, Miquel C, Poillot C, Marboutin E (2012) Wolf monitoring in France: A dual frame process to survey time- and space-related changes in the population.

- Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy 23: 14–28. <https://doi.org/10.4404/hystrix-23.1-4559>
- Feng J, Frisina MR, Webster MS, Ulziimaa G (2009) Genetic differentiation of argali sheep *Ovis ammon* in Mongolia revealed by mitochondrial control region and nuclear microsatellites analyses. *Journal of the Bombay Natural History Society* 106: 38–44.
- Forin-Wiart M-A, Poulle M-L, Piry S, Cosson J-F, Larose C, Galan M (2018) Evaluating metabarcoding to analyse diet composition of species foraging in anthropogenic landscapes using Ion Torrent and Illumina sequencing. *Scientific Reports* 8: 17091. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34430-7>
- Gervasi V, Linnell JDC, Berce T, Boitani L, Cerne R, Ciucci P, Cretois B, Derron-Hilfiker D, Duchamp C, Gastineau A, Grente O, Huber D, Iliopoulos Y, Karamanlidis AA, Kojola I, Marucco F, Mertzanis Y, Männil P, Norberg H, Pagon N, Pedrotti L, Quenette P-Y, Reljic S, Salvatori V, Talvi T, von Arx M, Gimenez O (2021) Ecological correlates of large carnivore depredation on sheep in Europe. *Global Ecology and Conservation* 30: e01798. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2021.e01798>
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2009) Seaview version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27: 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Grente O, Saubusse T, Gimenez O, Marboutin E, Duchamp C (2022) Wolf depredation hotspots in France: Clustering analyses adjusting for livestock availability. *Biological Conservation* 267: 109495. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2022.109495>
- Hacker CE, Jevit M, Hussain S, Muhammad G, Munkhtsog B, Munkhtsog B, Zhang Y, Li D, Liu Y, Farrington JD, Balbakova F, Alamanov A, Kurmanaliev O, Buyanaa C, Bayandonoi G, Ochirjav M, Liang X, Bian X, Weckworth B, Jackson R, Janecka JE (2021) Regional comparison of snow leopard (*Panthera uncia*) diet using DNA metabarcoding. *Biodiversity and Conservation* 30: 797–817. <https://doi.org/10.1007/s10531-021-02118-6>
- Hakimzadeh A, Abdala Asbun A, Albanese D, Bernard M, Buchner D, Callahan B, Caporaso JG, Curd E, Djemiel C, Brandström Durling M, Elbrecht V, Gold Z, Gweon HS, Hajibabaei M, Hildebrand F, Mikryukov V, Normandeau E, Özkurt E, M Palmer J, Pascal G, Porter TM, Straub D, Vasar M, Větrovský T, Zafeiropoulos H, Anslan S (2024) A pile of pipelines: An overview of the bioinformatics software for metabarcoding data analyses. *Molecular Ecology Resources* 24: e13847. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13847>
- Hiendleder S, Mainz K, Plante Y, Lewalski H (1998) Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: No evidence for contributions from urial and argali sheep. *The Journal of Heredity* 89: 113–120. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.2.113>
- Hiendleder S, Kaupé B, Wassmuth R, Janke A (2002) Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 269: 893–904. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.1975>
- IDELE (2018) Ovins 2017 Productions lait et viande, Les chiffres clés du GEB.
- Jusino MA, Banik MT, Palmer JM, Wray AK, Xiao L, Pelton E, Barber JR, Kawahara AY, Gratton C, Peery MZ, Lindner DL (2019) An improved method for utilizing high-throughput amplicon sequencing to determine the diets of insectivorous animals. *Molecular Ecology Resources* 19: 176–190. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12951>
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A (2012) Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization

- and analysis of sequence data. *Bioinformatics* (Oxford, England) 28: 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Khalatbari L, Egeter B, Abolghasemi H, Hakimi E, Ghadirian T, Khaleghi Hamidi AH, Jowkar H, Breitenmoser U, Brito JC (2022) Assessing Asiatic cheetah's individual diet using metabarcoding and its implication for conservation. *Scientific Reports* 12: 11403. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15065-1>
- Klymus KE, Baker JD, Abbott CL, Brown RJ, Craine JM, Gold Z, Hunter ME, Johnson MD, Jones DN, Jungbluth MJ, Lor Y, Maloy AP, Merkes CM, Noble R, Patin NV, Sepulveda AJ, Spear SF, Steele JA, Takahashi M, Watts AW, Theroux S (2024) The MIEM guidelines: Minimum information for reporting of environmental metabarcoding data. *Metabarcoding and Metagenomics* 8. <https://doi.org/10.3897/mbmg.8.128689>
- Lawson Handley LJ, Byrne K, Santucci F, Townsend S, Taylor M, Bruford MW, Hewitt GM (2007) Genetic structure of European sheep breeds. *Heredity* 99: 620–631. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6801039>
- Leigh JW, Bryant D, Nakagawa S (2015) PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6(9): 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Leopold BD, Krausman PR (1986) Diets of 3 Predators in Big Bend National Park, Texas. *The Journal of Wildlife Management* 50: 290–295. <https://doi.org/10.2307/3801915>
- Linnell J, Cretois B (2018) Research for AGRI Committee - The revival of wolves and other large predators and its impact on farmers and their livelihood in rural regions of Europe. European Parliament, Brussels.
- Littleford-Colquhoun BL, Freeman PT, Sackett VI, Tulloss CV, McGarvey LM, Geremia C, Kartzinel TR (2022) The precautionary principle and dietary DNA metabarcoding: Commonly used abundance thresholds change ecological interpretation. *Molecular Ecology* 31: 1615–1626. <https://doi.org/10.1111/mec.16352>
- 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* 12: e03557. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3557>
- Meadows JRS, Hiendleder S, Kijas JW (2011) Haplogroup relationships between domestic and wild sheep resolved using a mitogenome panel. *Heredity* 106: 700–706. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.122>
- Morehouse AT, Boyce MS (2017) Troublemaking carnivores: Conflicts with humans in a diverse assemblage of large carnivores. *Ecology and Society* 22(3): 4. <https://doi.org/10.5751/ES-09415-220304>
- Nadler CF, Hoffmann RS, Woolf A (1973) G-band patterns as chromosomal markers, and the interpretation of chromosomal evolution in wild sheep (*Ovis*). *Experientia* 29: 117–119. <https://doi.org/10.1007/BF01913288>
- Paradis E (2010) pegas: An R package for population genetics with an integrated–modular approach. *Bioinformatics* (Oxford, England) 26: 419–420. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp696>
- Pirog A, Duchamp C, Kaerle C, Dufaure de Citres C, Rousselot S, Lavarec J, Queney G (2025) Standardization of a high-quality methodological framework for long-term genetic monitoring of the French wolf population. *Ecology and Evolution* 15: e71345. <https://doi.org/10.1002/ece3.71345>
- Portanier E, Chevret P, Gélín P, Benedetti P, Sanchis F, Barbanera F, Kaerle C, Queney G, Bourgoin G, Devillard S, Garel M (2022) New insights into the past and recent evolutionary history of the Corsican mouflon (*Ovis gmelini musimon*) to inform its conservation. *Conservation Genetics* 23: 91–107. <https://doi.org/10.1007/s10592-021-01399-2>

- R Core Team (2023) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reynolds JC, Aebischer NJ (1991) Comparison and quantification of carnivore diet by faecal analysis: A critique, with recommendations, based on a study of the Fox *Vulpes vulpes*. *Mammal Review* 21: 97–122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1991.tb00113.x>
- Rezaei HR, Naderi S, Chintauan-Marquier IC, Taberlet P, Virk AT, Naghash HR, Rioux D, Kaboli M, Pompanon F (2010) Evolution and taxonomy of the wild species of the genus *Ovis* (Mammalia, Artiodactyla, Bovidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.10.037>
- Riaz T, Shehzad W, Viari A, Pompanon F, Taberlet P, Coissac E (2011) ecoPrimers: Inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Research* 39: e145–e145. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr732>
- Ripple WJ, Estes JA, Beschta RL, Wilmers CC, Ritchie EG, Hebblewhite M, Berger J, Elmhagen B, Letnic M, Nelson MP, Schmitz OJ, Smith DW, Wallach AD, Wirsing AJ (2014) Status and ecological effects of the world’s largest carnivores. *Science* 343: 1241484. <https://doi.org/10.1126/science.1241484>
- Rochus CM, Tortereau F, Plisson-Petit F, Restoux G, Moreno-Romieux C, Tosser-Klopp G, Servin B (2018) Revealing the selection history of adaptive loci using genome-wide scans for selection: An example from domestic sheep. *BMC Genomics* 19: 71. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4447-x>
- Roffler GH, Allen JM, Massey A, Levi T (2021) Metabarcoding of fecal DNA shows dietary diversification in wolves substitutes for ungulates in an island archipelago. *Ecosphere* 12: e03297. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3297>
- Royaux C, Norvez O, Coissac E, Boyer F, Le Bras Y (2022) Metabarcoding/eDNA through Obitools (Galaxy Training Materials). <https://training.galaxyproject.org/training-material/topics/ecology/tutorials/Obitools-metabarcoding/tutorial.html>
- Ryder M (1991) Domestication, history and breed evolution in sheep. Volume B8. Elsevier, Amsterdam.
- Savouré-Soubelet A, Arthur C, Aulagnier S, Body G, Callou C, Haffner P, Marchandeu S, Moutou F, Saint-Andrieux C (2021) Atlas des mammifères sauvages de France volume 2: Ongulés et Lagomorphes. Volume 83. Muséum national d’Histoire naturelle, Paris.
- Schroeder H, Palczewski S, Degen B (2021) Development of D-Loop mitochondrial markers for amplification of prey DNA from wolf scat. *Conservation Genetics Resources* 13: 1–4. <https://doi.org/10.1007/s12686-020-01169-1>
- Shi Y, Hoareau Y, Reese EM, Wasser SK (2021) Prey partitioning between sympatric wild carnivores revealed by DNA metabarcoding: A case study on wolf (*Canis lupus*) and coyote (*Canis latrans*) in northeastern Washington. *Conservation Genetics* 22: 293–305. <https://doi.org/10.1007/s10592-021-01337-2>
- Simon C, Buckley TR, Frati F, Stewart JB, Beckenbach AT (2006) Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37: 545–579. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110018>
- Spaulding R, Krausman PR, Ballard WB (2000) Observer bias and analysis of gray wolf diets from scats. *Wildlife Society Bulletin* 28: 947–950.
- Tercel MPTG, Cuff JP (2022) The complex epistemological challenge of data curation in dietary metabarcoding: Comment on “The precautionary principle and dietary DNA metabarcoding: Commonly used abundance thresholds change ecological interpretation” by Littleford-Colquhoun et al. (2022). *Molecular Ecology* 31: 5653–5659. <https://doi.org/10.1111/mec.16576>
- Yang L, Tan Z, Wang D, Xue L, Guan M-x, Huang T, Li R (2014) Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Scientific Reports* 4: 4089. <https://doi.org/10.1038/srep04089>