**UNIVERSITE BLAISE PASCAL** **UNIVERSITE D'AUVERGNE**
N° D.U. 2055 Année 2010

**ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**
N°d'ordre 527

# Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II
en vue d'obtenir le grade de

## DOCTEUR D'UNIVERSITE

**Spécialité :** Ecologie et Biologie des Populations

Soutenue le 24 septembre 2010 par

**Apostolos-Manuel Koussoroplis**

---

# SOURCES DE CARBONE ET D'ACIDES GRAS ESSENTIELS POUR LES JUVENILES DE *Liza saliens* (*Pisces, Mugilidae*) DANS LE RESEAU TROPHIQUE D'UNE LAGUNE COTIERE MEDITERRANEENNE :

Approche *in situ* par biomarqueurs lipidiques et isotopiques

---

| | |
|---|---|
| **Pr. Gilles BOURDIER,** LMGE, Université Blaise Pascal | **Président du jury** |
| **Pr. Christian DESVILETTES,** LMGE, Université Blaise Pascal | **Directeur de thèse** |
| **Dr. Alexandre BEC,** LMGE, Université Blaise Pascal | **Co-directeur de thèse** |
| **Pr. Benoît SAUTOUR,** EPOC, Université de Bordeaux | **Rapporteur** |
| **Dr. Martin KAINZ,** WasserCluster Lunz, Autriche | **Rapporteur** |
| **Dr. Christel LEFRANCOIS,** LIENSs, Université de la Rochelle | **Examinateur** |

LMGE/UMR CNRS 6023/Université Blaise Pascal
Divérsité Specifique et Fonctionnelle des Réseaux Trophiques Aquatiques
24, av. des Landais –Bât. Biologie A – 63173 AUBIERE

# Remerciements

Cette étude a été réalisé dans le laboratoire « Microorganismes : Génome et Environnement », UMR CNRS 6023 et le « Ficheries Research Institute » (Greek National Agricultural Research Foundation : NAGREF) de Nea Peramos, dirigés respectivement par Christian AMBLARD et Argyris KALANIOTIS que je remercie pour leur accueil et la disponibilité qu'ils ont fait preuve tout au long de ce travail.

Ces recherches ont pu être menées à bien grâce à une Bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche dont j'ai bénéficié pendant trois ans ainsi qu'un soutien financier et matériel du NAGREF.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Christian DESVILETTES et Alexandre BEC, pour leur soutien et leur guidance tout au long de ce travail. Merci d'avoir fait de moi un jeune Jedi et de m'avoir initié aux secrets de la Force !

Je souhaite également remercier Gilles BOURDIER, Manos KOUTRAKIS et Marie-Elodie PERGA, pour avoir participé activement et significativement à ce travail. Leur soutien et leur expertise ont été déterminants.

Toute ma gratitude s'adresse également à Benoît SAUTOUR et Martin KAINZ qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse et à Christel LEFRANCOIS pour avoir accepté de juger ce travail.

Je souhaite aussi remercier:

Lionel JOUVE, concepteur et constructeur du PESCADOU I (figure 2.5) et II (sa version motorisé et téléguidé), notre « Q » (Bond et al. 007) à nous, qui par son ingéniosité a pu réaliser nos idées de « gadgets » les plus folles !

Yaurick VAN DEN BERG, qui tel un fidèle « Sancho Pancha », m'a suivi en Grèce, a pataugé dans la vase, a traqué le mulet et a trié le copépode…

Merci à Emilie DUFAUD, qui est arrivée telle une « Déesse *ex machina* » au bon moment, appris en deux temps trois mouvements tous les secrets des lipides et m'a épaulé considérablement dans mon travail.

Katerina KADEMOGLOU et Sébastien BRET pour m'avoir (énormément) aidé avec mes contenus stomacaux et mes tris de bestioles plus petites les unes que les autres.

Anastasia, Argyris, Ioanna, Dimitris et Panagiotis pour leur aide précieuse sur le terrain.

Stephanne FRAISSE pour ses comptages de zooplancton que je n'ai malheureusement pas pu exploiter ici…

Nathalie FRUQUIERE pour sa disponibilité, sa bonne humeur et surtout sa patience.

Les pécheurs de la coopérative, ces « corsaires lagunaires », qui m'ont permis d'entrer dans leur « territoire », m'ont offert leur bateau, leur expertise, leur café frappé, leur repas et leur ouzo.

Je dois également remercier mes collègues et surtout amis: Tout d'abord, Charles, qui en me proposant un rôle de stagiaire médecin légiste dans « Les Experts :qu'-ce-qui-a-bien-pu-tuer-cette-loutre-morte-bourrée-de-pesticides ?» m'a permis de faire mes premiers pas dans le recherche et m'accompagne depuis. Ensuite les anciens locataires du bureau bleu , (les Charlie's Angels) Anne-Catherine, Anne-Hélène et Emilie, qui m'ont accueilli, soutenu et chouchouté! Et enfin, les nouveaux locataires du bureau bleu et du bureau jaune : Hélène, Marion, Mélanie (les Charlie's et Manu's Angels), Guillaume, Jeremy et Jeff pour leur amitié, leur soutien moral, leur humour, leur bonne humeur, leurs moments de folie (et leur super cadeau de thèse). J'ai eu une chance incroyable de vous rencontrer et de passer ces années de thèse avec vous. Vous êtes des belles personnes ! En sachant que j'allais vous voir (pour certaines, toute la sainte journée !!), me lever le matin pour venir au labo a été un plaisir (presque) tous les jours!

Je remercie tout particulièrement mes parents ainsi que ma petite sœur pour leurs encouragements et leur soutien (moral et financier) infaillible tout au long de mes études universitaires. Merci d'avoir toujours eu confiance en moi et de m'avoir offert tout ce qui faut pour réussir dans la vie.

Enfin, ma pensée va vers Laura, qui partage mon quotidien depuis le début, et qui m'a soutenu, encouragé, rassuré, nourri, blanchi et supporté le long de cette thèse. Je vais avoir toute une vie pour te montrer ma gratitude…

…A mes deux grands-pères, Apostolos et Louis

## RESUME

Les lagunes côtières Méditerranéennes constituent des zones de nourrissage pour les juvéniles de plusieurs espèces de poissons côtiers. C'est sur cet apport constant en juvéniles ainsi que sur les ressources trophiques du milieu que s'appuie l'aquaculture extensive dans la lagune Vassova (Préfecture de Kavala, Grèce). Afin d'optimiser la production piscicole, il apparaît important d'identifier les processus favorisant la survie et la croissance des jeunes poissons.

Ce travail s'est focalisé sur une espèce communément exploitée dans les lagunes Méditerranéennes : le mulet sauteur *Liza saliens* (*Mugilidae*). Notre étude s'est attachée à identifier les ressources trophiques soutenant la croissance des juvéniles de *L. saliens* (15 - 50 mm, longueur totale / LT) et à préciser leur qualité nutritionnelle en termes d'apports en acides gras polyinsaturés (AGPI)**.** Ainsi, pendant la période de colonisation de la lagune Vassova par *L. saliens* (Juin - Novembre), des prélèvements mensuels de poissons (juvéniles de *L. saliens* et principales espèces piscicoles sédentaires)*,* de leurs proies potentielles, et des différentes sources de matière organique ont été effectués sur deux stations de la lagune. Une approche combinant l'analyse des biomarqueurs lipidiques, l'analyse isotopique et l'analyse des contenus stomacaux a été adoptée afin d'identifier les sources de carbone soutenant la croissance des jeunes *L. saliens*. Les analyses lipidiques ont également permis de suivre l'évolution de la composition en AG des lipides membranaires (lipides polaires : LP) et de stockage (lipides neutres : LN) des juvéniles de *L. saliens* durant leur premiers mois de vie lagunaire. Enfin, en déterminant par GC-C-IR-MS la composition isotopique des AGPI assimilés par *L. saliens,* il a été possible d'identifier l'origine de ces composés essentiels.

Nos résultats montrent qu'à leur arrivé dans la lagune, les juvéniles (~15 mm, LT) se nourrissent exclusivement d'organismes planctoniques. Lorsque les juvéniles atteignent les 20 mm (LT), ils passent progressivement vers une alimentation principalement basée sur des proies benthiques. Ce changement de régime alimentaire se traduit par une diminution importante des apports alimentaires en 22:6ω3. A cet égard, les résultats obtenus en GC-C-IRMS montrent que chez *L. saliens* cet AGPI a comme toute première origine, les microorganismes du compartiment planctonique. Il apparaît donc qu'au cours de leur transition du milieu planctonique marin vers le milieu benthique lagunaire, les juvéniles de *L. saliens* sont confrontés à une diminution de la qualité nutritionnelle. Néanmoins, le 22 :6ω3, mais également le 20:4ω6 semblent être activement retenus dans les lipides membranaires des jeunes poissons. Plus généralement, nos résultats montrent que le 20:4ω6 est fortement retenu par les principales espèces pisciaires de la lagune, suggérant l'importance pour les poissons estuariens, de ce composé essentiel impliqué dans la résistance des poissons aux stress environnementaux.

## ABSTRACT

Mediterranean coastal lagoons are considered as major nursery areas for several coastal fish species. In Vassova lagoon (Kavala Prefecture, Greece), this continuous input of juveniles, along with the lagoons' natural food resources, sustain local extensive aquaculture. Therefore, in order to optimise the fisheries' yield, the factors affecting juveniles' growth and survival in the lagoon need to be assessed.

The objectives of this research work are to identify the organic matter sources sustaining growth of a common commercial Mediterranean species (*Liza saliens*, *Mugilidae*) juveniles' (15 – 50 mm, total length / TL) and to assess their nutritional quality in terms of polyunsaturated fatty acids (PUFAs). In that aim, fish (*L. saliens* juveniles and principal resident fish species), their potential preys, and basal organic matter sources where sampled monthly during *L. saliens* settlement in Vassova lagoon (June - November). The origin of carbon assimilated by *L. saliens* was assessed using lipid and isotopic biomarker approaches as well as stomach content analysis. Moreover, lipid analyses allowed understanding the influence of diet on the fatty acid (FA) composition of *L. saliens* storage (neutral lipids: NLs) and membrane lipids (polar lipids: PLs) during early life in the lagoon. Finally, the isotopic composition of the PUFAs assimilated by *L. saliens* juveniles was determined by GC-C-IR-MS and allowed the assessment of the sources of these compounds in the ecosystem.

Results indicate that at their arrival at the lagoons' mouth *L. saliens* juveniles (~15 mm, TL) feed on planktonic organisms. When juveniles reach the size of 20 mm (TL), they progressively shift towards benthic prey. This dietary shift is followed by an important decrease of the dietary levels of DHA. Indeed, in Vassova lagoon, this PUFA seems to be mainly produced by planktonic microorganisms. Therefore, during the transition from the marine planktonic environment towards the lagoons' demersal habitat, *L. saliens* juveniles probably experience a decrease in the nutritional quality of their food. However, 22:6ω3 as well as 20:4ω6 appear to be actively retained in *L.saliens* membrane lipids (PLs). More interestingly, 20:4ω6 seems also to be retained by other fish species found in the lagoon. The latter suggests that this essential compound, which in fish is implicated in resistance processes to environmental stressors, has an important physiological role for fish in estuarine environments.

## Abréviations en français

| | |
|---|---|
| **AG** | Acide gras |
| **AGE** | Acide gras essentiel |
| **AGMI** | Acide gras monoinsaturé |
| **AGPI** | Acide gras polyinsaturé |
| **AGR** | Acide gras ramifié |
| **AGS** | Acide gras saturé |
| **AICS** | Analyse isotopique de composé spécifique |
| **ARA** | Acide arachidonique |
| **CID** | Carbone inorganique dissous |
| **CPG** | Chromatographie en phase gazeuse |
| **DHA** | Acide docosahexaenoïque |
| **EMAG** | Ester méthylique d'acide gras |
| **EPA** | Acide eicosapentaenoïque |
| **FO** | Fréquence d' occurrence |
| **LN** | Lipide neutre |
| **LP** | Lipide polaire |
| **LT** | Longueur totale |
| **MOP** | Matière organique particulaire |
| **MOPS** | Matière organique particulaire en suspension |
| **MOS** | Matière organique sédimentaire |
| **PH** | Protistes hétérotrophes |

## Abréviations en anglais

| | |
|---|---|
| **ANOVA** | Analysis of variance |
| **DFA** | Discriminant function analysis |
| **EFA** | Essential fatty acid |
| **CSIA** | Compound specific isotopic analysis |
| **FA** | Fatty acid |
| **FAME** | Fatty acid methyl ester |
| **HUFA** | Highly unsaturated fatty acid |
| **IAEA** | International atomic energy agency |
| **IR-MS** | Isotope ratio mass spectrometre |
| **MUFA** | Monounsaturated fatty acid |
| **NL** | Neutral lipid |
| **NLFA** | Neutral lipid-derived fatty acid |
| **PL** | Polar lipid |
| **PLFA** | Polar lipid-derived fatty acid |
| **PUFA** | Polyunsaturated fatty acid |
| **SAFA** | Saturated fatty acid |
| **SOM** | Sediment organic matter |
| **SPE** | Solid phase extraction |
| **TL** | Total length |

**INTRODUCTION** ..... **5**

**CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE** ..... **11**

1.. LES LAGUNES COTIERES MEDITERRANEENNES. ..... 13
1.1.1 Generalités ..... 13
1.1.2 Rôles fonctionnels des lagunes côtières méditerranéennes pour la faune piscicole ..... 13
1.1.3 Réseaux trophiques dans les lagunes côtières méditerranéennes ..... 15
1.2 UTILISATION DES BIOMARQUEURS LIPIDIQUES ET ISOTOPIQUES POUR L'ETUDE DES RESEAUX TROPHIQUES ..... 17
1.2.1 Introduction ..... 17
1.2.2 Les lipides dans les réseaux trophiques aquatiques ..... 18
1.2.2.1 Généralités ..... 18
1.2.2.1 Composition en AG des producteurs primaires, des bactéries et des protistes hétérotrophes : utilisation des AG en tant que marqueurs chémotaxonomiques ..... 21
1.2.2.2 Composition en AG des consommateurs métazoaires : utilisation de AG en tant qu'indicateurs de transfert trophique ..... 24
1.2.2.3 Limites de l'utilisation des biomarqueurs lipidiques ..... 25
1.2.3 Importance nutritionnelle des acides gras essentiels pour les poissons téléostéens marins ..... 26
1.2.3.1 La notion d' acides gras essentiels ..... 26
1.2.3.2 Rôles physiologiques des AGE chez les poissons téléostéens ..... 27
1.2.4 Les rapport isotopiques dans les réseaux trophiques aquatiques ..... 29
1.2.4.1 Généralités ..... 29
1.2.4.2 Le fractionnement photosynthétique : la signature isotopique des producteurs primaires. ..... 30
1.2.4.3 Fractionnement trophique ..... 31
1.2.4.4 L'application à l'étude des réseaux trophiques et ses limites ..... 32
1.2.5. Couplage de l'analyse lipidique à l'analyse isotopique ..... 33
1.2.5.1 Analyses simultanées ..... 33
1.2.5.2 Analyse isotopique de composés spécifiques ..... 33

**CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES** ..... **35**

2.1 SITE D'ETUDE ..... 37
2.1.1 Les lagunes deltaïques de la rivière Nestos ..... 37
2.1.2 La lagune Vassova ..... 37
2.2 ESPECES ETUDIEES ..... 40
2.2.1 Mugilidés ..... 40
2.2.1.1 *Liza saliens* ..... 42
2.2.1.2 *Liza aurata* ..... 43
2.2.1.3 *Liza ramada* ..... 43
2.2.1.4 *Chelon labrosus* ..... 43
2.2.2 Autres espèces ..... 44
2.2.2.1 *Atherina boyeri* ..... 44
2.2.2.2 *Aphanius fasciatus* ..... 44
2.2.2.3 *Pomatoschistus* spp. ..... 45
2.2.2.4 *Sparus aurata* ..... 45
2.3 PRELEVEMENT ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ..... 47

2.3.1 Sources de matière organique ..... 47
2.3.1.1 Seston ..... 47
2.3.1.2 Matière organique sédimentaire ..... 47
2.3.1.3 Macrophytes et épiphytes ..... 48
2.3.3 Invertébrés ..... 48
2.3.3.1 Zooplancton ..... 48
2.3.3.2 Epibenthos ..... 48
2.3.4 Poissons ..... 49
2.4 ANALYSES ..... 51
2.4.1 Analyse lipidique ..... 51
2.4.1.1 Extraction des lipides totaux ..... 51
2.4.1.2 Séparation des différentes classes de lipides par séparation sur phase solide (SPE) ..... 51
2.4.1.3 Préparation des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) ..... 51
2.5.1 Acidification des échantillons destinés à l'analyse isotopique ..... 56
2.5.2 Analyse isotopique ..... 56
2.5.3 Analyse isotopique des composés spécifiques ..... 57
2.5.4 Analyse des contenus stomacaux ..... 57
2.4.5 Autres mesures ..... 58

**CHAPITRE 3 : EVOLUTION DU REGIME ALIMENTAIRE DES JUVENILES DE *Liza saliens* PENDANT LA PHASE DE COLONISATION ET SES IMPLICATIONS POUR LES APPORTS EN ACIDES GRAS ESSENTIELS ..... 59**

PREAMBULE ..... 61
3.1 ABSTRACT ..... 63
3.2 INTRODUCTION ..... 64
3.3 MATERIALS AND METHODS ..... 65
3.3.1 Study site, sample collection, fatty acid, stable isotope and stomach content analysis ..... 65
3.3.2 Nutritional condition ..... 65
3.3.3 Data analysis ..... 65
3.4 RESULTS ..... 67
3.4.1 Stomach-content analysis ..... 67
3.4.2 $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ analysis ..... 69
3.4.3 FA composition of basal sources and primary producers ..... 71
3.4.4 FA composition of potential preys ..... 73
3.4.5 FA composition of *L. saliens* ..... 73
3.4.6 Nutritional condition ..... 75
3.5 DISCUSSION ..... 77
3.5.1 Food web sustaining *L. saliens* growth during settlement ..... 77
3.5.2 Implications of settlement for condition and essential FA nutrition of *L. saliens* ..... 79
3.6 CONCLUSION ..... 82

**CHAPITRE 4: IMPORTANCE NUTRITIONNELLE DES DIFFERENTES SOURCES DE CARBONE POUR LES JUVENILES DE *Liza saliens*, APPROCHE PAR LES RAPPORTS ISOTOPIQUES D'ACIDES GRAS ($\delta^{13}C$)** ..... 83

PREAMBULE ..... 85
4.1 ABSTRACT ..... 87
4.2 INTRODUCTION ..... 88
4.3 MATERIALS AND METHODS ..... 90
4.3.1 Study site ..... 90
4.3.2 Sampling ..... 92
4.3.3 Stomach contents analysis ..... 92
4.3.4 Fatty acid and fatty acid isotope analysis ..... 92
4.3.5 Bulk $\delta^{13}C$ analysis ..... 93
4.3.6 Data analysis ..... 93
4.4 RESULTS ..... 93
4.4.1 Stomach contents ..... 93
4.2 Fatty acids composition ..... 95
4.4.3 Bulk $\delta^{13}C$ of potential foods ..... 95
4.4.4 $\delta^{13}C$ of individual fatty acids ..... 95
4.5 DISCUSSION ..... 100
4.5.1 $\delta^{13}C$ values of individual FAs ..... 100
4.5.2 Lipid class $\delta^{13}C$ differences ..... 102
4.6 CONCLUSION ..... 103

**CHAPITRE 5:TRANSFERT DES ACIDES GRAS DANS LE RESEAU TROPHIQUE DE LA LAGUNE VASSOVA ..... 105**

PREAMBULE ..... 107
5.1 ABSTRACT ..... 109
5.2. INTRODUCTION ..... 110
5.3. MATERIALS AND METHODS ..... 112
5.3.1 Study site, sample collection, fatty acid and stable isotope analysis ..... 112
5.3.2 Data analysis ..... 112
5.4 RESULTS ..... 115
5.4.1 $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ ..... 115
5.4.2 Fatty acid composition ..... 117
5.4.3 Transfer and retention of FAs in the food web ..... 118
5.5 DISCUSSION ..... 123
5.5.1 The food web in the Vassova lagoon ..... 123
5.5.2 Transfer of FAs from basal sources to primary consumers ..... 124
5.5.3 Transfer of FAs from primary consumers to fish ..... 126
5.5.4 The ecophysiological significance of ARA retention in fish ..... 127
5.6 CONCLUSION ..... 129

**CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES** ..... **131**

6.1. REGIME ALIMENTAIRE DES JUVENILES DE *Liza saliens* ..... 133
6.2. PRINCIPALES SOURCES DE MATIERE ORGANIQUE POUR LES JUVENILES DE *Liza saliens*..... 134
6.3. QUALITE NUTRITIONNELLE DES RESSOURCES ALIMENTAIRES POUR LES JUVENILES DE *Liza saliens* ..... 136
6.4. ORIGINE DES ACIDES GRAS ESSENTIELS AU DEVELOPEMENT JUVENILES DE *Liza saliens* ..... 137
6.5. DYNAMIQUE D'INTEGRATION DU SIGNAL ISOTOPIQUE DANS LES ACIDES GRAS ISSUS DES LIPIDES NEUTRES ET POLAIRES ..... 138
6.6 ROLE DES ACIDES GRAS POLYINSATURES DANS LE RESEAU TROPHIQUE DE LA LAGUNE VASSOVA ..... 138

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**..... 141

# INTRODUCTION

Les lagunes côtières du Bassin Méditerranéen constituent d'importantes zones de nourrissage pour les juvéniles de nombreuses espèces de poissons téléostéens marins (*Mugildae, Sparidaé*) (Franco et al. 2008). En effet, après une phase de vie larvaire pélagique, les alevins de la majorité de ces espèces colonisent les milieux lagunaires afin de profiter de conditions environnementales apparemment favorables à leur développement (Able 2005, Beck et al. 2001). Cet arrivage constant de nouveaux individus est à la base du renouvellement des stocks piscicoles exploités par l'aquaculture extensive lagunaire. Cette méthode d'aquaculture traditionnelle consiste à piéger les juvéniles après leur entrée dans la lagune, à l'aide de barrages artificiels interdisant tout retour vers le milieu marin pour les poissons au-delà d'un certaine taille. Une fois à l'intérieur, leur croissance reposera entièrement sur les ressources trophiques du milieu (Koutrakis 2000). A l'issue de la période de croissance, lorsque la taille commerciale est atteinte, les poissons sont alors capturés à l'aide d'engins de pêche ou piégés au cours de la phase de retour en mer. Dans les lagunes côtières grecques, ce type d'aquaculture extensive représente une importante activité commerciale avec 700 à 1600 tonnes de poissons produits par an (essentiellement des mulets, du bar et de la dorade) dans 76 lagunes qui représentent une surface totale de 34500 ha (Koutrakis 2000, Koutrakis 1994, Tsihrintzis et al. 2007).

En Grèce, la gestion piscicole de ces lagunes reste encore largement empirique et consiste d'une part, à permettre à une partie des géniteurs de migrer en mer pour se reproduire, et d'autre part, à optimiser l'entrée et le piégeage des juvéniles (Tsihrintzis et al. 2007). Cependant, la colonisation d'une zone de nourrissage est une phase critique se caractérisant généralement par des taux de mortalité importants dont l'ampleur détermine le maintien des populations adultes. Les principales causes de mortalité sont liées à la prédation et à l'échec de certains juvéniles, au cours des semaines qui suivent leur arrivée, à s'acclimater ou à se nourrir dans leur nouvel habitat (Almany and Webster 2006, Bradford and Cabana 1997, Gibson 1994, Hoey and McCormick 2004, Islam and Tanaka 2009, Planes et al. 2009). Dès lors, et afin d'optimiser la production piscicole des lagunes, il apparaît important d'identifier les processus favorisant la survie et la croissance des juvéniles qui les colonisent.

Ainsi, au moment de la migration à l'intérieur d'une zone de nourrissage, la prédation est généralement plus intense sur les individus de petite taille (Sogard 1997). Par ailleurs, les juvéniles de plus grande taille sont généralement considérés comme étant plus aptes à se nourrir de manière efficace (Miller et al. 1988) ; ce qui nous amène à penser que la survie de ces jeunes poissons pourrait dépendre en partie de leur capacité à croître rapidement (Meekan

and Fortier 1996, Pedersen 1997, Searcy and Sponaugle 2001). Toutefois, une croissance trop rapide peut affecter le système immunitaire et la résistance des individus aux stress environnementaux (Arendt 1997). Dans les milieux estuariens (lagunes côtières, estuaires) notamment, les poissons doivent faire face à des fluctuations importantes de la température, de l'oxygène dissous, de la salinité et de la turbidité (Long and Seitz 2008, Panfili et al. 2005). En conséquence, les juvéniles doivent disposer de ressources alimentaires leur assurant un rythme de croissance suffisant tout en maintenant un état physiologique leur permettant de faire face aux contraintes du milieu.

A l'heure actuelle, les besoins alimentaires de nombreuses espèces de poissons marins à l'intérêt économique évident (*e.g. Sparidae, Pleuronectidae*) sont bien documentés (Guillaume et al. 1999). Il est largement admis qu' au même titre que la quantité, la qualité nutritionnelle des aliments disponibles conditionne le développement, la croissance et la résistance des poissons face aux forçages biotiques (maladies) ou abiotiques (température, salinité, oxygène dissous) (Ronnestad et al. 1999, Sargent et al. 1999). Parmi les différents nutriments nécessaires au développement et à la croissance des poissons les lipides jouent un rôle majeur. En effet, ils représentent chez les poissons, la principale forme de stockage énergétique (Triglycérides) et apparaissent comme des constituants cellulaires majeurs (Phospholipides membranaires) (Arts and Kohler 2009, Sargent et al. 1999, Tocher 2003). Plus particulièrement, les acides gras polysinsaturés (AGPI) des séries ω3 et ω6 sont reconnus comme des facteurs nutritionnels primordiaux pour le développement et la condition physiologique de la plupart des métazoaires aquatiques (Arts et al. 2001). De ce fait, la production et le transfert de ces composés dans les réseaux trophiques lagunaires pourraient constituer les facteurs clés déterminant la survie et la croissance de diverses espèces de poissons.

Dans ce contexte, ce travail de thèse a comme objectif principal, **l'identification des sources d'AGPI et la visualisation de leur transfert vers les poissons lagunaires. L'étude s'est principalement focalisée sur les *Mugilidae* et plus précisément sur les juvéniles du mulet sauteur *Liza saliens* en raison de l'intérêt halieutique et commercial de cette espèce, ainsi que de son abondance et de son ubiquité dans les lagunes méditerranéennes** (Akin et al. 2005, Franco et al. 2006, Koutrakis et al. 2005). A l'opposé de ce qui est habituellement observé dans le milieu pélagique marin, les milieux lagunaires se caractérisent par une forte hétérogénéité spatiale offrant une multitude de sources de carbone potentielles (phytoplancton, biofilms épibenthiques et épiphytiques, macroalgues, végétaux vasculaires marins et terrestres). Dès lors, et afin de répondre à nos objectifs, il a été nécessaire de

déterminer les liens qui s'établissent entre les différents compartiments trophiques d'une lagune. **Les outils qui se sont imposés à nous pour mener à bien cette démarche reposent sur l'utilisation de marqueurs lipidiques et isotopiques complétés par des techniques plus classiques d'analyse de contenus stomacaux des différents stades de développement de *Liza saliens.***

Ce manuscrit est divisé en six chapitres. Le premier chapitre illustre le contexte bibliographique dans lequel s'inscrit ce travail. Le deuxième chapitre est consacré à la présentation du site et du matériel biologique étudié ainsi que des différentes méthodes de prélèvement et d'analyses communes à l'ensemble des articles scientifiques présentés. Les résultats que nous avons obtenus sont donc exposés sous la forme de trois publications sous presse ou en cours de révision et qui constituent autant de chapitres. Enfin, dans le sixième et dernier chapitre, une conclusion générale et des perspectives sont proposées.

# CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

**CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ..... 11**

1.1 LES LAGUNES COTIERES MEDITERRANEENNES. ..... 13
1.1.1 Généralités ..... 13
1.1.2 Rôles fonctionnels des lagunes côtières méditerranéennes pour la faune piscicole ..... 13
1.1.3 Réseaux trophiques dans les lagunes côtières méditerranéennes ..... 15
1.2 UTILISATION DES BIOMARQUEURS LIPIDIQUES ET ISOTOPIQUES POUR L'ETUDE DES RESEAUX TROPHIQUES ..... 17
1.2.1 Introduction ..... 17
1.2.2 Les lipides dans les réseaux trophiques aquatiques ..... 18
1.2.2.1 Généralités ..... 18
1.2.2.1 Composition en AG des producteurs primaires, des bactéries et des protistes hétérotrophes : utilisation des AG en tant que marqueurs chémotaxonomiques ..... 21
1.2.2.2 Composition en AG des consommateurs métazoaires : utilisation de AG en tant qu'indicateurs de transfert trophique ..... 24
1.2.2.3 Limites de l'utilisation des biomarqueurs lipidiques ..... 25
1.2.3 Importance nutritionnelle des acides gras essentiels pour les poissons téléostéens marins ..... 26
1.2.3.1 La notion d' acides gras essentiels ..... 26
1.2.3.2 Rôles physiologiques des AGE chez les poissons téléostéens ..... 27
1.2.4 Les rapport isotopiques dans les réseaux trophiques aquatiques ..... 29
1.2.4.1 Généralités ..... 29
1.2..4.2 Le fractionnement photosynthétique : la signature isotopique des producteurs primaires. ..... 30
1.2.4.3 Fractionnement trophique ..... 31
1.2..4.4 L'application à l'étude des réseaux trophiques et ses limites ..... 32
1.2.5. Couplage de l'analyse lipidique à l'analyse isotopique ..... 33
1.2.5.1 Analyses simultanées ..... 33
1.2.5.2 Analyse isotopique de composés spécifiques ..... 33

## 1.1. LES LAGUNES COTIERES MEDITERRANEENNES.

### 1.1.1 Généralités

Les lagunes méditerranéennes sont des plans d'eau littoraux**,** généralement de faible profondeur, séparés de la mer par un cordon littoral appelé lido. Néanmoins, des ouvertures sur le lido plus ou moins grandes et nombreuses et appelées « graus », permettent la communication avec le milieu marin. Les lagunes sont également en étroite relation avec les zones humides qui les entourent (marais, deltas, etc.) et reçoivent ainsi de nombreux apports du bassin versant. Les apports en eau douce confèrent alors aux eaux lagunaires un caractère généralement mésohalin (18-30 ; échelle de salinité pratique) (Franco et al. 2008b). La communication avec le milieu marin et les apports en eau douce créent au niveau spatial un gradient de salinité dont l'amplitude peut varier de l'échelle journalière (marées) à l'échelle saisonnière. En effet, le climat méditerranéen, avec ses variations saisonnières très marquées, peut modifier profondément les conditions environnementales régnantes dans les lagunes. Ainsi une importante pluviométrie peut augmenter les apports en eau douce et en nutriments et des vents forts venant de la mer peuvent réduire le temps de résidence de l'eau dans les lagunes (Sylaios & Theocharis 2002).

Les apports en nutriments et en matière organique issus du bassin versant induisent une productivité primaire élevée de l'ordre de 200 à 400 g C $m^{-2}$ $an^{-1}$ (Nixon 1981). Cette richesse en matière organique, mais également la faible profondeur d'eau qui caractérise ces lagunes, sont à l'origine d'une forte diversité de producteurs primaires. En effet, outre le phytoplancton, les microalgues benthiques, les macrophytes et leurs épiphytes associées contribuent également à la production primaire des lagunes (Knoppers 1994). L'importante production primaire, ainsi que les apports allochtones en matière organique issus du bassin versant soutiennent une production secondaire élevée. Par exemple, la production piscicole dans les lagunes méditerranéennes peut atteindre les 150 kg $ha^{-1}$ $an^{-1}$ (Amanieu & Lasserre 1981) soit vingt fois plus que les milieux marins ouverts adjacents (Margalef 1985).

### 1.1.2 Rôles fonctionnels des lagunes côtières méditerranéennes pour la faune piscicole

On dénombre environ 200 espèces de poissons dans les lagunes méditerranéennes. Il s'agit de poissons d'origine marine et dulçaquicole, migrateurs (poissons diadromes) ou résidents (Franco et al. 2008a). Les principales familles retrouvées en termes de fréquence et d'abondance sont les *Atherinidae, Blenidae, Clupeidae, Cyprinodontidae, Engraulidae, Gobidae, Moronidae, Mugilidae, Sparidae* et *Syngnathidae* (Franco et al. 2006, Koutrakis et al. 2005, Maci & Basset 2009).

Relativement peu d'espèces sont considérées comme strictement « lagunaires » ou « résidentes », c'est à dire comme étant inféodées à ces milieux durant tout leur cycle biologique. En effet, la majorité des espèces sont marines, et séjournent dans les lagunes uniquement pendant certaines périodes de leur vie (Franco et al. 2008a). Il peut s'agir d'individus adultes qui y entrent périodiquement. Néanmoins, dans la plupart des cas, ce sont des formes larvaires et juvéniles (*e.g. Liza* sp., *Chelon labrosus*, *Mugil cephalus*).

Quel que soit le stade de développement considéré, ces milieux pourraient offrir plusieurs avantages aux poissons. En raison de leur faible profondeur, les lagunes se réchauffent plus rapidement que le milieu marin adjacent, offrant ainsi des températures favorables à la croissance des poïkilothermes pendant une plus grande période de l'année. Cette faible profondeur favorise également le développement de macrophytes qui par leur présence réduiraient le risque de prédation pour les individus de petite taille (Gibson et al. 2002, Ruiz et al. 1993, Rypel et al. 2007). Enfin, comme les lagunes sont des milieux particulièrement productifs, on considère qu'elles offrent des ressources alimentaires suffisamment abondantes pour le développement des juvéniles (Yàñez-Aranbicia et al. 1994).

Cependant, les milieux lagunaires pourraient aussi présenter des contraintes. En effet, ces milieux sont aussi caractérisés par d'importantes fluctuations des conditions environnementales (température, salinité, oxygène dissous). Ces conditions fluctuantes génèrent des phénomènes de stress adaptatif chez les poissons et provoquent un accroissement des dépenses métaboliques (Bonga 1997, Yamashita et al. 2003). Les fortes densités d'alevins et de juvéniles habituellement observées au sein des lagunes méditerranéennes comparativement aux milieux côtiers adjacents ont conduit les chercheurs à considérer ces milieux comme des nourriceries (Beck et al. 2001). Les facteurs écologiques qui induisent ces fortes densités sont encore mal compris. D'après des études menées sur d'autres types de nourriceries comme les estuaires, ces milieux offriraient un avantage sur le plan nutritionnel par rapport aux secteurs adjacents où les alevins sont également présents (Islam & Tanaka 2005, Islam & Tanaka 2006). Toutefois, cette règle ne semble pas pouvoir s'appliquer à tous les types de nourriceries. Ainsi, si les densités d'alevins sont habituellement plus fortes dans les mangroves que dans les récifs coralliens adjacents, celles-ci seraient plutôt liées à une meilleure protection vis-à-vis des risques de prédation qu'à de meilleures conditions de croissance et d'alimentation (Grol et al. 2008). Cette hypothèse semble renforcée par un certain nombre d'études montrant que la qualité nutritionnelle des ressources alimentaires provenant d'habitats particuliers, habituellement considérés comme nourriceries (herbiers côtiers de zostères), peut être sub-optimale pour les alevins et les juvéniles de morue (*Gadus*

*morhua*) (Copeman et al. 2008, Copeman et al. 2009). Par ailleurs, malgré des températures favorables à la croissance, l'instabilité des conditions du milieu mentionnée plus tôt dans ce chapitre, implique très probablement un certain coût métabolique pour les jeunes poissons (Bonga 1997, Yamashita et al. 2003). Ce coût serait donc compensé par des meilleurs taux de survie liés à une moindre exposition à la prédation et/ou à une meilleure alimentation en termes de quantité et de qualité. Toutefois, peu d'études se sont intéressées aux régimes alimentaires des alevins et des juvéniles dans les lagunes méditerranéennes et aucune donnée n'existe sur la qualité nutritionnelle des ressources qu'ils exploitent. De plus, cette qualité est susceptible d'évoluer en fonction des sources de nourriture recherchées puisque de nombreuses espèces d'alevins passent par différents régimes alimentaires au fur et à mesure de leur croissance (Albertini-Berhaut 1980, Vizzini & Mazzola 2003).

### 1.1.3 Réseaux trophiques dans les lagunes côtières méditerranéennes

Les lagunes méditerranéennes sont caractérisées par une grande diversité de producteurs primaires (macroalgues, microalgues planctoniques, microalgues epiphytiques et benthiques, phanérogames marins, halophytes) (Vizzini & Mazzola 2008). La fluctuation de facteurs tels que la profondeur, la salinité, le temps de résidence de l'eau et l'apport en nutriments déterminent l'importance relative en termes de biomasse et l'alternance des différentes communautés de producteurs primaires dans le temps et l'espace (Knoppers 1994, Trobajo et al. 2002).

De manière générale, on estime qu'en milieu marin seulement 10% de la production issue des phanérogames est broutée (Duarte & Cebrian 1996, Knox 1986). Cette proportion est estimée à 30% pour les macroalgues, et à 45% pour les microalgues benthiques et planctoniques (Duarte & Cebrian 1996, Sorokin 1981). Ainsi, une grande partie de la production primaire non consommée finit dans le compartiment détritique (Duarte & Cebrian 1996). En milieu côtier et estuarien ainsi que dans les lagunes, la part du matériel organique détritique est souvent prépondérante au sein du pool total de matière organique (Mann 1988). En fonction de sa qualité nutritionnelle (palatabilité, digestibilité, contenu calorique, teneurs en azote et en nutriments essentiels), le matériel détritique peut, soit être utilisé directement (détritus algal) par les consommateurs, soit l'être par l'intermédiaire d'une « médiation microbienne » (détritus de phanérogames). En effet, les bactéries associées à la décomposition des particules détritiques améliorent leur qualité nutritionnelle et permettent ainsi leur utilisation par les niveaux trophiques supérieurs (Phillips 1984, Tenore 1983).

Les détritus et leurs bactéries attachées sont associés à d'autres sources de matière organique (protozoaires hétérotrophes, microalgues planctoniques et benthiques, mycètes) constituant un « pool » de matière organique particulaire (MOP) en suspension dans la colonne d'eau (MOPS ou seston) ou qui s'accumule dans les sédiments (matière organique sédimentaire : MOS). La MOP semble être une composante très importante du réseau trophique des lagunes méditerranéennes (Carlier et al. 2007a, Carlier et al. 2007b, Vizzini & Mazzola 2003, Vizzini & Mazzola 2005, Vizzini & Mazzola 2008). En revanche, comme les différentes sources constituant le pool particulaire sont étroitement associées, il est difficile d'estimer leurs contributions respectives au sein de la MOP et, en conséquence, leur transfert aux consommateurs. En outre, peu de consommateurs primaires estuariens ou lagunaires se nourrissent de manière exclusive sur un composant unique du pool particulaire. Ils ingèrent plutôt un mélange des différents composants selon leur disponibilité et leurs besoins nutritionnels (David et al. 2006, Hlaili et al. 2008, Leal et al. 2008). Ce type de stratégie alimentaire pourrait ainsi permettre aux consommateurs d'obtenir les différents nutriments essentiels à leur développement tout en profitant de l'abondance du matériel détritique dans le milieux (Phillips 1984).

Les macrophytes (macroalgues et angiospermes aquatiques), bien représentés dans les lagunes méditerranéennes, semblent également jouer un rôle trophique dont l'importance pour les consommateurs dépend souvent de leur abondance dans le milieu (Vizzini & Mazzola 2008). Néanmoins, les voies par lesquelles la matière organique issue des macrophytes est transférée aux consommateurs (broutage, voie detritique) ne sont pas élucidées. Les macrophytes servent également de support aux biofilms épiphytiques. En raison de leur abondance et de leur haute qualité nutritionnelle, les biofilms épiphytiques, composés de diatomées, de bactéries, de protozoaires et de champignons, peuvent constituer une source de matière organique pour de nombreux crustacés épibenthiques (amphipodes, isopodes, copépodes harpacticoïdes) (Vizzini & Mazzola 2008). A cet égard, dans d'autres types d'écosystèmes côtiers tels que les herbiers de zostères, les microorganismes épiphytiques sont la principale source de matière organique des consommateurs (Jaschinski et al. 2008).

Au sein des lagunes méditerranéennes, les transferts de matière et d'énergie vers les poissons s'effectuent surtout par le réseau trophique benthique (Franco et al. 2008b). En effet, les crustacés épibenthiques constituent les principales sources alimentaires de la communauté pisciaire alors que le zooplancton pélagique n'est consommé que par quelques espèces (*e.g.* *Atherina* sp., *Syngnathus* sp.) et par les jeunes alevins (Vizzini & Mazzola 2003, Vizzini & Mazzola 2005, Vizzini & Mazzola 2006). Parmi les formes épibenthiques, les copépodes

harpacticoides semblent jouer un rôle central dans la chaîne alimentaire des poissons (et particulièrement des juvéniles) lagunaires et estuariens (Coull 1999). L'abondance, la visibilité et la qualité nutritionnelle de ces crustacés ont été avancées afin d'expliquer cette importance (Coull 1990, Coull 1999). En effet, certaines espèces de copépodes harpacticoides sont aptes à se nourrir sélectivement sur des particules à haute qualité nutritionnelle (diatomées) (Azovsky et al. 2005, Carman & Fry 2002), alors que d'autres, se nourrissant de particules de faible qualité nutritionnelle sont capables de synthétiser des nutriments essentiels (acides gras polyinsaturés) (Nanton & Castell 1998) améliorant ainsi la qualité de la matière organique disponible pour les poissons.

## 1.2 UTILISATION DES BIOMARQUEURS LIPIDIQUES ET ISOTOPIQUES POUR L'ETUDE DES RESEAUX TROPHIQUES

### 1.2.1 Introduction

Les études menées afin de visualiser les flux de matière et d'énergie au sein des réseaux trophiques des écosystèmes aquatiques, font appel le plus souvent à deux outils principaux : l'analyse lipidique et l'analyse isotopique.

L'analyse lipidique se base sur le concept de biomarqueur. Un biomarqueur est un composé organique stable sur une échelle de temps donnée dont la structure peut être assignée à une origine biologique définie. Ainsi les composés spécifiques détectés au sein d'un organisme ou d'un groupe d'organismes sont des biomarqueurs chémotaxonomiques qui permettent d'évaluer la présence et l'abondance relative des taxons considérés au sein de mélanges complexes de matière organique (e.g. seston, sediment). Lorsque ces biomarqueurs chémotaxonomiques sont conservés lors d'un transfert trophique, la spécificité et la stabilité de ces composés permettent de visualiser les flux de matière et d'énergie dans les réseaux trophiques .

Les acides gras (AG) sont les biomarqueurs lipidiques les plus couramment utilisés dans les études des réseaux trophiques aquatiques puisque ces composés sont présents chez la plupart des procaryotes et eucaryotes à l'exception notable des *Archae*. De plus, mis a part leur intérêt en tant que biomarqueurs, certains AG sont également des indicateurs de la qualité nutritionnelle d'un compartiment trophique (Brett & Muller-Navarra 1997).

L'analyse isotopique se base sur la transmission prévisible de la composition isotopique des proies vers les consommateurs (DeNiro & Epstein 1978). Ainsi, les éléments comme le carbone dont la composition isotopique ne varie quasiment pas entre niveaux trophiques sont particulièrement utiles pour déterminer l'origine de la matière organique et

suivre son devenir. D'autres éléments comme l'azote subissent de plus grandes variations à chaque transfert trophique et sont indiqués pour assigner à la composante considérée son niveau trophique.

Les paragraphes qui suivent s'efforceront de présenter les intérêts respectifs de l'utilisation des AG et des isotopes du C et du N dans l'étude des flux de matière. Nous en présenterons aussi les limites afin de souligner l'intérêt de l'utilisation simultanée de ces deux approches, ainsi que de leur combinaison par l'analyse isotopique de composés spécifiques (AICS)

### 1.2.2 Les lipides dans les réseaux trophiques aquatiques

#### *1.2.2.1 Généralités*

- *Lipides*

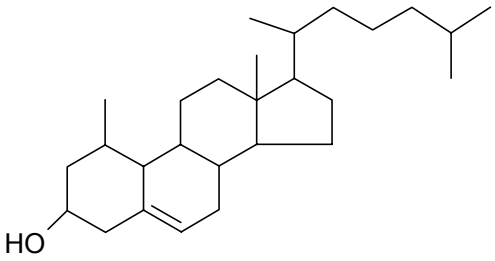
Les lipides se définissent comme des substances organiques peu ou pas solubles dans l'eau mais solubles dans les solvants polaires. Le terme de lipides renferme une grande diversité de structures et de fonctions. En se basant sur les différences de polarité de ces molécules on peut considérer alors les lipides neutres (**LN**) et les lipides polaires (**LP**) :

Lipides neutres (Fig. 1.1) :

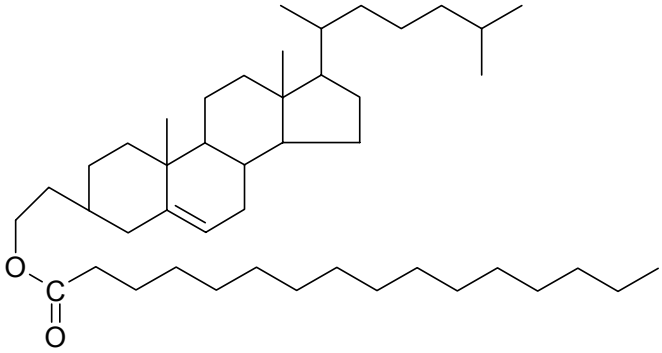
Il peut s'agir d'AG esterifiés avec du glycérol (mono-, di-, triglycérides), des stérols (stérides) et des alcool gras (cérides). Ces grosses molécules constituent des réserves énergétiques stockant l'excédent d'énergie issue de la photosynthèse ou apportée par l'alimentation (le plus souvent il s'agit de triglycérides). Dans les LN, on inclut également les AG libres et les stérols.

Lipides polaires (Fig. 1.2):

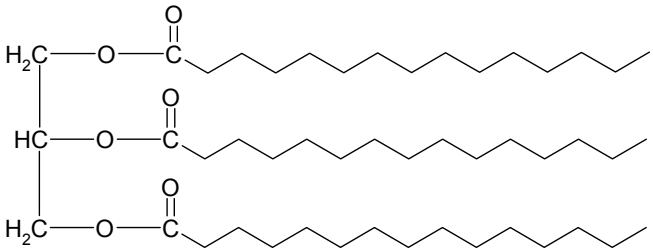
Il s'agit des glycolipides, des lipoprotéines et surtout des phospholipides. A l'exception des lipoprotéines, les LP sont composés d'un ou de deux AG et au minimum de deux autres composés (glycérol, acide phosphorique). Les LP et plus particulièrement les phospholipides sont les principaux constituants des membranes cellulaires dans lesquelles ils jouent un rôle structurel et fonctionnel important.



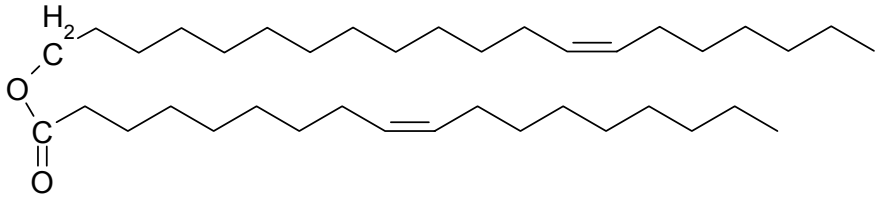

Stérol (Cholestérol)




Ester de stérol

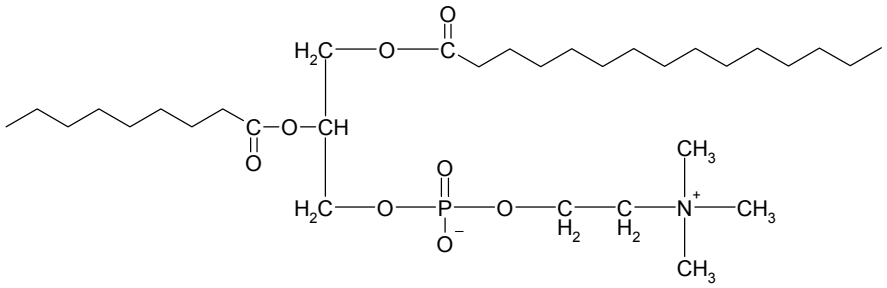



Triglycéride

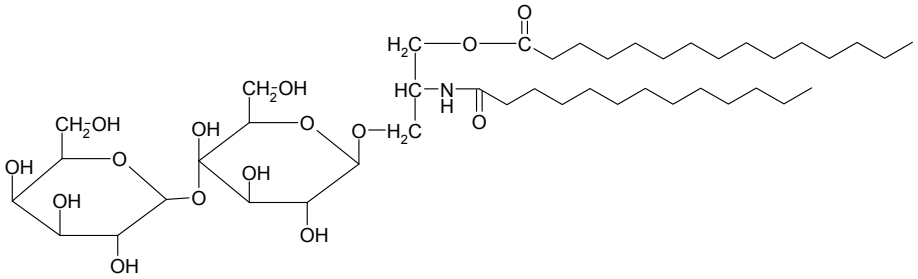



Céride

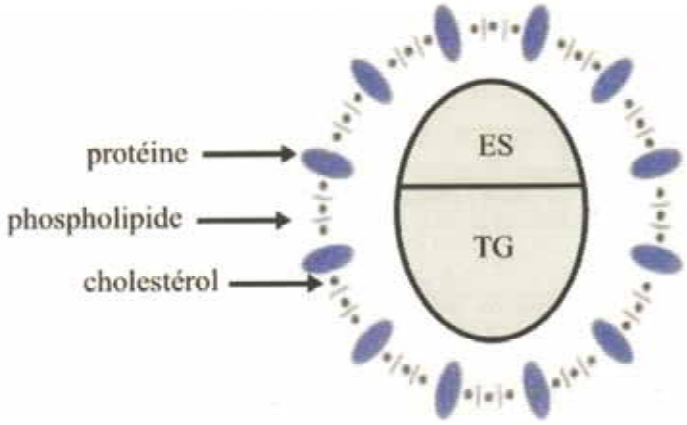
**Figure 1.1 :** Structure des lipides neutres



Phospholipide (phosphatidylcholine)



Glycolipide (galactocérébroside)




Lipoprotéine
(ES: esters de stérols ; TG: triglyceride)

**Figure 1.2 :** Structure des lipides polaires

*Nomenclature des acides gras*

Les acides gras (**AG**) sont les constituants de base de la plupart des lipides, rarement présents à l'état libre, formés d'une chaîne linéaire ou ramifiée comprenant un nombre d'atomes de carbone (entre 4 et 40). On distingue :

Les AG saturés (**AGS**): chaîne carboné sans double liaison.

Les AG saturés à chaîne ramifiée (**AGR**) : la ramification peut être un groupement méthyle disposé sur l'avant dernier atome de carbone par rapport à la fonction méthyle terminale. Ce méthyle peut être branché en position *iso* ou *anteiso.*

Les AG monoinsaturés (**AGMI**) et polyinsaturés (**AGPI**) : ils possèdent une ou plusieurs doubles liaisons sur la chaîne carbonée.

La nomenclature des AG est basée sur le nombre d'atomes de carbone et l'existence de doubles liaisons, leur nombre et leur position. On utilisera ici la nomenclature suivante: **X:YωZ**

Où: X = nombre d'atomes de carbone, Y = nombre de doubles liaisons, Z = localisation de la première liaison double à compter de l'extrémité méthyle.

#### *1.2.2.1. Composition en AG des producteurs primaires, des bactéries et des protistes hétérotrophes : utilisation des AG en tant que marqueurs chémotaxonomiques*

Comme il à été dit précédemment, certains AG spécifiques d'un organisme ou d'un groupe d'organismes peuvent permettre d'évaluer la présence et l'abondance relative des taxons considérés au sein de mélanges complexes de matière organique (e.g. seston, sediment).

- *Microalgues*

Dans les écosystèmes aquatiques, les microalgues sont les principaux producteurs d'AGPI de types ω3 et ω6 (Olsen 1998, Sargent et al. 1987) et leur composition en AG varie en fonction des classes considérées. En outre, différents facteurs environnementaux tels que la lumière, la température, la salinité et les teneurs en nutriments (phosphore, azote, carbone) peuvent induire des variations de composition en AG au sein d'une même espèce (Guschina & Harwood 2009).

Les **Bacillariophycées** (diatomées) sont caractérisées par de fortes proportions en 20:5ω3 (acide eicosapentanoique :EPA) et de 16:1ω7, ainsi que par la présence d'AGPI à 16 atomes de carbone (16:2ω4, 16:2ω7, 16:3ω4, 16:4ω1) qui sont des marqueurs chémotaxonomiques de ce groupe (Bourdier & Amblard 1989, Dunstan et al. 1992, Viso &

Marty 1993, Volkman et al. 1998). Au sein des diatomées pennées on peut également trouver des proportions importantes de 20:4ω6 (Dunstan et al. 1994).

La composition en AG des **Chlorophytes** (chlorophycées, zygophycées etc..) se caractérise par de fortes proportions d'AGPI à 16 et 18 atomes de carbone des séries ω3 et ω6 ainsi que par l'absence d'AGPI à 20 et 22 carbones (Scribe et al. 1991, Viso & Marty 1993, Volkman et al. 1989).

Les **Cryptophycées** présentent de fortes teneurs en EPA, 18:4ω3 et 18:3ω3 (Ahlgren et al. 1990, Napolitano 1998, Nichols et al. 1984, Sargent & Whittle 1981).

La composition en AG des **Dinophycées** est marquée par d'importantes proportions de 18:1ω9, 18:4ω3, EPA, 22 :6ω3 (acide docosahexaenoique, DHA), et éventuellement de 18:5ω3, (Mayzaud et al. 1976, Napolitano 1998, Viso & Marty 1993, Volkman et al. 1998).

Les **Eustigmatophycées** sont surtout caractérisées par d'importantes proportions de 16:1ω7 et d'EPA (Dalsgaard et al. 2003, Volkman et al. 1999, Zhukova & Aizdaicher 1995).

Les profils d'AG des **Prasinophycées** sont représentés par de fortes proportions de 16:4ω3, 18:3ω3, 18:4ω3 et d' EPA (Dunstan et al. 1992, Zhukova & Aizdaicher 1995).

Les **Prymnesiophycées** ont une composition en AG caractérisée par de fortes teneurs en 16:1ω7, 18:4ω3 et EPA. Chez certaines espèces, on trouve également d'importantes proportions de DHA (Bell & Pond 1996, Pond & Harris 1996, Volkman et al. 1991, Zhukova & Aizdaicher 1995).

Le **Raphidophyceés** contiennent aussi d'importantes proportions de 16:1ω7, de 18:4ω3 et d'EPA (Marshall et al. 2002, Nichols et al. 1987).

- *Cyanobactéries*

Ces procaryotes photosynthétiques sont caractérisés par des fortes teneurs en 16:0, des teneurs non négligeables en 18:2ω6 et chez certains genres, des teneurs en 16:1ω7 ou en 18:3ω3 très élevées (Dijkman et al. 2010). Bien que certaines cyanobactéries soient capables de synthétiser de petites quantités d'EPA (Vargas et al. 1998), la majorité de ces microorganismes ne contient pas d'AG dont la chaîne carbonée dépasse les 18 atomes (Dijkman et al. 2010, Merritt et al. 1991, Napolitano 1998, Vargas et al. 1998).

- *Macroalgues et végétaux terrestres*

La composition en AG des **macroalgues** est caractérisé par d'importantes proportions d' AGPI à 18 atomes de carbone (Chlorophycées, Phaeophycées) de 18:1ω9 et d'ARA (Rhodophycées, Pheaophycées) (Dembitsky et al. 1993, Fleurence et al. 1994, Kayama et al. 1989, Khotimchenko et al. 2002).

Chez les **végétaux supérieurs** (angiospermes, terrestres ou aquatiques), la composition en AG est caractérisée par de très importantes proportions de 18:2ω6 et/ou de 18:3ω3 et des proportions non négligeables d'AGS à plus de 24 atome de carbone (Harwood & Russel 1984).

- *Bactéries hétérotrophes*

Seules les eubactéries contiennent des AG, les *Archaea* ont une composition différente et caractéristique. En effet, leurs membranes cellulaires contiennent des lipides formés de ramifications isoprènes et de groupements éthers (Turich et al. 2007).

Les eubactéries sont caracterisées par des AGR à 15 et 17 atomes de carbone (Perry et al. 1979, Volkman et al. 1980), les AG linéaires dominants sont le 15:0, le 16:0, le 17:0 et le 18:1ω7 ; elles peuvent aussi synthétiser des AG cyclopropylés en 17 et 19 carbones (Perry et al. 1979). Si l'on fait exception de certaines bactéries vivant dans les grands fonds océaniques chez qui on a décelé la présence d'EPA (Henderson et al. 1995), les eubactéries sont généralement incapables de synthétiser des AG de plus de 18 atomes de carbone et des AGPI. On considère que le rapport 18:1ω7/18:1ω9 est supérieur à 1 chez les bactéries (Claustre et al. 1992) et inférieur à 1 chez les diatomées, les prymnésiophycées et les algues vertes (Volkman et al. 1989). Souvent, la somme des AG à 15 et 17 atomes de carbone est utilisée pour caractériser ces bactéries (Dalsgaard et al. 2003). Cependant, ces indices seraient spécifiques de certains groupes bactériens (Claustre et al. 1992), et ne permettraient pas de caractériser la totalité de la biomasse bactérienne. D'autres études ont pu distinguer des groupes précis tels que les clostridiées, les bactéries gram-positives ou gram -négatives, ou encore les bactéries sulfato-réductrices à l'aide d'un ou de plusieurs AG particuliers (Changrui & Hollander 1997, Langworthy et al. 1998, Taylor & Parkes 1983, Volkman & Johns 1977).

- *Protistes hétérotrophes*

Les protistes hétérotrophes (PH) n'ont généralement pas de composition en AG caractéristique ; celles-ci dépendent fortement de la nature de leur alimentation. Ainsi, les protistes algivores pourraient contenir préférentiellement des AGPI ω3 alors que ceux se nourrissant sur des bactéries hétérotrophes accumuleraient plutôt des AGR provenant de leur sources respectives de nourriture (Desvilettes & Bec 2009). Il semblerait également que les protistes bactérivores présentent des rapports ω3/ ω6 généralement bas (Desvilettes et al. 1997, Sargent et al. 1987, Zhukova & Kharlamenko 1999). Chez de nombreux groupes de PH, on retrouve l'équipement enzymatique nécessaire à l'insertion de doubles liaison en position ω3 et ω6 et/ou aussi à la bioconversion des 18:3ω3 et 18:2ω6 en DHA, EPA et en ARA respectivement (Bec et al. 2006, Veloza et al. 2006, Zhukova & Kharlamenko 1999).

### *1.2.2.2 Composition en AG des consommateurs métazoaires : utilisation des AG en tant qu'indicateurs de transfert trophique*

Les AG contenus dans les lipides des métazoaires aquatiques (*e.g.* zooplancton, zoobenthos, poissons etc.) sont un mélange d'AG synthétisés *de novo* et d'AG issus de l'alimentation. Néanmoins, lorsque l'apport lipidique alimentaire est suffisant, la néosynthèse et la bioconversion des AG sont ralenties voire inhibées et la majorité des AG provient de l'alimentation sans subir de modifications marquées. Dans ce cas, la stabilité métabolique de certains AG lors du transfert trophique permet de les utiliser en tant que traceurs des relations proie-prédateur. Par exemple, une expérience de nutrition au cours de laquelle le copépode *Acartia tonsa* fut nourri avec un cilié bactérivore a permis de mettre en évidence un transfert et une accumulation d'AG d'origine bactérienne chez les copépodes et les ciliés (Ederington et al. 1995). Plusieurs études ont ainsi pu caractériser le régime alimentaire naturel de nombreux microcrustacés zooplanctoniques (El-Sabaawi et al. 2009, Kattner et al. 1989, Lee et al. 1971b). De manière analogue, St. John & Lund (1996) ont pu montrer le transfert d'AG spécifiques de diatomées à des larves de morue par l'intermédiaire de leurs proies (*nauplii* du copépode *Acartia tonsa)*. Cependant, la dynamique de l'incorporation des AG d'origine alimentaire dans les lipides des consommateurs diffère entre LN et LP. Cela peut conduire à d'importantes différences de composition entre ces deux classes de lipides et diminuer le potentiel de marqueur trophique conféré à certains acides gras. En raison de processus de synthèse différents, on considère généralement que la composition en AG des LN reflète plus fidèlement la composition en AG de la nourriture que celle des LP .

- *Lipides neutres*

Lors de la formation des TAG, qui sont la forme la plus abondante de LN dans de nombreux organismes aquatiques (Ackman 1998), les AG issus de l'alimentation sont convertis en acyl-coenzyme A sans aucune sélectivité pour la longueur de la chaîne aliphatique ou le nombre et la localisation des doubles liaisons (Lands 2009). Bien que le transfert de l'AG de son coenzyme A vers la première et la deuxième position du glycérol soit sélective, c'est l'AG alimentaire le plus abondant qui est placé en troisième position (Ackman 1998, Lands 2009). Ceci explique, pourquoi la **c**omposition en AG des TAG reflète bien celle des apports alimentaires (Dalsgaard et al. 2003).

- *Lipides polaires*

Il est généralement admis que la composition en AG des lipides polaires est, du fait de leur rôle structurel et fonctionnel, moins influencé par les apports alimentaires. En effet, lors de la formation des LP les réactions enzymatiques qui estérifient ou trans-estérifient des AG

en deuxième position de la molécule de glycérol sont sous contrôle génétique et présentent une très grande affinité pour des AGPI à 20 ou 22 atomes de carbone (Ackman 1998, Lands 2009). De plus, la sélectivité pour tel ou tel AGPI peut être modifiée en réponse à l'abondance relative de ces derniers dans la nourriture (Copeman et al. 2002, Fountoulaki et al. 2003, Hessen & Leu 2006) ou bien en réponse à des stimuli extérieurs tels que la température (Arts & Kohler 2009, Brett et al. 2009) et la salinité (Cordier et al. 2002, Kheriji et al. 2003). Ces processus permettent, aux organismes d'assurer le fonctionnement optimal de leurs membranes cellulaires dans une large gamme de conditions environnementales.

Bien que les LP présentent une certaine homéostasie vis-à-vis des variations des apports en AG alimentaires, l'affinité des enzymes pour des AGPI particuliers n'est pas absolue. Ainsi, l'excès au-delà d'un certain seuil d'un AGPI dans les apports alimentaires sur un autre peut, à terme, influencer la composition des LP (Sargent et al. 1999b).

#### *1.2.2.3 Limites de l'utilisation des biomarqueurs lipidiques*

L'intérêt mais aussi les limites de l'utilisation des AG en tant que biomarqueurs résident dans la relative stabilité et la relative spécificité de ces composés.

La spécificité d'un AG biomarqueur est en effet toute relative et dépend de la composition taxonomique de l'échantillon étudié. A titre d'exemple, le 18:4ω3 a été souvent utilisé comme biomarqueur des dinophycées (Leveille et al. 1997). D'autres études n'ont pu bénéficier de cette spécificité car leurs échantillons contenaient outre les dinophycées des cryptophycées et des chrysophycées, toutes riches en 18:4ω3 (Bec 2003). Un AG pris isolement est rarement spécifique d'un groupe taxonomiquement homogène d'organismes. (Bec 2003, Dalsgaard et al. 2003, Reuss & Poulsen 2002). De plus la composition biochimique d'un groupe taxonomique est susceptible de varier en fonction des conditions environnementales (lumière, température, nutriments, phase de croissance, période de stress) (Guschina & Harwood 2009). Ainsi l'évaluation de l'importance relative d'un groupe taxonomique dans un pool de matière organique (seston, sediment) peut s'avérer délicate.

Concernant la visualisation des relations trophiques, on peut également être confronté à certaines limites. Certains AG peuvent subir des élongations et des désaturations après leur incorporation dans un organisme. C'est le cas par exemple de l'EPA et du DHA qui chez certains organismes proviennent en partie de la nourriture et en partie de mécanismes de bioncorversion du 18:3ω3 (Bell & Tocher 2009). Par ailleurs, les animaux peuvent jusqu'à un certain degré, retenir préférentiellement certains AG (Copeman et al. 2002, Hessen & Leu 2006). Cela peut aboutir à des profils d'AG qui ne reflètent plus ceux de la nourriture ingérée.

### 1.2.3 Importance nutritionnelle des acides gras essentiels pour les poissons téléostéens marins

#### *1.2.3.1 La notion d'acides gras essentiels*

Contrairement aux végétaux, la majorité des animaux et donc les poissons téléostéens ne disposent pas des enzymes nécessaires (Δ12- et Δ15-désaturases) à la formations de 18:3ω3 et de 18:2ω6 précurseurs des AGPI des séries ω3 et ω6 (fig 1.3) ; malgré le fait que ces vertébrés aient besoin de ces composés pour leur développement et leur croissance (Olsen 1998). Devant être obligatoirement apportés par la nourriture, ces AGPI sont donc considérés comme des molécules « essentielles » (Acides Gras Essentiels : **AGE**).Les exigences précises en AGE varient qualitativement et quantitativement selon les familles de poissons considérées (Sargent et al. 1999a). Les poisson d'eau douce possèdent les désaturases (Δ6 et Δ5) et les élongases qui leur permettent de synthétiser la totalité des AGPI des séries ω3 et ω6 à partir des précurseurs 18:3ω3 et 18:2ω6 (Henderson & Tocher 1987, Sargent et al. 1995). Toutefois, la synthèse des AGPI à longue chaîne (DHA, EPA, ARA) est coûteuse sur le plan énergétique et il est préférable d'obtenir ces AG par l'alimentation (Olsen 1998). Contrairement aux poissons d'eau douce, les espèces marines qui n'ont pas, ou n'ont qu'une très faible activité de l'enzyme Δ5-desaturase, sont incapables de réaliser ces bioconversions à un taux appréciable. Ils doivent alors récupérer les AGPI à longue chaîne (DHA, EPA, ARA) *via* leur nourriture (Brett et al. 2009, Sargent et al. 1999a, Sargent et al. 1995).

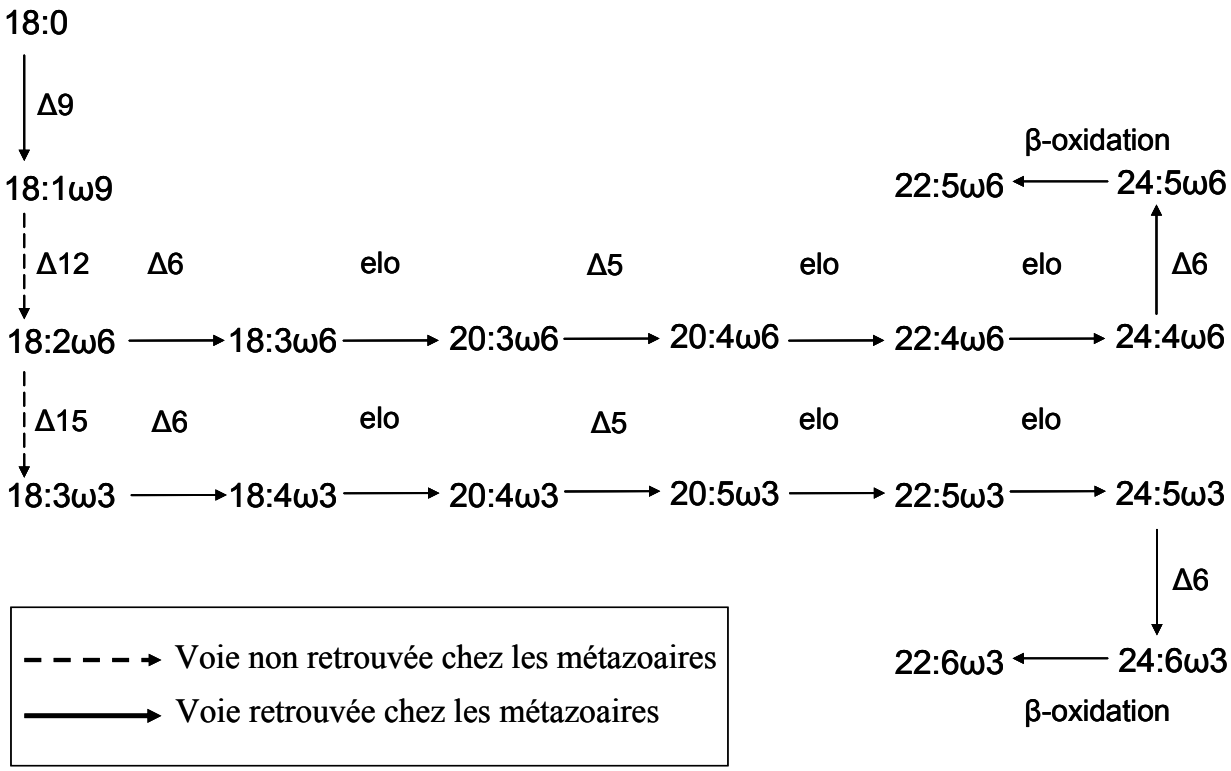



**Figure 1.3 :** Désaturation et élongation des AGPI des séries ω6 et ω3. **Elo:** élongase ; **Δ5,6,9,12,15 :** désaturases

### *1.2.3.2 Rôles physiologiques des AGE chez les poissons téléostéens*

Les AGPI des séries ω3 et ω6 sont intimement liés aux mécanismes physiologiques et biochimiques essentiels au développement des organismes aquatiques (Arts et al. 2001). Les AGPI à longue chaîne carbonée (EPA et DHA), très abondants dans les LP ont un rôle structuro-modulateur au sein des membranes cellulaires. La longueur de leur chaîne carbonée ainsi que leur degré d'insaturation élevé confère à ces molécules une très grande flexibilité qui permet aux membranes cellulaires de maintenir leur fluidité (en particulier dans des conditions de basses températures) (Eldho et al. 2003). Ainsi, les membranes cellulaires peuvent maintenir leurs propriétés de perméabilité, d'élasticité, de transport latéral, de protéines transmembranaires, de formation et absorption de vésicules sous une large gamme de conditions externes (Wassall et al. 2004). Par ailleurs, la formation au sein des membranes cellulaires d' « îlots de fluidité » constitués de LP riches en DHA permet aux protéines transmembranaires (*e.g.* succinate hydrogenase, cytochrome oxidase, $Na^+/K^+$-ATPase) d'adopter leur conformation spatiale optimale et donc de fonctionner correctement (Arts & Kohler 2009). Par ailleurs, le DHA est un composant majeur des LP des cellules rétiniennes, oculaires et nerveuses des vertébrés (Sargent et al. 1999a). Ainsi, les larves de poissons ont des besoins importants en DHA pour achever la formation de leur système nerveux, qui est

incomplet à l'éclosion. En effet, il a été montré que les carences en DHA chez les larves de poissons sont associés à des troubles du système nerveux affectant la vision (Sargent et al. 1993a). Ces troubles induisent des défauts de pigmentation et conduisent à des défaillances des comportements de prédation et d'évasion (aptitude à former des bancs), compromettant ainsi la survie des larves en milieu naturel (Bell & Sargent 1996, Bell et al. 1995, Copeman et al. 2002, Masuda & Tsukamoto 1999). De plus, certains AG comme l'EPA et l'ARA constituent les précurseurs des eicosanoïdes (Prostaglandines, Thromboxanes, Leucotriénes ; Fig. 1.4), une famille de molécules ayant des fonctions analogues aux hormones (Schmitz & Ecker 2008). Ces molécules sont des médiateurs qui agissent sur la vasoconstriction, la régulation hydrominérale, l'inflammation, l'immunité et le métabolisme énergétique (Arts & Kohler 2009, Schmitz & Ecker 2008). Parmi les eicosanoïdes, les prostaglandines ($G_3$) derivées de l'EPA ou de l'ARA ($G_2$) sont des régulateurs antagonistes. Chez les vertébrés, on soupçonne le rapport $G_3/G_2$ comme étant impliqué dans le contrôle de la plupart des processus physiologiques mentionnés plus haut (Calder 2009, Olsen 1998). Le rapport $G_3/G_2$ est dépendant du rapport des AG précurseurs dans les PL des membranes cellulaires , lui-même étant sous l'influence partielle des apports alimentaire (Olsen 1998). Ceci explique comment, indépendamment des teneurs absolues, les proportions relatives en AGPI de la nourriture peuvent agir sur la physiologie des animaux. Chez les poissons par exemple, il a été montré que même lorsque une alimentation est suffisamment riche en lipides, un rapport DHA:EPA:ARA inadéquat peut avoir des effets marqués sur l'immunité et la résistance aux stress (Arts & Kohler 2009, Koven et al. 2003, Van Anholt et al. 2004).

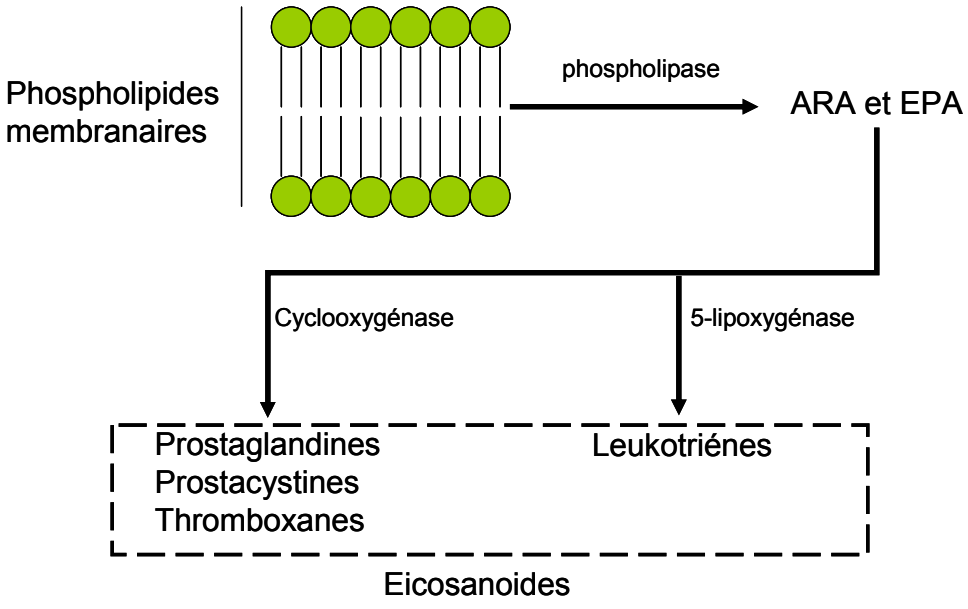



**Figure 1.4 :** Voies de synthèse des principaux eicosanoïdes

### 1.2.3 Les rapports isotopiques dans les réseaux trophiques aquatiques

#### *1.2.3.1 Généralités*

Les isotopes sont des éléments chimiques possédant le même nombre d'électrons et de protons mais un nombre différent de neutrons, conduisant ainsi à un nombre de masse particulier à chaque isotope. La plupart des éléments ont plusieurs isotopes stables : hydrogène : $^{1}H$, $^{2}D$ ; carbone : $^{12}C$, $^{13}C$ ; azote : $^{14}N$, $^{15}N$ ; oxygène : $^{16}O$, $^{17}O$, $^{18}O$ ; soufre : $^{32}S$, $^{33}S$, $^{34}S$, $^{36}S$.

Les légères variations de masse entre les formes isotopiques d'un même élément entraînent des différences pour certaines propriétés physico-chimiques comme la densité, le volume molaire, la température de vaporisation et de condensation, les conditions de précipitation, la viscosité mais aussi la vitesse des réactions et les constantes d'équilibre. De même, la vitesse des réactions enzymatiques est influencée par la composition isotopique. Ainsi, au cours de réactions physiques, chimiques ou biologiques, des différences de composition isotopique se créent entre les réactifs et les produits formés : cette différence représente le fractionnement isotopique.

Ce fractionnement isotopique entraîne des différences dans la composition isotopique des produits formés. Les variations naturelles d'abondance isotopique sont très faibles en valeur absolue. Ainsi, afin d'obtenir la précision nécessaire aux mesures d'abondance isotopique, on effectue une mesure relative à un standard calculée par l'équation suivante :

Pour le carbone :

$$\delta^{13}C_{échantillon}=[(^{13}C/^{12}C_{échantillon}-^{13}C/^{12}C_{PDB})-1]\times 1{,}000$$

Pour l'azote :

$$\delta^{15}N_{échantillon}=[(^{15}N/^{14}N_{échantillon}-^{15}N/^{14}N_{AIR})-1]\times 1{,}000$$

Le standard utilisé pour le carbone est le V-PDB, le rostre de bélemnite fossile (*Belemnita americana*) issue du gisement de fossiles Pee Dee aux Etats Unis (Craig 1957). Pour l'azote c'est la composition isotopique de l'azote atmosphérique qui est utilisée comme référence (Mariotti 1983).

### *1.2.3.2 Le fractionnement photosynthétique : la signature isotopique des producteurs primaires.*

- *Carbone*

La composition isotopique du carbone des producteurs dépend de plusieurs facteurs :

1) La composition isotopique de la source de carbone inorganique :

Chez les végétaux aquatiques par exemple, la composition isotopique du carbone est déterminée par la composition isotopique du carbone inorganique dissous (CID). Ce dernier montre des rapports isotopiques très variables, dépendant de l'importance de la dégradation de la matière organique, de la dissolution des calcaires ($CaCO_3$), de l'échange de $CO_2$ entre l'eau et l'air et de l'activité photosynthétique. En milieu océanique, les variations de $\delta^{13}C$ du CID sont essentiellement dépendantes de la photosynthèse et de la dégradation de la matière organique. Par exemple, les processus de photosynthèse favorisent l'assimilation du $^{12}C$ au profit du $^{13}C$ lorsque le $CO_2$ n'est pas limitant. Ainsi, le CID résiduel a tendance à être enrichi en $^{13}C$.

2) Les cycles biochimiques utilisés au cours de la synthèse de matière organique :

Chez les végétaux, il existe une discrimination négative envers l'isotope lourd lors de la diffusion du $CO_2$ à travers la paroi cellulaire mais surtout au cours de la photosynthèse (Lajtha & Michener 1994, Raven et al. 1994). En fonction de l'enzyme photosynthétique considérée (RUBISCO pour les plantes en C3, PEP-carboxylase pour les plantes en C4), le fractionnement isotopique sera différent. En conditions non limitantes, les isotopes lourds sont contre-sélectionnés par les enzymes photosynthétiques entraînant un fractionnement de -29 ‰ pour la RUBISCO et de -6 ‰ pour la PEP-carboxylase sur les produits formés (Goericke et al. 1994).

3) La concentration des éléments minéraux nutritifs originels dans le milieu :

L'ampleur du fractionnement isotopique photosynthétique est concentration-dépendante. Ainsi, tous les facteurs susceptibles de réduire la concentration intracellulaire en $CO_2$ réduiront aussi le fractionnement isotopique en conduisant à des $\delta^{13}C$ plus élevés. Ainsi, en milieu aérien où le $CO_2$ atmosphérique n'est pas limitant le fractionnement sera maximal par rapport au milieu aquatique où le $CO_2$ dissous diffuse plus difficilement à travers les parois cellulaires. En milieu aquatique, la turbulence hydrodynamique détermine la diffusion du $CO_2$ dans les cellules végétales et par ce biais, la concentration intracellulaire et le fractionnement photosynthétique (Raven et al. 1994). Ainsi, des différences de turbulence hydrodynamique entre la surface (forte turbulence) et le fond (faible turbulence) peuvent expliquer le fait que

les algues pélagiques (phytoplancton) sont en moyenne appauvries d'environ 7 ‰ en $^{13}C$ par rapport aux algues benthiques (France 1995). D'autres facteurs agissant sur la concentration intracellulaire de $CO_2$ comme la morphologie et le taux de croissance influencent également le fractionnement trophique du carbone chez les producteurs primaires.

- *Azote*

De la même façon que le carbone, la signature $\delta^{15}N$ des producteurs primaires dépend de la signature de la source inorganique utilisée et du fractionnement lors de la fixation. Les sources inorganiques d'azote utilisables par les végétaux sont variées (azote atmosphérique, ammonium, nitrates…) et leurs signatures isotopiques peuvent être affectées par les processus microbiens de nitrification, dénitrification et apports anthropiques (Cabana & Rasmussen. 1994). Le fractionnement isotopique dépend également de la croissance algale et de la nature du substrat utilisé (Lajtha & Michener 1994).

#### *1.2.3.3 Fractionnement trophique*

- *Carbone*

Lors d'une transition trophique un enrichissement en isotopes lourds du carbone des consommateurs par rapport à leur nourriture est régulièrement observé. Cet enrichissement résulte du fractionnement associé au métabolisme respiratoire et est généralement très faible (0,5 ± 1,3‰ ; McCutchan et al. 2003). Ainsi, la composition isotopique du carbone de l'ensemble du corps d'un consommateur reflète celle de sa nourriture (DeNiro & Epstein 1978). A l'échelle des différentes fractions biochimiques, les protéines ont une composition isotopique en carbone beaucoup plus proche de celle de la nourriture, tandis que les lipides sont significativement plus appauvris en $^{13}C$ (DeNiro & Epstein 1977). De ce fait, la composition isotopique en carbone d'un consommateur peut varier en fonction du tissu analysé et de sa composition biochimique (Post et al. 2007).

- *Azote*

Pour l'azote, on observe un enrichissement en $^{15}N$ plus important que celui observé pour le carbone. Cet enrichissement moyen de 2 ± 1,8‰ (McCutchan et al. 2003) est du à l' excrétion préférentielle du $^{14}N$ par les organismes lors des processus de désamination des protéines (Minagawa & Wada 1984). Contrairement au $\delta^{13}C$, le $\delta^{15}N$ permet de suivre uniquement le devenir des protéines, qui sont la seule fraction biochimique contenant de l'azote. Ainsi, la nature du tissu analysé n'influence pas la mesure du $\delta^{15}N$. Cependant, la nature du régime alimentaire (insectivore, herbivore, teneur en protéines) est susceptible

d'entraîner des différences au niveau du fractionnement isotopique entre consommateurs dont il faut tenir compte (McCutchan et al. 2003).

Etant donné que lors des transferts trophiques le fractionnement isotopique varie peu entre consommateurs, la grande variabilité de compositions isotopiques entre consommateurs observée dans l'environnement provient de la base des réseaux trophiques, au niveau des producteurs primaires (Lajtha & Michener 1994).

#### *1.2.3.4 L'application à l'étude des réseaux trophiques et ses limites*

Une fois fixée dans la matière organique, la composition isotopique ne subit donc que de très faibles variations lors des processus de dégradation et de transfert dans les chaînes alimentaires. C'est sur cette relation étroite et constante qu'est basée l'utilisation des abondances naturelles en isotopes stables pour l'étude des relations trophiques dans les milieux naturels. Chez les organismes supérieurs, et quel que soit l'élément, il existe cependant une légère différence entre l'animal et sa nourriture. Le très faible enrichissement du carbone à chaque niveau trophique le rend particulièrement utile pour suivre et déterminer l'origine de la matière organique. A l'opposé, l'azote avec un enrichissement relativement fort, sera plus particulièrement indiqué pour analyser la structure trophique de l'écosystème, notamment pour identifier le niveau trophique des consommateurs (Post 2002). La combinaison des deux indicateurs fournit par conséquent une image des flux majeurs de matière organique dans le réseau trophique, à condition que les compositions isotopiques $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ des sources soient connues et que les $\delta^{13}C$ des différentes sources potentielles soit suffisamment distincts. Cependant il n'est pas toujours possible d'obtenir la signature isotopique d'un producteur primaire pur. C'est souvent le cas dans l'étude des réseaux trophiques aquatiques où par exemple le phytoplancton ne peut pas être séparé de la matrice de matière organique particulaire en suspension (MOPS) qui est échantillonnée. En effet, il s'agit d'un mélange de phytoplancton, de bactéries, de ciliés, de particules détritiques etc. Bien que souvent il est implicitement supposé que le phytoplancton constitue la plus grande partie de matière organique prélevée, ce n'est pas forcement le cas dans des milieux comme les estuaires qui sont caractérisés par d'importants apports détritiques. Une autre difficulté est liée aux temps de renouvellements cellulaires très différents entre les différents maillons trophiques étudiés (e.g phytoplancton-zooplancton-poissons). Ainsi, un changement de signature isotopique au sein du phytoplancton ne sera entièrement transmis au zooplancton

qu'au bout de quelques jours (Grey 2000) et de quelques semaines aux poissons adultes (Hesslein et al. 1993).

### 1.2.4 Couplage de l'analyse lipidique à l'analyse isotopique

#### *1.2.4.1 Analyses simultanées*

L'analyse isotopique et les biomarqueurs lipidiques sont des outils puissants pour déterminer l'origine de la matière organique et son devenir dans les réseaux trophiques, chacun présentant néanmoins, ses propres limites. Si pendant longtemps ces deux approches ont été conduites séparément, un nombre croissant d'études démontre l'intérêt de les conduire simultanément (Alfaro et al. 2006, Dahl et al. 2003, El-Sabaawi et al. 2009, Jaschinski et al. 2008, Kharlamenko et al. 2001, Perga et al. 2006). En effet, ces deux approches sont souvent complémentaires et permettent de repousser leurs limites respectives. Par exemple, leur emploi simultané a permis à Jaschinski et al (2008) d'identifier les épiphytes –isotopiquement indistincts des zostères- en tant que ressource principale pour les consommateurs d'un herbier de zostères.

#### *1.2.4.2 Analyse isotopique de composés spécifiques*

L'avènement de l'Analyse Isotopique des Composés Specifiques (AICS) par GC-C-IRMS (Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry) a permis de combiner l'utilisation des biomarqueurs organiques à celle de l'analyse isotopique et de repousser les limites des biomarqueurs organiques. Ainsi, on peut remédier au manque de spécificité d'un composé en mesurant sa composition isotopique, à condition que les organismes le produisant se distinguent isotopiquement (Bec 2003, Chamberlain et al. 2004). Il devient alors possible de suivre le transfert de ce composé dans une chaîne alimentaire (Budge et al. 2008).

Par ailleurs, les analyses isotopiques sont limitées par la précision de l'échantillonnage. Comme il a été dit précédemment, il est parfois impossible d'obtenir la signature isotopique d'un groupe d'organismes isolés (*e.g.* bacteries, phytoplancton) d'une matrice organique complexe (*e.g.* MOPS, sediment). Il est cependant relativement aisé de séparer un biomarqueur associé à ce groupe d'organismes et de mesurer son rapport isotopique par GC-C-IRMS (Boschker et al. 1999, Canuel et al. 1997, Van den Meersche et al. 2009).

Largement appliqué dans les sols ou les estuaires, notamment à partir de marquages artificiels au $^{13}C$, l'AICS permet de suivre les voies de transferts du carbone détritique dans les compartiments microbiens (Boschker et al. 1999, Boschker & Middelburg 2002, Jones et al. 2003). A titre d'exemple, Boschker et al. (1999) ont mesuré les rapports isotopiques d'AG bactériens provenant des phospholipides extraits de sédiments, afin de déterminer les sources de matière organique utilisées par ces bactéries enfouies dans ces mêmes sédiments.

L'utilisation de l'AICS pour l'étude des réseaux trophiques reste encore peu répandue. En raison de la mise au point récente de l'AICS, l'interprétation des données demande de mieux comprendre, notamment au niveau moléculaire, les mécanismes de fractionnement isotopique lors de la synthèse, du transfert trophique et du métabolisme des lipides (Chamberlain et al. 2004, Pond et al. 2006, Veefkind 2003).

Néanmoins, elle offre de nouvelles perspectives intéressantes dans le suivi des composés essentiels dans un écosystème. A titre d'exemple, Pond et al. (1997b, 2000) ont pu montrer que les AGPI de crustacés appartenant aux communautés animales benthiques associées à des cheminées hydrothermales étaient synthétisés par du phytoplancton se développant dans la zone photique. Ces composés seraient donc accumulés pendant la phase pélagique de ces organismes et conservés après leur migration en milieu benthique (Pond et al. 1997b).

# CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

**CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES ..... 35**

2.1 SITE D'ETUDE ..... 37
2.1.1 Les lagunes deltaïques de la rivière Nestos ..... 37
2.1.2 La lagune Vassova ..... 37
2.2 ESPECES ETUDIEES ..... 40
2.2.1 *Mugilidae* ..... 40
2.2.1.1 *Liza saliens* ..... 42
2.2.1.2 *Liza aurata* ..... 43
2.2.1.3 *Liza ramada* ..... 43
2.2.1.4 *Chelon labrosus* ..... 43
2.2.2 Autres espèces ..... 44
2.2.2.1 *Atherina boyeri* ..... 44
2.2.2.2 *Aphanius fasciatus* ..... 44
2.2.2.3 *Pomatoschistus* spp. ..... 45
2.2.2.4 *Sparus aurata* ..... 45
2.3 PRELEVEMENT ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ..... 47
2.3.1 Sources de matière organique ..... 47
2.3.1.1 Seston ..... 47
2.3.1.2 Matière organique sédimentaire ..... 47
2.3.1.3 Macrophytes et épiphytes ..... 48
2.3.3 Invertébrés ..... 48
2.3.3.1 Zooplancton ..... 48
2.3.3.2 Epibenthos ..... 48
2.3.4 Poissons ..... 49
2.4 ANALYSES ..... 51
2.4.1 Analyse lipidique ..... 51
2.4.1.1 Extraction des lipides totaux ..... 51
2.4.1.2 Séparation des différentes classes de lipides par séparation sur phase solide (SPE) ..... 51
2.4.1.3 Préparation des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) ..... 55
2.5.1 Acidification des échantillons destinés à l'analyse isotopique ..... 56
2.5.2 Analyse isotopique ..... 56
2.5.3 Analyse isotopique des composés spécifiques ..... 57
2.5.4 Analyse des contenus stomacaux ..... 57
2.5.5 Autres mesures ..... 58

## 2.1 SITE D'ETUDE

### 2.1.1 Les lagunes deltaïques de la rivière Nestos

La rivière Nestos prend sa source à 2240 m d'altitude, dans les monts Rila dans le sud de la Bulgarie. Après avoir traversé les Rhodopes et les plaines de la Macédoine orientale, elle se jette dans la Mer Egée. En se déplaçant, le delta de la rivière Nestos a formé sur son passage une série de lagunes saumâtres (Agiasma, Vassova, Eratino, Kokala, Magana, Monastiraki, Haidefto). Ces lagunes sont peu profondes (~ 1 m), et communiquent avec la mer par des graus étroits. Les lagunes sont caractérisées par une importante végétation benthique composée d'un nombre restreint d'espèces (*Ruppia cirrhosa*, *Cymodocea* spp., *Zostera sp.*, *Ulva* spp., *Gracilaria* spp., *Cladophora* spp.)(Orfanidis et al. 2001). Les marées (microtidales), la force et la direction des vents et des courants marins ainsi que les apports en eau douce déterminent la salinité qui varie en moyenne de 19 à 34 (échelle de salinité pratique). La région du delta de Nestos est un site Natura 2000, protégé par la convention Ramsar. L'agriculture (maïs, céréales, coton), la pêche et le tourisme sont les principales activités humaines. L'usage commercial des lagunes est la pisciculture traditionnelle qui consiste à piéger dans les lagunes les poissons migrants à l'aide de barrages au niveau des graus. Les poissons sont capturés soit aux engins de pêche (senne, filet maillant) dans le bassin central soit au niveau des barrages lors de leur migration vers la mer. Toutefois, en raison du fait que la majorité des poissons exploités se reproduisent en mer, les barrages sont ouverts pendant certaines périodes de l'année afin de permettre aux géniteurs de se reproduire. Par ailleurs, les barrages sont perméables aux larves et aux juvéniles leur permettant ainsi de coloniser les lagunes et de renouveler les stocks piscicoles. Les principales espèces exploitées par la coopérative piscicole de Kavala sont les *Mugilidae* (*Mugil cephalus*, *Chelon labrosus*, *Liza* spp.), le bar commun (*Dicentrarchus labrax*) et la daurade (*Sparus aurata*).

### 2.1.2 La lagune Vassova

La lagune Vassova (40°57'N, 24°34'E ; Fig. 2.1 et 2.2) est une petite (0,7 km²) lagune saumâtre eutrophe (Orfanidis et al. 2005, Sylaios & Theocharis 2002). Elle est compartimentée en un grand bassin central d'une profondeur moyenne de 0,5 m et plusieurs chenaux artificiels plus profonds (2 à 4 m) qui permettent l'hivernage des poissons.

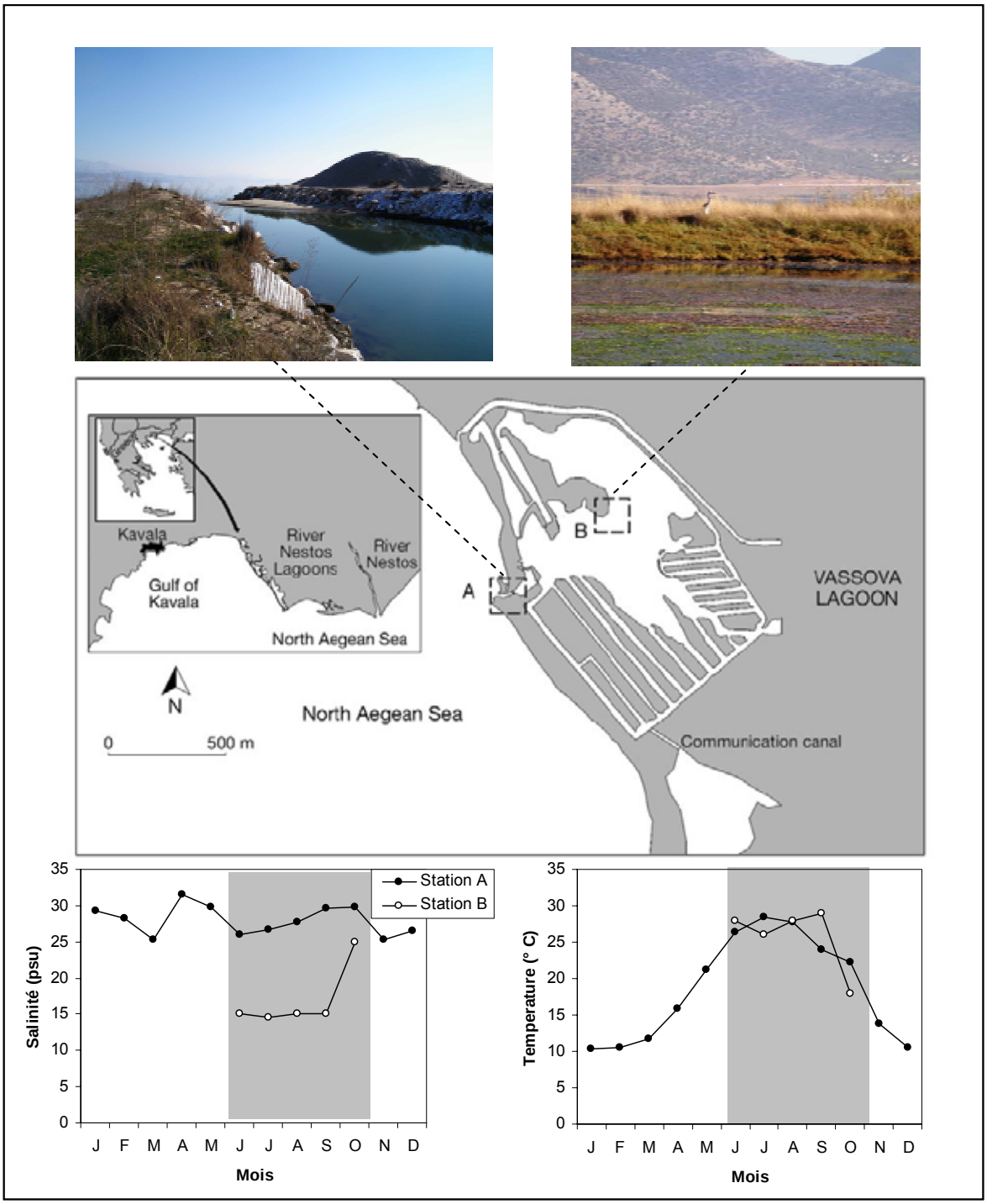



**Figure 2.1 :** Lagune Vassova, stations d'échantillonnage (Photos : Koussoroplis, 2007) et moyennes mensuelles de température et salinité pour l'année 2007 ; En gris : période d'étude. (Source : F.R.I of Nea Peramos, ; Koussoroplis, 2007)

La communication avec la mer adjacente se fait par un chenal étroit (longueur 200 m, largeur moyenne 15 m) d'une profondeur moyenne de 0,8 m. Un chenal a été creusé autour de la lagune afin d'empêcher l'entrée d'eau douce et d'éléments nutritifs issus du lessivage des terres agricoles adjacentes (Tsihrintzis et al. 2007). Cependant, comme en témoignent les valeurs de salinité réduites mesurées dans la partie interne de la lagune (Orfanidis et al. 2005), des entrées limitées d'eau douce ont néanmoins lieu (moyenne annuelle estimée: 0.940 $m^3$ $s^{-1}$ ; Sylaios & Theocharis, 2002). Les apports en eau douce dus aux précipitations sont assez limités (moyenne annuelle estimée : 0.042 $m^3$ $s^{-1}$ ; Sylaios & Theocharis 2002). Les entrées d'eau douce semblent également constituer la principale source d'azote minéral dans la lagune. Ainsi, les plus fortes teneurs en azote minéral dissous (~ 12 µmol $l^{-1}$) sont mesurées en hiver et coïncident avec les apports maximaux en eau douce (Orfanidis et al. 2005). A l'opposé, la faible variation annuelle des teneurs en phosphore dissous (~ 1µmol $l^{-1}$) indiquent qu'une fraction importante de cet élément provient de la minéralisation de la matière organique sédimentée (Orfanidis et al. 2005). Le temps de résidence de l'eau dans la lagune est relativement court (5-14 jours) (Sylaios et al. 2003). Cela favorise la dominance des algues benthiques opportunistes telles que *Ulva* spp., *Gracilaria* spp. et *Cladophora* spp. (biomasse sèche moyenne annuelle: 337 g $m^{-1}$) vis-à-vis du phytoplancton (moyenne annuelle Chl a = 1.14 µg $l^{-1}$), la plus grande partie de l'année (Orfanidis et al. 2001, Orfanidis et al. 2000, Trobajo et al. 2002). L'accumulation de biomasse macroalgale entraîne de fortes variations nycthémérales des teneurs en oxygène dissous (Sfriso & Marcomini 1996). Par ailleurs, la décomposition des blooms saisonniers des macroalgues benthiques provoque souvent des épisodes dystrophiques (Sfriso & Marcomini 1996). La production piscicole est estimée à 90 kg $ha^{-1}$ $an^{-1}$ et elle est surtout composée de *Mugilidae* (88 %), le bar commun et la daurade composant les 12% restants (Kokkinakis et al. 1997).

## 2.2 ESPECES ETUDIEES

### 2.2.1 ***Mugilidae***

Cette famille de poissons Téléostéens compte 17 genres et 72 espèces bien répandues dans toutes les mers tropicales et tempérées. Plusieurs espèces présentent un intérêt halieutique, et jouent un rôle alimentaire important à l'échelle mondiale (FAO 2006). Dans les lagunes méditerranéennes, les *Mugilidae* font partie des poissons les plus fréquemment rencontrés (Akin et al. 2005, Franco et al. 2006, Koutrakis et al. 2005, Maci & Basset 2009, Poizat et al. 2004) et ils jouent un rôle important pour les pêcheries artisanales locales. Ce sont des poissons au corps fusiforme, gris, marqué de rayures longitudinales plus sombres au ventre argenté et dépourvu de ligne latérale. Les *Mugilidae* vivent le long des côtes dans des milieux sablo-vaseux de faible profondeur. Ils sont euryhalins et donc souvent rencontrés dans les eaux saumâtres et la partie inférieure des fleuves. Ils se déplacent souvent entre la mer et les milieux estuariens (estuaires, lagunes) à des fins trophiques et reproductrices (Fig. 2.2). Les lagunes constituent notamment des zones de nourriceries essentielles pour ces poissons. Leur période de reproduction, très étalée, varie en fonction des espèces. A l'approche de la période de frai, les géniteurs, vivant dans les lagunes et les estuaires, se rassemblent en bancs reproducteurs et regagnent la mer. Un à deux mois après la ponte d'oeufs pélagiques, les larves des différentes espèces, mesurant entre 15 et 20 mm (longueur totale, **LT**), vont coloniser lagunes et estuaires (Koutrakis 1994).–Le renouvellement des stocks de mulets dépendra donc de la capacité des adultes à regagner le milieu marin pour se reproduire et du succès de colonisation des nourriceries par les alevins. Le cycle de vie complexe de la majorité des *Mugilidae* passent par une série de stades de développement se caractérisant, entre autres, par des régimes alimentaires différents. Ainsi jusqu'à environ 30 mm (LT), ils sont considérés comme étant zooplanctonophages, puis ils adoptent un régime alimentaire à base d'invertébrés benthiques jusqu'à une taille de 50 mm (LT) (copépodes harpacticoides, amphipodes) (Albertini-Berhaut 1980, Gisbert et al. 1996) pour ensuite progressivement s'orienter vers un régime alimentaire omnivore/détritivore commun à tous les mugilidae (Blanco et al. 2003, Cardona et al. 2001).

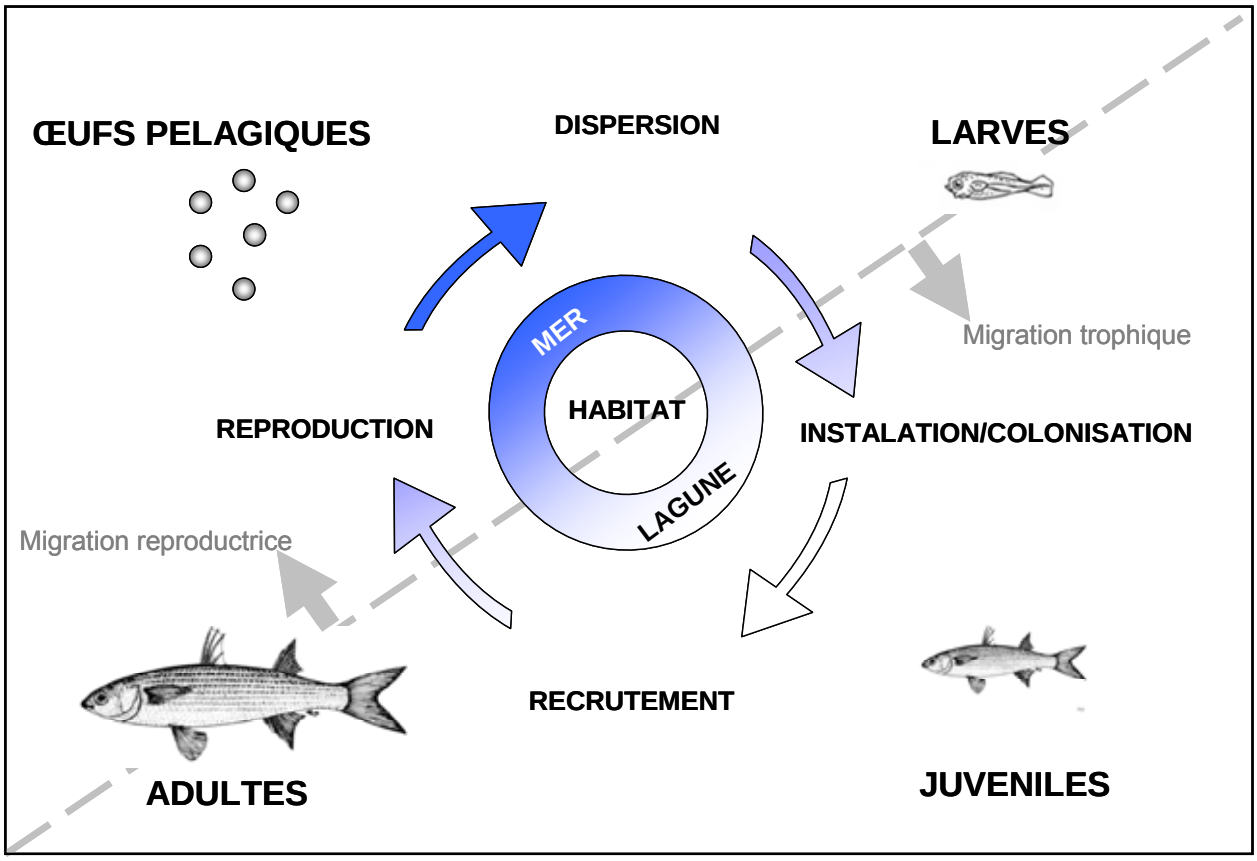



**Figure 2.2 :** Cycle de vie des *Mugilidae* retrouvés dans les lagunes méditerranéennes

### *2.2.1.1 Liza saliens*

Cette espèce connue aussi sous le nom vernaculaire de « mulet sauteur » est parmi les plus communes et abondantes espèces de *Mugilidae* en méditerranée. Morphologiquement elle se distingue des autres *Mugilidae* par sa lèvre supérieure relativement fine (inférieure au diamètre de l'œil), un repli adipeux oculaire peu développé et des nageoires pectorales longues (repliées elles atteignent l'œil). La taille maximale observée est d'environ 40 cm (LT), les males atteignent la maturité sexuelle à 2 ans et les femelles à 3 ans. En mer Egée la période de reproduction s'étend entre mai et octobre et les alevins (10-15 mm; LT) apparaissent au niveau des graux de juin à octobre (Koutrakis 1994, Koutrakis 2004). Les alevins et les juvéniles de *Liza saliens* (Fig. 2.3) sont très compétitifs *vis-à-vis* de leurs congénères et montrent une préférence pour les salinités élevées. Ainsi, cette espèce domine les assemblages de *Mugilidae* à des salinités supérieures à 13 (Cardona 2006, Cardona et al. 2008).




**Figure 2.3 :** Photographie de juvéniles de *Liza saliens*. (Photo : Koussoroplis 2007)

#### *2.2.1.2 Liza aurata*

Cette espèce commune en méditerranée est connue aussi sous le nom vernaculaire de « mulet doré » (Fig. 2.4). Morphologiquement, elle se distingue des autres *Mugilidae* par une marque dorée sur les opercules, l'absence de repli adipeux oculaire. Les nageoires pectorales repliées atteignent la pupille de l'oeil. La taille maximale est d'environ 60 cm (LT), les males atteignent la maturité sexuelle à 3 ans et les femelles à 4 ans. En mer Egée, la période de reproduction s'étend entre septembre et décembre et les alevins (15-20 mm; LT) apparaissent aux niveau des graux en hiver et surtout au printemps (Koutrakis 1994, Koutrakis 2004). Les alevins et les juvéniles de *Liza aurata* préfèrent les salinités élevées. Cette espèce est moins compétitive que les autres espèces de *Mugilidae* et ne domine ~~donc~~ jamais les assemblages de Mugilidae (Cardona 2006, Cardona et al. 2008).

#### *2.2.1.3 Liza ramada*

Espèce commune en méditerranée, connue aussi sous le nom vernaculaire de « mulet porc» (Fig.2.4). Elle se distingue des autres *Mugilidae* par une marque noire à l'insertion de la nageoire pectorale et un repli adipeux oculaire peu développé. Les nageoires pectorales repliées n'atteignent pas l'oeil. La taille maximale observée est d'environ 70 cm (LT), les males atteignent la maturité sexuelle entre 2 et 3 ans et les femelles entre 3 et 4 ans. En mer Egée, la période de reproduction s'étend entre novembre et janvier et les alevins (15-20 mm; LT) apparaissent aux graux des lagunes en hiver (Koutrakis 1994, Koutrakis 2004). Les alevins et les juvéniles de *Liza aurata* préfèrent les faibles salinités. Cette espèce peut parfois dominer les assemblages de *Mugilidae* à des salinités inférieures à 13 (Cardona 2006, Cardona et al. 2008).

#### *2.2.1.4 Chelon labrosus*

Espèce commune en méditerranée, connue aussi sous le nom vernaculaire de «mulet lippu» (Fig. 2.4). Elle est caractérisée par une lèvre supérieure relativement épaisse dotée de 2 à 3 rangées de papilles et un repli adipeux oculaire qui ne recouvre pas toute la surface de l'oeil. Les nageoires pectorales repliées n'atteignent pas l'oeil. La taille maximale observée est d'environ 75 cm, les males atteignent la maturité sexuelle entre 2 et 3 ans et les femelles à 3 ans. En mer Egée, la période de reproduction s'étend entre février et avril et les alevins (15-20 mm; LT) apparaissent aux niveau des graux au printemps (Koutrakis 1994, Koutrakis 2004). Les alevins et les juvéniles de *Chelon labrosus* préfèrent les faibles salinités.

Cette espèce peut parfois dominer les assemblages de *Mugilidae* à des salinités inférieures à 13 (Cardona 2006, Cardona et al. 2008).

### 2.2.2 Autres espèces

#### *2.2.2.1 Atherina boyeri*

Ces petits poissons (LT maximale 20 cm) au corps allongé et légèrement comprimé latéralement appartiennent à la famille des *Atherinidae* (Fig. 2.4). Ils sont considérés comme sédentaires et caractéristiques des lagunes méditerranéennes (Akin et al. 2005, Franco et al. 2006, Koutrakis et al. 2005, Maci & Basset 2009, Poizat et al. 2004). En Grèce, la reproduction a lieu de mars à octobre et les œufs sont fixés sur des algues filamenteuses benthiques (Leonardos & Sinis 2000). Ces poissons se nourrissent essentiellement de zooplancton et d'invertébrés benthiques (Economidis et al. 2009, Vizzini & Mazzola 2005). Il s'agit d'une espèce très euryhaline dont on retrouve même des populations isolées dans des lacs d'eaux douce côtiers (Economidis et al. 2009). Bien que commercialement exploitée, cette espèce n'est pas menacée.

#### *2.2.2.2 Aphanius fasciatus*

Cette espèce est caractérisée par un corps trapu, sans ligne latérale marquée. Comme tous les membres de la famille des *Cyprinodontidae*, elle présente plusieurs rangées de petites dents à l'intérieur de la bouche. Le dimorphisme sexuel est très prononcé, les males étant particulièrement colorés. Ce poisson de petite taille (8,5 cm) est typiquement estuarienne et peut supporter les fluctuations importantes des conditions environnementales (salinité, température, oxygène). Par conséquent, on peut le retrouver aussi bien en eau douce que dans des lagunes hypersalines (Economidis et al. 2009). En Grèce, *Aphanius fasciatus* se reproduit entre avril et juillet, en déposant ses œufs sur le fond et la végétation immergée (Economidis et al. 2009). Les alevins se nourrissent de zooplancton et les adultes de petits invertébrés aquatiques (larves des diptères, amphipodes, isopodes) (Leonardos 2008). Cette espèce ne présente aucun intérêt commercial, néanmoins la diminution accélérée de la surface de son habitat par des facteurs anthropiques, ainsi que la compétition avec l'espèce introduite *Gambusia affinis,* la rendent vulnérable (convention de Berne : Annexe II, EC directive 92/43/EEC).

#### *2.2.2.3 Pomatoschistus spp.*

Ce genre de la famille des *Gobiidae* est fréquemment rencontré dans les milieux lagunaires européens. (Akin et al. 2005, Franco et al. 2006, Koutrakis et al. 2005, Maci & Basset 2009, Poizat et al. 2004). Dans la lagune Vassova, deux espèces, difficilement distinguables sont rencontrées : *P. marmoratus* et *P. minutus.* La longueur maximale est de 6,5 cm (LT) pour *P. marmoratus* et de 8 cm pour *P. minutus.* Les deux sont itéropares. La reproduction a lieu au printemps et en été. Les males construisent un nid dans une coquille de bivalve vide dans la laquelle les femelles viennent pondre. Les males s'occupent des œufs jusqu'à l'éclosion. Leurs larves sont pélagiques et se nourrissent de zooplancton. Au-delà d'une certaine longueur, ils deviennent benthiques et se nourrissent d'invertébrés épibenthiques (amphipodes, copépodes harpacticoïdes) (Baldo & Drake 2002, Dolbeth et al. 2007, Leitao et al. 2006, Mazzoldi & Rasotto 2001, Persic et al. 2004).

#### *2.2.2.4 Sparus aurata*

Espèce bien connue de la famille des *Sparidae* il s'agit de la dorade royale. C'est un poisson au corps haut, aplati latéralement, présentant une nageoire caudale échancrée et une longue nageoire dorsale unique. La bouche est petite mais munie de dents puissantes. Les individus atteignent régulièrement une taille de 50 cm (LT) et un poids humide de 6 kg. La reproduction a lieu en hiver dans les zones côtières (Arias 1980). Apres l'éclosion, les alevins migrent au printemps vers les lagunes afin de profiter des conditions thermiques favorables. Ils y séjournent jusqu'en automne et c'est le refroidissement rapide des eaux lagunaires qui les forcera à retourner en milieu marin (Abecasis & Erzini 2008, Suau & Lopez 1976). Les adultes migrent également de la mer vers les lagunes chaque printemps afin de bénéficier de la température et des ressources trophiques abondantes et y restent jusqu'en automne (Suau & Lopez 1976). Les larves sont zooplanctonophages, les juvéniles se nourrissent principalement d'amphipodes et les adultes de décapodes, gastropodes, bivalves et annélides (Costa & Cataudella 2007, Pita et al. 2002, Russo et al. 2007).



*Liza aurata*



*Liza ramada*



*Chelon labrosus*



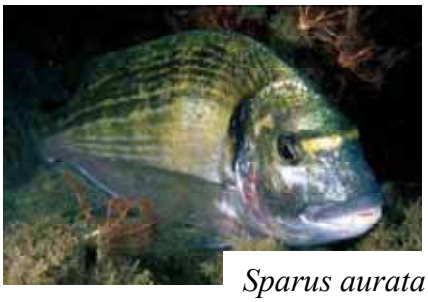
*Atherina boyeri*



*Pomatoschistus sp.*



*Aphanius fasciatus*



*Sparus aurata*

**Figure 2.4 :** Photographies des autres espèces étudiées (Source : Fishbase)

## 2.3 PRELEVEMENT ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Nous présenterons ici toute la méthodologie commune aux trois études réalisées dans le cadre de cette thèse afin de limiter la redondance dans les différents chapitres/articles. Les procédés méthodologiques propres à chaque étude seront, eux, présentés dans les chapitres concernés.

Cette étude a été conduite entre juin et novembre 2007, période de colonisation des lagunes par les larves de *Liza saliens* dans la région étudiée (Koutrakis 1994, Koutrakis et al. 2005). Les échantillons ont été prélevés sur deux stations, l'une a été choisie afin de capturer les alevins de *Liza saliens* au moment de leur entrée dans la lagune (station A, fig 2.1), et l'autre afin de prélever les alevins déjà installés dans le milieu (station B, fig 2.1)

### 2.3.1 Sources de matière organique

#### *2.3.1.1 Seston*

24 l d'eau sont prélevés à environ 10cm de profondeur. Au laboratoire, cette eau est pré-filtrée par gravité sur de la toile à blutter de 100 µm afin d'éliminer la majorité des organismes macrozooplanctoniques (copépodes). Un volume connu de l'eau prélevée est ensuite filtré par gravité sur de la toile à blutter de 30 µm. La toile est par la suite rincée plusieurs fois à l'eau marine artificielle stérile afin de récupérer les particules constituant la classe de taille 100-30 µm. Le filtrat obtenu est alors filtré sur de la toile à blutter de 5µm à l'aide d'un vide modéré. Après rinçage à l'eau marine artificielle stérile, les particules de classe de taille 30-5µm sont récupérées. Les deux fractions de taille ainsi obtenues sont filtrées sur filtres Whatman GF/F (diamètre 47mm, porosité 0,7 µm) préalablement décontaminés (4h à 450°C). Puis le filtrat obtenu est récupéré sur filtres Whatman GF/F constituant la dernière classe de taille 5-0,7 µm. Tous les filtres sont lyophilisés et stockés à -80°C en attente des analyses.

#### *2.3.1.2 Matière organique sédimentaire*

En vue de l'analyse de la matière organique sédimentaire (MOS), 5 carottes de sédiment sont réalisées à l'aide de carotteurs en PVC (diamètre interne : 5cm). Le premier centimètre des carottes est récupéré et suspendu dans de l'eau marine artificielle stérile puis filtré par gravité sur une toile à blutter de 65 µm afin d'éliminer la méiofaune, les débris de macrophytes et les particules inorganique (sable). Le filtrat obtenu est ensuite filtré sous vide modéré sur des filtres en fibre de verre Whatman GF/F décontaminés, lyophilisé et stocké à -80°C en attente des analyses.

#### *2.3.1.3 Macrophytes et épiphytes*

Les macrophytes (macroalgues, phanérogames marines, halophytes) sont ramassés à la main. Les phanérogames marines et les macroalgues sont débarrassées de leurs épiphytes par grattage à l'aide d'une lame de rasoir et par rinçage à l'eau marine artificielle stérile. Les épiphytes récupérés sont mis en suspension dans de l'eau marine artificielle stérile, puis subissent une pré-filtration sur de la toile à blutter à 100 µm afin d'éliminer l'epifaune. Le filtrat est ensuite filtré sous vide modéré sur des filtres en fibre de verre Whatman GF/F décontaminés. Les filtres et les échantillons de macrophytes sont lyophilisés et stockés à -80°C en attende des analyses. Le filtrat obtenu est récupéré sur filtres Whatman GF/F décontaminés, lyophilisé et stocké à -80°C.

### 2.3.3 Invertébrés

#### *2.3.3.1 Zooplancton*

En raison de la faible profondeur de la lagune, le zooplancton (majoritairement des copépodes) est prélevé par des trais horizontaux à l'aide d'un filet bongo (maille 100 µm) monté sur un flotteur (fig 2.5). Au laboratoire les organismes sont concentrés dans un faible volume d'eau puis placés dans des pots de prélèvement stockés à -80°C. Préalablement aux analyses lipidiques et isotopiques, le zooplancton est décongelé par parties et trié à la pince ou à la pipette en verre dans des disques de Petri plongés dans la glace sous loupe binoculaire et équipée de lumière froide. Les organismes sont triés selon leur groupe taxonomique (copépodes calanoides, cyclopoides,) et leur stade de développement (copépodites, nauplii). Un nombre d'individus variant de ~500 (calanoides) à ~2000 (nauplii) est ensuite récupéré sur des filtres Whatman GF/F décontaminés puis l'ensemble est lyophilisés et stocké à -80°C en attente des analyses.

#### *2.3.3.2 Epibenthos*

Les organismes épibenthiques et épiphytiques (majoritairement des amphipodes et des copépodes harpacticoides) sont prélevés à l'aide d'une épuisette équipée d'un filet de 300µm. Au laboratoire, les organismes sont traités de la même façon que le zooplancton. Le nombre d'organismes déposés sur les filtres varie de ~10 (amphipodes) à ~100 (copépodes harpacticoïdes).

### 2.3.4 Poissons

Les poissons sont capturés à la senne (longueur 12m, hauteur 1,5m, vide de maille de la poche centrale 2 mm) à partir de la plage (Fig. 2.6). Plusieurs traits (3 à 4) de 40 à 15 m sont réalisés. Les individus adultes ou espèces non capturables à la senne sont piégés aux barrages qui se trouvent au niveau du grau. Les poissons capturés, sont choqués par le froid (immergés dans de l'eau marine contenant de la glace) puis rapidement transportés au laboratoire (moins d'une heure de trajet). Au laboratoire les poissons sont identifiés, mesurés (LT ; précision 0,5 mm) et pesés (poids humide ; précision : 0,1 mg). Afin d'effectuer l'analyses des contenus stomacaux les tractus digestif sont prélevés et fixés dans du formol à 8%. Du tissu musculaire dorsal (ou les filets entiers pour les individus mesurant < 20 mm) est prélevé, lyophilisé et stocké à -80°C en attente des analyses lipidiques et isotopiques.



**Figure 2.5 :** Photographie du dispositif utilisé pour le prélèvement de zooplancton (Photo : Koussoroplis, 2007)



**Figure 2.6:** Photographie du filet seine utilisé pour le prélèvement des poissons (Photo : Koutrakis, 2007)

## 2.4 ANALYSES

### 2.4.1 Analyse lipidique

#### *2.4.1.1 Extraction des lipides totaux*

L'extraction est réalisée sur les échantillons lyophilisés et pré-pesés (pour les poissons ; précision 0,001 mg) selon la méthode de (Folch et al. 1957) (**Fig. 2.7**). L'échantillon est dans un premier temps broyé dans un mélange chloroforme / méthanol (2 :1, v /v), afin de réaliser la rupture des liaisons protéines/lipides, puis il subit une sonication et un passage au bain-marie afin d'optimiser cette rupture. Après l'ajout d'une solution de NaCl (0.9%) suivi d'une centrifugation, l'extrait lipidique total est récupéré par évaporation sous flux d'azote et conservé dans de l'hexane (1 ml) à - 40°C.

#### *2.4.1.2 Séparation des différentes classes de lipides par séparation sur phase solide (SPE)*

Cette étape est effectuée sur les extraits lipidiques totaux afin de les séparer en LN et PL. La séparation s'effectue sur des micro-colonnes à phase stationnaire de type amino-propyle (SPE strata $NH_2$ 500mg, Phenomenex ; Fig. 2.8). Selon une méthode modifiée à partir de (Kaluzny et al. 1985), l'extrait lipidique dissous dans du chloroforme est déposé sur une colonne pré-conditionnée à l'hexane. La fraction des LN est récupérée par élution avec du chloroforme/ 2-propanol (2:1 v/v). Les AG libres sont ensuite obtenus par élution avec du diétlyléther/acide acetique (100:2 v/v). Ensuite les LP sont élués dans du méthanol pur. Après évaporation à froid sous flux d'azote, les différentes fractions lipidiques sont reprises dans de l'hexane.

#### *2.4.1.3 Préparation des esters méthyliques d'acides gras (EMAG)*

Afin d'identifier les AG par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG), il est nécessaire de les convertir en molécules plus légères non polaires, les esters méthyliques d'acides gras (EMAG ; Fig. 2.9). Les lipides totaux sont estérifiés en une seule étape en utilisant du $H_2SO_4$ methanolique (2% ; Christie, 1982). Les échantillons sont portés à 75°C pendant 2 heures dans un bain-marie à sec. L'adjonction d'un mélange eau-hexane (1:2, v/v) suivi d'une centrifugation permet de séparer les EMAG du matériel insaponifiable. Les EMAG sont récupérés à partir de la phase supérieure, après évaporation à 40°C sous flux d'azote, les échantillons sont repris dans 50-100µl d'hexane puis stockés à -40°C.

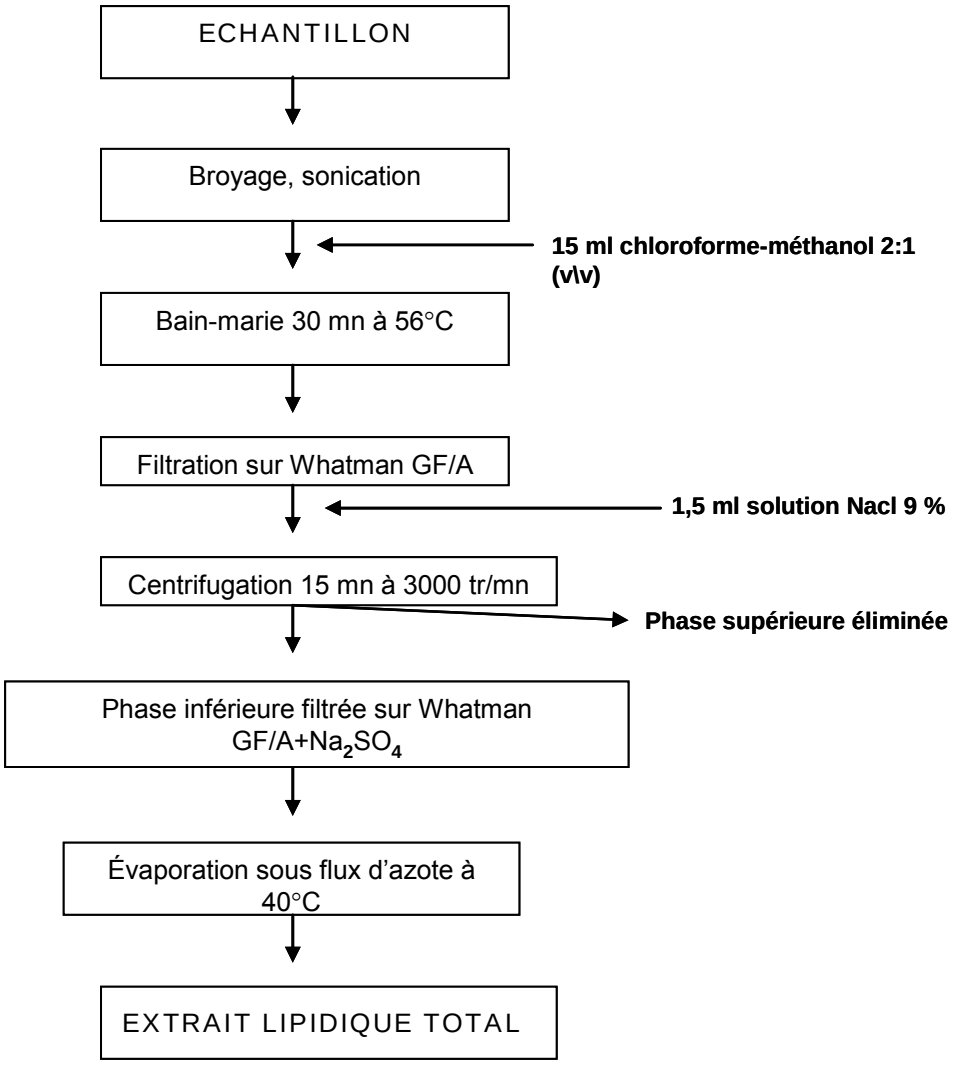



**Figure 2.7 :** Protocole d'extraction des lipides

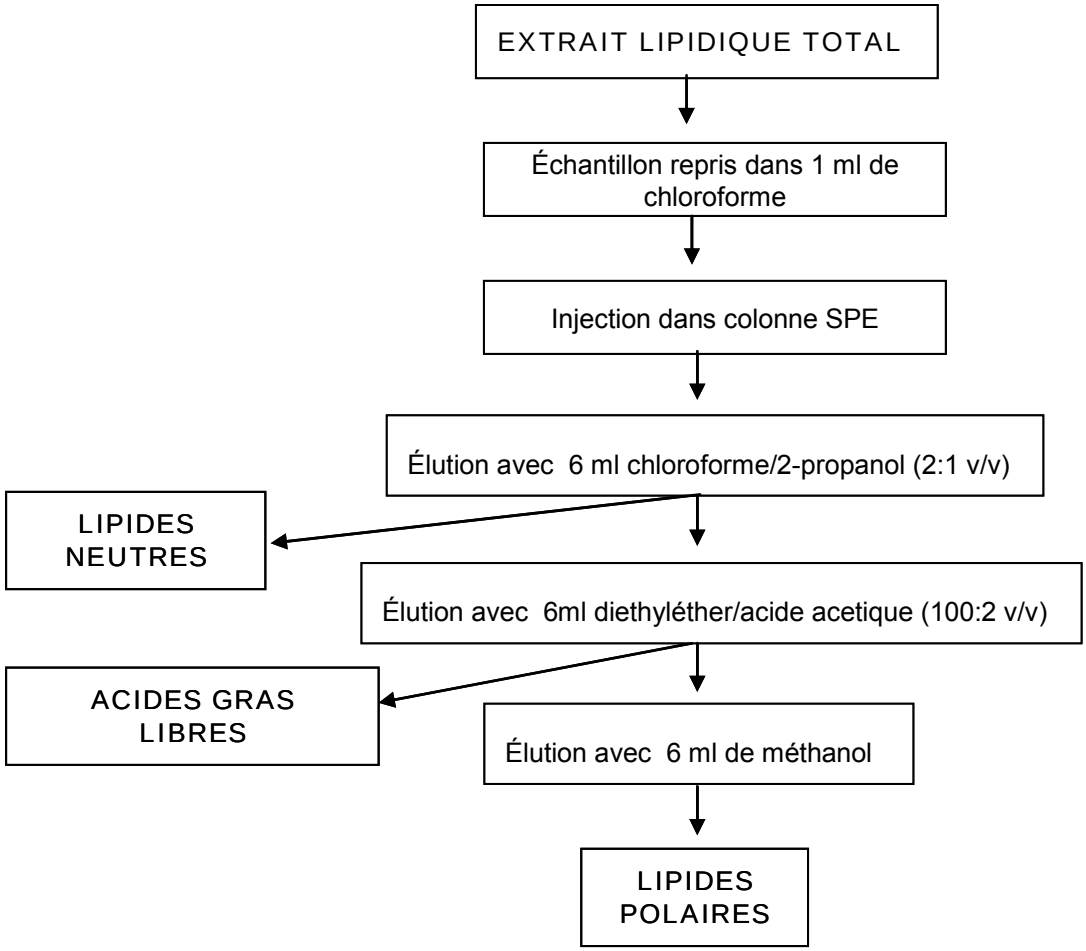



**Figure 2.8:** Protocole de séparation des différentes classes de lipides

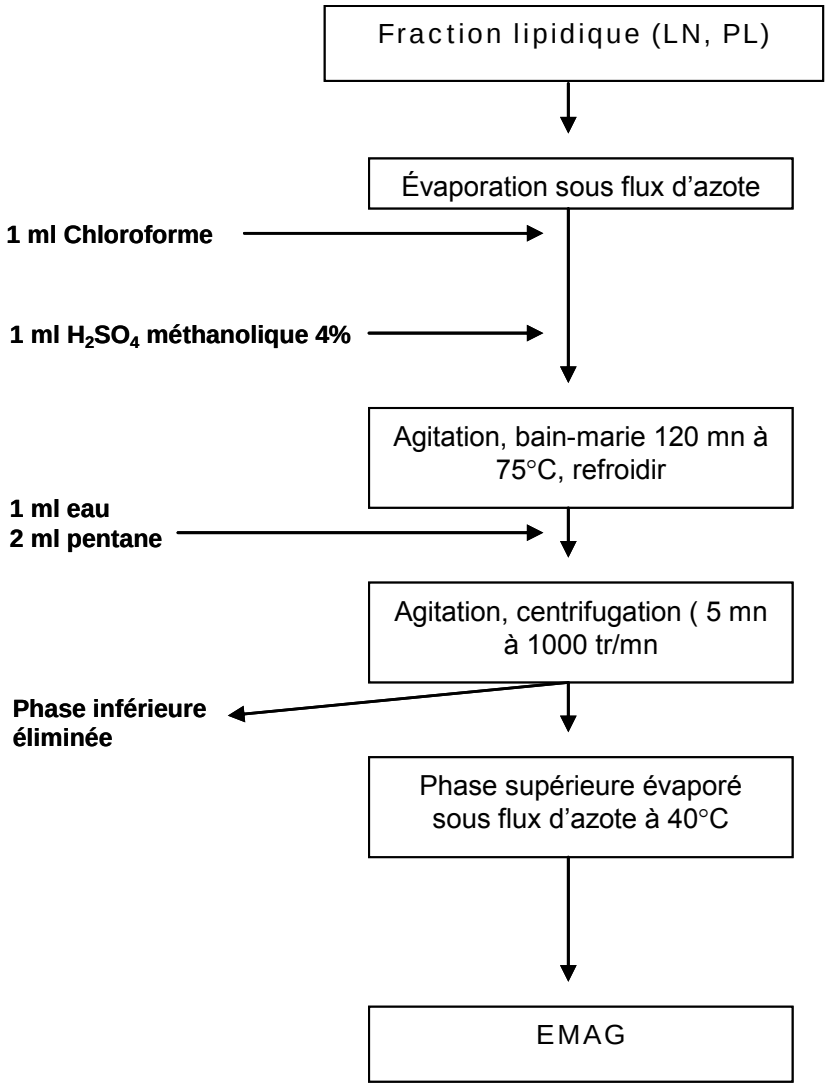



**Figure 2.9:** Protocole de conversion des acides gras en esters méthyliques d'acides gras (EMAG)

### *2.4.1.4 Analyse des EMAG par chromatographie en phase gazeuse (CPG)*

Les EMAG sont séparés avec un chromatographe Agilent 6850 (Santa Clara, Etats-Unis) dans les conditions opératoires suivantes :

- Colonne capillaire : Supelco® OMEGAWAX™, L = 30m, ∅=0,32mm, phase stationnaire polaire FFAB CB, épaisseur du film = 0,25µm.
- Injecteur : mode SPLIT (1 :10)
- Détecteur à ionisation de flamme (DIF)
- Gaz vecteur : Hélium
- Conditions de température : injecteur = 300°C, détecteur = 260°C
- Programmation de température : 140°C à 3°C/min.

L'intégration des pics est faite par le programme Mosaic Chrompack, alors que l'identification des AG est effectuée par comparaison avec un mélange d'AG connus. Les AG sont quantifiés à l'aide d'un étalon interne incorporé en quantité fixe dans l'échantillon avant la conversion en EMAG (afin d'estimer les pertes éventuelles pouvant survenir pendant cette conversion). Celui-ci doit être absent des échantillons et se comporter de la même façon que les AG analysés. L'acide tridécanoique (13 :0) et l'acide trieicosanoique (23 :0) ont été choisis comme double étalon interne car ils répondent bien à ces différents critères.

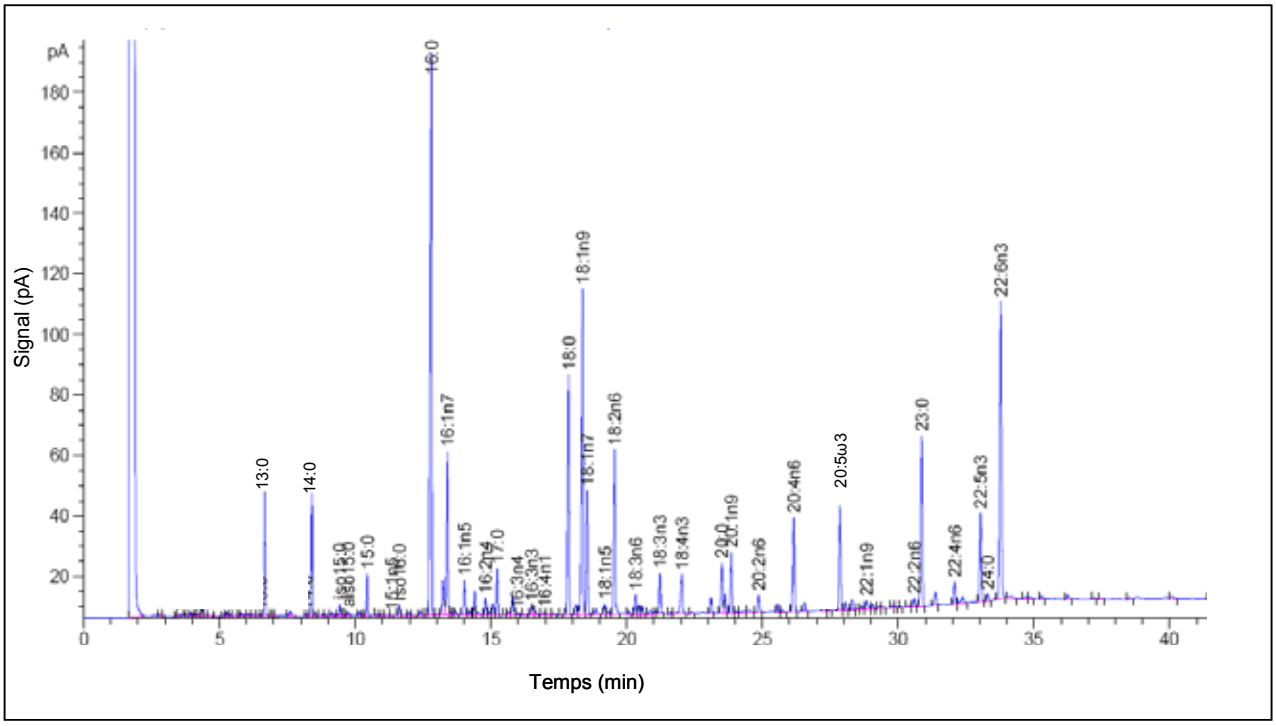



**Figure 2.10:** Exemple de chromatogramme (échantillon: *Atherina boyeri*)

### 2.5.1 Préparation des échantillons destinés à l'analyse isotopique

La présence de carbonates dans les échantillons marins peut entrainer un biais des analyses isotopiques du carbone. Ainsi, afin de les éliminer des échantillons susceptibles d'en contenir (zooplancton, zoobenthons, seston, SOM, macroalgues), ces derniers sont acidifiés brièvement (<5 min) à l'aide d'HCl (10 %). Pour les échantillons récupérés sur filtres en fibre de verre (zooplancton, zoobenthos, seston, SOM), quelques goûtes d'HCl (10 %) sont déposés en cours de filtration. Quand plus aucune effervescence (due à la libération de $CO_2$ lors de la dissolution des carbonates) n'est observée, les filtres sont rincés à l'eau distillée. En ce qui concerne les macroalgues, ces végétaux sont immergés dans une solution d' HCl (10 %) jusqu'à l'arrêt de l'effervescence, puis rincés à l'eau distillée. Les effets de l'acidification sur l'analyse isotopique de l'azote sont encore débattus (Bosley & Wainright 1999, Bunn et al. 1995, Carabel et al. 2006, Jacob et al. 2005). Il semblerait que des temps d'incubation longs (> 1 heure) dans la solution acide puissent entraîner une dissolution et une perte de la matière organique et donc des biais sur les mesures du $\delta^{15}N$. Néanmoins, les temps d'acidification très courts utilisés ici nous paraissent peu à même d'entraîner ces désagréments.

### 2.5.2 Analyse isotopique

Les échantillons lyophilisés sont broyés en poudre très fine, puis une certaine quantité est pesée dans des nacelles en étain (0,2 mg et 1 mg pour les tissus animaux et végétaux respectivement). Les échantillons sont analysés sur un spectromètre de masse - analyseur de ratio isotopique (IR-MS) Thermo-Finnigan Delta plus (Brême, Allemagne) couplé à un analyseur élémentaire Carlo Elba (Milan, Italie) au laboratoire « Stable Isotopes In Nature » de l'Université de New Brunswick au Canada. Les conditions opératoires sont :

- Température de la colonne de combustion : 1050°C
- Température colonne de réduction : 780°C
- Longueur de la colonne CPG (séparation) : 2 m
- Gaz vecteur : Hélium

Les données obtenues sont corrigées à l'aide d'étalons analytiques définis par l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (IAEA), analysés à intervalles réguliers pendant toute la durée des analyses. La écart type entre deux analyses successives d'étalons est inférieur à 0,2 ‰

### 2.5.3 Analyse isotopique des composés spécifiques

L'analyse de la composition isotopique des EMAG est réalisée à Davis (Californie) au laboratoire Stable Isotope Facility de l'Université de Californie, Etats-Unis. Les EMAG sont séparés sur un chromatographe Trace GC Ultra (Thermo Electron, Milan, Italie) puis injectés dans un spectromètre de masse - analyseur de ratio isotopique Finnigan Delta Plus IRMS (Thermo Electron, Brême, Allemagne) sous les conditions opératoires suivantes :

- Colonne capillaire : SGE Analytical science® BPX70™, L = 30m, ∅=0,25mm, phase stationnaire polaire CB, épaisseur du film = 0,25µm.
- Injecteur : mode SPLITLESS
- Gaz vecteur : Hélium (flux constant : 0,8 ml $min^{-1}$)
- Conditions de température : injecteur = 260°C,
- Programmation de température : de 100°C à 190°C à 4°C $min^{-1}$, 190°C pendant 10 min puis de 190°C à 250°C à 8°C $min^{-1}$, 250°C pendant 5 min.

Les valeurs obtenues sont corrigées à l'aide d'étalons analytiques. Les valeurs sont également corrigées pour le groupement méthyle ajouté lors de la conversion des AG en EMAG suivant la formule :

$$\delta^{13}C_{AG}=((n+1)* \delta^{13}C_{EMAG}-\delta^{13}C_{MeOH}))/n$$

où $\delta^{13}C_{FA}$ est la valeur de $\delta^{13}C$ de l'AG avant la méthylation, $\delta^{13}C_{EMAG}$ celle de son ester méthylique, $\delta^{13}C_{MeOH}$ celle du méthanol utilisé pour la méthylation et *n* le nombre d'atomes de carbone de l'AG. Le $\delta^{13}C$ du méthanol utilisé est de -45,3 ‰.

### 2.5.4 Analyse des contenus stomacaux

Pour l'analyse des contenus stomacaux des alevins de *Liza saliens,* les estomacs conservés ainsi que le premier tiers de l'intestin, sont ouverts à l'aide d'un micro-scalpel et d'aiguilles de dissection. Le contenu stomacal est récupéré dans une cellule de comptage de type Sedgewick-Rafter. L'identification et le comptage des items trophiques a lieu sous loupe binoculaire (MZ 125, Leica, Solms, Allemagne). La présence de sable, de débris végétaux, et de détritus amorphe est enregistrée. La fréquence d'occurrence (FO) et l'abondance numérique relative (A) sont calculées selon les formules suivantes (Hyslop 1980):

$$FO\ (\%) = (Ni/N)\times 100 \text{ et } A(\%) = (\Sigma S_i/\Sigma S_t)\times 100$$

où $N_i$ est le nombre d'estomacs contenant la proie *i* , N le nombre total d'estomacs ayant un contenu, $S_i$ est la somme des individus de la proie *i* trouvés dans tous les estomacs, S la somme totale d'individus de tous les types de proies trouvés dans tous les estomacs.

### 2.5.5 Autres mesures

La température et la salinité de l'eau sont mesurées à l'aide d'une sonde multiparamètres Consort C562.

# CHAPITRE 3 :

## EVOLUTION DU REGIME ALIMENTAIRE DES JUVENILES DE *Liza saliens* PENDANT LA PHASE DE COLONISATION ET SES IMPLICATIONS POUR LES APPORTS EN ACIDES GRAS ESSENTIELS

**CHAPITRE 3 : EVOLUTION DU REGIME ALIMENTAIRE DE JUVENILES DE *Liza saliens* PENDANT LA PHASE DE COLONISATION ET SES IMPLICATIONS POUR LES APPORTS EN ACIDES GRAS ESSENTIELS ..... 59**

PREAMBULE ..... 61
3.1 ABSTRACT ..... 63
3.2 INTRODUCTION ..... 64
3.3 MATERIALS AND METHODS ..... 65
3.3.1 Study site, sample collection, fatty acid, stable isotope and stomach content analysis ..... 65
3.3.2 Nutritional condition ..... 65
3.3.3 Data analysis ..... 65
3.4 RESULTS ..... 67
3.4.1 Stomach-content analysis ..... 67
3.4.2 $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ analysis ..... 69
3.4.3 FA composition of basal sources and primary producers ..... 71
3.4.4 FA composition of potential preys ..... 73
3.4.5 FA composition of *L. saliens* ..... 73
3.4.6 Nutritional condition ..... 75
3.5 DISCUSSION ..... 75
3.5.1 Food web sustaining *L. saliens* growth during settlement ..... 75
3.5.2 Implications of settlement for condition and essential FA nutrition of *L. saliens* ..... 79
3.6 CONCLUSION ..... 82

**PREAMBULE**

Comme nous l'avons souligné dans notre synthèse bibliographique, le passage de la vie pélagique marine à la vie en lagune côtière est une phase critique du cycle de vie de *Liza saliens*. En effet, au cours de cette période de leur vie, les juvéniles doivent maintenir des taux de croissance très élevés (Sogard 1997) tout en s'adaptant aux conditions environnementales stressantes de leur nouvel habitat (Yamashita et al. 2003). Cette situation pourrait entraîner une dégradation de la condition physiologique et compromettre la survie de *Liza saliens* ainsi que celle d'autres jeunes poissons marins au mode de vie analogue (Arendt 1997). En conséquence, pendant cette phase migratoire, la plupart des poissons juvéniles ont des besoins accrus en énergie et en nutriments essentiels. Toutefois, cette migration pourrait impliquer des changements importants de la qualité des apports alimentaires en raison : (1) du changement de la nature des sources de carbone à la base du réseau trophique et (2) de changements ontogéniques du comportement alimentaire des alevins.

Nous avons rapporté au préalable, que pour les poissons larvaires et juvéniles, la qualité nutritionnelle de la nourriture est largement dépendante de sa composition en AGPI à longue chaîne. A cet égard, les concentrations en AGPI à longue chaîne carbonée des différents compartiments trophiques des milieux côtiers et estuariens seraient comparativement plus faibles que celles observées en milieu pélagique marin (Alfaro et al. 2006, Copeman et al. 2009, Copeman et al. 2008, Veloza 2005). De ce fait, et en contradiction avec l'idée généralement admise selon laquelle les lagunes et les estuaires offrent des conditions alimentaires optimales aux poissons juvéniles, la migration des juvéniles vers ses milieux pourrait impliquer une diminution de la qualité nutritionnelle des apports alimentaires (Copeman et al. 2008). Ceci, pourrait avoir des effets considérables sur la physiologie des jeunes poissons et sur leur taux de survie pendant la colonisation (Sargent et al. 1999a). Le travail exposé dans ce chapitre s'est donc attaché à relier, au cours de la phase de transition entre milieu marin et lagunaire, l'évolution du régime alimentaire des juvéniles de *L. saliens,* aux apports nutritionnels en AG. L'objectif était de mieux comprendre le rôle des ressources alimentaires sur la survie des juvéniles et leur impact indirect sur le recrutement de nouveaux individus dans la population de mulet sauteur.

# DIETARY SHIFT DURING SETTLEMENT AND IMPLICATIONS FOR ESSENTIAL FATTY ACID NUTRITION IN 0+ LEAPING GREY MULLET (*Liza saliens*)

APOSTOLOS-MANUEL KOUSSOROPLIS[1,2], ALEXANDRE BEC[1,2], MARIE-ELODIE PERGA[3], EMMANUIL KOUTRAKIS[4] AIKATERINI KADEMOGLOU[4,5], GILLES BOURDIER[1,2] AND CHRISTIAN DESVILETTES[1,2]

[1] Clermont université, Université Blaise Pascal, LMGE, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND

[2] CNRS, UMR 6023, LMGE, F-63173

[3] National Institute for Agronomical Research (INRA), Alpine Center for Research on Lake Ecosystems and Food Webs (CARRTEL), BP 511, 74203 Thonon-les-Bains cedex, France

[4] National Agriculture Research Foundation, Fisheries Research Institute, Dpt of Inland Waters and Lagoons, 640 07 Nea Peramos, Greece

[5] University of Ioannina, Dpt of Biological Applications and Technologies, Zoology lab, 45110, Ioannina, Greece

**Soumis pour publication à « *Marine biology* »**

## 3.1 ABSTRACT

Analyses of stable isotopes (C, N), of fatty acids (**FAs**) and of stomach contents were combined to establish matter flows sustaining growth of leaping grey mullet *Liza saliens* during settlement in a coastal lagoon. Based on these results, changes in the essential FA contents (22:6ω3/**DHA**, 20:5ω3/**EPA** and 20:4ω6/**ARA**) of *L. saliens* were related to those of its preys and basal sources. During settlement, mullets shifted from a planktonic to a benthic diet. The difference of FA contents between planktonic and benthic preys strongly affected *L. saliens* FA composition and important modifications of DHA:EPA, DHA:ARA and EPA:ARA ratios in mullet lipids were observed. Moreover, the shift of mullets towards benthic resources was followed by an increased retention of ARA in their lipids suggesting an important role of this essential fatty acid for fish in estuarine environments. Finally, the impairment of essential FA ratios between structural lipids and diet in settled fish might indicate that the nutritional quality of the lagoon's food sources is suboptimal in relation to *L. saliens* physiological needs.

*Keywords:* fatty acids, stable isotopes, stomach contents, fish early life stages, nursery areas, foods webs, food quality, coastal ecosystems.

## 3.2 INTRODUCTION

For many marine fish, recruitment is determined during the larval and the settlement phases (Bradford & Cabana 1997). During settlement, the survival of juveniles is dependent on their ability to feed efficiently, to avoid predation, and to cope with environmental stressors such as changing salinities or temperatures. In fish, these abilities are strongly dependent on food quality (Sargent et al. 1999a) and especially on the availability of $C_{20}$ and $C_{22}$ polyunsaturated fatty acids (**PUFAs**) such as DHA (Docosahexaenoic acid: 22:6ω3), EPA (Eicosapentaenoic acid: 20:5ω3) and ARA (Arachidonic acid: 20:4ω6). These PUFAs are related to optimal growth, development of visual acuity (crucial for prey capture and predator avoidance) and stress resistance (Bell & Sargent 1996, Bell et al. 1995, Koven et al. 2003, Navarro & Sargent 1992). Moreover, EPA and ARA are the major precursors of eicosanoids, which are involved in a variety of physiological mechanisms related to the organism's response and survival to stressful situations (Koven et al. 2003, Sargent et al. 1999b, Schmitz & Ecker 2008). Generally, DHA, EPA, ARA and their precursors i.e. 18:3ω3, 18:2ω6 are formed in primary producers while most consumers, including most marine fish, cannot synthesize them efficiently (Olsen 1998).Therefore, as marine fish rely on dietary inputs for the supply of these FAs they are considered as essential. However, as the trans-acylases that esterify essential FAs exhibit a limited specificity, dietary excess of one essential FA over another can lead to the same excess in fish tissues and affect fish physiology (Sargent et al. 1999b). Therefore, even when their availability is not limiting, excessive dietary levels of EPA over DHA can negatively affect larval and juvenile growth and survival (Bell et al. 1995). In the same way, high dietary EPA inputs competitively inhibit the formation of ARA derived eicosanoids (Sargent et al. 1999b, Schmitz & Ecker 2008). As a result, ARA:EPA ratio in fish tissues controls eicoisanoid action (Sargent et al. 1999a). Another example of the influence of essential FA ratios on fish is the propagation of an excessively high DHA:ARA ratio (>20:1) through the food web of the southern Baltic Sea up to Atlantic salmon eggs, which is suspected to be one of the causes of high mortality rates observed on newborn fry (Ahlgren et al. 2005). Thus, in a food web, the ratios at which essential FAs are produced and transferred to fish could influence fish fitness and by this bias, the success of settlement (Bell & Sargent 1996).

Leaping grey mullet, *Liza saliens* (*Mugilidae*) is one of the most common and widespread commercially exploited fish in Mediterranean lagoons. Mullets share with numerous other marine fish species a common life cycle in which adults spawn offshore and post-larvae settle in estuarine coastal habitats after they spent some time in offshore plankton. Within coastal

nurseries, lagoons are key nursery areas for young-of-the-year fish where they find a suitable environment for growth and survival (Franco et al. 2008, Kjerfve 1994, Koutrakis 1994, Koutrakis et al. 2005, Yàñez-Aranbicia et al. 1994). During settlement, mullets are known to undergo important dietary shifts (Albertini-Berhaut 1980) which could imply changes in food quality. However, although lagoons have long been recognized as fish nurseries and thus of great commercial importance for fisheries, very little is known about the trophic ecology of juvenile fish settling in these areas. Moreover, with the exception of the recent study of (Copeman et al. 2009), the question of food quality in coastal nurseries has to our knowledge never been addressed. In the present study, stable isotope, FA and stomach content analyses were combined to assess how settlement and concomitant dietary shifts could affect essential FA nutrition of 0+ *L. saliens* in a Mediterranean coastal lagoon.

## 3.3 MATERIALS AND METHODS

### 3.3.1 Study site, sample collection, fatty acid, stable isotope and stomach content analysis

For detailed information, please refer to chapter 2. Sampling stations and samples used for this study are presented in figure 3.1 and table 3.1 respectively.

### 3.3.2 Nutritional condition

Nutritional condition of *L. saliens* during settlement was evaluated by using individual muscle, NLFA and PLFA contents (expressed as µg FAs per mg dry muscle) and relative condition factor ($K_n$ ; Le Cren 1951). $K_n$ were calculated by using $K=aW/L^b$ where $W$ is body wet weight in g, $L$ the TL in mm and $a$ and $b$ are constants. The parameters, $a$ and $b$, are calculated by determining the length-weight relationship of all studied *L. saliens* ($\log_{10} W = \log_{10} a + b\log_{10} L$).

### 3.3.3 Data analysis

According to previous studies on *L. saliens*, settlement (*i.e.* the transition from marine pelagic to estuarine demersal habitats) occurs for a TL range of 20 – 30 mm (Albertini-Berhaut 1980). Thus, *L. saliens* samples were arbitrarily separated into three categories: "settling" (TL < 20 mm), "transitional" (20 mm < TL < 30 mm) and "settled" (30 mm< TL < 60). Statistics were performed on PAST (Hammer 2001) and XLSTAT-Pro 7.5 (Addinsoft, Paris, France). Discriminant function analysis (**DFA**) was used to differentiate *L. saliens* lipid classes and size classes. Thus, 12 FA variables (14:0, 16:0, 18:0, 16:1ω7, 18:1ω9, 18:2ω6,

18:3ω3, 18:4ω3, 20:4ω6, 20:5ω3, 22:6ω3, sum of bacterial FAs) were selected according to their abundance and/or their physiological importance.

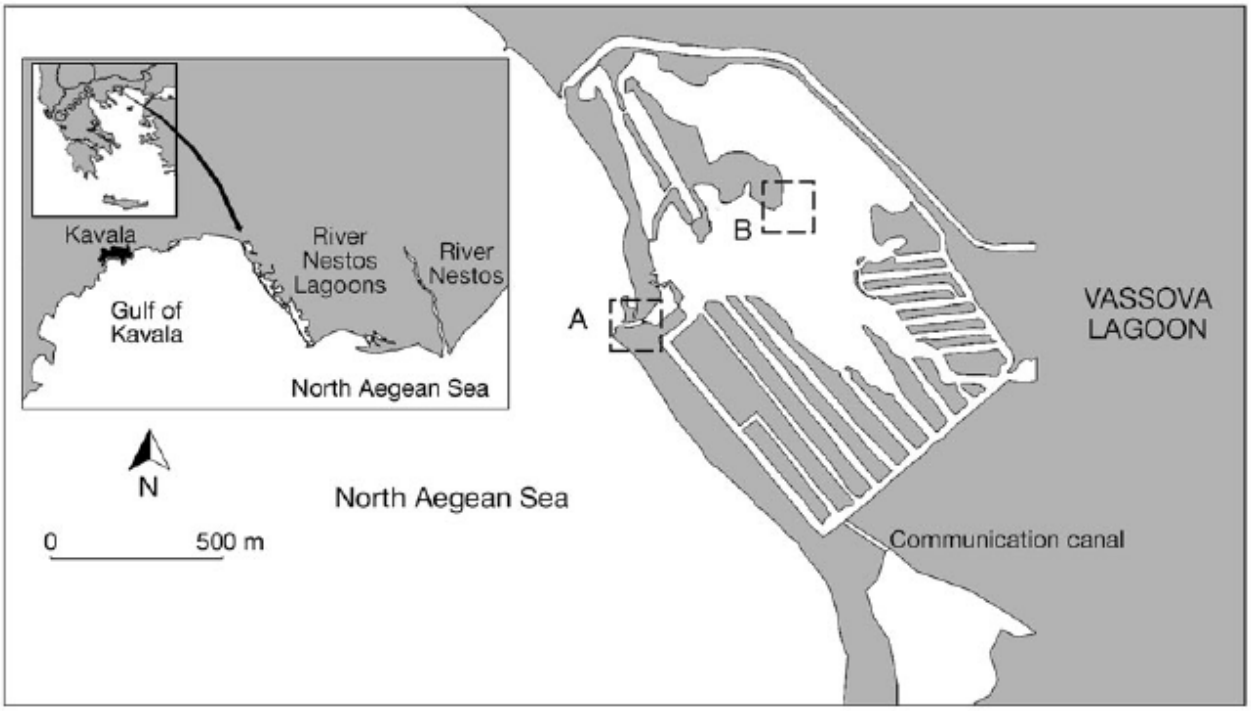



**Figure 3.1 :** Map of Vassova Lagoon and the area of river Nestos Delta lagoons (Greece), reproduced from Tsihrintzis et al. (2007). The sampling stations are indicated with dashed boxes.

| Sample type | Collection date | Site | Treatement |
|---|---|---|---|
| ***Liza saliens*** | | | |
| Size classes (TL) | | | |
| Settling (TL< 20mm) | 26/6 - 6/8 - 21/8 -20/9, 2007 | A | Stomach content analysis, fatty acid analysis, stable isotope analysis |
| Transitional (20 <TL<30mm) | 6/8 - 21/8 -20/9, 2007 | A,B | |
| Settled (TL>30mm) | 6/8 - 21/8 -20/9, 2007 | A,B | |
| ***Other*** | | | |
| Cyclopoid copepodits | 26/6 - 21/8, 2007 | A | Stab. isot. anal. |
| Amphipods | 21/8 -20/9, 2007 | A,B | Fatty acid analysis, stable isotope analysis |
| Calanoid copepodits | 26/6 - 21/8, 2007 | A | |
| Harpacticoids | 6/8 - 21/8 -20/9, 2007 | A,B | |
| Nauplii | 26/6 - 21/8, 2007 | A | |
| Seston | 26/6 - 6/8 - 21/8 -20/9, 2007 | A,B | |
| Sediment | 26/6 - 6/8 - 21/8 -20/9, 2007 | A,B | |
| Macroalgae | 21/08/2007 | B | |
| Halophytes | 21/08/2007 | A,B | |

**Table 3.1 :** Sample information.

As the number of samples per group must exceed the number of variables, transitional fish FA samples were excluded from analysis. Stable isotope and FA compositions between *L. saliens* size classes were compared using one-way analysis of variance (**ANOVA**) followed by Tukey's pairwise comparisons. Spearman's rank correlation test was used to explore for any size effect on *L. saliens* stable isotope composition. Differences of essential FA levels and ratios between *L. saliens* lipid classes were determined with paired *t*-tests. For this study, isotope and FA data from the different seston size fraction were pooled and hereafter referred as seston. Given the small area of the lagoon and the fact that stable isotope and fatty acid compositions of invertebrate preys and primary producers might undergo faster temporal changes than fish, samples from different dates and locations were pooled in order to provide mean compositional data. Pooled samples of invertebrate prey stable isotope and fatty acid compositions where compared by ANOVA test followed by Tukey's pairwise comparisons. All data were checked for normality and heteroscedacity, and when needed data was arcsine square-root (FA proportional data) or log transformed (stable isotope and FA ratio data) in order to meet these assumptions. The relative contributions of the different basal sources and primary producers to *L. saliens* and its prey, were estimated with a dual-isotope multiple-sources mixing model (SIAR package for R) (Parnell et al. 2008). The average discrimination factors were set at 1.1±0.3‰ and 2.8±0.4‰ for C and N respectively (McCutchan et al. 2003). Seston, sediment organic matter (**SOM**), and epiphytes were used as possible food sources for amphipods and epibenthic harpacticoids. For zooplankton (i.e. nauplii and and calanoid copepodits) only seston and SOM were used. For *L. saliens,* seston, SOM and epiphytes were used as basal sources and considered to be two trophic levels below. The mean $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values for all macroalgae and seagrass samples were also used for calculations under the term "macroalgae". Based on the presence of marcoalgal material in stomachs (see below) they were considered as being one trophic level below *L. saliens.*

## 3.4 RESULTS

### 3.4.1 Stomach-content analysis

Stomach content analysis revealed a progressive switch from planktonic towards benthic food items with increasing fish length (Fig 3.2).While settling fish fed mainly on planktonic preys such as nauplii larvae, cyclopoid (*Oithona* spp.) and calanoid copepodites (mainly *Acartia* spp.) (Fig 3.2), in transitional and settled fish the most frequent and abundant prey items in stomachs were the epibenthic harpacticoid copepod *Metis* sp. followed by bivalve post-larvae (Fig 3.2). Some planktonic prey items, such as planktonic copepods,

nauplii, and amphipods were still present in some stomachs of transitional fish but their relative numerical abundance was low while virtually no planktonic items (calanoid and cyclopoid copepods, nauplii) were found in settled fish stomachs. In some of the transitional fish stomachs, sand/detritus was found while settled fish stomachs were characterized by the high frequency occurrence of sand/detritus and macroalgal debris (Fig. 3.2).

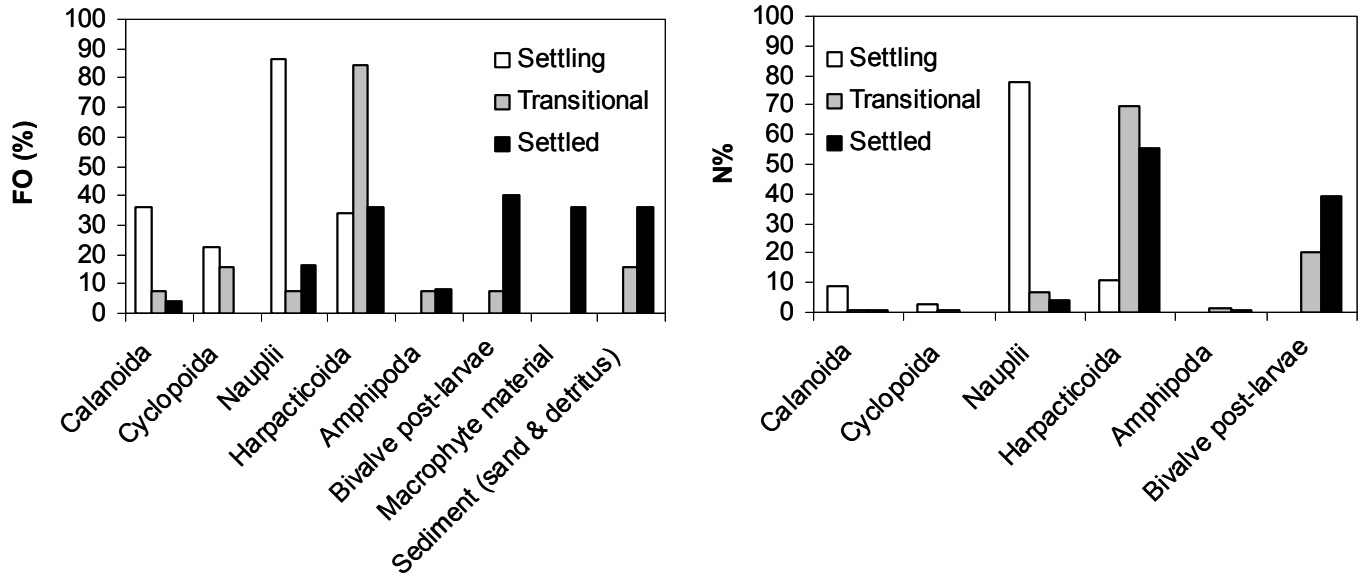



**Figure 3.2 :** *Liza saliens*. Results of stomach content analyses for juvenile fish collected in Vassova lagoon from June to September 2007. Size -classes were: Settling, TL<20 mm (n=30); transitional, 20 mm < T L< 30 mm (n=15); settled, TL > 30 mm (n=42). FO: frequency of occurrence; N: mean numerical abundance.

### 3.4.2 $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ analysis

In the Vassova lagoon, basal sources $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values ranged from -26.6± 0.6‰ (halophytes) to -10.5 ± 2.14‰ (green algae) and from 3.9 ± 2.1‰ (SOM) to 9.5 ± 4.9‰ (halophytes) respectively (Table 3.2, Fig. 3.3). During the study period, $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values of invertebrates varied from -22.5 ± 1.3‰ (nauplii) to -17.2 ± 1.9 ‰ (Amphipods) and from 5.5 ± 1.1‰ (Cyclopoids, *Oithona* spp.) to 7.4 ± 1.3 ‰ (Harpacticpoids, *Metis* sp.) respectively (Table 3.2, Fig. 3.3). Significant differences in the $\delta^{13}C$ values were found between the invertebrate preys, but not for $\delta^{15}N$ (Table 3.2). Isotope mixing model indicated that seston was the dominant organic matter source for nauplii, and calanoïds (mean contribution: 63% and 69% respectively; Table 3.3) and that Harpaticoïds had a more benthic and mixed diet (44%, 33%, and 20% contributions for seston, SOM and epiphytes respectively; Table 3.3). According to the model, amphipods' diet was dominated by benthic sources (16%, 60%; and 24% contributions for seston, SOM and epiphytes respectively; Table 3.3). *L. saliens* $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values varied significantly from -20.2 ± 0.8‰ (settling) to -16.7 ± 1.5‰ (settled) and form 5.4 ± 1.5‰ (settling) to 9.9 ± 1.2‰ (settled) respectively (Table 3.2). $\delta^{15}N$ values were significantly correlated with TL for settling and settled fish (Spearman's rank correlation, settling $R = 0.553$, $P < 0.01$; settled: $R = 0.400$, $P < 0.05$). No significant effect of sampling station or sampling date on *L. saliens* $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ could be detected (ANOVA, settling: $\delta^{13}C_{date}$: $F = 1.276$, $P = 0.303$; $\delta^{15}N_{date}$, $F = 0.422$, $P = 0.739$; transitional and settled, $\delta^{13}C_{date}$: $F = 1.243$, $P = 0.297$; $\delta^{15}N_{date}$, $F = 1.337$, $P = 0.253$; $\delta^{13}C_{station}$: $F = 1.413$, $P = 0.240$; $\delta^{15}N_{station}$, $F = 1.030$, $P = 0.739$). Assuming a mean per-trophic-level fractionation of 1.1±0.3‰ and 2.8±0.4‰ for $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ respectively (McCutchan et al. 2003), only the $\delta^{13}C$ values of settling fish were consistent with a diet based on naupli, calanoïds and cyclopoïds (Fig. 3.3). As $\delta^{15}N$ was unusually low and inconsistent with the $\delta^{15}N$ of the basal sources (Fig. 3.3; see discussion below), we run the isotope mixing model only with $\delta^{13}C$. Results indicated that seston was likely the principal carbon basal source for settling fish (Table 3.3). Transitional fish $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values were consistent with a diet based on harpaticoids (Fig. 3.3), and the isotope mixing model indicated an increase of the contribution of benthic basal sources (32%, 60%, 5% and 3% contributions for seston, SOM, epiphytes and macroalgae respectively, Table 3.3). Settled fish showed more enriched $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values than transitional fish suggesting a further change in diet (Table 3.2, Fig. 3.3). Mixing model indicated that this could be due to an increase of the relative contribution of epiphytes and macroalgae (30%, 45%, 10% and 15% contributions for seston, SOM, epiphytes and macroalgae respectively, Table 3.3).

| | n | $\delta^{13}C$ | $\delta^{15}N$ |
|---|---|---|---|
| ***Liza saliens*** | | | |
| Settling (TL<20 mm) | 30 | -20.2±0.8$^{a}$ | 5.4±1.5$^{a}$ |
| Transitional (20<TL<30 mm) | 15 | -18.4±1.2$^{b}$ | 9.7±0.5$^{b}$ |
| Settled (TL>30 mm) | 38 | -16.7±1.5$^{c}$ | 9.9±1.2$^{b}$ |
| **Invertebrates** | | | |
| Amphipoda | 6 | -17.2±1.9$^{a}$ | 7.0±0.6 |
| Calanoida | 3 | -20.9±0.3$^{a,b}$ | 6.4±0.8 |
| Cyclopoida | 3 | -22.0±1.4$^{a}$ | 5.5±1.1 |
| Harpacticoida | 15 | -19.5±0.8$^{b}$ | 7.4±1.3 |
| Nauplii | 4 | -22.5±1.3$^{c}$ | 6.6±1.3 |
| **Sources** | | | |
| Seston (size fractions and stations pooled) | 48 | -21.5±1.7 | 5.1±2.0 |
| MOS (stations pooled) | 16 | -18.9±0.8 | 3.9±0.5 |
| Epiphytes | 3 | -17.0±0.4 | 5.9±1.5 |
| Red algae (macroalgae) | 3 | -15.1±0.2 | 8.6±0.1 |
| Green algae (macroalgae) | 3 | -10.5±2.14 | 5.7±1.3 |
| *Zostera* sp. | 3 | -11.3±0.1 | 6.8±0.1 |
| Halophytes | 4 | -26.6±0.6 | 9.5±4.9 |

**Table 3.2 :** *Liza saliens* and food web components. $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values (mean ± SD); n: number of replicates. Values with different letters are significantly different (ANOVA, $P < 0.05$; Only for invertebrate prey).

| Consumer/Source | Seston | SOM | Epiphytes | Macroalgae |
|---|---|---|---|---|
| ***L. saliens* settling *** | 92 (82 - 100) | 8 (0-18) | - | - |
| ***L. saliens* transitional** | 32 (9-55) | 60 (33-82) | 5 (0-13) | 3 (0-9) |
| ***L. saliens* settled** | 30 (7-70) | 45 (19-71) | 10 (0-24) | 15 (0-26) |
| **Nauplii** | 63 (24-100) | 37 (0-76) | - | - |
| **Calanoida** | 67 (35-100) | 33 (0-65) | - | - |
| **Harpacticoida** | 47 (29-66) | 33 (1-56) | 20 (0-40) | - |
| **Amphipoda** | 16 (0-39) | 60 (30-87) | 24 (0-46) | - |

**Table 3.3:** Results from the SIAR isotope mixing model. Values are the mean contributions (%) of dietary items to consumers. Values in parentheses are the 1- 99 percentile ranges. **-:** not considered for calculations; ***:** calculated only with $\delta^{13}C$.

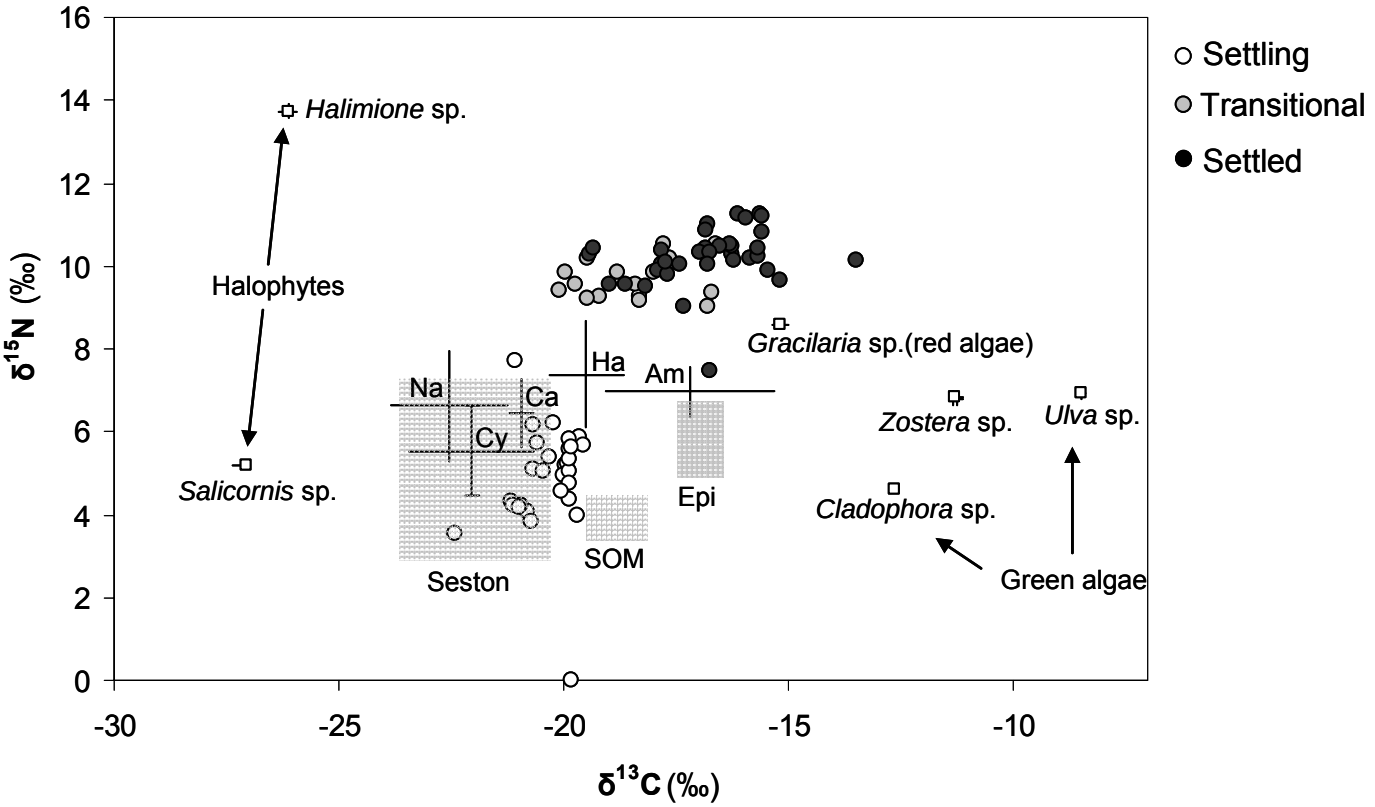



**Figure 3.3:** $\delta^{13}C$ (‰) vs. $\delta^{15}N$ (‰) biplot of *L. saliens* juveniles and food web components from Vassova lagoon (June to September 2007). Circles give *L. saliens* size classes: white circles: **Settling**; grey circles: **Transitional;** black circles **Settled**. Invertebrate preys are plotted as means (± SD): **Am**: amphipods; **Ca:** calanoïds; **Cy:** cyclopoïds; **Ha:** harpaticoids; **Na**: nauplii Ranges for potential ultimate organic matter sources are also shown: **Epi:** Epiphytes; **SOM:** sediment organic matter.

### 3.4.3 FA composition of basal sources and primary producers

Seston SOM and epithyte samples **SAFAs** (saturated FAs), **MUFAs** (monounsaturated FAs ) and PUFAs represented 52-59, 19-24, 20-23% of total FA weight respectively. 16:0 and 18:0 were the two most abundant SAFAs and made up 39% to 45% of total FAs (Table 3.4). Seston and more particularly SOM presented also substantial levels of bacterial FA (7.3±1.8% and 15.1±3.9%; Summ of iso- and anteiso-15:0 and 17:0) and 22:0+24:0. The most abundant MUFA in SOM and epiphytes was 16:1ω7 (7.9 ± 2.8% and 9.5 ± 2.8% respectively) whereas sestonic MUFAs were dominated by 18:1ω9 (8.2 ± 2.7%) (Table 3.4). SOM PUFA composition presented high levels of $C_{16}$ PUFAs (10 ± 4.5%, table), sestonic and epiphytic PUFAs were dominated by $C_{18}$ PUFAs (18:2ω6, 18:3ω3 and 18:4ω3; ~9.4% and ~8% respectively, Table 3.4). With the exception of epiphytes in which EPA represented 5% of total FAs thus reflecting an important diatom presence, $C_{20}$+$C_{22}$ PUFA levels (ARA, EPA and DHA) in seston and SOM were low (<2% of total FA weight; Table 3.4). Seston lipids were

the richest in DHA, and SOM lipids contained virtually no DHA and ARA (Table 3.4).

| | Seston | | | Macroalgae | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | (all size fractions) | SOM | Epiphytes | Red algae | Green algae | Zostera sp. | Halophytes |
| | (n=48) | (n=16) | (n=5) | (n=4) | (n=6) | (n=4) | (n=4) |
| **pg FA/ ind** | - | - | - | - | - | - | - |
| **Fatty acid (%)** | | | | | | | |
| **14:0** | 4.3±1.4 | 4.0±0.9 | 5.8±1 | 9.6±0.9 | 2.6±0.7 | 2.8±1.6 | 1.8±0.4 |
| **16:0** | 26.4±4.3 | 26.1±3.7 | 29.1±0.7 | 54.9±2.5 | 36.9±12.7 | 26±6.5 | 30.1±11.8 |
| **18:0** | 16.0±4.7 | 13.3±5.4 | 15.5±2.3 | 3.3±0.3 | 3.6±2.7 | 1.9±0.8 | 2.9±1.4 |
| **Bacterial** | 7.3±1.8 | 15.1±3.9 | 4.5±2.9 | - | - | - | - |
| **22:0+24:0** | 3.4±3.6 | 6.9±14.5 | 1.3±0.4 | tr | 1.3±1.7 | 1.1±1.0 | 8.9±6.7 |
| **16:1ω9** | 2.6±1.7 | 1.6±0.9 | 0.9±0.7 | tr | 6.5±12.3 | 0.7±0.7 | tr |
| **16:1ω7** | 4.7±3.3 | 7.9±2.8 | 9.5±3.5 | 2.3±2.5 | 5.1±2.8 | n.d. | n.d. |
| **18:1ω9** | 8.2±2.7 | 4.7±1.7 | 5.2±2.1 | 13.5±1.9 | 6.1±6.3 | 3.2±1.4 | 11.9±2.3 |
| **18:1ω7** | 4.4±3.3 | 4.5±3.2 | 2.1±0.3 | 1.1±0.4 | 14.1±6.4 | 1.1±0.6 | 1.2±0.9 |
| **20:1ω9** | tr | tr | tr | - | - | - | - |
| **$C_{16}$ PUFA** | 4.7±2.5 | 10±4.5 | 3.5±1.4 | tr | 3.8±3.8 | 1.8±1.1 | 1.2±1.2 |
| **18:2ω6** | 5.9±2.4 | 2.6±1.1 | 3.9±1.8 | 1.2±0.2 | 3.3±1.2 | 18.3±5 | 20.1±8.5 |
| **18:3ω3** | 1.4±0.9 | 0.9±0.5 | 3.9±2.3 | 0.7±0.9 | 6.7±3.8 | 36.5±8.2 | 16.7±13.1 |
| **18:4ω3** | 2.1±1.3 | 1.6±1.5 | 2.5±0.8 | tr | 2.3±1.6 | 1.0±1.0 | tr |
| **20:4ω6** | 0.5±0.7 | tr | 1.0±0.6 | 8.4±1.6 | 1.0±1.1 | 0.8±0.8 | 0.5±0.7 |
| **20:5ω3** | 1.7±0.8 | 1.2±1.1 | 5.0±0.7 | tr | 1.3±1.7 | 0.8±0.5 | tr |
| **22:6ω3** | 1.2±0.8 | tr | 0.9±0.3 | n.d. | tr | tr | n.d. |
| **DHA:EPA** | 0.7±0.4 | 0.2±0.2 | 0.2±0.1 | - | - | - | - |
| **DHA:ARA** | 3.6±2.4 | 0.9±1.0 | 0.9±0.2 | 0.2±0 | - | - | - |
| **EPA:ARA** | 5.1±2.4 | 3.5±2.4 | 4.9±3.1 | 3.1±0.0 | 0.02±0.0 | - | - |
| **ω3/ω6** | 1.1±0.6 | 1.1±0.8 | 2.3±0.5 | 0.5±0.1 | 0.1±0.07 | 0.07±2.5 | 2.5±1.1 |

| | Zooplankton | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Nauplii | Calanoida | Cyclopoida | Harpacticoida | Amphipoda |
| | (n=4) | (n=3) | | (n=9) | (n=10) |
| **pg FA/ ind** | 27.2±7.8 | 118±83.2 | | 673.4±355 | 84835±45690.1 |
| **Fatty acid (%)** | | | | | |
| **14:0** | 3.5±1.2 $^{a,b}$ | 4.7±1.1 $^{a}$ | | 1.6±0.5 $^{b,c}$ | 1.6±1.3 $^{c}$ |
| **16:0** | 29.6±4.0 $^{a}$ | 30.4±4.2 $^{a}$ | | 18.4±3.4 $^{b}$ | 22.3±3.6 $^{b}$ |
| **18:0** | 16.1±1.8 $^{a,b}$ | 21.6±8.9 $^{a}$ | | 24.3±9.2 $^{a}$ | 9.9±3.2 $^{b}$ |
| **Bacterial** | 5.1±0.9 | 4.0±0.4 | | 4.7±1.9 | 4.1±1.2 |
| **22:0+24:0** | 2.6±0.5 | 0.7±0.6 | | 1.9±0.8 | 2.2±1 |
| **16:1ω9** | tr | tr | | tr | tr |
| **16:1ω7** | 1.7±0.4 | 5.0±1.8 | | 2.3±0.8 | 3.7±2.8 |
| **18:1ω9** | 8.6±0.6 $^{a}$ | 7.0±3.7 $^{a}$ | | 10.9±2.5 $^{b}$ | 13.7±3.1 $^{b}$ |
| **18:1ω7** | 1.8±0.2 $^{a}$ | 2.0±1.8 $^{a}$ | | 1.7±0.4 $^{a}$ | 5.0±1.5 $^{b}$ |
| **20:1ω9** | 0.6±0.1 $^{a}$ | 0.9±0.6 $^{a}$ | | 4.0±1.6 $^{b}$ | 1.0±0.4 $^{a}$ |
| **$C_{16}$ PUFA** | 1.1±0.5 $^{a}$ | 1.5±0.2 $^{a}$ | | 2.7±0.6 $^{b}$ | 2.5±1.1 $^{b}$ |
| **18:2ω6** | 4.7±0.6 $^{a}$ | 2.2±0.9 $^{b}$ | | 5.6±2.0 $^{a}$ | 4.4±1.0 $^{a}$ |
| **18:3ω3** | 2.4±1.7 | 1.5±0.4 | | 2.3±0.8 | 2.9±0.7 |
| **18:4ω3** | 2.1±1.4 | 1.8±0.4 | | 2.4±1.2 | 1.6±1.1 |
| **20:4ω6** | tr $^{a}$ | 0.6±0.31 $^{a}$ | | 1.1±0.6 $^{b}$ | 4.5±1.6 $^{c}$ |
| **20:5ω3** | 2.9±0.9 $^{a}$ | 4.1±0.5 $^{a}$ | | 4.2±2.2 $^{a}$ | 10.9±4.3 $^{b}$ |
| **22:6ω3** | 6.2±2.8 $^{a}$ | 8.3±3.2 $^{a}$ | | 3.2±1.8 $^{b}$ | 4.9±0.7 $^{a\,b}$ |
| **DHA:EPA** | 2.4±1.2 $^{a}$ | 1.9±0.6 $^{a}$ | | 0.7±0.3 $^{b}$ | 0.6±0.5 $^{b}$ |
| **DHA:ARA** | 12.5±3.3 $^{a}$ | 16.6±11.3 $^{a}$ | | 3.3±2.6 $^{b}$ | 1.1±0.4 $^{a,b}$ |
| **EPA:ARA** | 4.4±1.7 $^{a,}$ | 7.6±3.2 $^{a}$ | | 4.1±1.9 $^{b}$ | 2.4±2.6 $^{b}$ |
| **ω3/ω6** | 1.8±0.6 | 4.4±1.1 | | 1.7±0.6 | 2.1±2.5 |

**Table 3.4:** Number of replicates (n) and (mean ± SD) fatty acid compositions (% of total fatty acid weight) and fatty acid ratios in basal sources and potential preys of *Liza saliens* in Vassova lagoon from June to September 2007.
**Bacterial FAs:**15:0+iso15:0+anteiso15:0+17:0+iso17:0+anteiso17:0; **$C_{16}$ PUFAs :** 16:2ω4 + 16:3ω3+16:4ω1 ; **tr :** trace amounts (< 0.5%); **n.d:** not detected; **-:** not calculated. Different letters (only for invertebrate prey) denote significant differences (ANOVA, $P < 0.05$)

The DHA:EPA ratio in seston, SOM and epiphytes was <1. In seston however, the DHA:EPA and DHA:ARA ratios were higher than those in SOM and epiphytes (Table 3.4).

Macrophyte PUFAs (green and red algae, seagrass and halophytes) had markedly different FA compositions than other sources. In red algae *Gracilaria* sp., 16:0, 18:1ω9 and ARA were the principal FAs and accounted ~76% of total FAs (Table 3.4). Green algae (*Ulva* sp. and *Cladophora* sp.) contained mainly 16:0, 16:1ω7, 18:1ω7 and 18:3ω3 (~65% of total FAs, Table 2). 18:3ω3, 18:2ω6 and 16:0 accounted for ~80% of total EFAs in seagrass *Zostera* sp (Table 2). Halophytes composition was characterised by high proportions 16:0, 22:0+24:0, 18:1ω9, 18:2ω6 and 18:3ω3 accounting for ~80% of total FAs (table 3.4).

### 3.4.4 FA composition of potential preys

Among the potential preys of *L. saliens*, cyclopoids where not analysed for FA composition as we could not meet mass requirements for analysis. SAFAs, MUFAs and PUFAs represented 39-61, 16-25, 22-35% of total FA weight respectively in the different potential preys. The two main SFAs in all prey organisms were 16:0 and 18:0 (33% - 51% of total FAs, Table 3.4). Moreover, potential preys shared substantial proportions of bacterial FAs and non negligible amounts of 22:0+24:0 (4 - 5% and 1 - 2.5% of total FAs respectively, Table 3.4). MUFAs were dominated by 18:1ω9 (7 - 13.7% of total FAs) in all potential preys, but important proportions of 16:1ω7, 18:1ω7 or 20:1ω9 could also be detected in calanoïds, harpaticoïdsa and Harpaticoïds respectively (Table 3.4). $C_{16}$ PUFAs (1 - 2.7%) were found in significantly higher proportions in epibenthic prey (harpacticoïds, amphipods). Calanoïds contained significantly lower 18:2ω6 levels than other preys, but 18:3ω3 and 18:4ω3 were found in similar levels in all organisms (Table 3.4). DHA dominated PUFAs composition in planktonic prey (nauplii, calanoïds) whereas for harpacticoids and amphipods EPA was dominant. Consistently, planktonic prey had significantly higher DHA levels and DHA:EPA and DHA:ARA ratios than epibenthic prey (Table 3.4).

### 3.4.5 FA composition of *L. saliens*

For fish, in both lipid classes, SAFAs were dominant (42.5% - 50.8% and 42.5% - 50.0% of total FA weight for NLs and PLs respectively) followed by PUFAs ( 30.6% - 37.0% and 36.4% - 39.9% of total FA weight for NLs and PLs respectively) and monounsaturated FAs (MUFAs; 18.0% - 22.7% and 13.1% - 17.3% of total FA weight for NLs and PLs respectively).

| | Neutral lipids | | | Polar lipids | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Settling | Transitional | Settled | Setting | Transitional | Settled |
| $K_n$ | (n=30) 0.92±0.19 | (n=15) 0.92±0.17 | (n=33) 0.88±0.18 | | | |
| | (n=21) | (n=8) | (n=33) | (n=12) | (n=8) | (n=29) |
| mg FAs $g^{-1}$ DW | 8.5±4.1 a | 7.4±3.4 a.b | 4.7±3.3 b | 13.9±8.7 | 16.3±10.0 | 8.6±3.5 |
| **Fatty acid** | | | | | | |
| 14:0 | 7.7±3.5 a | 4.7±1.0 a b | 6.0±1.9 b | 2.5±0.8 a | 1.6±0.6 b | 1.5±0.4 b |
| 16:0 | 25.4±4.0 | 24.6±3.6 | 23.3±4.0 | 30.6±3.5 a | 26.4±5.3 b | 26.9±4.7 b |
| 18:0 | 11.4±4.4 a | 8.7±1.5 a b | 6.2±3.0 b | 12.9±2.8 a | 10.1±2.4 b | 9.5±3.5 b |
| Bacterial | 5.4±1.5 | 5.2±1.4 | 6.4±2.2 | 2.7±0.6 | 4.2±1.2 | 3.8±1.3 |
| 22:0+24:0 | tr | tr | tr | 0.9±0.9 a | 2.3±0.9 b | 1.8±0.8 a |
| 16:1ω7 | 5.8±2.6 a | 7.5±2.2 a.b | 9.2±3.4 b | 2.3±0.5 | 2.6±0.9 | 2.8±0.8 |
| 18:1ω9 | 6.7±1.6 | 6.1±1.8 | 6.8±3.1 | 8.5±2.2 | 9.1±1.6 | 10.2±2.4 |
| 18:1ω7 | 2.4±0.6 | 3.0±0.5 | 3.3±0.9 | 1.9±0.5 a | 2.2±0.6 a.b | 2.5±0.6 b |
| $C_{16}$ PUFA | 1.9±0.8 a | 3.1±1.5 a.b | 4.7±2.1 b | 2.5±0.7 | 3.1±0.4 | 3.5±1.4 |
| 18:2ω6 | 2.3±0.5 a | 3.9±1.3 a b | 4.8±3.7 b | 1.3±0.3 a | 1.8±1.1 a b | 2.4±1.7 b |
| 18:3ω3 | 0.9±0.5 a | 2.6±0.8 b | 2.2±1.3 b | tr a | 0.7±0.2 b | 0.8±0.5 b |
| 18:4ω3 | 4.5±3.4 | 3.2±1.4 | 3.9±3.4 | 0.6±0.8 | 0.7±0.4 | 0.7±0.5 |
| 20:4ω6 | 1.0±0.3 a | 2.6±0.8 b | 3.0±1.8 b | 1.7±0.7 a | 5.8±2.1 b | 5.2±2.1 b |
| 20:5ω3 | 5.0±2.1 | 5.5±1.1 | 6.8±4.0 | 8.1±2.6 | 8.1±2.5 | 9±2.9 |
| 22:5ω3 | 0.7±0.4 | 2.1±1.0 | 1.4±0.9 b | tr a | 1.6±0.5 b | 1.7±1.1 b |
| 22:6ω3 | 11.3±5.3 a | 8.3±2.2 a | 5.1±3.9 c | 19.9±5.2 a | 14.9±6.7 a | 12±4.5 |
| DHA:EPA | 2.2±0.4 a | 1.5±0.2 b | ∗0.8±0.5 c | 2.5±0.5 a | 1.8±0.4 b | 1.4±0.6 b |
| DHA:ARA | 11.3±4.6 a | 3.4±1.3 b | ∗1.8±0.9 b | 13±4.5 a | 2.7±1.1 b | 2.5±1.1 b |
| EPA:ARA | 5.0±1.6 a | 2.2±0.6 b | ∗2.7±1.4 b | 5.2±1.5 a | 1.5±0.6 b | 1.8±0.6 b |
| ω3/ω6 | 5.0±2.1 a | 2.8±0.9 b | 2.4±1.0 | 7.3±2.8 a | 2.7±0.9 b | 2.5±0.7 b |

**Table 3.5:** *Liza saliens.* Number of replicates (**n**) and (mean ± SD) of relative condition factor (***K*n***), (mean ± SD) fatty acid composition (% of total fatty acid weight) and fatty acid ratios in Vassova lagoon from June to September 2007. **Bacterial FAs:** 15:0 + iso15:0 + anteiso15:0 + 17:0 + iso17:0 + anteiso17:0; **$C_{16}$ PUFAs :** 16:2ω4 + 16:3ω3+16:4ω1 ; **tr :** trace amounts (< 0.5%); **n.d:** not detected; **-:** not calculated. Different letters denote significant differences (ANOVA, $P < 0.05$). Asterisks (only for ratios) denote significant difference between NLs and PLs (paired *t*-test, $P < 0.05$)

In both lipid classes, the most abundant SFAs were 16:0 and 18:0 (Table 3.5). In MUFAs, 16:1ω7 and 18:1ω9 were dominant (Table 3.5). 18:2ω6 was the most abundant $C_{18}$ PUFA and DHA and EPA dominated HUFA composition (Table 3). DFA differentiated NLs from PLs and settling from settled fish (Fig. 3.4). The two discriminant functions explained 97,74% of total variance (Wilks' $\lambda$=0.007, $F$ = 27,01, $P$ < 0.0001). The first discriminant function explained 50,59% of variance and separated settling from settled fish indicating that settlement was followed by important modifications in *L. saliens* FA composition, concerning more particularly DHA, ARA, 18:3ω3, 18:2ω6, 18:0 and 16:0. Indeed, during settlement, 16:0, 18:0 and DHA levels decreased significantly whereas 18:3ω3, 18:2ω6 and ARA levels showed a significant increase in both lipid classes (Table 3.5). The second discriminant function explained 47.15% of total variance and separated lipid classes indicating higher $C_{20}$+$C_{22}$ PUFA, 18:1ω9, 18:0, and 16:0 contents in PLs. A seasonal (*i.e*. sampling date) or spatial (*i.e.* sampling station) effect was found for some FAs (ANOVA, $P$ < 0.05). However, as indicated by the compact clusters in DFA these effects were much less important than those observed between size classes and taking them into account had no effect on statistical significance of differences between size classes. The DHA:EPA, DHA:ARA and EPA:ARA ratios also decreased significantly with increasing size class in both lipid classes (Table 3.5). In settled fish DHA:EPA ratio was significantly higher in PLs than in NLs whereas for the DHA:ARA and EPA:ARA ratios the opposite patterns were observed (Table 3.5).

### 3.4.6 Nutritional condition

The length-weight relationship could be written as follows $Log_{10}W = -4.79+2,96log_{10}L$ ($r^2$ = 0.98; p < 0.0001; n=87), with $a = 10^{-4.79\ (\pm 0.04)}$ and $b$ = 2.96 ± 0.06. Based on these values $K_n$ varied from 0.92 ± 0.20 in settling fish to 0.88 ± 0.18 in settled fish (table 3.5). NLFA muscle content decreased significantly from 8.5 ± 4.1 µg mg $^{-1}$ in settling fish to 4.7 ± 3.3 µg mg $^{-1}$ in settled ones (Table 3). PLFA muscle content was 13.9 ± 8.7, 16.3 ± 10.0 and 8.6 ± 3.5µg mg $^{-1}$ in settling, transitional and settled fish respectively (Table 3.5)

## 3.5 DISCUSSION

### 3.5.1 Food web sustaining *L. saliens* growth during settlement

Stomach content analysis demonstrated differences in diet compositions between the three studied size classes of *L. saliens* in accordance with a progressive shift from planktonic to benthic items in fish stomachs with increasing TL.

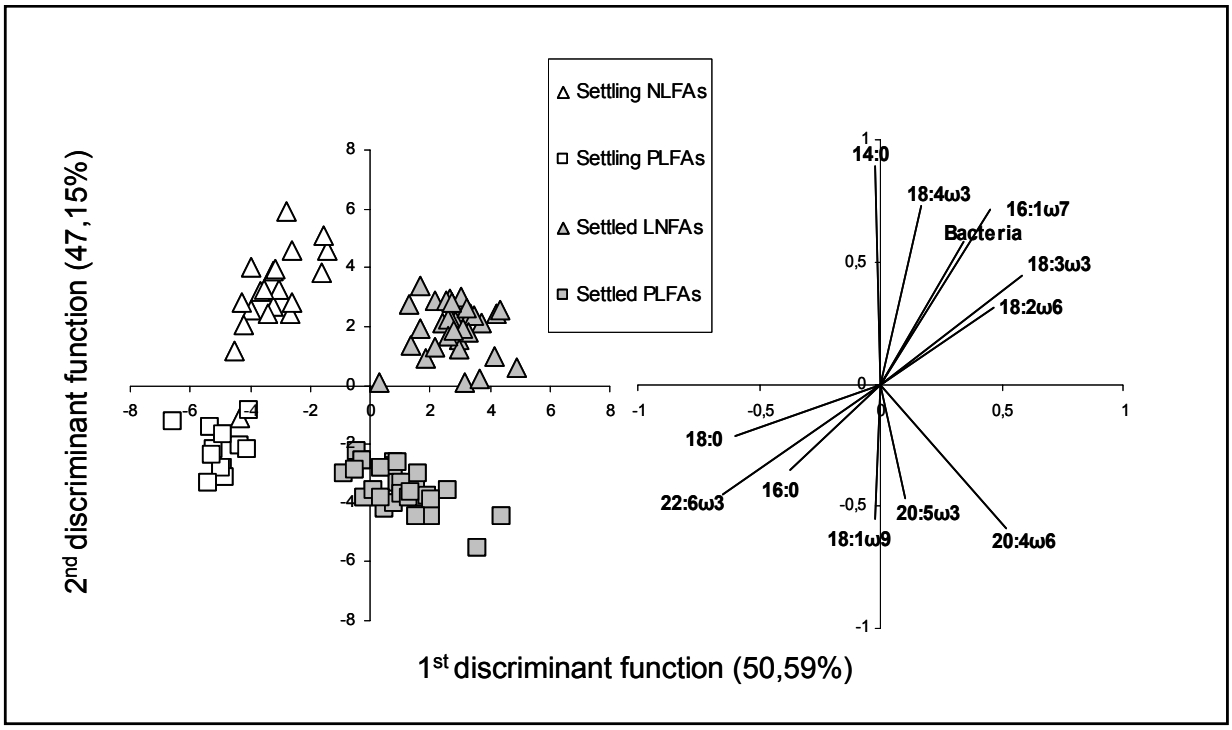



**Figure 3.4 :** Discriminant function analysis (DFA) of neutral and polar lipid fatty acid proportions (NLFAs, PLFAs) for *L. saliens* samples collected in Vassova lagoon from June to September 2007. **Left panel:** individual sample scores on the two first discriminant functions; **Right panel:** Loading coefficients of selected variables.

Settling fish diets were dominated by naupli, with a lesser contribution of calanoid and cyclopoid copepodites corroborating previous findings on mugilid post-larvae diets (Albertini-Berhaut 1980). However, despite the fact that the $\delta^{13}C$ values and stomach contents of settling *L. saliens* were in agreement with reliance upon planktonic sources, their $\delta^{15}N$ signatures were not consistent with that of their prey items and could reflect their previous offshore habitat. During the summer stratification period, nitrogen-fixing cyanobacteria might be the main nitrogen source of planktonic food webs in oligotrophic waters such as those of northern Aegean sea (Aberle et al. 2009, Foster et al. 2009, Zehr et al. 2001) resulting in low baseline $\delta^{15}N$ values (~ 0‰ or lower), then propagated to higher trophic levels (Aberle et al. 2009). Another explanation could be important predation of larval fish on protozoan microzooplankton, undetected in stomach contents because of very short (~ 0.5 h) digestion time (de Figueiredo et al. 2005, Fukami et al. 1999, Pepin & Dower 2007). In both cases, the "time-lag" between stomach contents and $\delta^{15}N$ of settling fish is suggesting a very recent switch on the lagoons' nauplii. Consistently, the very sharp increase of settling individual's $\delta^{15}N$ with TL suggests an "equilibration" to the lagoon zooplanktonic food sources as fish gain biomass (Herzka et al. 2002, Perga & Gerdeaux 2005). Stomach contents and stable isotope results proved that dietary shift towards benthic resources occur between 20 and 30 mm. This suggests that harpacticoid copepods are a prey of major importance for transitional and settled fish. However, settled fish $\delta^{13}C$ suggested that more $^{13}C$-enriched sources than harpacticoids also contributed to *L. saliens* production. Although amphipods could isotopically fit as a prey, their occurrence in stomachs was low. Therefore, it is more likely that this $^{13}C$-enriched source were bivalve post-larvae which were found in large numbers in more than 30% of the stomachs. Unfortunately, no isotopic data or fatty acid data on these prey taxa is available as our sampling protocol was not designed for their collection. Moreover, a direct consumption of macroalgal and/or seagrass material as indicated by the isotope mixing model probably contributes to the decrease of settled fish $\delta^{13}C$.

Most marine fish store energy under the form of neutral lipids (NLs; mainly triacylglycerols and steryl esters) whereas polar lipids (PLs; mainly phospholipids) are mainly used as structural components for cellular membranes. As evidenced by DFA, $C_{20}$+$C_{22}$ PUFAs are, due to their important structural and physiological roles, preferentially integrated in PLs (Dalsgaard et al. 2003, Sargent et al. 1993b). On the other hand, the accumulation of FAs in NLs is dietary dependent. Therefore, changes in *L. saliens* NL FA composition during settlement support a dietary shift towards a benthic diet. For instance, the decrease of DHA along with the increase of ARA and $C_{16}$ PUFAs reflects the FA pattern found in *Harpaticoïds*.

Nevertheless, Harpaticoïds FA composition cannot seldom explain the increase in the proportions of other FAs (18:3ω3, 18:2ω6, 18:1ω7, 16:1ω7) thus confirming the contribution of other dietary sources which contain important proportions of these FAs such as macroalgal and seagrass material. Isotope mixing model revealed that the principal basal organic matter sources for *L. saliens* and its prey were seston and SOM. These particulate organic matter pools were characterised by high levels of SFAs, bacterial FAs, and low of levels of $C_{20}$+$C_{22}$ PUFAs. Such pattern is typical of coastal and estuarine systems and indicates that detritus and bacterial biomass dominates over phytoplankton biomass (Alfaro et al. 2006, Copeman et al. 2009). The presence of 22:0+24:0 indicated that terrestrial plant material contributed to the detrital particulate pool and to consumers (Budge et al. 2001). During the study, time period, low DHA:EPA ratios and high levels of 16:1ω7 and $C_{16}$ PUFAs in seston and SOM indicated the fresh microalgal fraction of particulate organic matter was probably constituted by an important proportion of diatoms (Dalsgaard et al. 2003, Desvilettes et al. 1997, Viso & Marty 1993). Diatoms also appeared to constitute an important component of epiphytes as they presented the highest EPA levels amongst all basal sources.

Substantial levels of bacterial and macrophyte detrital biomarker FAs (*i.e.* 22:0+24:0 and $C_{18}$ PUFAs) found in pelagic (nauplii, calanoïds) and benthic (Harpaticoïds and amphipods) consumers, indicated their important reliance on the microbial food web and on a common organic matter pool of mixed terrestrial, macroalgal and microalgal detrital material. However, the significantly higher DHA:EPA and DHA:ARA ratios found in pelagic consumers indicated some dietary differences. Small coastal planktonic copepods are important grazers of heterotrophic protists (Atienza et al. 2006, Atkinson 1994, David et al. 2006, Gifford & Dagg 1991) which are a significant link between bacterial and picophytoplanktonic productions and copepods in estuarine environments (David et al. 2006, Hlaili et al. 2008). By accumulating and synthesizing essential FAs, heterotrophic protists upgrade food quality of their prey for zooplankton (Bec et al. 2006, Desvilettes & Bec 2009, Lund et al. 2008, Veloza et al. 2006) and could constitute along with microalgae, a major source of essential FAs in a detritus based food web. Recent studies reported that marine heterotrophic protists preferentially accumulate DHA over EPA (Chu et al. 2008, Veloza et al. 2006). Therefore, high DHA:EPA and DHA:ARA ratios suggest that heterotrophic protists and/or dinoflagellates which are also rich in DHA (Viso & Marty 1993, Zhukova & Aizdaicher 1995), contribute significantly to pelagic consumers' diet. On the other hand, benthic primary consumers in coastal and estuarine environments usually feed selectively upon epibenthic or epiphytic diatom biofilms (Azovsky et al. 2005, Carlier et al. 2007, Coul

1999, Jaschinski et al. 2008, Sauriau & Kang 2000) thus explaining the low DHA:EPA and DHA:ARA ratios in harpacticoids and amphipods.

### 3.5.2 Implications of settlement for condition and essential FA nutrition of *L. saliens*

The settlement period is a phase of intense growth for many marine fish with changing resources and predators. During this period, ontogenic changes impose constraints on what food fish will feed upon and intense predation may induce a selection pressure for growth (Sogard 1997). As fish grow, they need to synthesise PLs in order to build their cellular membranes. On the other hand, in temperate ecosystems fish tend to accumulate energy, mostly under the form of neutral lipids, during summer and fall in order to reduce their susceptibility to winter starvation (Hurst 2007, Hurst & Conover 2003, Pangle et al. 2004). Finally, in estuarine environments such as lagoons, facing fluctuating environmental parameters might imply extra energetic costs (Davis 2006). Therefore, changes in tissue lipid content in *L. saliens* settlers can be regarded as a trade-off between growth related benefices, stress resistance costs, food quantity/quality and over-wintering survival. Although lipid storage strategy of juvenile *L. saliens* is unknown, a previous study in another northern Greece lagoon (Porto-Lagos lagoon) suggested that settlement was followed by a slight decrease in $K_n$ (Koutrakis 1994). In Vassova lagoon, *L. saliens* had a $K_n$ within the range reported by (Koutrakis 1994) (~0.88 – 1.07). Here we found that *L. saliens* grew after settlement with a concomitant slight decrease in $K_n$ and in NLFA and PLFA muscle content, statistically significant only for NLFAs. Increased size with decreased energetic reserves suggests that selection pressure for growth is an important factor driving energy allocation in *L. saliens* juveniles. The non isometric-growth revealed by the length-weight relationship (*i.e.* $b < 3$) is a further indication that energy in primarily allocated to size increase rather than weight gain. Given the high abundance of dietary items selected by settled fish in Vassova lagoon during the study period (authors' observation), it seems unlikely that food quantity is a limiting factor. Therefore, we interpret settled *L. saliens* nutritional condition as the result of the energetic costs for growth and/or stress resistance and the nutritional quality of benthic resources (see below).

Numerous fish nutrition studies highlighted the importance of adequate essential FAs ratios in food and consequently in body tissues for their health and development (Copeman et al. 2002, Koven et al. 2003, Sargent et al. 1999a, Sargent et al. 1999b). For instance, it has been shown that a DHA:EPA ratio of 2:1 is optimal for many marine fish species larvae and juveniles (Sargent et al. 1999a).

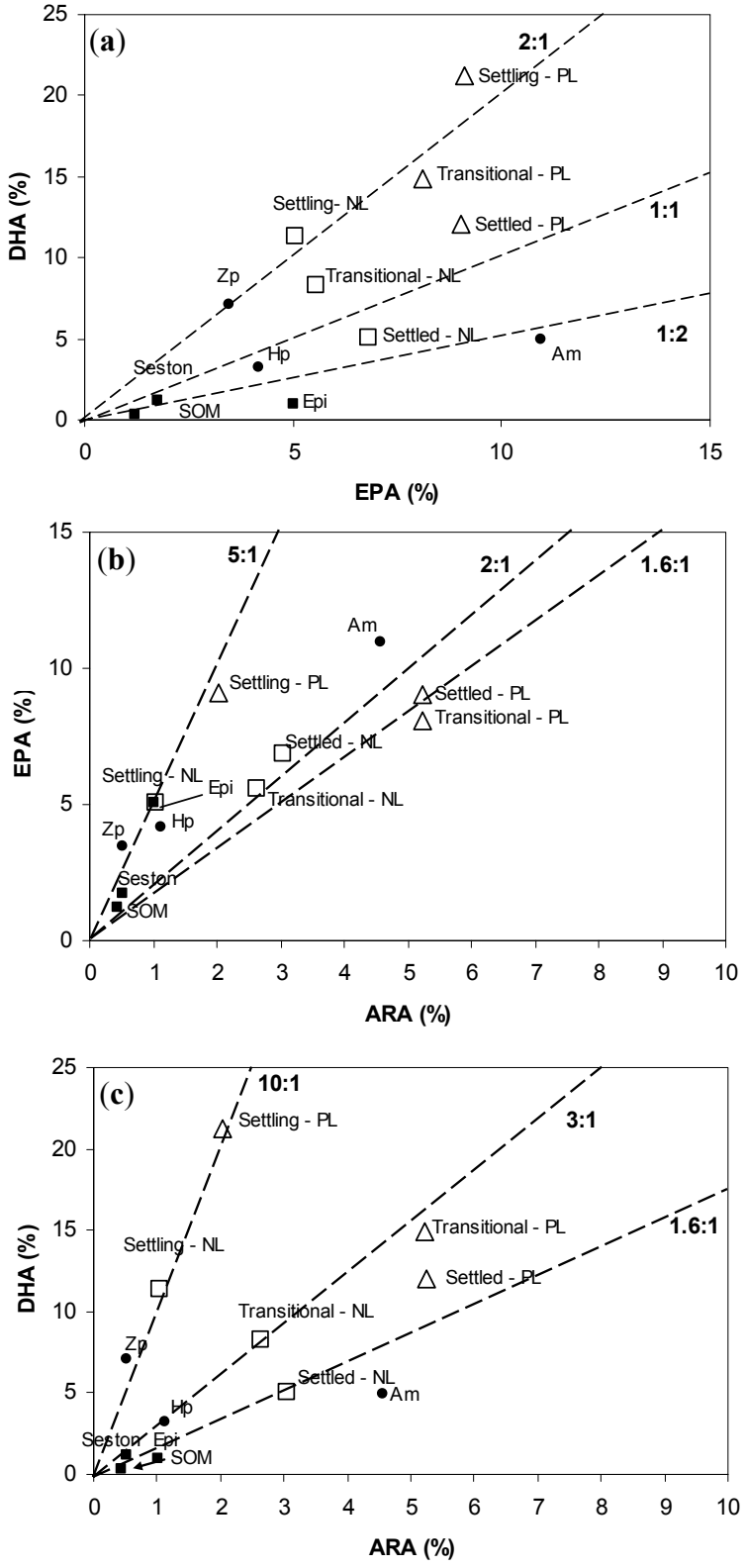



**Figure 3.5 :** Relative proportions of (**a**) DHA plotted against that of EPA; (**b**) EPA plotted against that of ARA; (**c**) DHA plotted against that of ARA in *L. saliens* and food web components collected in Vassova lagoon from June to September 2007 (mean values, for SD refer to tables 2,3). **Dashed lines:** lines of constant fatty acid ratios.

However, although DHA:ARA and EPA:ARA ratios has also been found to be important, little is know about their optima in food which seem to vary between species and developmental stages. In *L. saliens,* settlement was followed by considerable changes of these ratios in NLs and in PLs. The high DHA:EPA, DHA:ARA and EPA:ARA ratios (Fig. 3.5 a,b,c) found in settling fish NLs and PLs were in agreement with the high importance of DHA and EPA relative to ARA for marine larval fish in which ARA is usually found in small amounts (Sargent et al. 1999b). The absence of any significant differences between essential FA ratios in settling fish PLs and those found in NLs or zooplankton suggests that no preferential retention of an essential FA over another occurs (Fig. 3.5 a,b,c). During settlement essential FA ratios in PLs showed like NLs, a sharp decrease in settled fish, significant differences appeared between these two lipid classes (Table 3.5). It has been shown that PLs from larval and juvenile fish tend to maintain the levels of a given essential FA even when it is present in lower proportions in diet (Copeman et al. 2002). As PLs are under physiological constrains, it can be expected that they will tend to maintain an optimal essential FA ratio independently from diet. Hence, the differences between NLs and PLs in settled fish could be interpreted as a preferential retention of DHA and ARA in PLs in order to moderate the inadequacy of dietary essential FA ratios. Therefore, in the context of an increased demand for PLs in order to meet the growth requirements, the sharp decrease of DHA in *L. saliens* lipids during settlement can be considered as detrimental. A deficiency in DHA levels in PLs could affect membrane competency and lead to malfunctioning of the nervous system, thus affecting schooling behavior (Navarro & Sargent 1992), predator avoidance (Bell & Sargent 1996), and prey capture efficiency (Bell et al. 1995) which are determinant for growth and survival. Moreover, the decrease of DHA in *L. saliens* lipids is aggravated by the concomitant increase in $C_{18}$ PUFAs observed in settled *L. saliens.* Indeed, the inclusion of high levels of $C_{18}$ PUFAs, negatively affect fish growth and survival. The mechanism of this effect is *via* competition between 18:3ω3 or 18:2ω6 with longer chain DHA or EPA and ARA respectively for the enzymes that esterify them onto PL backbones (Sargent et al. 1999b).

The apparently increased demand for ARA in settled fish PLs could reflect the new environmental parameters they have to cope with. Indeed, estuarine areas are considered to be stressful environments for organisms as they present strong daily fluctuation of temperature, oxygen, salinity and turbidity. Prolonged stress can induce increases in fish cortisol body levels, an adaptative response to stress which is involved in the catabolism of energy-yielding substrates and restoration of hydromineral balance (Bonga 1997, Yamashita et al. 2003).

Among other secondary effects, cortisol has inhibitory effects on growth and immune function in fish (Bonga 1997). ARA seems to play an important role during stress challenges in estuarine fish (Sargent et al. 1999a). It appears that ARA-derived eicosanoids modulate cortisol levels and action and thus influence the general survival and resistance to stress (Koven et al. 2003, Van Anholt et al. 2004). However, the exact mechanisms involved and the effects of ARA on stress tolerance in fish are still poorly understood but seem to vary among species, developmental stage, relative levels of the other essential FAs in tissues and type of stress (Copeman et al. 2002, Koven et al. 2003).

## 3.6 CONCLUSION

This study showed that the food webs sustaining *L. saliens* during the settlement were based mostly on detritus-rich seston and SOM. The basal organic matter was first transferred to *L. saliens* via planktonic and after settlement, via epibenthic copepods. These preys appear to have a crucial role in the food web as they accumulate essential FAs and determine the ratios at which these molecules are available to fish. Hence, compositional differences between planktonic and epibenthic copepods resulted in differences in the available dietary essential FA ratios between settling and settled *L. saliens.* The latter resulted to a sharp decrease of DHA to apparently suboptimal DHA:EPA, DHA:ARA and EPA:ARA ratios in the settled fish lipids. As essential FAs are major constituents of PLs which in turn are the building blocks of cellular membranes, inadequate dietary essential FA levels and ratios could be detrimental in the context of increased growth rates. Therefore it appears that the functional role of the benthic nursery habitats of Vassova lagoon for *L. saliens* is not increased food quality. However, advantages such as higher food abundance or increased predation avoidance could constitute a trade-off for lower food quality.

# CHAPITRE 4:

## IMPORTANCE NUTRITIONNELLE DES DIFFERENTES SOURCES DE CARBONE POUR LES JUVENILES DE *Liza saliens*, APPROCHE PAR LES RAPPORTS ISOTOPIQUES D'ACIDES GRAS ($\delta^{13}C$)

**CHAPITRE 4: IMPORTANCE NUTRITIONNELLE DES DIFFERENTES SOURCES DE CARBONE POUR LES JUVENILES DE *Liza saliens*, APPROCHE PAR LES RAPPORTS ISOTOPIQUES D'ACIDES GRAS ($\delta^{13}C$)** ..... 83

PREAMBULE ..... 85
4.1 ABSTRACT ..... 87
4.2 INTRODUCTION ..... 88
4.3 MATERIALS AND METHODS ..... 90
4.3.1 Study site ..... 90
4.3.2 Sampling ..... 90
4.3.3 Stomach contents analysis ..... 92
4.3.4 Fatty acid and fatty acid isotope analysis ..... 92
4.3.5 Bulk $\delta^{13}C$ analysis ..... 93
4.3.6 Data analysis ..... 93
4.4 RESULTS ..... 93
4.4.1 Stomach contents ..... 93
4.4.2 Fatty acids composition ..... 95
4.4.3 Bulk $\delta^{13}C$ of potential foods ..... 95
4.4.4 $\delta^{13}C$ of individual fatty acids ..... 95
4.5 DISCUSSION ..... 100
4.5.1 $\delta^{13}C$ values of individual FAs ..... 100
4.5.2 Lipid class $\delta^{13}C$ differences ..... 102
4.6 CONCLUSION ..... 103

**PREAMBULE**

Les résultats présentés dans le chapitre précédant (chapitre 3) nous ont permis d'obtenir une image précise de l'évolution du régime alimentaire des juvéniles de *L. saliens* au cours de la colonisation de la lagune. Nous avons ainsi pu montrer que les juvéniles passent d'un régime alimentaire planctonique vers un régime alimentaire benthique et que cette transition s'accompagne d'importants changements au niveau des apports alimentaires en AG. Ces changements se traduisent notamment par une importante diminution des apports en DHA accompagnée d'une augmentation des apports en AGPI à 18 atomes de carbone, signes indicateurs d'une moindre qualité nutritionnelle des ressources alimentaires exploitées dans la lagune (Sargent et al. 1999). En effet, les proportions relatives en AGE que les jeunes mulets tentent de maintenir dans leurs lipides membranaires (LP) ne correspondent pas à la composition en AGE des apports alimentaires. De ce fait, il semble que dans la lagune étudiée la qualité des ressources alimentaires est suboptimale pour les juvéniles de *L. saliens*. Plus particulièrement, l'abondance relative de certains AGE et notamment celle du DHA apparaissent comme un facteur potentiellement limitant pour leur développement.

Les travaux présentés dans ce chapitre visent donc à identifier l'origine des principaux AG incorporés par les jeunes poissons au cours de la colonisation en utilisant leurs signatures isotopiques individuelles.

**NUTRITIONAL IMPORTANCE OF MINOR DIETARY SOURCES FOR SETTLING LEAPING GREY MULLET *Liza saliens* (*Mugilidae*): INSIGHTS FROM $\delta^{13}C$ ANALYSIS**

APOSTOLOS-MANUEL KOUSSOROPLIS[1,2], ALEXANDRE BEC[1,2], MARIE-ELODIE PERGA [3], EMMANUIL KOUTRAKIS[4] CHRISTIAN DESVILETTES[1,2] AND GILLES BOURDIER[1,2]

[1] Clermont université, Université Blaise Pascal, LMGE, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND

[2]CNRS, UMR 6023, LMGE, F-63173

[3] I.N.R.A., Station d'Hydrobiologie Lacustre, BP 511, 74203 Thonon-les-Bains cedex, France

[4]NAGREF, Fisheries Research Institute, Dpt of Inland Waters and Lagoons, 640 07 Nea Peramos, Greece

**Paru dans « *Marine Ecology-Progress Series* », 2010, Vol.404, p. 207-217**

## 4.1 ABSTRACT

The present case study combined fatty acid analysis and compound-specific carbon isotopic analysis of fatty acids in order to trace changes in dietary sources of essential fatty acids during settlement of an estuarine fish (*Liza saliens,* Mugilidae) in its lagoon nursery. Compositional and isotopic shifts in neutral and polar-lipid-derived fatty acids were analysed separately, as these two lipid classes are thought to integrate dietary isotopic signals differently. An increase of 5‰ in the $\delta^{13}C$ of many fatty acids in settled fish indicated that they had shifted from planktonic to benthic resources during settlement. However, the sharp decrease in the proportion of 22:6ω3 in settled fish and the fact that this specific fatty acid kept a planktonic $\delta^{13}C$ signature revealed that benthic resources could not provide this compound, in contrast to 20:4ω6 and 20:5ω3. Consequently, although the production of settled fish was essentially supported by benthic dietary sources, as confirmed by biomarker results, minor reliance on planktonic dietary sources was required to provide fish with 22:6ω3. The "lag" between the increase in $\delta^{13}C$ in fatty acids derived from neutral and from polar lipids suggested that neutral lipid fatty acids integrated the dietary isotopic signal faster. These contrasting dynamics highlight the importance of analyzing lipid classes separately when fast dietary shifts are expected, and could be used to obtain dietary information on different time-scales.

**Keywords:** compound specific analysis, neutral lipids, polar lipids, fatty acids, lagoons, fish

## 4.2 INTRODUCTION

Many organisms migrate during their life in order to find environmental conditions which maximize fitness (Albon & Langvatn 1992, Dini & Carpenter 1992, Rittenhouse et al. 2009, Wysujack et al. 2009). These movements between different environments and thus different food webs imply dietary shifts and behavioural change. Migration-induced dietary switches often occur during crucial steps in the organism's life cycle (reproduction, larval settlement, metamorphosis) in which metabolic needs are high. Therefore, during these events, both food quantity and quality may be determinant for the fitness of individuals and thus the ecological success of populations (Bell & Sargent 1996, Gibson 1994, Vanni & Lampert 1992).

Carbon isotope ratio analysis is a powerful tool to study trophic linkage within ecosystems and dietary shifts in animals, enabling major carbon flows to be traced in food webs (McConnaughey & McRoy 1979, Vander Zanden et al. 1999). However, bulk carbon isotope analysis provides information essentially on dietary sources most significantly contributing to consumers' secondary production (Perga & Gerdeaux 2005), but not on the nutritional quality of the assimilated food. For example, in the case of complex environments such as estuarine ecosystems, with multiple primary producers and organic matter inputs, the proportion and nutritional quality of the various carbon sources may not be homogeneously distributed between sources (Alfaro et al. 2006, Richoux & Froneman 2008). Hence, a minor dietary source, the carbon of which does not support significant secondary production, might play a significant functional role as a supplier of nutritionally important compounds. Thus, in identifying only the quantitatively important organic matter sources, classical stable isotope analysis may have largely underestimated the functional importance of minor dietary sources. The importance of the nutritional quality of food is widely accepted, and compounds such as essential fatty acids (FAs) (20:4ω6, 20:5ω3, 22:6ω3) are known to play a key role in many physiological processes (Arts 1998, Arts et al. 2001, Olsen 1998). Deficiencies in these compounds have a direct impact on the fitness of young fish and may affect recruitment into adult populations (Adams 1998, Bell & Sargent 1996, Olsen 1998). Moreover, essential FAs cannot be synthesized at sufficient rates by most animals and have to be provided by food (Bec et al. 2006). Therefore, it appears crucial to verify the quality assimilated dietary sources in order to achieve a more precise understanding of the dietary factors underlying population dynamics. Some FAs are specific to certain dietary sources (bacteria, diatoms, dinoflagellates, macroalgae, vascular plants) and can be transferred to higher trophic levels and thus be used as biomarkers (Dalsgaard et al. 2003, Desvilettes & Bec 2009, Koussoroplis et al. 2008,

Napolitano 1998, Viso & Marty 1993). Nevertheless, essential FAs are not always specific, as they can be simultaneously present in more than one source, hence limiting their value as biomarkers. By characterizing these compounds isotopically (compound-specific isotopic analysis: **CSIA**), however, it is possible to determine whether all essential FAs have common or distinct sources, and also to obtain specific information on their origins (Chamberlain et al. 2004, Murphy & Abrajano 1994, Pond et al. 1997a, Pond et al. 1997b, Rieley et al. 1999, Van den Meersche et al. 2009). Moreover, the rapid isotopic turnover of FAs compared to other biochemical fractions makes analysis of their $\delta^{13}C$ a very reactive proxy for fast dietary change (Lau et al. 2009, Meier-Augenstein 2002).

Most marine fish store their lipids in the form of neutral lipids (NLs: mainly triacylglycerols), whereas cell-membrane lipids are mostly in the form of polar lipids (PLs: mainly phospholipids) (Dalsgaard et al. 2003). Dietary lipids are hydrolysed in the gut and the liberated fatty acids are absorbed into epithelial cells where they are re-esterified, often without any transformation into NL or PL, and transported to tissue (Dalsgaard et al. 2003, Sargent et al. 1989, Sargent et al. 1993b). Because of their distinct physiological roles, the different lipid classes (NL, PL) are thought to have different turnover rates (Veefkind 1997). Although little studied to date, contrasting dynamics between these two lipid classes could affect the integration of the dietary fatty acid $\delta^{13}C$ signal and thus the interpretation of fatty acid isotope data.

Leaping grey mullet *Liza saliens* (Pisces, Mugilidae) is a common mediterranean estuarine fish species with a life-cycle involving migration from offshore to estuarine areas. Reproduction takes place between late spring and late fall in offshore areas (Koutrakis 1994). Planktonic eggs hatch offshore, and larvae measure approximately 1.7-2 mm (Total Length: TL). At 4 mm TL, larvae with resorbed vesicles start feeding on marine plankton. In north-east Greece, *L. saliens* migration towards coastal lagoons occurs at 10-15 mm TL, between early summer and late fall (Koutrakis 1994, Koutrakis 2004, Koutrakis et al. 2005). Once in their coastal nursery, post-larvae progressively switch from zooplanktonic prey to a benthic omnivore diet (Albertini-Berhaut 1980).

We hypothesized that changes in origin of essential FAs as a result of dietary switch would be isotopically reflected in fish FAs, and that such changes would be integrated differently in NLs and PLs. We therefore analysed the carbon isotope composition of FAs derived from the NLs and the PLs of leaping grey mullet *L. saliens*, in order: (1) to assess the dietary sources of essential FAs for leaping grey mullet in the lagoon nursery, and (2) to study the isotope dynamics of fatty acids in PLs and NLs.

## 4.3 MATERIALS AND METHODS

### 4.3.1 Study site

For study site (fig .4.1) description please refer to chapter 2.

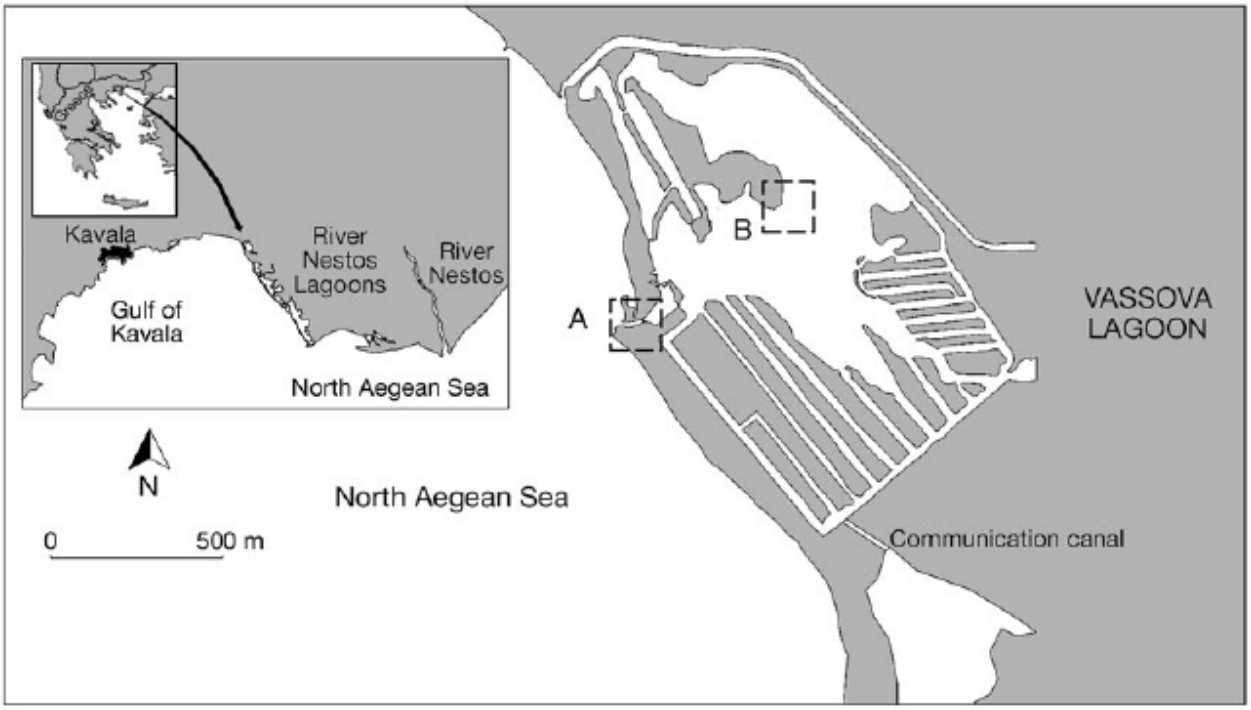



**Figure 4.1 :** Map of Vassova Lagoon and the area of river Nestos Delta lagoons (Greece), reproduced from Tsihrintzis et al. (2007). The sampling stations are indicated with dashed boxes.

### 4.3.2 Sampling

Fish (10-50 mm TL) were sampled every two weeks from June to September 2007 by a hand-trawled seine net (12 m long, 1.5 m high, 2 mm mesh), in the lagoon's entrance (site A) and main basin (site B). Fish were ice-shocked and immediately transported to the laboratory, where TL was measured to the closest 0.5 mm, and stocked at -80°C before analysis. During the sampling period, more than 200 *L. saliens* juveniles were captured, including 87 reserved for gut contents analysis and 15 for FA and CSIA analysis. Individuals for FA and CSIA analysis were selected to give the closest possible representation of a cohort, and arbitrarily separated into 10mm-size class intervals (10-15 mm, 15-20 mm, 20-30 mm, 30-40 mm, and 40-50 mm TL, an exception being made for the two smallest size classes, for which a 5-mm interval was chosen). Three young adult fish (>200 mm TL) were also sampled in the fish-trap installations of the lagoon and were used as reference for a dietarily and spatially stabilized state.

To estimate the range of $\delta^{13}C$ values for the various *L. saliens* food sources, zooplankton, epibenthic invertebrates, sediment and dominant benthic macroalgae were

sampled. As density was too low in the central basin, zooplankton was sampled only in the lagoon entrance, by horizontal hauls with a hand-trawled bongo net (100 µm mesh) fitted to a floater. Epibenthic invertebrates (benthic harpacticoids and amphipods) were collected by a hand-towed net (300 µm mesh). Replicate samples (n = 4) of the first centimetre of sediment from the central basin were collected using hand-corers (5 cm internal diameter). Collected surface sediment was resuspended in artificial sterile seawater and carefully sieved on a 64-µm Nitex mesh to eliminate meiofauna and large debris, and filtered by precombusted GF/F Whatmann fibreglass filters. The dominant benthic macroalgae (*Gracilaria* sp. n = 2, *Ulva* sp. n = 2) were hand-picked from the central basin, scraped to eliminate epifauna and epiflora, and rinsed with sterile artificial seawater. Sample information is summarized in Table 4.1

| Sample type | Collection date | Site | Treatement | N |
|---|---|---|---|---|
| ***L.saliens*** (10-50 mm, TL) | June-September 2007 | A,B | Gut content analysis | 87 |
| ***Liza saliens*** | | | | |
| Size classes (TL) | | | | |
| 10-15 mm | 19 June 2007 | A | Fatty acid analysis, fatty acid $\delta^{13}C$ analysis | 3 |
| 15-20 mm | 26 June 2007 | A | | 3 |
| 20-30 mm | 6 August 2007 | B | | 3 |
| 30-40 mm | 21 August 2007 | B | | 3 |
| 40-50 mm | 20 September 2007 | B | | 3 |
| >200 mm | 20 September 2007 | B | | 3 |
| ***Other*** | | | | |
| Zooplankton | 26 June 2007 | A | Bulk $\delta^{13}C$ analysis | 4 |
| Zooplankton | 20 August 2007 | A | | 6 |
| *Epibenthic invertebrates* | 20 August 2007 | B | | 4 |
| Sediment | 20 August 2007 | B | | 4 |
| Macroalgae | 20 August 2007 | B | | 4 |

**Table 4.1 :** Sample information

### 4.3.3 Stomach contents analysis

In order to determine the size at which fish settled (i.e. shifted towards benthic foraging), gut contents of 87 *L. saliens* (10-50 mm TL) were examined under binocular microscope. Diet items were grouped into four categories: zooplankton (calanoid and cyclopoid copepods, and nauplii), epibenthic prey (harpacticoid copepods, bivalve post-larvae, and amphipods), sand/detritus, and macroalgal material (debris of macroalgal tissue). The frequency of occurrence and mean numerical abundance of these food categories were measured as described in chapter 2.

### 4.3.4 Fatty acid and fatty acid isotope analysis

Lipids were extracted from *L. saliens* samples, separated in lipid classes, and fatty acids converted in fatty acid methyl esters (**FAME**) as described in chapter 2. Experimental GC settings, identification and quantification procedure of *L. saliens* fatty acid composition is also given in chapter 2. Extracted sample FAMEs were analysed at the UC Davis Stable Isotope Facility for CSIA with a GC-combustion-isotope ratio MS (IRMS) system: a Trace GC Ultra (Thermo Electron, Milan, Italy) was interfaced with a Finnigan Delta Plus IRMS (Thermo Electron, Bremen, Germany) and installed with a BPX70 column (30.0 m length, 0.25 mm ID, 0.25 µm film thickness; SGE Analytical Science, Austin, TX). Samples were injected in splitless mode (inlet temperature, 260°C; carrier gas, helium; constant flow rate of 0.8 ml $min^{-1}$; oven temperature rise from 100°C to 190°C at 4°C $min^{-1}$ with 10-min hold, then 190°C to 250°C at 8°C $min^{-1}$ with 5-min hold). An isotopically calibrated $CO_2$ reference was introduced at the beginning and end of each GC run to convert the raw data for combusted FAME peaks into $\delta^{13}C$ values according to the formula:

$$\delta^{13}C_{sample}=[(^{13}C/^{12}C_{sample}-^{13}C/^{12}C_{PDB})-1]\times 1{,}000.$$

$\delta^{13}C$ values were corrected using working standards composed of several FAMEs calibrated against standard reference materials. FAME $\delta^{13}C$ values were corrected for the methyl-group addition during methylation according to the formula:

$$\delta^{13}C_{FA}=((n+1)*\delta^{13}C_{FAME}-\delta^{13}C_{MeOH}))/n$$

where $\delta^{13}C_{FAME}$ and $\delta^{13}C_{MeOH}$ are the $\delta^{13}C$ values of the measured fatty acid methyl ester and methanol used during methylation, respectively, $\delta^{13}C_{FA}$ represents the FA $\delta^{13}C$ prior to methylation, and *n* is the number of carbon atoms in the (non-methylated) FA. For the present

study, the $\delta^{13}C$ of the methanol used for FAME preparation was -45.3‰. In addition to essential FAs, FAs that presented the greatest abundance were present in all samples and for which no coelutions occurred were studied: i.e., 14:0, 15:0 16:0, 18:0, 16:1ω7, 18:2ω6, 18:4ω3, 20:4ω6, 20:5ω3, and 22:6ω3.

### 4.3.5 Bulk $\delta^{13}C$ analysis

As it was not possible to meet mass requirements for FA $\delta^{13}C$ analysis for zooplankton and epibenthic invertebrates, $\delta^{13}C$ ranges of potential food sources were estimated from bulk carbon isotope analysis. Composite samples of zooplankton (n = 10, >100 ind.), benthic harpacticoids (n = 2, ~100 ind.), amphipods (n = 2, 10 ind.), sediment samples and macroalgae samples (*Gracilaria sp.*, n = 2; *Ulva sp.*, n = 2) were analysed for bulk $\delta^{13}C$. Sample preparation and analysis procedure for bulk stable isotope analysis are given in chapter 2.

### 4.3.6 Data analysis

Changes in FA composition or FA $\delta^{13}C$ during settlement were explored by comparing "settling" and "settled" individuals (10-20 mm and 20-50 mm TL, respectively; see Stomach contents results). >200 mm fish were not taken into account for comparison, as they were not from the same cohort. Differences in FA $\delta^{13}C$ between lipid classes were explored separately for six size classes: 10-15 mm, 15-20 mm, 20-30 mm, 30-40 mm, 40-50 mm and >200 mm TL. Significant differences were assessed by Mann-Whitney test (XLSTAT-PRO 7.5, Addinsoft). Differences between bulk $\delta^{13}C$ signatures of potential foods were assessed by Kruskall-Wallis test followed by Mann-Whitney *post-hoc* test after Bonferroni correction (XLSTAT-PRO 7.5, Addinsoft).

## 4.4 RESULTS

### 4.4.1 Stomach contents

Stomach contents analysis revealed a progressive switch towards benthic food items (Fig. 4.2). Smaller size-class (10-15 mm and 15-20 mm TL) individuals fed mainly on planktonic prey (notably nauplii). Despite the presence of some benthic invertebrates (small harpacticoid copepodits) in stomachs of 10-15 mm and 15-20 mm fish, their relative numerical abundance was low (Fig. 4.2). The true dietary shift occurred in the 20-30 mm size class, where presence of sand and detritus was first detected and benthic prey were present in

all stomachs in much larger numbers than zooplankton (Fig. 4.2). In the 30-40 mm and 40-50mm classes, the benthic omnivore/detritivore diet was confirmed, with macrophyte debris and more sand and detritus (Fig. 4.2). As the smaller size classes (10-15 mm and 15-20 mm) were planktivores, they were considered as not yet settled but in transition between sea and lagoon and categorised as "settling" juveniles. The size classes above 20 mm (i.e. 20-30 mm, 30-40 mm and 40-50 mm) presented all the signs of benthic omnivore behaviour and were therefore categorised as "settled" juveniles.

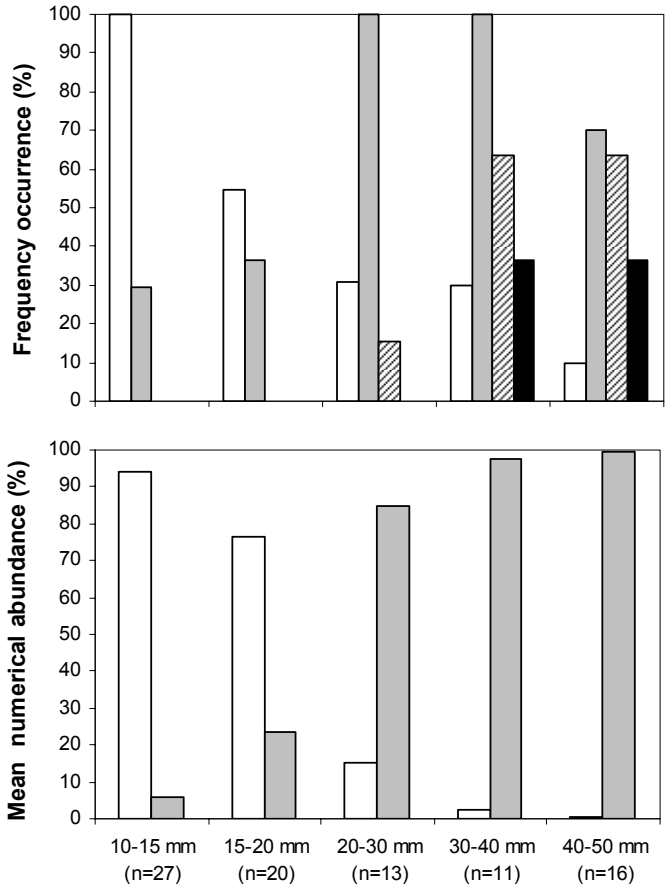



**Figure 4.2:** *Liza saliens*. Stomach content analysis data. Frequency of occurrence and mean numerical abundance of prey items found in *L. saliens* stomachs. TL: total length. White bars: zooplankton; grey bars: epibenthic invertebrates; hatched bars: sand/detritus; black bars: macrophyte material

### 4.4.2 Fatty acids composition

When summed, the selected FAs (14:0, 15:0, 16:0, 18:0, 16:1ω7, 18:2ω6, 18:4ω3, 20:4ω6, 20:5ω3 and 22:6ω3) represented the major part of total FA weight (63.1% to 77.8% and 67.4% to 84.8% of total FA weight for NL and PL respectively). The most abundant FA was 16:0 in both lipid classes (Table 4.2). Although generally present in high proportions, essential FAs (20:4ω6, 20:5ω3, 22:6ω3) were more abundant in PL and represented up to 36% of total FA weight for smaller size-classes. Settlement significantly affected FA composition in both lipid classes: in NLs, the proportion of 14:0 and 22:6ω3 significantly decreased and that of 18:2ω6 and 20:4ω6 increased in "settled" (20-50 mm TL) individuals (Mann-Whitney test, $P < 0.05$; Table 4.2). In PLs, the same patterns were observed between "settling" (10-20 mm TL) and "settled" (20-50 mm TL) fish, along with a significant decrease in the proportion of 18:0 (Mann-Whitney test, $p < 0.05$; Table 4.2). The FA composition of PLs from young adult fish (>200 mm) was generally similar to that of "settled" (20-50 mm TL) fish, except for the proportions of 16:0 and 16:1ω7 and the lower proportion of 22:6ω3 in NLs (Mann-Whitney test, $P < 0.05$; Table 4.2).

### 4.4.3 Bulk $\delta^{13}C$ of potential foods

The $\delta^{13}C$ of potential *L. saliens* food items varied from -23.01‰ (zooplankton) to -11.8‰ (benthic macroalgae) (Fig. 4.3). Epibenthic invertebrates and sediment had intermediate values (-17.13‰ and 18.23‰ respectively). Although no significant differences were found between benthic food items (e.g., epibenthic invertebrates, sediment or benthic macroalgae), all differed significantly from zooplankton (Kruskall-Wallis, $P < 0.05$; Fig. 4.3). As zooplankton sampled in June (n = 4) did not differ significantly from that sampled in August (n = 6) (Mann-Whitney, $P < 0.05$), the samples were pooled (see Fig. 4.3).

### 4.4.4 $\delta^{13}C$ of individual fatty acids

$\delta^{13}C$ values for NL-derived FAs (**NLFAs**) in 10-15 mm and 15-20 mm individuals were similar and ranged from -20‰ for 15:0 to -26‰ for 18:2ω6 (Fig. 4.4). In contrast, the $\delta^{13}C$ values of 14:0, 15:0, 16:0, 16:1ω7and 20:5ω3 were considerably enriched (up to 15‰ increase for 14:0) in individuals from the 20-30 mm size-class (Fig. 4.4). In the 30-40 mm and 40-50 mm size-classes, these FAs had more depleted $\delta^{13}C$, while remaining above the 10-15 mm $\delta^{13}C$ values (Fig. 4.4). Overall, NLs 14:0, 16:0, 18:0, 16:1ω7, 18:2ω6, 20:4ω6 and

20:5ω3 were significantly isotopically heavier in 20-50 mm "settled" fish compared to the smaller (10-20 mm TL) "settling" fish (Mann-Whitney test, $P < 0.05$; Table 2).

PL-derived FA (**PLFA**) $\delta^{13}C$ values ranged from -24.5‰ for 16:1ω7 and 18:4 ω3 to -28.5‰ for 22:6ω3 in the smaller size-classes (Fig. 4.4). As for NLFAs, $\delta^{13}C$ values of individual FAs increased with size (Fig. 4.4). However, in contrast to NLFAs, this enrichment was gradual and the most enriched $\delta^{13}C$ values were observed for the 30-40 mm and 40-50mm size-classes (Fig. 4.4). The FAs that exhibited maximal relative $\delta^{13}C$ increase were 14:0, 16:0, 16:1ω7, 18:2ω6 and 20:5ω3 (6‰ increase for 16:0 and 20:5ω3 to 8‰ increase for 14:0 and 16:1ω7) (Fig. 4.4). The other PLFAs had a more limited relative $\delta^{13}C$ increase, varying from 3‰ for 18:0 to 5‰ for 18:4 ω3. Overall, in PLs, 14:0, 16:0, 18:0, 16:1ω7, 18:2ω6, 20:4ω6, 20:5ω3 and 22:6ω3 were significantly isotopically heavier in "settled" (20-50 mm TL) than "settling" (10-20 mm TL) fish (Mann-Whitney test, $P < 0.05$; Table 4.2). In both lipid classes, an increase in intermolecular variability was observed for middle-sized fish (20-30 mm and 30-40 mm) (Fig. 4.5). This high variability of 16‰ for NLFAs and of 8‰ for PLFAs decreased again in larger size classes (Fig. 4.5). In the 10-15 mm and 15-20 mm sizes-classes, NL-derived 22:6ω3 was significantly heavier than that derived from PLs (Mann-Whitney test, $P < 0.05$; Fig. 4.4). This was also the case for 14:0, 15:0, 16:0, 16:1ω7, 18:2ω6 and 20:5ω3 in the 20-30 mm and 30-40 mm size-classes (Mann-Whitney test, $P < 0.05$; Fig. 4.4).

| Size class | 10-15 mm | 15-20 mm | 20-30 mm | 30-40 mm | 40- 50 mm | >200mm | Mean Settling (10-20 mm) | Mean Settled (20-50 mm) | Mean Settling $\delta^{13}C$ | Mean Settled $\delta^{13}C$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **NEUTRAL LIPIDS** | | | | | | | | | | |
| **Total FAMEs (mg $g^{-1}$ DW)** | 9.1±2.8 | 12.5±3.1 | 5.7±0.6 | 4.1±1.5 | 5.4±3.8 | 27.6±6.5 | **10.8±3.3** | **5.2±1.4** | | |
| **14:0** | 8.0±0.2 | 11.4±3.7 | 3.8±0.7 | 8.2±0.1 | 5.2±1.3 | 4.7±0.1 | **10.2±2.7** | **5.7±1.7 *** | **-22.16±4.70** | **-13.04±5.52 *** |
| **15:0** | 1.1±0.1 | 1.4±0.2 | 0.9±0.1 | 1.9±0.1 | 1.8±0.0 | 1.9±0.7 | **1.2±0.2** | **1.5±0.4** | **-19.88±4.90** | **-14.05±5.33** |
| **16:0** | 21.7±0.3 | 23.7±0.3 | 27.2±0.9 | 20.6±4.6 | 21.4±1.0 | 29.9±2.4 | **22.8±0.9** | **23.1±3.1** | **-23.39±3.62** | **-15.37±4.93 *** |
| **18:0** | 7.8±0.4 | 7.0±2.6 | 10.5±0.5 | 5.8±1.5 | 7.9±1.0 | 3.4±0.8 | **7.3±1.4** | **7.8±2.0** | **-26.33±0.85** | **-21.64±1.22 *** |
| **16:1ω7** | 4.9±1.4 | 8.6±1.3 | 7.4±3.5 | 9.0±0.9 | 8.0±0.1 | 14.6±1.3 | **7.9±3.3** | **8.2±1.8** | **-22.30±5.74** | **-13.75±3.38 *** |
| **18:2ω6** | 2.0±0.5 | 2.4±0.2 | 3.7±0.6 | 3.8±1.7 | 4.9±2.7 | 3.8±0.9 | **2.3±0.4** | **3.9±1.4 *** | **-26.05±2.67** | **-22.38±1.22 *** |
| **18:4ω3** | 10.6±7.4 | 3.0±1.4 | 4.8±2.1 | 2.9±1.0 | 5.2±2.9 | 4.0±3.1 | **5.9±5.7** | **4.2±1.8** | **-22.18±3.15** | **-21.23±1.84** |
| **20:4ω6** | 1.3±0.4 | 1.2±0.1 | 2.1±0.6 | 3.4±2.1 | 2.4±1.1 | 1.5±0.5 | **1.2±0.2** | **2.7±1.2 *** | **-24.31±3.40** | **-20.19±2.79 *** |
| **20:5ω3** | 5.2±0.1 | 5.7±0.5 | 4.4±0.6 | 8.4±5.4 | 3.4±0.0 | 4.0±1.8 | **5.5±0.4** | **5.6±2.8** | **-22.47±3.57** | **-17.63±1.98 *** |
| **22:6ω3** | 11.2±1.8 | 13.0±3.4 | 6.9±0.7 | 5.8±3.9 | 2.4±1.2 | 1.8±1.0 | **11.8±2.2** | **6.0±3.6 *** | **-25.08±1.70** | **-23.51±0.76 *** |
| **POLAR LIPIDS** | | | | | | | | | | |
| **Total FAMEs (mg $g^{-1}$ DW)** | 10.8±2.8 | 15.1±5.5 | 6.0±0.7 | 9.4±0.8 | 10.6±3.9 | 13.1±0.6 | **13.6±5.0** | **8.7±0.8** | | |
| **14:0** | 2.6±0.0 | 2.7±0.2 | 1.6±0.6 | 1.8±0.2 | 1.6±0.7 | 1.0±0.6 | **2.7±0.1** | **1.6±0.4 *** | **-25.19±1.42** | **-18.28±1.67 *** |
| **15:0** | 0.7±0.1 | 0.8±0.1 | 0.8±0.3 | 0.7±0.1 | 0.9±0.1 | 0.7±0.4 | **0.7±0.1** | **0.8±0.1** | **-24.63±0.99** | **-20.51±2.01 *** |
| **16:0** | 29.5±0.8 | 27.7±1.9 | 28.9±7.6 | 24.0±5.9 | 27.3±6.4 | 29.1±2.7 | **28.9±1.5** | **26.1±5.7** | **-27.51±2.30** | **-22.41±2.56 *** |
| **18:0** | 10.7±0.4 | 12.2±1.2 | 9.3±2.4 | 7.7±2.6 | 9.5±1.3 | 7.2±0.3 | **12.0±1.4** | **8.8±1.7 *** | **-25.76±1.50** | **-22.57±2.20 *** |
| **16:1ω7** | 2.3±0.0 | 2.6±0.4 | 2.6±0.2 | 2.8±0.2 | 2.5±1.1 | 4.4±1.6 | **2.5±0.4** | **2.7±0.6** | **-25.10±1.32** | **-18.16±1.78 *** |
| **18:2ω6** | 1.1±0.3 | 1.2±0.3 | 2.8±1.3 | 1.5±0.5 | 2.9±1.4 | 4.2±2.1 | **1.2±0.2** | **2.8±1.4** | **-27.69±1.40** | **-23.66±1.39 *** |
| **18:4ω3** | 1.7±1.6 | 0.6±0.7 | tr | 0.8±0.1 | 0.8±0.1 | 0.8±0.7 | **0.9±1.2** | **0.6±0.3** | **-23.86±1.25** | **-21.54±2.71** |
| **20:4ω6** | 2.2±0.5 | 2.3±0.4 | 4.9±3.1 | 6.0±3.4 | 4.8±2.3 | 5.6±1.4 | **2.1±0.4** | **5.1±2.2 *** | **-27.42±1.62** | **-23.13±1.86 *** |
| **20:5ω3** | 8.8±1.8 | 8.4±1.1 | 11.1±3.5 | 10.4±4.9 | 7.5±2.0 | 9.9±1.6 | **8.2±1.3** | **9.2±3.0** | **-25.92±0.95** | **-21.81±2.22 *** |
| **22:6ω3** | 24.8±2.4 | 21.5±2.1 | 11.5±3.2 | 16.3±4.4 | 9.2±8.9 | 7.4±3.1 | **22.3±3.0** | **13.0±4.9 *** | **-29.53±1.40** | **-25.44±1.86 *** |

**Table 4.2:** *Liza saliens*. Fatty acid composition (% wt; mean ± SD) and fatty acid $\delta^{13}C$ (‰; mean ± SD) of juveniles. Tr: trace amounts (<0.5%); DW: dry weight *: significant difference between settling (10-20 mm TL) and settled (20-50 mm TL) fish (Mann-Whitney, $P < 0.05$)

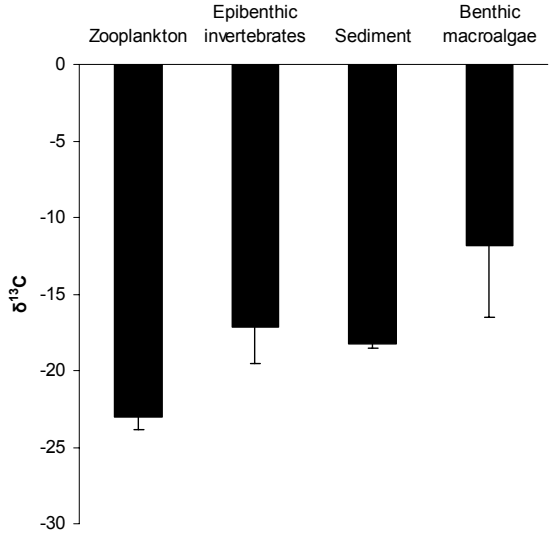



**Figure 4.3:** Bulk $\delta^{13}C$ signatures (mean ± SD) of the potential food items of *Liza saliens* juveniles. Zooplankton (n = 10), epibenthic invertebrates (n = 4), sediment (n = 4), benthic macroalgae (n = 4). Food items with different letters are significantly different (Kruskal-Wallis test followed by *post hoc* Mann-Whitney test, $P < 0.05$)

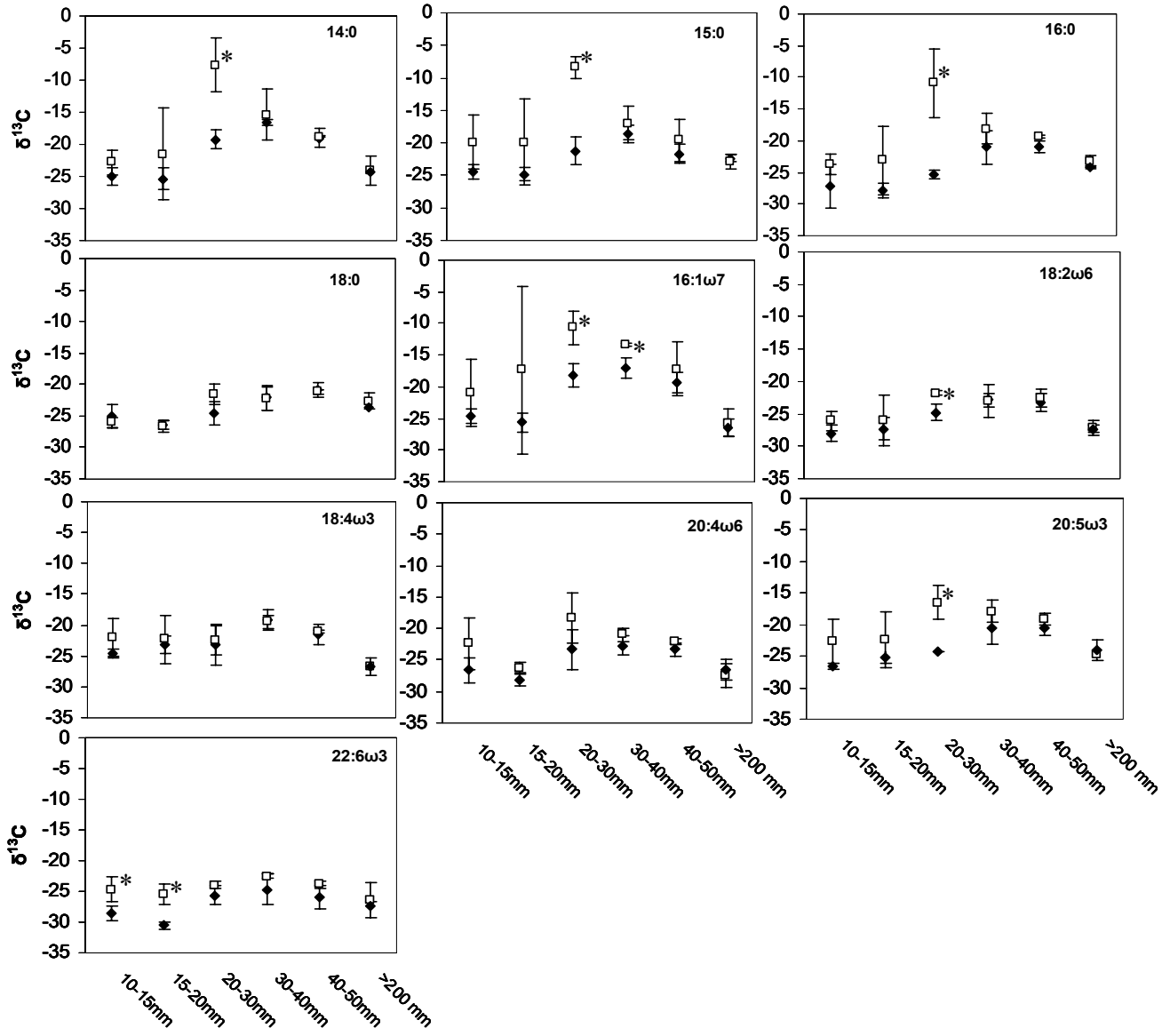



**Figure 4.4:** *Liza saliens*. $\delta^{13}C$ signatures (mean ± SD) of individual fatty acids within neutral lipid (open squares) and polar lipid (solid diamonds) of juveniles (n = 3). *: significant difference between lipid classes for the given size class (Mann-Whitney, $P < 0.05$).

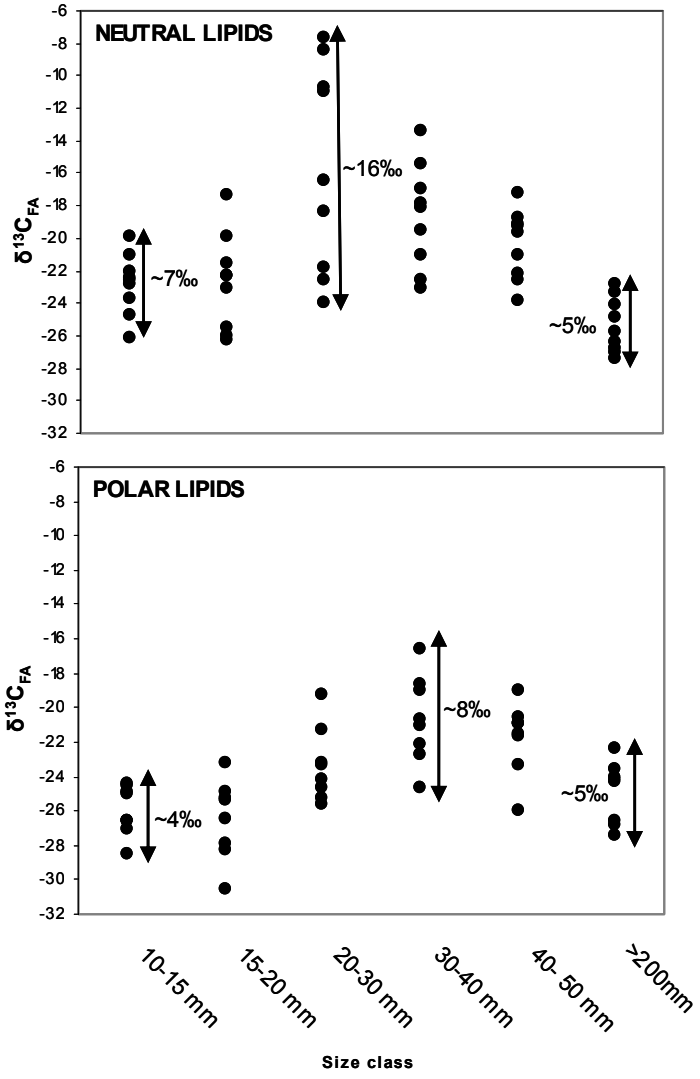



**Figure 4.5:** *Liza saliens.* Intermolecular $\delta^{13}C$ (‰) variability between fatty acids within lipid classes of juveniles. Each dot is the mean value (n = 3) for one of the 10 studied fatty acids.

## 4.5 DISCUSSION

### 4.5.1 $\delta^{13}C$ values of individual FAs

In the smallest size class, FA $\delta^{13}C$ ranged from -20‰ to -28‰, taking NL and PL together (Fig. 4.4). These values are consistent with the bulk $\delta^{13}C$ signatures of zooplankton (Fig. 4.3) and are typically planktonic in lagoon and coastal food webs, taking into account a slight $^{13}C$ depletion in lipids relative to bulk tissue (Herzka et al. 2002, Pepin & Dower 2007, Vizzini & Mazzola 2005, Vizzini & Mazzola 2008, Vizzini et al. 2005). We are therefore confident that the smallest size class was representative of the "marine – planktonic" phase of *L. saliens* juveniles. As expected, the transition towards the lagoon food web and the diet shift affected most FAs' $\delta^{13}C$ values. Indeed, in comparison to their younger congeners, "settled" (20-50 mm) individuals displayed significant $^{13}C$ enrichment in most of their FAs in both lipid classes (Table 2). This enrichment coincided with the presence of benthic food items in the stomachs of *L. saliens* above 20 mm and is consistent with the higher $\delta^{13}C$ values of benthic resources (Figs 4.2, 4.3). In marine environments, the $\delta^{13}C$ values of benthic primary producers are more positive than those of phytoplankton (France 1995). It is believed that the reduced water turbulence in benthos results in a thicker boundary layer around benthic algae, restricting the diffusion rate of $CO_2$ or $HCO_3^-$ with subsequent reduced discrimination against $^{13}C$ (France 1995). In coastal environments, this phenomenon may generate a mean $\delta^{13}C$ enrichment of 5‰ or more in benthic algae (including epiphytes) relative to phytoplankton (France 1995, Herzka et al. 2002, Jaschinski et al. 2008, Vinagre et al. 2008). However, the "plankton"-like FA $\delta^{13}C$ values of >200 mm fish were quite surprising, and suggested that young adult *L. saliens,* which are supposed to have a similar diet to "settled" (20-50 mm TL) juveniles, occupy a distinct isotopic niche. Although considered as benthic omnivores/detritivores, it has been shown that in eutrophic systems grey mullet species can behave as efficient zooplanktivorous pump-filters, foraging simultaneously on plankton and benthos (Cardona et al. 2001). This does not seem to have been the case here, as their FA composition was quite similar to that of "settled" fish which forage exclusively in benthos (Table 4.2). Another possible explanation could be a strong reliance on planktonic microalgae, as shown for another grey mullet species (*Liza ramada*) in the Mira estuary (Almeida 2003). Although the lack of stomach contents analysis in young adult *L. saliens* in the present study precluded any firm conclusion as to dietary niche, the very low intermolecular $\delta^{13}C$ variability between FAs and lipid classes justifies their use as reference for "stabilised" diet (Fig.4.4, Fig. 4.5).

The change in diet of the 20-30 mm specimens was accompanied by an increase in intermolecular $\delta^{13}C$ variability between FAs, from 4‰-7‰ (in PL and NL respectively) for individuals in the 10-15 mm size-class to 8‰-16‰ (in PL and NL respectively) for individuals in the 20-30 mm and 30-40 mm size-classes (Fig. 4.5). This dramatic increase might reflect the greater variability of food sources exploited by fish in a transitional state between planktonic and benthic resources. In the 40-50 mm and >200 mm size-classes, intermolecular $\delta^{13}C$ variability was low, in agreement with progressive diet "stabilisation" (Fig. 4.5). The great intermolecular variability was due to the fact that $^{13}C$ enrichment during settlement was not equally great for all FAs (Table 4.2). The most enriched FAs were 14:0, 15:0, 16:0, 16:1ω7 and 20:5ω3 and the $\delta^{13}C$ differences between "settling" (10-20 mm TL) and "settled" (20-50 mm TL) fish lay within those expected between plankton and benthos (Table 4.2; Fig. 4.3). On the other hand, 18:0, 18:2ω6, 18:4ω3, 20:4ω6 and 22:6ω3 displayed only moderate enrichment (Table 4.2). As 16:1ω7 and 20:5ω3 are considered to be diatom biomarkers and 14:0 and 16:0 are abundant in algal taxa in general (Dalsgaard et al. 2003, St. John & Lund 1996, Viso & Marty 1993), it is likely that the increase in $\delta^{13}C$ in "settled" (20-50 mm TL ) fish reflects increased reliance on epiphytic or benthic diatoms. Moreover, 15:0 is often used as a bacterial biomarker (Bec et al. 2003, Dalsgaard et al. 2003, Jaschinski et al. 2008), and its enriched $\delta^{13}C$ values suggest the benthic origin of the bacterial carbon on which "settled" (20-50 mm TL) fish rely, probably by ingesting sediment directly. The particularly high mean $\delta^{13}C$ values of 14:0, 15:0, 16:0 and 16:1ω7 in the 20-30 mm fish (-7.6‰ to -10.9‰ for 14:0 and 16:0 respectively in NLs) were close to the bulk $\delta^{13}C$ values of macroalgae (Table 4.2; Fig. 4.3). The latter might reflect a momentary reliance on macroalgae. If this is the case, this reliance would concern only the 20-30mm size-class, as in 30-40 mm and 40-50 mm fish FA $\delta^{13}C$ decreased again towards values closer to that of bulk sediment (Fig. 4.3; Fig. 4.4). On the other hand, the other FAs (18:0, 18:2ω6, 18:4ω3, 20:4ω6 and 22:6ω3) retained depleted "plankton-like" signatures in all size-classes, suggesting that the sources of some FAs remained partially or totally planktonic even for fish that adopted benthic foraging habits (Fig. 4.4). This was the case of 22:6ω3, for which $\delta^{13}C$ values remained low (from -23‰ to -25‰ for NL and PL respectively) even in larger "settled" (20-50 mm TL) fish (Table 4.2; Fig. 4.4). The dramatic size-linked decrease in the proportion of this FA in NL and PL (Table 2) indicates that, in contrast to other essential FAs (20:4ω6, 20:5ω3), the benthic resources exploited by *L. saliens* juveniles could not provide them with sufficient amounts of 22:6ω3. The proportion of 20:4ω6 increased at settlement and that of 20:5ω3 remained unchanged in both lipid classes (Table 4.2; Fig. '4.4). This indicates that these two essential FAs are more abundant than 22:6ω3 in

"settled" (20-50 mm TL) individuals' food. Moreover, the increase in the intermolecular $\delta^{13}C$ variability of the essential FAs in the "settled" size classes compared to 10-15 mm fish indicates isotopically distinct sources for these components (Fig. 4.5). It appears that in the Vassova lagoon the main sources of 22:6ω3 are $^{13}C$-depleted and thus more planktonic, whereas those of 20:5ω3 are more $^{13}C$-enriched and closer to the $\delta^{13}C$ values expected for the benthic food web. Although 20:4ω6 is usually abundant in red algae such as *Gracilaria sp*. (Fleurence et al. 1994, Kayama et al. 1989), which were abundant in the lagoon, it does not have a macroalgal $\delta^{13}C$ signature (Fig. 4.3, Fig. 4.4) but seems to be of mixed planktonic and benthic origin. Therefore, even after settlement, *L. saliens* juveniles must still be relying on plankton to obtain certain essential dietary components.

### 4.5.2 Lipid class $\delta^{13}C$ differences

For marine fish, PLs are the "building blocks" of the cell membranes, and NLs (mainly triacylglycerols) are the main form of energy storage (Ackman 1980, Ackman 1989, Sargent et al. 1993b). In order to satisfy their energy needs, most fish mobilise NLs before PLs (Sargent et al. 1989). On the other hand, juvenile fish are in a period of intense growth and need PLs to build new tissues. It is consequently more likely that newly synthesised PLs are simply added to those already present in tissue, rather than replacing them. Therefore, while PLs tend to maintain a stable FA composition in order to maintain the structural integrity of cells, NLs undergo intense turnover due to constant energy demands and dietary input (Dalsgaard et al. 2003, Sargent et al. 1989). Thus, because of the contrasting physiological roles of NLs and PLs, NLs should integrate dietary FA $\delta^{13}C$ signatures more quickly than PLs. In the case of a $\delta^{13}C$ change in dietary FAs due to diet shift or movement between distinct food webs, the different integration rates of the two lipid classes should generate a temporary imbalance between $\delta^{13}C$ as measured for PL- and NLFAs. The present results show that, for the size-classes for which dietary transition was expected (e.g. from sea to lagoon, or plankton to benthos), the $^{12}C/^{13}C$ ratio of some FAs differed between NLs and PLs (Fig. 4.4). In the 10-15 mm and 15-20 mm size-classes, which are considered to have recently entered the lagoon, most FAs in NLs tended to be slightly enriched in $^{13}C$ compared to FAs in PLs, and for 22:6ω3 the difference was statistically significant (Fig. 4.4). At this size (10-20 mm), *L. saliens* are still feeding on planktonic organisms (Fig. 4.2). However, the contrasting environmental parameters of the lagoon as compared to the open sea could lead to a more $^{13}C$-enriched signal in lagoon zooplankton compared to its marine counterpart. Consequently, the NLFAs of the young *L. saliens* that recently entered the lagoon should be

representative of their new $^{13}C$-enriched lagoon zooplanktonic prey, whereas PLFAs should maintain the lighter isotopic signal characteristic of their previous marine food. In 20-30 mm fish, the $\delta^{13}C$ imbalance between NL- and PL-derived 22:6ω3 disappeared, and other more pronounced $\delta^{13}C$ discrepancies between NLs and PLs appeared for 14:0, 15:0, 16:0, 16:1ω7 and 20:5ω3 (Fig. 4.4). In this size-class (20-30 mm), *L. saliens* begins to forage on benthos, which is more enriched in $^{13}C$ than plankton (Fig. 4.3). Again, NLs appeared to integrate this isotopic change in diet faster than PLs, which probably showed values intermediate between planktonic and benthic food. These $\delta^{13}C$ imbalances should disappear after feeding on an isotopically constant diet for a period long enough to allow PLs to fully integrate the $\delta^{13}C$ dietary signal. Indeed, the $\delta^{13}C$ discrepancy between lipid classes disappeared in larger juveniles and adults that are assumed to be settled and to have a stable diet (Fig. 4.4).

## 4.6 CONCLUSION

CSIA showed that the migration and settlement of *L. saliens* in their lagoon nursery were followed by changes in the origin of dietary carbon. By coupling isotope analysis to FA biomarkers, it was possible to determine that the dietary carbon shift was due to increased reliance on benthic diatoms and bacteria. It was also demonstrated that benthic and planktonic foods are not qualitatively equivalent and that *L. saliens* juveniles relied on plankton for their 22:6ω3 input even after they started foraging in benthos. Strong evidence also emerged that PLs integrate the dietary $\delta^{13}C$ signal slower than NLs and that a recent isotopic dietary change generates discrepancies between the $\delta^{13}C$ values of the FAs derived from the two lipid classes. The information obtained from FA $\delta^{13}C$ signals, which cannot be provided by bulk tissue isotope analysis, may be valuable in conservation biology, as it enables deeper understanding of the nutritional function of nursery areas and feeding grounds in general. Moreover, the differential FA $\delta^{13}C$ turnover between lipid classes observed for *L. saliens* could be used with aquatic organisms sharing similar lipid dynamics as an indicator of recent dietary switch or recent migration between isotopically distinct areas or food webs, and could provide a unique opportunity to obtain simultaneous information on recent and earlier diet history.

# CHAPITRE 5:

## TRANSFERT DES ACIDES GRAS DANS LE RESEAU TROPHIQUE DE LA LAGUNE VASSOVA

**CHAPITRE 5: TRANSFERT DES ACIDES GRAS DANS LE RESEAU TROPHIQUE DE LA LAGUNE VASSOVA ..... 105**

PREAMBULE ..... 107
5.1 ABSTRACT ..... 109
5.2. INTRODUCTION ..... 110
5.3. MATERIALS AND METHODS ..... 112
5.3.1 Study site, sample collection, fatty acid and stable isotope analysis ..... 112
5.3.2 Data analysis ..... 112
5.4 RESULTS ..... 115
5.4.1 $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ ..... 115
5.4.2 Fatty acid composition ..... 117
5.4.3 Transfer and retention of FAs in the food web ..... 118
5.5 DISCUSSION ..... 123
5.5.1 The food web in the Vassova lagoon ..... 123
5.5.2 Transfer of FAs from basal sources to primary consumers ..... 124
5.5.3 Transfer of FAs from primary consumers to fish ..... 126
5.5.4 The ecophysiological significance of ARA retention in fish ..... 127
5.6 CONCLUSION ..... 129

**PREAMBULE**

Les conditions environnementales fluctuantes (e.g. température, salinité, oxygène) habituellement rencontrées dans les lagunes sont susceptibles de provoquer des situations de stress chez les poissons. Un certain nombre de stratégies comportementales (recherche de secteurs moins soumis aux fluctuations) et de mécanismes physiologiques intimement liés à la biophysique et à la biochimie membranaires (osmorégulation, adaptation homeostatique membranaire), permettent aux poissons de s'y adapter (Katselis et al. 2007, Tocher et al. 1995). Les AGPI membranaires ou rapports d'AGPI (*e.g* EPA/ARA ; DHA/EPA) sont impliqués dans la régulation hormonale de ces mécanismes et participent au fonctionnement optimal des membranes cellulaires et leurs protéines transmembranaires (Arts and Kohler 2009). Les poissons sont tributaires de leur alimentation pour obtenir ces AG, alors même que leur disponibilité, dans le milieu lagunaire, est assez variable et fonction des différents types de nourriture. Malgré cela, les poissons doivent pouvoir ajuster et maintenir la composition en AG de leurs lipides membranaires indépendamment des apports lipidiques de la nourriture. A cet égard, nous avons signalé dans le premier chapitre, que dans une certaine mesure, l'allocation au niveau des LP d'un AG peut varier, chez certains poissons, en réponse à son abondance relative dans la nourriture (Copeman et al. 2002, Fountoulaki et al. 2003). Dans la lagune Vassova, nous avons pu observer que les juvéniles de *Liza saliens*, tentent de maintenir des niveaux élevés de DHA et d'ARA dans leur LP malgré les faibles proportions de ces AG dans leur alimentation (chapitre 3). Il était important de déterminer s'il s'agit d'un mécanisme lié aux besoins élevés en AGPI à longue chaîne de cette espèce et/ou stade de développement, ou si ces deux AG avaient un rôle précis pour leur survie dans un milieu aux facteurs abiotiques variables. Dès lors, il semble opportun de vérifier si de tels besoins existent également chez les autres *Mugilidae*, ainsi que chez les espèces sédentaires (*Atherina boyerii*, *Pomatoschistus* spp., *Aphanius fasciatus*) de la lagune. Nous avons donc analysé l'origine, le transfert et l'accumulation au sein de ces poissons des AGPI à longue chaîne et plus précisément de l'ARA (20:4ω6) impliqué dans la régulation des phénomènes de stress environnementaux.

# FATTY ACID TRANSFER IN THE FOOD WEB OF A COASTAL MEDITERRANEAN LAGOON : EVIDENCE FOR HIGH ARACHIDONIC ACID RETENTION IN FISH

APOSTOLOS-MANUEL KOUSSOROPLIS[1,2], ALEXANDRE BEC[1,2], MARIE-ELODIE PERGA[3], EMMANUIL KOUTRAKIS[4], GILLES BOURDIER[1,2] AND CHRISTIAN DESVILETTES[1,2]

[1] Clermont université, Université Blaise Pascal, LMGE, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND

[2] CNRS, UMR 6023, LMGE, F-63173

[3] National Institute for Agronomical Research (INRA), Alpine Center for Research on Lake Ecosystems and Food Webs (CARRTEL), , BP 511, 74203 Thonon-les-Bains cedex, France

[4] National Agriculture Research Foundation, Fisheries Research Institute, Dpt of Inland Waters and Lagoons, 640 07 Nea Peramos, Greece

**Soumis à "*Estuarine, Coastal and Shelf Science*", en révision**

## 5.1 ABSTRACT

The transfer dynamics of fatty acids (FAs) were investigated in the food web of a Mediterranean lagoon. C and N stable isotopes values and FA composition of the food web components were analysed and the contributions of the different food sources to consumers were determined using an isotope mixing model. Using food sources' contributions and their FA compositions, a second model was built in order to estimate the FA composition of consumers' mixed diets which was compared to consumers' FA composition. Correlation analysis between FA composition and $\delta^{15}N$ values of food web components indicated a general trend of increasing proportions of highly unsaturated fatty acids (**HUFAs**) with increasing trophic levels while the proportions saturated fatty acids (SAFAs) and 18-carbon polyunsaturated fatty acids (PUFAs) decreased. These patterns, suggest that the FA composition of the basal organic matter sources might differ from the consumers' needs. Nevertheless, it appears that consumers are able to regulate their FA composition by differential retention of individual FAs. More interestingly, comparison of FA composition of fish to those of their diets showed a surprisingly high retention of arachidonic acid (ARA). This trend challenges the idea of low ARA needs in marine fish and indicates the important physiological role of this essential FA for fish in estuarine environments.

*Keywords:* essential fatty acids, stable isotopes, foods webs, food quality, estuarine ecosystems, Mediterranean lagoons

## 5.2. INTRODUCTION

Mediterranean lagoons are like other coastal areas, very productive ecosystems and play a crucial role as feeding grounds for adults and juvenile fish and invertebrate species (Kjerfve 1994, Razinkovas et al. 2008). However, in contrast to other coastal ecosystems (*e.g.* estuaries, fjords), Mediterranean lagoons are for climatic reasons deprived of significant freshwater inputs (Elliott et al. 2002) and often their communication with adjacent sea is limited (Franco et al. 2008). As a consequence, the secondary production of Mediterranean lagoons food webs is expected to rely on autochthonous detrital sources in addition to phytoplankton or microphytobenthos (Elliott et al. 2002, Franco et al. 2008, Vizzini & Mazzola 2008). In detritus-dominated environments such as lagoons or estuaries, basal sources are characterized by high levels of saturated fatty acids (SAFAs) and 18-carbon polyunsaturated FAs ( $\geq$ 2 double bonds; PUFAs) and relatively low levels of highly unsaturated FAs ( $\geq$ 20 carbon atoms and $\geq$ 3 double bonds; HUFAs) (Alfaro et al. 2006, Copeman et al. 2009, Mudge et al. 1998, Richoux & Froneman 2008).

In aquatic ecosystems, ω3 and ω6 polyunsturated FAs (PUFAs) have important effects on growth, reproduction and survival of invertebrates and fish (Arts et al. 2001, Sargent et al. 1999a). Among these molecules, the three major HUFAs: docosahexaenoic acid (22:6ω3/DHA) Eicosapentaenoic acid (20:5ω3/EPA) and Arachidonic acid (20:4ω6/ARA) are particularly important. For example, DHA regulates cell membrane properties such as fluidity. EPA and ARA are precursors for different molecular families of the eicosanoid class of hormones, which are locally active signalling molecules that control inflammation, immunity, energy allocation, mineral balance and reproductive success in animals (Parrish 2009, Sargent et al. 1999a, Schmitz & Ecker 2008). ARA-derived eicosanoids are more biologically active than those derived from EPA but EPA competitively inhibits the formation of eicosanoids derived from ARA (Sargent et al. 1999a, Schmitz & Ecker 2008). Hence, the EPA:ARA ratio in tissues determines the eicosanoid action on fish physiology.

ω3 and ω6 PUFAs are generally formed in primary producers (mainly phytoplankton, microphytobenthos) while most marine metazoa cannot synthesize them efficiently (Olsen 1998, Parrish 2009). These compounds are then transferred and concentrated through the food web (Olsen 1998, Parrish 2009). Therefore, as most marine animals (fish, invertebrates) rely on dietary inputs for the supply of 18:3ω3, 18:2ω6, ARA, EPA and DHA, they are considered as essential (essential fatty acids: EFAs) (Arts et al. 2001). As the incorporation of EFAs in animal tissues is based on low specificity acylases and trans-acylases, tissue composition -and

therefore membrane structure and eicosanoid regulation- are influenced by the relative proportions of these compounds in the environment (Copeman & Parrish 2003). For example, 18-carbon PUFAs which are abundant in macrophyte (*e.g.* macroalgae, immerged halophytes) detritus can compete for the enzymes that esterify ARA, EPA and DHA in consumers' tissues. Thus, excessive dietary levels of these compounds could have negative effects on fish growth and survival (Sargent et al. 1999a). Hence, EFA relative availability in aquatic food webs can affect intrinsic health, growth and reproduction of animal populations (Ahlgren et al. 2005, Olsen 1998).

Most marine fish store their lipids in the form of neutral lipids (NLs), whereas cell-membrane lipids are mostly in the form of polar lipids (PLs) (Dalsgaard et al. 2003). NLs lipids are storage lipids and considered to better reflect diet as their FA composition largely depends on the most abundant dietary available FAs (Dalsgaard et al. 2003, Lands 2009). On the other hand, PLs are the major constituent of cell membranes and because of their physiological role, their FA composition is determined by more selective processes regulated to a certain extend by specific bodily needs and functions (Ackman 1998, Lands 2009) Indeed, PUFA retention patterns in fish tissues have been shown to respond to parameters such as salinity, temperature (Cordier et al. 2002b) or dietary lipids' FA composition (Copeman et al. 2002, Fountoulaki et al. 2003). Therefore, as PLs tend to show a certain degree of homeostasis and, in the case that dietary lipids' EFA levels are limiting for fish**,** one could expect a selective enrichment of these compounds from the food to consumer (Castell et al. 2003, Copeman et al. 2002, Hessen & Leu 2006). Similarly, FAs in excess should occur in lower proportions in consumers than food (Copeman et al. 2002).

In the present study, Our objectives where (1) to investigate the dynamics of FA transfer and retention across multiple trophic levels (2) to identify which EFAs are mostly retained and could be limiting for fish in the studied Mediterranean lagoon. In that aim, carbon and nitrogen stable isotope analyses were used in order to identify the main prey items as well as in the basal sources sustaining the growth of the dominant fish species in the studied Mediterranean lagoon. Then FA compositions of fish were related with those of their prey and basal sources as identified by isotope results.

## 5.3. MATERIALS AND METHODS

### 5.3.1 Study site, sample collection, fatty acid and stable isotope analysis

For detailed information refer to chapter 2. Sampling stations and samples used for this study are presented in figure 5.1 and table 5.1 respectively. Small fish (*Atherina boyerri*, *Pomatoschistus sp*., *Aphanius fasciatus*, *Liza saliens* fry) were sampled with a hand-trawled bag seine net (12 m long , 1.5 m high with a 2 mm mesh) whereas *Sparus aurata* and Mugilid (*i.e. Liza* spp. and *Chelon labrosus*) adults were captured by local fishermen in the fish-trap installations of the lagoon.

### 5.3.2 Data analysis

The respective contribution of food sources to the different consumers, were assessed resorting to the SIAR package for R (Parnell et al. 2008). The average discrimination factors were set at 1.1±0.3‰ and 2.8±0.4‰ for C and N respectively (McCutchan et al. 2003). Seston, sediment organic matter (SOM) and epiphytes where used as possible food sources for amphipods and epibenthic harpacticoids. For zooplankton (i.e. naupli and and calanoid copepodits) only seston and SOM were used. For adult mugilids *(Liza* spp., *C. labrosus*) the model was run using SOM, seston and harpacticoids as possible food sources, as these omnivorus/detritivorous fish are known to depend on planktonic and benthic microalgae, detritus and epibenthic crustaceans (Almeida 2003, Cardona et al. 2001). For *L. saliens* fry and *A. boyeri* we used zooplankton and harpacticoids as possible food sources as indicated by stomach contents analysis (Kademoglou 2009, Koussoroplis et al. 2010). Amphipods and harpacticoids were used as possible food sources for *Pomatoschistus* spp. and *A. fasciatus*, which are considered as epibenthic crustacean predators (Baldo & Drake 2002, Leonardos 2008, Persic et al. 2004). No attempt was made to run the model for *S. aurata* as this species is considered to forage on annelids and molluscs (Costa & Cataudella 2007) which were not sampled in this study.

The FA accumulation factor ($AF_{FA}$) (Hessen & Leu 2006) for consumers was estimated by the ratio of the proportion of a given FA in consumers' lipids ($P_{FAcons}$) on the proportion of this FA in their diet ($P_{FAdiet}$)

$$AF_{FA} = \frac{P_{FAcons}}{P_{FAdiet}}$$

$P_{FAdiet}$ was calculated following:

$$P_{FA.diet} = \frac{\sum_i (C_i \times P_i \times Q_i)}{\sum_i (C_i \times Q_i)}$$

Where $C_i$ is the mean contribution of the food source $i$ to a consumer biomass calculated by the isotope mixing model, $P_i$ is the proportion of the given FA (percentage of total FA weight) in the food source $i$ and $Q_i$ in total FA content of the food source $i$ (µg FA mg $C^{-1}$). Stable isotope compositions between food web components were compared using Kruskal-Wallis tests followed by pairwise comparisons (Mann-Whitney *U*-test, Bonferroni adjusted significance levels). Differences among fish fatty acid compositions were evaluated using the analysis of similarity (ANOSIM) routine. The similarity percentage analysis routine (SIMPER) was used to identify the FAs that contributed more to the differences among fish. The transfer and the retention dynamics of FAs through the food web were evaluated by (1) by calculating Spearman's rank correlation coefficients between FA proportion and $\delta^{15}N$ using only PL-derived FA proportions for fish, and (2) calculating the degree of significance of the difference of *AF*s from unity (*i.e.* when a given FA is present to the same proportion in diet and consumer *AF*=1) using the t-test. All calculations were performed using the XLStat 7.5- Pro (Addinsoft) and the PAST software (Hammer 2001). Significance level was set at $\alpha$=0.05.

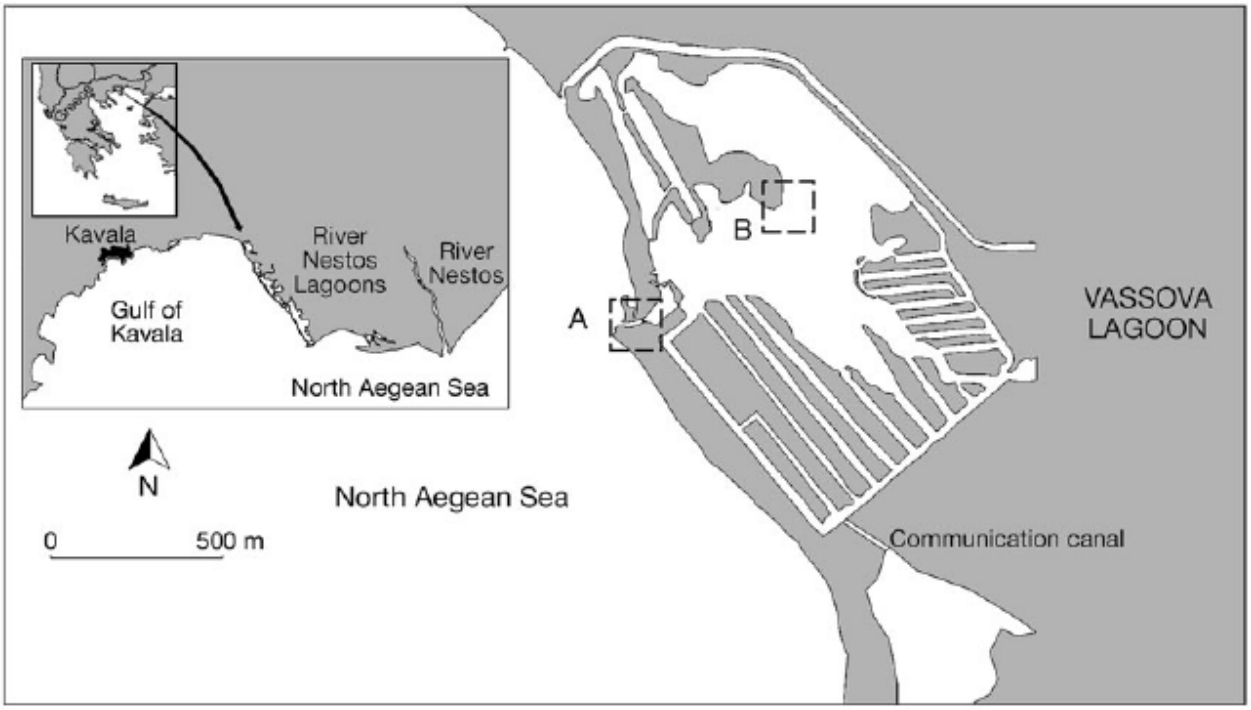



**Figure 5.1:** Map of Vassova Lagoon and the area of river Nestos Delta lagoons (Greece), reproduced from Tsihrintzis et al. (2007). The sampling stations are indicated with dashed boxes

| Sample type | Collection date | Site | Treatement |
|---|---|---|---|
| **CONSUMERS** | | | |
| *C. labrosus* | 20/9, 2007 | B | Fatty acid analysis, stable isotope analysis |
| *L. aurata* | 20/9, 2007 | B | |
| *L. ramada* | 20/9, 2007 | B | |
| *L. saliens* | 20/9, 2007 | B | |
| *L. saliens fry* | 6/8 - 21/8, 2007 | B | |
| *A. fasciatus* | 21/8 -20/9, 2007 | B | |
| *A. boyeri* | 6/8 - 21/8 -20/9, 2007 | A,B | |
| *S. aurata* | 20/9, 2007 | B | |
| *Pomatoschistus* spp. | 21/8 -20/9, 2007 | A,B | |
| Amphipods | 21/8 -20/9, 2007 | A,B | |
| Calanoid copepodits | 26/6 - 21/8, 2007 | A | |
| Harpacticoids | 6/8 - 21/8 -20/9, 2007 | A,B | |
| Nauplii | 26/6 - 21/8, 2007 | A | |
| **SOURCES** | | | |
| Epiphytes | 21/08/2007 | A,B | |
| Halophytes | 21/08/2007 | A,B | |
| Seston | 26/6 - 6/8 - 21/8 -20/9, 2007 | A,B | |
| Sediment | 26/6 - 6/8 - 21/8 -20/9, 2007 | A,B | |
| Macroalgae | 21/08/2007 | B | |

**Table 5.1 :** Sample information

## 5.4 RESULTS

### 5.4.1 $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$

In the Vassova lagoon, basal sources $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values ranged from -26.6± 0.6‰ (halophytes) to -10.5 ± 2.14‰ (*Ulva*) and from 2.9 ± 2.1 ‰ (Seston 0.7-5 µm, station A) to 9.5 ± 4.9‰ (halophytes) (Table 5.2; Fig. 5.2). Seston or SOM $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values were not different between sampling sites and size fractions (results not shown). The basal sources differed significantly in their $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values ($\delta^{13}C$: Kruskal-Wallis: $H = 49.43$ , $P < 0.0001$; $\delta^{15}N$ Kruskal-Wallis, $H = 20.25$, $P < .0001$) with $\delta^{13}C_{halophytes} < \delta^{13}C_{seston} < \delta^{13}C_{SOM} = \delta^{13}C_{epiphytes} < \delta^{13}C_{macroalgae\ and\ Zostera\ sp.}$ and $\delta^{15}N_{halophytes} = \delta^{15}N_{macroalgae\ and\ Zostera\ sp} = \delta^{15}N_{epiphytes} > \delta^{15}N_{seston} = \delta^{15}N_{SOM}$ . During the study period, $\delta^{13}C$ values of invertebrates varied from -22.5 ± 1.3‰ (nauplii) to -17.2 ± 1.9‰ (amphipods) while their $\delta^{15}N$ values varied from 6.4 ± 0.8‰ (calanoïds) to 7.4 ± 1.3‰ (harpacticoïds, *Metis* sp.) respectively (Table 5.2; Fig. 5.2). When pooling the prey samples from different dates and locations, significant differences in the $\delta^{13}C$ values were found between the invertebrates (Kruskal-Wallis, $H = 18.31$, $P < 0.001$), but not for $\delta^{15}N$ (results not shown). Mixing model outputs indicated that nauplii and calanoïds were mostly relying on seston with a partial contribution of SOM (Table 5.3). On the other hand, SOM appeared to be the principal food source for amphipods and harpacticoïds, with non-negligible contributions of seston and epiphytes (Table 5.3).

Fish $\delta^{13}C$ varied from -20.3±0.8‰ (*L. ramada*) to -14.5±0.4‰ (*A. fasciatus*), with significant differences between species *A. fasciatus* > *Pomatoschistus* sp.> *A.boyeri* = Adults mugilids = *L. saliens* fry = *S.aurata* (Kruskal-Wallis, $H = 37.31$, $P < 0.001$). Fish $\delta^{15}N$ varied from 8.1±0.5 ‰ (*L. saliens*) to 11.6±0.2‰ (*Sp. aurata*) without significant differences between species (results not shown; Table 5.2; Fig. 5.2). With the exception of *L .saliens* for which SOM was the dominant food source (40% contribution; Table 5.3) the isotope mixing model indicated that harpacticoïds were the major food source for most adult mugilids (44-55% contribution; Table 5.3). Harpacticoïds appeared also as the major food source for *A. boyeri* and a *L. saliens* fry (40% and 77% contributions respectively; Table 5.3) but for *L. saliens* fry, calanoïds and nauplii were also important food sources (23% and 32% contributions respectively, Table 5.3). Amphipods were most likely the most important food source for *Pomatoschistus sp.* and *A. fasciatus* (70% and 82% contributions respectively; Table 5.3). Macroalgae and macrophytes were not included as food sources to any isotope mixing calculations as they were either too enriched or too depleted in $^{13}C$ to be likely direct food sources for any of the consumers (Table 5.2; Fig 5.2.).

| | Sample | n | $\delta^{13}C$ | | $\delta^{15}N$ | | Size (mm, TL) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***Consumers*** | | | | | | |
| | ***C. labrosus*** | 3 | -18.5±0.7 | | 9.4±0.2 | - | 277.0±14.4 |
| | ***L. aurata*** | 3 | -18.3±0.7 | - | 8.6±0.9 | - | 279.6±1.5 |
| | ***L. ramada*** | 3 | -20.3±0.8 | - | 9.6±0.8 | - | 265.6±6.7 |
| | ***L. saliens*** | 3 | -19.1±0.4 | - | 8.1±0.6 | - | 237.0±7.9 |
| | ***L. saliens* fry** | 3 | -18.9±0.9 | - | 10±0.7 | - | 25.6±4.1 |
| | ***A. fasciatus*** | 8 | -14.5±0.4 | - | 10.4±0.4 | - | 33.6±8.4 |
| | ***A. boyeri*** | 8 | -17.6±1.9 | - | 11.2±1.9 | - | 53.4±18.9 |
| | ***S. aurata*** | 3 | -17.7±0.5 | - | 11.6±0.2 | - | 243.3±5.7 |
| | ***Pomatoschistus* spp.** | 9 | -15.9±0.4 | - | 11.2±0.9 | - | 25.6±8.1 |
| **Zooplankton** | **Nauplii** | 4 | -22.5±1.3 | - | 6.6±1.3 | - | - |
| | **Calanoida** | 3 | -20.9±0.3 | - | 6.4±0.8 | - | - |
| | **Harpacticoida** | 15 | -19.5±0.8 | - | 7.4±1.3 | - | - |
| | **Amphipoda** | 6 | -17.2±1.9 | - | 7.0±0.6 | - | - |
| | ***Sources*** | | | | | | |
| **Seston** | **100-30 µm** | 16 | -21.0±0.2 (St.A) | -21.4±1.7 (St.B) | 4.5±1.1 (St.A) | 5.6±0.8 (St.B) | - |
| | **30-5 µm** | 16 | -23.1±0.6 (St.A) | -19.5±3.2 (St.B) | 4.2±1.5 (St.A) | 6.2±1.2 (St.B) | - |
| | **5-0.7 µm** | 16 | -22.8±0.2 (St.A) | -21.9±0.9 (St.B) | 2.9±2.1 (St.A) | 4.1±0.3 (St.B) | - |
| | **SOM** | 16 | -19.2±0.4 (St.A) | -18.7±0.6 (St.B) | 3.9±0.4 (St.A) | 3.7±0.5 (St.B) | - |
| | **Epiphytes** | 16 | -17.0±0.4 | - | 5.9±1.5 | - | - |
| **Macroalgae** | **Red algae** | 3 | -15.1±0.2 | - | 8.6±0.1 | - | - |
| | **Green algae** | 6 | -10.5±2.14 | - | 5.7±1.3 | - | - |
| | ***Zostera* sp.** | 3 | -11.3±0.1 | - | 6.8±0.1 | - | - |
| | **Halophytes** | 3 | -26.6±0.6 | - | 9.5±4.9 | - | - |

**Table 5.2 :**. $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values (‰, mean ± SD) basal sources and consumers in Vassova lagoon (June to September 2007); n: number of replicates. **- :** not relevant or not calculated

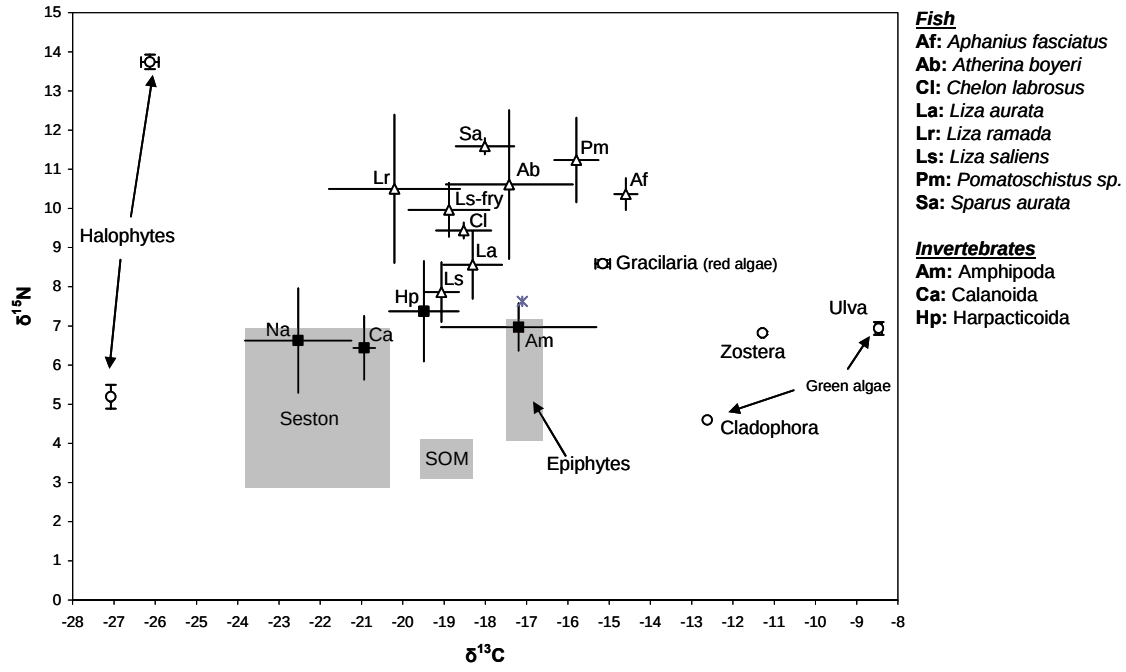



**Figure 5.2:** $\delta^{13}C$ (‰) vs. $\delta^{15}N$ (‰) biblot of food web components from Vassova lagoon (June to September 2007). Values are plotted as means (± SD): Grey squares denote ranges for potential ultimate organic matter sources calculated with the mean (± SD): **Seston:** calculated from all size fraction and station samples **SOM:** sediment organic matter, calculated from both stations samples.

| Consumer/Food | Seston | SOM | Epiphytes | Nauplii | Calanoida | Harpactoida | Amphipoda |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***C.labrosus*** | 17 (0-40) | 28 (0-52) | - | - | - | 55 (24-85) | - |
| ***L.aurata*** | 17 (0-42) | 38 (0-64) | - | - | - | 45 (15-73) | - |
| ***L.ramada*** | 35 (0-63) | 20 (0-46) | - | - | - | 44 (0-77) | - |
| ***L.saliens*** | 28 (1-48) | 40 (12-64) | - | - | - | 32 (1-56) | - |
| ***L.saliens* -fry** | - | - | - | 23 (0-48) | 32 (1-60) | 45 (10-80) | - |
| ***A.boyeri*** | - | - | - | 8 (0-25) | 15 (0-41) | 77 (45-100) | - |
| ***A.fasciatus*** | - | - | - | - | - | 18 (0-46) | 82 (54-100) |
| ***Pomatoschistus* sp.** | - | - | - | - | - | 30 (2-54) | 70 (46-98) |
| **Nauplii** | 63 (24-100) | 37 (0-76) | - | - | - | - | - |
| **Calanoida** | 67 (35-100) | 33 (0-65) | - | - | - | - | - |
| **Harpactoida** | 47 (29-66) | 33 (1-56) | 20 (0-40) | - | - | - | - |
| **Amphipoda** | 16 (0-39) | 60 (30-87) | 24 (0-46) | - | - | - | - |

**Table 5.3 :** Results from the SIAR isotope mixing model. Values are the mean contributions (%) of dietary items to consumers. Values in parentheses are the 1- 99 percentile ranges.

### 5.4.2 Fatty acid composition

As no significant difference in the FA composition was found between seston size fractions (results not shown), the three size fractions were pooled and hereafter referred to as "seston" (Table 2). Seston SOM and epithytes samples SAFAs, monounsaturated (MUFAs) and PUFAs represented 52-51, 19-24, 20-23% of total FA weight respectively (Table 5.4). In Seston and SOM, PUFA composition was dominated by $C_{18}$ PUFAs while HUFAs were found in very low levels (<2% of total FA weight) (Table 5.4). Epihytes, however, contained up to 5% of EPA in their FAs (Table 5.4). Seston FAs were the richest in DHA, and SOM lipids contained virtually no DHA and ARA (Table 5.4).

Macrophyte PUFAs (green and red algae, *Zostera* and halophytes) had markedly different FA compositions than other sources. Except for the red algae which were characterized by low levels of $C_{18}$ PUFAs (1.5% and 0.8% of total FA weight, for ω6 and ω3 respectivelly) and high levels of ARA, other macrophytes contained virtually no $C_{20}$ and $C_{22}$ PUFAs but high levels of $C_{18}$ PUFAs (Table 5.4).

In invertebrate consumers, SAFAs, MUFAs and PUFAs represented, 16-25, 22-35% of total FA weight respectively (Table 5.4). $C_{18}$ ω6 PUFAs varied from 2.8% (calanoïds) to 6.4% (naupli) of total FA weight and $C_{18}$ ω3 PUFAs from 3.4% (calanoïds) to 4.8% (harpacticoïds) of total FA weight (Table 5.4). DHA was the dominant HUFA (6.2% - 8.3% of total FA weight respectively) in nauplii and calanoïds whereas EPA was dominant in harpacticoids and amphipods (4.2% - 10.9% of total FA weight respectively) and ARA was also found in moderate levels (1.1% - 4.5% of total FA weight respectively; Table 5.4).

SAFAs contributed to 38.4% - 43.6% and 33.0% - 44.8% of total FA weight of fish NLs and PLs respectively while MUFAs represented 20.0% - 42.0% and 13.4% - 25.5% of total FA weight of fish NLs and PLs respectively and PUFAs accounted for 19.6% - 36.9%

and 34.4% - 51.2% of total FA weight of fish NLs and PLs respectively (Table 5.5). In fish NLs, $C_{18}$ ω3 PUFAs varied from 1.9% (*S. aurata*) to 8.5% (*L. ramada*) and $C_{18}$ ω6 PUFAs from 2.2% (*S. aurata*) to 4.3% (*L. saliens*) of total FA weight (Table 5.5). HUFAs were dominated by DHA in *A. boyeri*, *A. fasciatus* and *L. saliens* fry (5.6% - 16.7%, of total FA weight; Table 5.5) and by EPA in *L. aurata*, *L. ramada*, *L. saliens*, *S. aurata* and *Pomatoschistus spp*. (5.3% - 7.3% of total FA weight; Table 5.5). Some significant differences could be detected in the NLs' PUFA profiles between species/stages (ANOSIM, R = 0.7085, $P < 0.0001$) with DHA and EPA primarily accounting for the differences (SIMPER, 13,11% and 6,04%, overall average dissimilarity: 29, 94%). In PLs, $C_{18}$ ω3 PUFAs varied from 0.9% (*S. aurata*) to 2.0% (*L. ramada*) and $C_{18}$ ω6 PUFAs from 1.3% (*L. aurata*) to 4.9% (*L. saliens*) of total FA weight (Table 5.5). HUFAs were dominated by DHA in PLs of *L. aurata*, *L. ramada*, *A. boyeri*, *A. fasciatus, Pomatoschistus spp*. and *L. saliens* fry (11.5% - 23.6% of total FA weight) whereas EPA was dominant in PL of *C.labrosus, L.saliens and Sparus aurat*a (9.9% - 16.0% of total FA weight; Table 5.5). Although, much less expressed than in NLs, some significant differences could be detected in the PLs' PUFA profiles between species/stages (ANOSIM, R = 0.4032, $P < 0.0001$) with DHA and EPA primarily accounting for the differences (SIMPER, 4,05% and 2,94%, overall average dissimilarity: 12, 89%).

### 5.4.3 Transfer and retention of FAs in the food web

Individual FA proportions for PUFAs, ARA, EPA, DHA and DHA:EPA ratio of the different food web components were positively correlated with their $\delta^{15}N$ values (Fig 5.3). In contrast, SAFAs, $C_{18}$ PUFAs *(i.e* sum of $C_{18}$ ω6 and $C_{18}$ ω3 PUFAs) and EPA:ARA were negatively correlated to $\delta^{15}N$ whereas no significant correlations were found for MUFAs and DHA:ARA (Fig 5.3). The calculation of *AF*s for invertebrate primary consumers indicated that in nauplii PUFAs levels did not differ from diet (results not shown), $AF_{EPA}$ and $AF_{DHA}$ levels in calanoïds were significantly higher and $AF_{C18\ PUFAs}$ levels significantly lower than unity (t-test, $P < 0.05$; Fig. 5.4). $AF_{DHA}$ of harpacticoïds and $AF_{DHA}$, $AF_{EPA}$, $AF_{ARA}$ of amphipods were significantly higher than unity (t-test, $P < 0.05$, Fig. 5.4). In fish NLs, $AF_{DHA}$ was found in significantly higher than unity for *L. aurata*, *L. ramada* and *A. boyeri* (t-test, $P < 0.05$, Fig. 5.4). $AF_{EPA}$ and $AF_{ARA}$ were significtly different from unity in *L. aurata*, *L. ramada*, and *A. fasciatus*, and in *L. aurata*, *L. saliens*-fry and *A. boyeri* respectively (t-test, $P < 0.05$, Fig. 5.4). In A. boyeri NLs, $AF_{C18\ PUFAs}$ were significantly lower than unity (t-test, $P <$

0.05, Fig. 5.4). In fish PLs, with the exception of $AF_{EPA}$ in *Pomatoschistus* spp., all *AF*s significantly differed from unity (t-test, $P < 0.05$, Fig. 5.4).

| | Seston | | | | | Macroalgae | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 100-30 µm | 30-5 µm | 5-0.7 µm | SOM | Epiphytes | Red algae | Green algae | *Zostera* sp. | Halophytes |
| | (n=16) | (n=16) | (n=16) | (n=16) | (n=5) | (n=4) | (n=6) | (n=4) | (n=4) |
| **µg FA mg $C^{-1}$** | 73±51 | 64±38 | 73±24 | 57±45 | 103 | - | - | - | - |
| **Fatty acid (%)** | | | | | | | | | |
| **SAFA** | 59.1±7.4 | 59.8±2.2 | 52.2±6.8 | 61±6.3 | 56.9±3 | 69.1±3.7 | 48.9±14.2 | 33.3±9.5 | 43.8±19.2 |
| **MUFA** | 20.5±5.1 | 19.1±3.6 | 24.3±5.6 | 19.6±6.4 | 20.9±2.4 | 18±2.7 | 32±13.2 | 5.5±1.5 | 14.4±3.1 |
| **PUFA** | 20.1±6.2 | 20.3±4.4 | 23.3±4.1 | 19.4±6.2 | 22.2±4.7 | 12.9±1.1 | 19.1±7.1 | 61.2±11 | 41.8±19.7 |
| **$C_{18}$ ω6** | 5.6±1.6 | 8.1±3.4 | 6.3±1.9 | 3.4±1.9 | 4.6±1.7 | 1.5±0.1 | 3.3±1.2 | 18.6±4.7 | 24.3±1.2 |
| **$C_{18}$ ω3** | 3.5±2.2 | 2.9±1.5 | 4.4±1.7 | 2.4±1.5 | 6.5±3.1 | 0.8±0.8 | 9.5±4.2 | 37.5±7.5 | 28.3±0.8 |
| **ARA (20:4ω6)** | 0.6±0.7 | tr | 0.7±1.0 | tr | 1.0±0.6 | 8.4±1.6 | 1.0±1.1 | 0.8±0.8 | 0.5±0.7 |
| **EPA (20:5ω3)** | 1.9±0.8 | 1.3±0.5 | 2.1±1.0 | 1.2±1.1 | 5.0±0.7 | tr | 1.3±1.7 | 0.8±0.5 | tr |
| **DHA (22:6ω3)** | 1.4±1.0 | 0.8±0.4 | 1.4±0.8 | tr | 0.9±0.3 | n.d. | tr | tr | n.d. |
| **DHA:EPA** | 0.8±0.6 | 0.7±0.4 | 0.7±0.3 | 0.2±0.2 | 0.2±0.1 | - | - | - | - |
| **DHA:ARA** | 2.2±1.4 | 3.6±2.4 | 3.8±2.5 | 0.9±1.0 | 0.9±0.2 | - | - | - | - |
| **EPA:ARA** | 2.9±1.1 | 5.1±2.4 | 6.0±5.5 | 3.5±2.4 | 4.9±3.1 | 0.02±0.02 | 0.8±0.1 | - | - |
| **ω3/ω6** | 1.2±1.9 | 0.8±0.3 | 1.3±0.4 | 1.1±0.8 | 2.3±0.5 | 0.5±0.1 | 0.1±0.07 | 0.07±2.5 | 2.5±1.1 |

| Zooplankton | | | |
|---|---|---|---|
| Nauplii | Calanoida | Harpacticoida | Amphipoda |
| (n=4) | (n=3) | (n=9) | (n=10) |
| 545±157 | 137±28 | 467±123 | 433±233 |
| 56.4±3.4 | 61.6±5.5 | 50.5±10.5 | 39.1±7.1 |
| 17.1±0.9 | 16.2±6.7 | 21.0±4.5 | 25.4±2.7 |
| 26.1±3.8 | 22.0±3.7 | 28.6±7.7 | 35.4±5.8 |
| 6.4±0.6 | 2.8±0.4 | 6.6±2.3 | 5±0.9 |
| 4.6±1.9 | 3.4±0.2 | 4.8±1.5 | 4.6±1.7 |
| 0.4±0.3 | 0.6±0.31 | 1.1±0.6 | 4.5±1.6 |
| 2.9±0.9 | 4.1±0.5 | 4.2±2.2 | 10.9±4.3 |
| 6.2±2.8 | 8.3±3.2 | 3.2±1.8 | 4.9±0.7 |
| 2.4±1.2 | 1.9±0.6 | 0.7±0.3 | 0.6±0.5 |
| 12.5±3.3 | 16.6±11.3 | 3.3±2.6 | 1.1±0.4 |
| 4.4±1.7 | 7.6±3.2 | 4.1±1.9 | 2.4±2.4 |
| 1.8±0.6 | 4.4±1.1 | 1.7±0.6 | 2.1±2.5 |

**Table 5.4 :** Fatty acid compositions (% of total fatty acid weight) and fatty acid ratios in total lipids (mean ± SD) of basal sources and invertebrate consumers in Vassova lagoon (June to September 2007); **SAFA:** saturated fatty acids; **MUFA:** monounsaturated fatty acids; **PUFA:** polyunsaturated fatty acids

| | *C. labrosus* | *L. aurata* | *L. ramada* | *L. saliens* | *L. saliens* fry | *A. fasciatus* | *A. boyeri* | *S. aurata* | *Pomatoschistus* spp. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | (n=3) | (n=3) | (n=3) | (n=3) | (n=3) | (n=8) | (n=8) | (n=3) | (n=8) |
| **Size (TL, mm)** | 277.0±14.4 | 279.6±1.5 | 265.6±6.7 | 237.0±7.9 | 25.6±4.1 | 33.6±8.4 | 53.4±18.9 | 243.3±5.7 | 25.6±8.1 |
| **NEUTRAL LIPIDS** | | | | | | | | | |
| **µg FA mg$^{-1}$ DW** | | 38.1±16.2 | 15.4±0 | 27.5±6.5 | 5.6±0.4 | 6.5±2.5 | 4.6±1 | 7.4±2.5 | 9.4±6.9 |
| **SAFA** | | 40.6±0.3 | 43.7±0.1 | 43.5±0.6 | 42.9±1.7 | 43.8±4.6 | 39.5±5.4 | 38.4±1.7 | 40±3.9 |
| **MUFA** | | 31.3±0.7 | 29.2±1.8 | 33.7±1 | 20.2±2.8 | 27.8±3.6 | 20.2±4.1 | 42±0.9 | 31.1±5.9 |
| **PUFA** | | 28.1±0.2 | 27±1.9 | 22.8±1.6 | 36.9±2.8 | 28.4±3.2 | 40.3±7.3 | 19.6±0.8 | 28.8±6.9 |
| **$C_{18}$ ω3** | | 5.3±0.4 | 8.5±2.9 | 4.7±0.1 | 6.1±2.3 | 4.2±0.9 | 3.4±1.0 | 1.9±0.4 | 3.1±1.2 |
| **$C_{18}$ ω6** | | 3.3±0.6 | 2.9±0.3 | 4.3±0.4 | 3.9±0.9 | 3.9±1.1 | 3.0±1.4 | 2.2±0.0 | 3.4±2.3 |
| **ARA (20:4ω6)** | | 1.7±0.1 | 1.2±0.2 | 1.8±0.0 | 2.9±1.1 | 2.7±0.8 | 3.3±0.8 | 2.1±0.2 | 3.1±1.2 |
| **EPA (20:5ω3)** | | 7.3±0.5 | 5.5±0.1 | 4.9±1.1 | 6.3±1.4 | 1.9±0.3 | 5.1±1.7 | 5.3±1.0 | 6.1±3.0 |
| **DHA (22:6ω3)** | | 4.4±0.9 | 3.6±0.0 | 2.4±0.4 | 9.3±2.8 | 5.6±1.3 | 16.7±4.7 | 3.1±0.1 | 6±3.0 |
| **DHA:EPA** | | 0.6±0.2 | 0.7±0.0 | 0.5±0.0 | 1.5±0.3 | 2.9±0.4 | 3.3±0.5 | 0.6±0.1 | 1.0±0.2 |
| **DHA:ARA** | | 2.5±0.5 | 3.2±0.6 | 1.3±0.2 | 3.6±2.1 | 2.2±0.3 | 5.4±2.5 | 1.5±0.1 | 1.9±0.3 |
| **EPA:ARA** | | 4.2±0.3 | 4.8±1.1 | 2.6±0.5 | 2.3±0.8 | 0.7±0.1 | 1.6±0.5 | 2.5±0.3 | 1.9±0.5 |
| **ω3:ω6** | | 3.6±0.3 | 4.6±1.1 | 1.9±0.4 | 3.3±1.0 | 1.9±0.3 | 3.7±1.2 | 2.4±0.2 | 2.3±0.7 |
| **POLAR LIPIDS** | | | | | | | | | |
| **µg FA mg$^{-1}$ DW** | 8.6±2.5 | 11.5±1.1 | 12.3±3 | 13.5±1.0 | 20.7±10.4 | 10.4±3.6 | 8.7±2.2 | 7.6±0.4 | 29.6±23.6 |
| **SAFA** | 33.4±1.0 | 33.0±0.7 | 34.8±0.9 | 40.1±2.1 | 44.8±6 | 40.2±5.2 | 39.7±2.8 | 37.5±0.5 | 42.5±7.2 |
| **MUFA** | 15.7±3.9 | 15.2±5.1 | 15.2±1.8 | 25.5±5.2 | 17.2±3.7 | 19.5±1.9 | 13.4±2.3 | 22.4±1.6 | 19.1±3.2 |
| **PUFA** | 50.7±4.9 | 51.2±5.4 | 49.9±2.9 | 34.4±6.8 | 37.5±1.9 | 40.3±6.2 | 46.9±3.2 | 40.1±1.6 | 38.3±8.4 |
| **$C_{18}$ ω3** | 1.1±0.2 | 0.9±0.2 | 2.0±0.3 | 1.8±0.8 | 1.2±0.2 | 1.4±0.5 | 1.2±0.4 | 0.9±0.2 | 1.0±0.5 |
| **$C_{18}$ ω6** | 2.4±1.9 | 1.3±0.3 | 1.7±0.18 | 4.9±2.1 | 3.1±1.2 | 2.9±1.4 | 1.9±1.0 | 2.9±0.6 | 1.8±1.1 |
| **ARA (20:4ω6)** | 7.9±0.5 | 6.6±0.7 | 4.3±0.4 | 5.7±1.5 | 4.9±2.2 | 6.8±2.0 | 6.2±2.2 | 7.5±0.5 | 6.7±2.1 |
| **EPA (20:5ω3)** | 16±1.8 | 16.4±2.9 | 16.2±0.8 | 9.9±1.6 | 11.1±2.5 | 4.4±1.3 | 8.4±0.8 | 11.2±0.9 | 7.0±2.4 |
| **DHA (22:6ω3)** | 15.3±5.3 | 17.4±3.0 | 18.6±0.7 | 7.4±3.1 | 11.5±2.3 | 14.8±3.5 | 23.6±3.7 | 10.4±0.7 | 15.9±5.7 |
| **DHA:EPA** | 0.9±0.2 | 1.8±0.1 | 1.1±0.0 | 0.7±0.2 | 1.0±0.0 | 3.4±0.3 | 2.8±0.3 | 0.9±0.1 | 2.4±0.6 |
| **DHA:ARA** | 2.0±0.7 | 2.7±0.8 | 4.4±0.6 | 1.3±0.4 | 2.9±2.0 | 2.3±0.6 | 4.7±1.6 | 1.4±0.1 | 2.5±0.7 |
| **EPA:ARA** | 2.1±0.3 | 2.5±0.6 | 3.8±0.5 | 1.7±0.2 | 2.8±2.0 | 0.7±0.2 | 1.5±0.5 | 1.5±0.1 | 1.0±0.2 |
| **ω3:ω6** | 2.9±1 | 3.6±0.7 | 4.8±0.2 | 1.6±0.5 | 3.6±2.3 | 2.1±0.5 | 3.9±1.2 | 1.9±0.1 | 2.4±0.2 |

**Table 5.5 :** Fatty acid compositions (% of total fatty acid weight) and fatty acid ratios (mean ± SD) in neutral (left panel) and polar (right panel) lipids from dorsal muscle tissue of fish in Vassova lagoon (June to September 2007); **SAFA:** saturated fatty acids; **MUFA:** monounsaturated fatty acids; **PUFA:** polyunsaturated fatty acids

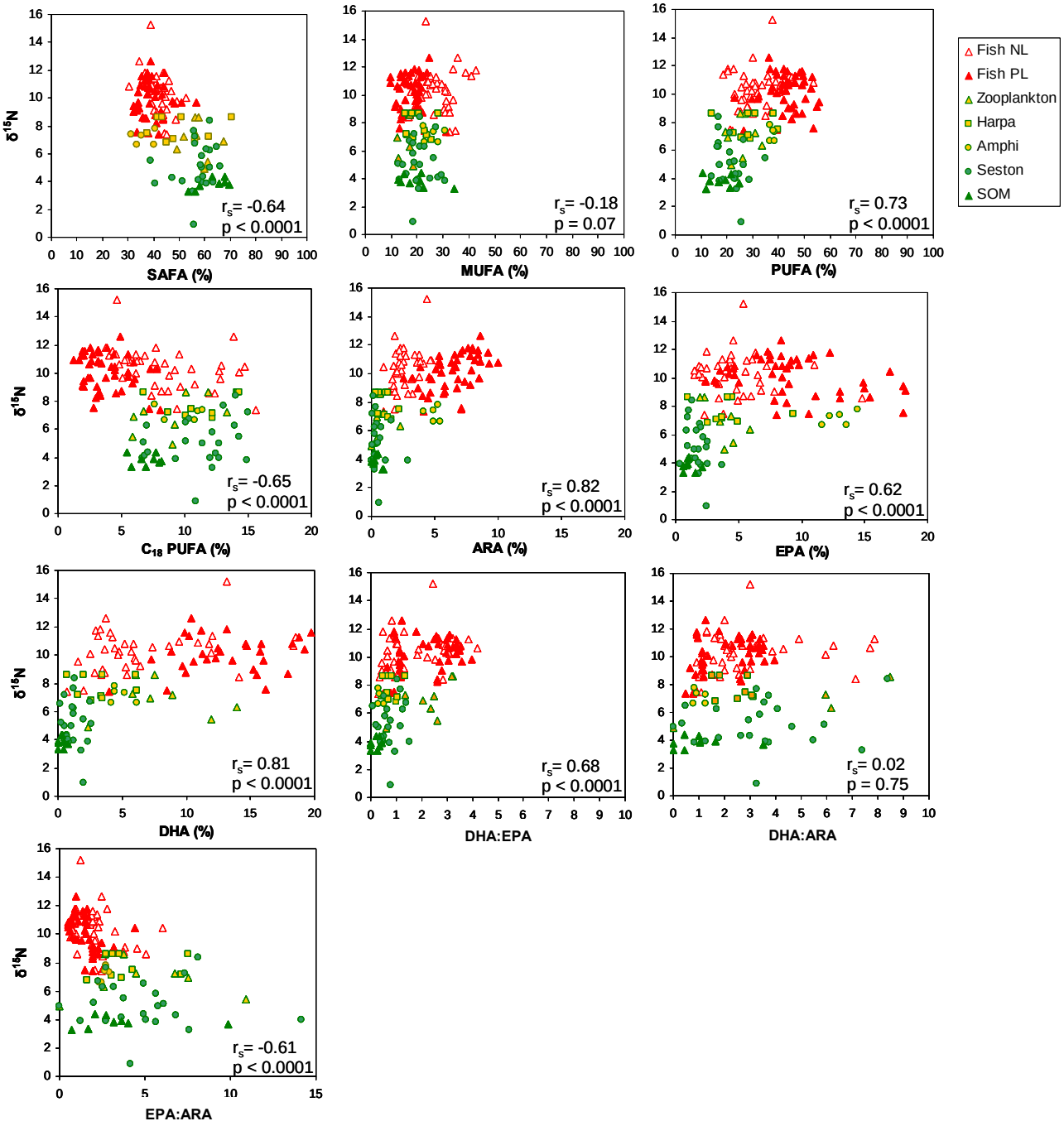



**Figure 5.3 :** Fatty acid proportions (% of total fatty acid weight) or ratios vs $\delta^{15}N$ (‰) biplot of food web components from Vassova lagoon (June to September 2007) . **SOM:** sediment organic matter. **Amphi:** amphipods; **Harpa:** harpacticoids **Zooplakton** (nauplii + calanoïds). Spearman correlation coefficients and significance levels are given for each plot. **SAFA:** saturated fatty acids; **MUFA:** monounsaturated fatty acids; **PUFA:** polyunsaturated fatty acids; **ARA:** (20:4ω6); **EPA:** (20:5ω3); **DHA:** (22:6ω3)

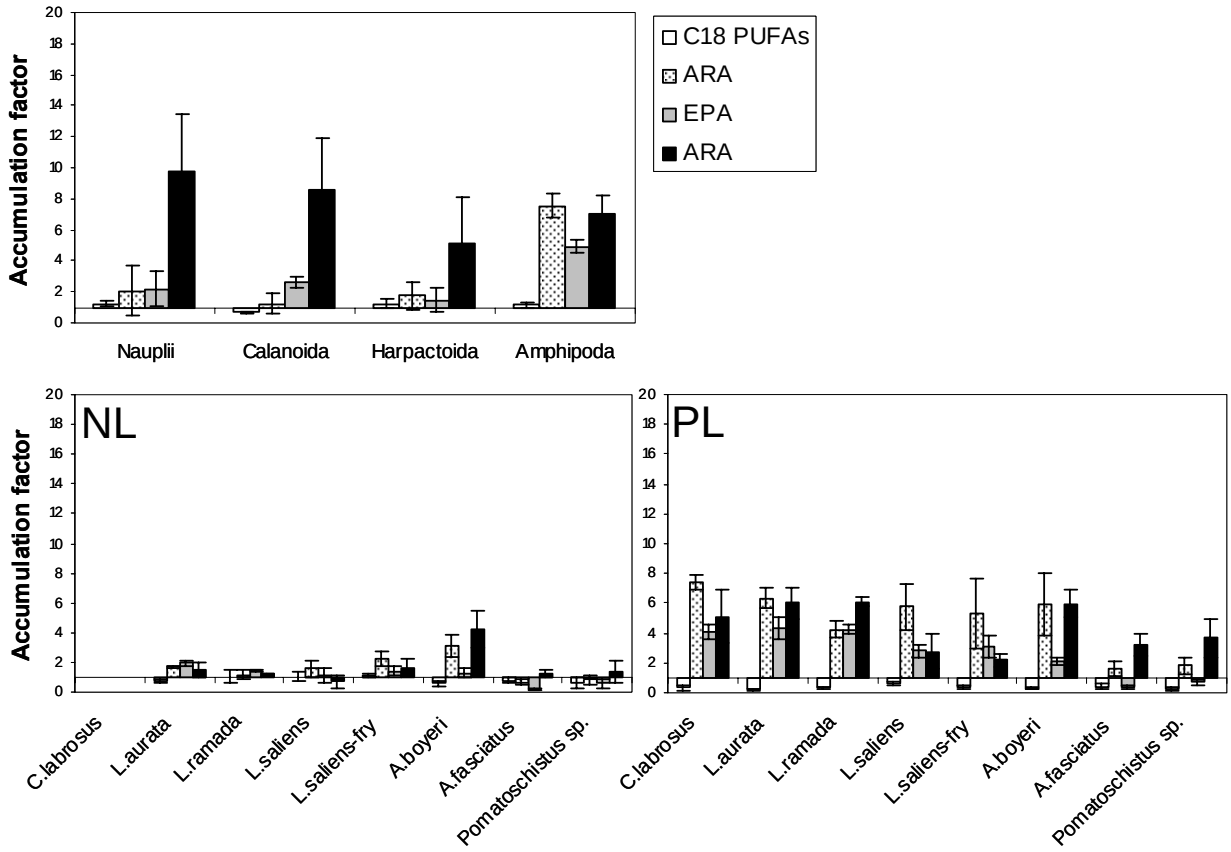



**Figure 5.4 :** Accumulation factors of polyunsaturated fatty acids in the consumers of Vassova lagoon. **NL :** Neutral lipids; **PL:** polar lipids. **PUFA:** polyunsaturated fatty acids; **ARA:** (20:4ω6); **EPA:** (20:5ω3); **DHA:** (22:6ω3)

## 5.5 DISCUSSION

### 5.5.1 The food web in the Vassova lagoon

In Vassova lagoon, the $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values of seston, SOM, epiphytes, macroalgae, seagrass and halophytes fell within ranges previously observed in other Mediterranean lagoons (Vizzini & Mazzola 2003, Vizzini & Mazzola 2006, Vizzini & Mazzola 2008). Considering an average fractionation of 1.1±0.3‰ and 2.8±0.4‰ per trophic level for C and N respectively(McCutchan et al. 2003), seston, SOM and epiphytes were likely at the basal sources sustaining the Vassova lagoon's food web. The latter contrasts with other Mediterranean lagoons where macroalgae and/or seagrass were shown to contribute to consumers' production (Vizzini & Mazzola 2008). However, it is very likely that macroalgal and seagrass sources contributed indirectly to consumers through the detrital pathways in Vassova lagoon. Indeed, the high levels of SAFAs and $C_{18}$ PUFAs comparatively to DHA and EPA in seston and SOM, suggest that macrophyte detritus account for an important part of sestonic or SOM organic matter (Alfaro et al. 2006, Copeman et al. 2009, Mudge et al. 1998, Richoux & Froneman 2008). Unfortunately, because of the difficulty of directly measuring the isotope composition of pure phytoplankton and microphytobenthos it is impossible to evaluate to which extent each source (microalgae, macroalgae) contributes to the seston and sediment organic matter pools.

Invertebrate's $\delta^{15}N$ indicated that they were first-order consumers feeding on a mixture of sources with a dominance of seston for naupli and calanoïds and harpacticoïds, and SOM and epiphytes for amphipods. The mixture of sources in invertebrate diets suggests a strong bentho-pelagic coupling probably caused by settling and ressuspension of organic matter due to the shallowness of the lagoon. However despite the apparent similarity between invertebrate diets, the low DHA:EPA ratios (<1) in amphipods and harpacticoïds indicated that they mostly fed upon diatoms, whereas nauplii and calanoïds (DHA:EPA > 1) relied more upon flagellates (Dalsgaard et al. 2003).

Fish isotopic values were in agreement with the diets described in literature. Hence amongst fish, adult mugilids had the lower $\delta^{15}N$ values (8.1 ‰ – 9.6 ‰) consistent with a direct exploitation of basal sources and invertebrates (Almeida 2003, Cardona et al. 2001). On the other hand, Mugilid fry, *A. boyeri*, P*omatoschistus spp*. and *A. fasciatus* which are considered as carnivores, had higher $\delta^{15}N$ values (10 ‰ – 11.6 ‰) (Baldo & Drake 2002, Leonardos 2008, Persic et al. 2004, Vizzini & Mazzola 2005). Despite the differences in the relative importances of each food category among fish species, the isotope mixing model output underlines the central dietary role of harpacticoid copepods for fish in Vassova lagoon.

Although harpacticoïds are considered as one of the major prey items for small estuarine fish (Coul 1999), their importance as food for fish seem quite variable among Mediterranean lagoons (Baldo & Drake 2002, Gisbert et al. 1996, Vizzini & Mazzola 2005, Vizzini et al. 2005). As lagoon fish species usually show a high degree of trophic plasticity, the latter probably reflects local and temporal differences in the abundance of harpacticoïds (Vizzini & Mazzola 2006). During the study period, the harpacticoid copepod *Metis spp*. was extremely abundant in the water column, at the sediment-water interface and in macrophyte beds (Authors' personal observation) and probably explains their ubiquitous contribution to fish diets.

### 5.5.2 Transfer of FAs from basal sources to primary consumers

Most of our understanding of FA transfer is derived from experimental simplified food chains under controlled conditions (*e.g*. (Ederington et al. 1995, Hall et al. 2006) while data from natural food webs are still limited (Copeman et al. 2009, Copeman & Parrish 2003, Hessen & Leu 2006, Kainz et al. 2004). In aquatic food webs, the FA composition of consumers (zooplankton, zoobenthos, fish) is considered to be influenced by that of their diet, although preferential retention and/or biosynthesis of some FAs is expected (Ackman 1998, Hessen & Leu 2006). Our results are consistent with such expectation, as it appears that FA composition of the food web components changes with increasing trophic levels. Hence, in Vassova lagoon the proportion of SAFAs was shown to progressively decrease of with increasing trophic levels and the opposite trend was observed for PUFAs. This trend is explained by the biological relevance of PUFAs for aquatic organism and suggests that FA acid composition of basal sources do not necessarily meet the physiological needs of consumers. However, different patterns were observed among PUFAs. There was a clear increase of HUFAs proportions with increasing trophic levels while $C_{18}$ PUFAs were found in the same levels in invertebrate consumers and fish NLs and their proportion clearly decreases in fish PLs. The latter contrasts with previous observations in freshwater systems where these PUFAs were accumulated at least up to zooplankton (Hessen & Leu 2006, Kainz et al. 2004). Freshwater zooplankton is believed to retain 18:3ω3 and 18:2ω6 in order to convert them into DHA and ARA respectively and thus to cope with the lower availability of these EFAs in freshwater systems (Bec et al. 2003a, Brett et al. 2009, Desvilettes et al. 1994). In marine systems, it is still unclear whether small mid-latidute calanoid copepod genera (*Acartia*, *Paracalanus*, *Pseudocalanus*) such as those studied here are able to perform efficiently such bioconversions (Veloza et al. 2006).Therefore, it is unclear whether the observed patterns

resulted from dietary $C_{18}$ PUFAs not being accumulated or being converted to DHA which is found up to 9-fold higher proportions in calanoïds total lipids in comparison to their food. Moreover, small planktonic calanoid copepods are important grazers of heterotrophic protists (Atkinson 1994, David et al. 2006, Gifford & Dagg 1991) This is particularly true in estuarine environments where heterotrophic protists can be a significant link between bacterial and picophytoplanktonic productions and copepods (David et al. 2006, Hlaili et al. 2008). By accumulating, elongating $C_{18}$ PUFAs into HUFAs or synthesizing *de novo* EFAs, heterotrophic protist upgrade food quality for zooplankton (Bec et al. 2003b, Bec et al. 2006, Breteler et al. 1999, Veloza et al. 2006). However, it appears that heterotrophic protists preferentially accumulate DHA over EPA which could also partially explain the higher accumulation of DHA over EPA in the studied calanoïds (Chu et al. 2008, Veloza et al. 2006). On the other hand, marine harpacticoïds have been suggested to be more efficient in converting $C_{18}$ PUFAs into HUFAs as an adaptation to the fact that they occupy detritus-rich habitats (Nanton & Castell 1998). In the present study, harpacticoïds also showed higher levels of DHA in comparison to their food. Nevertheless, harpacticoïds do not exhibit any accumulation of $C_{18}$ PUFAs and as for calanoïds it is difficult to affirm that any bioconversion of $C_{18}$ ω3 PUFAs into DHA occurs. Naupliar copepod stages also had higher DHA contents than their assumed food sources but the interpretation of these results requires caution. Indeed, virtually nothing is known on feeding ecology of naupliar stages and it is not unlikely that early stages do not feed and that a part of their FA content is actually of parental origin (Roff et al. 1995). Overall, copepods appeared to highly accumulate DHA but this was not the case of EPA and ARA that were found in similar levels to those found in basal sources. The latter suggests that DHA might be a limiting factor for copepods and that EPA and ARA are either metabolised or provided at sufficient levels in the Vassova lagoon. Amphipods contrasted with other invertebrate taxa in the fact that they seemed to accumulate ARA and EPA nearly as much as DHA. ARA and EPA are found in high levels in diatoms which are probably the main food item of these organisms (Jaschinski et al. 2008).

Although, our estimation of relative accumulation of an EFA to another is probably realistic, one should keep in mind when interpreting our results that the absolute accumulation factors for invertebrates are certainly over-estimated. Using the FA composition of mixed organic matter pools (*e.g.* seston, SOM) as proxies for invertebrate food FA levels in such a detritus-rich environment underestimates the EFA proportions of the items invertebrates could selectively feed upon. However, regardless of the implied mechanisms (*e.g.* prey selectivity, bioconvertion, accumulation) our study demonstrate the keystone role of invertebrate

consumers and more particularly of harpacticoïds in coastal lagoon ecosystems in trophicaly upgrading lipid- and HUFA-poor basal organic matter sources into lipid- and HUFA-rich biomass. Moreover, by selectively accumulating DHA over EPA, copepods provide to fish with a DHA:EPA ratio closer to 2:1 which is usually considered as optimal for marine fish (Sargent et al. 1999b). The fact that copepods upgrade the low nutritional quality (at least in lipid terms) of basal organic matter flux towards higher trophic levels might be a factor structuring the food web in Vassova lagoon, and could explain why adult mugilids, usually considered as mainly detritivores appear to rely so heavily upon harpacticoïds.

### 5.5.3 Transfer of FAs from primary consumers to fish

In fish consumers, NLs and PLs exhibited very contrasting patterns in regard to PUFA retention. With the exception of *A. boyeri*, individual PUFAs were found in most fish species, at levels similar to those in their respective food. The latter confirms the low selective nature of the enzymes esterifying FAs into NLs and supports the use of this NLs' FA composition as being a good marker of dietary inputs. The apparent accumulation of HUFAs in *A. boyeri* NLs might be an artefact linked to an active catabolism of MUFAs. While PUFAs and more particularly HUFAs have a poor energy yelding, MUFAs are the main source of FA-acid derived metabolic energy in fish (Sargent et al. 1999b). These are either derived from diet or synthesized *de novo* and accumulated in NLs as a form energy storage (Dalsgaard et al. 2003, Sargent et al. 1999b). Therefore, if for any reason *A. boyeri* has a negative energy budget (*i.e* more catabolism than storage of MUFAs) this would automatically raise the relative PUFA levels in NLs. This could also be the case of *L. saliens* fry which also contain quite elevated levels of HUFAs in their NLs, and seem along with *A. boyeri,* to have the lower NL-derived MUFA levels amongst studied fish.

In fish PLs, the high *AF*s for DHA, EPA and ARA show evidence for preferential retention and point their essentiality for fish. The opposite were observed for $C_{18}$ PUFAs which were found in significantly lower levels in fish PLs than in food. In a feeding experiment with yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*) Copeman et al (2002) showed that retention of FAs in flounders' lipids was proportional to their relative levels in diet and that the most retained FAs were those present in low levels in diet. However, when increasing dietary levels above a certain limit no more retention occurred and it was hypothesized that dietary levels met flounders' needs. Similarly, the retention patterns observed in the PLs of the lagoon fish species suggest that HUFAs levels in their food dietary sources were lower than optimal whereas $C_{18}$ PUFAs seem to be in excess. Nevertheless, it is difficult to estimate

precisely the fish (and invertebrates) optimal EFA dietary levels and to evaluate to which degree these compounds might be limitant. Indeed, the high *AF*s they exhibited for HUFAs also indicate that they retain them in a very efficient way and might be able to cope with low HUFAs dietary levels. In most fish DHA and ARA seem to be more accumulated than EPA. The latter could indicate lower needs, preferential catabolism/elongation and/or higher supply in EPA in comparison to DHA and ARA. As for primary consumers, it is difficult to differentiate to which degree the higher HUFAs levels in fish comparatively to their food are due retention or elongation and desaturation of $C_{18}$ PUFAs. Mugilids have been shown to be unable to perform these conversions efficiently (Mourente & Tocher 1993) but no data exists on the other studied species (*i.e. A. boyeri*, *A. fasciatus*, *Pomatoschistus* spp.). Marine fish species studied so far did not show any ability to convert efficiently $C_{18}$ PUFAs into HUFAs (Bell & Tocher 2009). However, caution should be used in generalizing those findings for such euryhaline species such as *A. boyeri* and *A. fasciatus* which can also be found in freshwater systems and may have developed HUFAs biosynthesis abilities like freshwater fish.

### 5.5.4 The ecophysiological significance of ARA retention in fish

Most research on dietary EFA requirements of marine fish have focused on DHA and EPA and the importance of ARA have been largely overlooked (Bell & Sargent 2003). This neglect is partially based on the assumption that ARA requirements are low given the fact that it is found in much lower level than DHA and EPA in most marine fish oils (Bell & Sargent 2003). However, increasing experimental evidence supports the importance of ARA in marine fish (Koven et al. 2003, Tocher et al. 2000, Van Anholt et al. 2004). Our estimations of EFA *AF*s in the Vassova lagoon fish indicate that ARA is highly retained in all species PLs. Moreover, it appears that in most species it is equally or more retained than EPA and DHA which is further supported by the low DHA:ARA and EPA:ARA ratios (4.4:1 – 1.4:1, 3.8-0.7:1 respectively) found in Vassova lagoons' fish species. Bell & Sargent (2003) hypothesized that the dietary optima of these ratios are species-dependent and influenced by the ecosystem the species inhabits. A comparison of our results with literature suggests that the ecosystem factor-might be at least as influent as the species-factor (Passi et al. 2002, Recks & Seaborn 2008)(Fig. 5.4). In figure 4 the dramatic differences among ecosystems in NL-derived DHA:ARA and EPA:ARA ratios suggest important ecosystem-specific differences in dietary inputs. Nevertheless, EFA ratios in PLs are supposed to be regulated by

fish in response to their physiological needs and hence partially independent of diet (Ackman 1998, Lands 2009). Under these assumptions, ARA retention could be linked to the

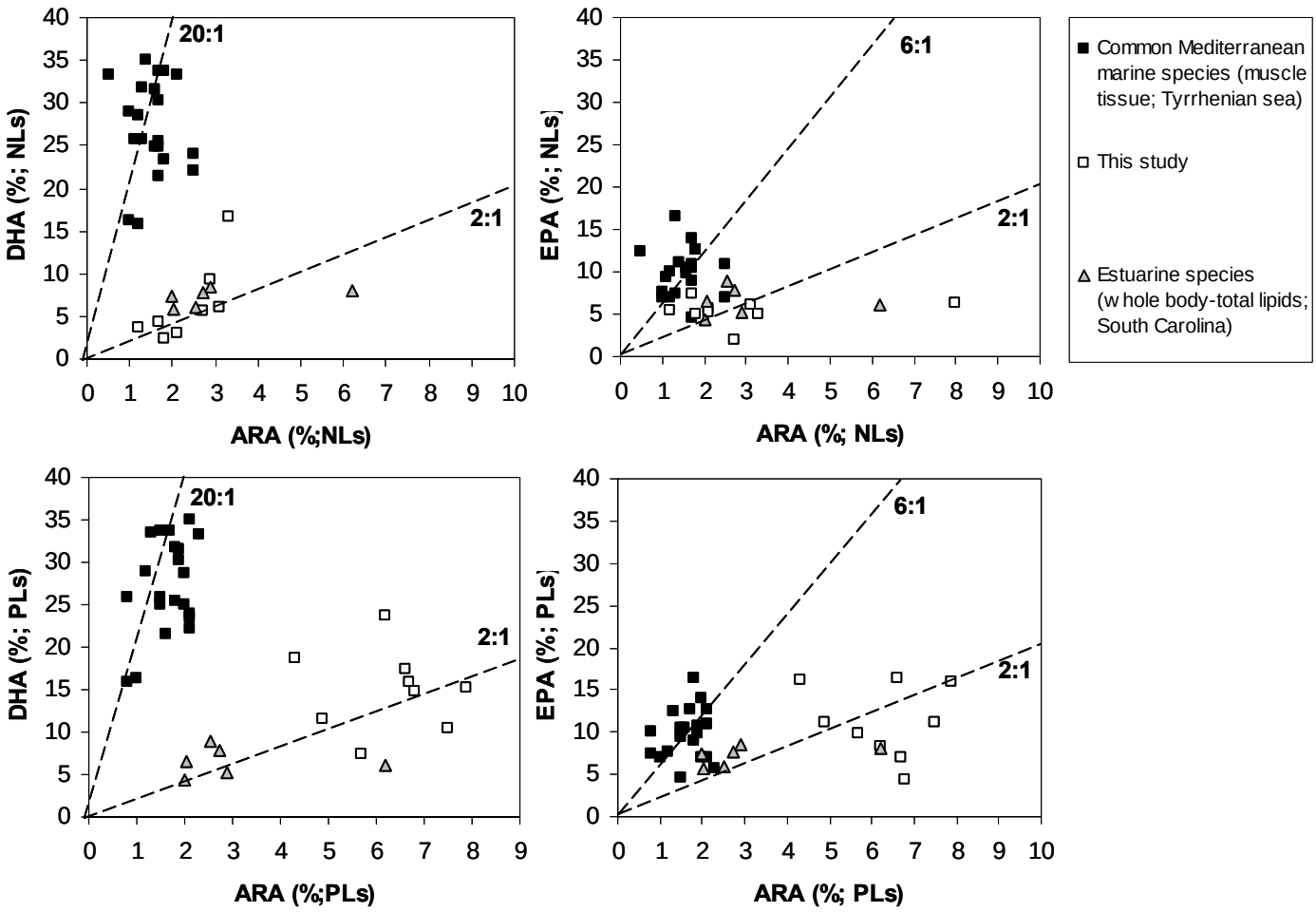



**Figure 5.5 :** Comparison of DHA:ARA (22:6ω3: 20:4ω6) and EPA:ARA (20:5ω3: 20:4ω6) ratios in fish lipids between different marine environments. Dashed lines denote constant fatty acid ratios; For complete species listings see Paci et al. 2002 and Recks & Seaborn 2008.

environmental parameters that fish have to cope with in lagoons and estuarine ecosystems in general. For example, in response to salinity or temperature fluctuations the retention rates of the different EFAs in fish PLs might vary (Cordier et al. 2002a, Kheriji et al. 2003, Skalli et al. 2006). For example, salmonids tend to decrease their PL EPA:ARA ratios in gill tissues during seawater acclimation and individuals with higher ARA levels in their gill PLs appear to adapt better to seawater challenge (Bell et al. 1997, Tocher et al. 2000). Moreover, it appears that some euryhaline estuarine fish are characterized by high ARA requirements (Sargent et al. 1999a) that may play an important role during stress challenges (Koven et al. 2003, Van Anholt et al. 2004). Estuarine areas are stressful environments as they present important daily fluctuation of temperature, oxygen, salinity and turbity which can induce important increases in cortisol body levels in fish (Bonga 1997, Yamashita et al. 2003). In fish, cortisol is an adaptative response to stress which is involved in the catabolism of energy-yelding substrates and restoration of hydromineral balance (Bonga 1997). Among other secondary effects, cortisol has inhibitory effects on growth and immune function in fish (Bonga 1997). It appears that ARA-derived eicosanoids modulate cortisol levels and action in fish and thus influence the general survival and resistance to stress (Koven et al. 2003, Van Anholt et al. 2004). It should however be noted that effects of increased levels ARA seem to vary with developmental stage. Indeed, high levels of ARA were found to be detrimental for successful pigmentation and resistance to salinity fluctuation stress during the larval stages of some marine and estuarine fish (Bell & Sargent 2003, Copeman et al. 2002).

## 5.6 CONCLUSION

During the study period, in this previously unsampled ecosystem, organic matter sources at the base of the food web were depleted in HUFAs but comprised important levels of SAFAs and $C_{18}$ PUFAs. By accumulating lipids in general and more particularly $C_{20-22}$ PUFA, primary consumers such as epibenthic harpacticoids and amphipods enhanced -in lipid terms- the nutritional quality of organic matter flow towards higher trophic levels. This ability in combination to the low lipid nutritional quality of basal sources might impose to mugilids -which can also substantially feed on primary producers-, to feed at a higher trophic level in order to meet their EFA needs. All studied fish species exhibited high *AF*s for HUFAs in their PLs indicating a potential limitation of HUFA availability in the food web but also very efficient FA retention abilities. Surprisingly, ARA was in most fish species PLs more accumulated than EPA and as much as DHA. Consequently, fish PLs exhibited DHA:ARA and EPA:ARA ratios substantially different from those observed for marine fish caught in

open waters. Our results highlight the important physiological role of this EFA for estuarine fish and suggest an eicosanoid system with different enzyme activity levels probably related to the stressful conditions reigning in estuarine environments.

# CHAPITRE 6 :

## CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

**CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES**…….....**131**

6.1. REGIME ALIMENTAIRE DES JUVENILES DE *Liza saliens* ..... 133
6.2. PRINCIPALES SOURCES DE MATIERE ORGANIQUE POUR LES JUVENILES DE *Liza saliens*..... 134
6.3. QUALITE NUTRITIONNELLE DES RESSOURCES ALIMENTAIRES POUR LES JUVENILES DE *Liza saliens* ..... 136
6.4. ORIGINE DES ACIDES GRAS ESSENTIELS POUR LES JUVENILES DE *Liza saliens*..... 137
6.5. DYNAMIQUE D'INTEGRATION DU SIGNAL ISOTOPIQUE DANS LES ACIDES GRAS ISSUS DES LIPIDES NEUTRES ET POLAIRES ..... 138
6.6 ROLE DES ACIDES GRAS POLYINSATURES DANS LE RESEAU TROPHIQUE DE LA LAGUNE VASSOVA ..... 138

Dans la lagune Vassova, le maintien des activités d'aquaculture extensive repose sur l'apport naturel en larves et juvéniles, ainsi que sur les ressources trophiques naturellement présentes dans le milieu. Afin d'optimiser la production piscicole, il est nécessaire d'identifier les processus favorisant la survie et la croissance des juvéniles, ce qui nécessite au préalable, d'approfondir nos connaissances sur le fonctionnement trophique des écosystèmes lagunaires.

Ce mémoire de thèse s'est donc focalisé sur l'étude des relations trophiques entre les juvéniles de *Mugilidae* et les autres compartiments trophiques de la lagune Vassova. Ainsi, deux études ont été consacrées à la nature et l'importance nutritionnelle (en termes d'apports en AGPI) des ressources soutenant la croissance des juveniles de *Liza saliens* pendant leurs premiers mois de vie lagunaire (Chapitres 3 et 4). Une troisième étude, élargie aux principales espèces pisciaires de la lagune Vassova, a été dédiée au suivi des AGPI dans le réseau trophique et leur retention dans les lipides des poissons (Chapitre 5).

Les conclusions majeures issues de ce travail ainsi que les perspectives qui s'en dégagent sont présentées ci-dessous.

## 6.1. REGIME ALIMENTAIRE DES JUVENILES DE *Liza saliens*

Deux approches menées en parallèle (analyse isotopique et analyse des contenus stomacaux, nous ont permis de préciser l'évolution du régime alimentaire de *L. saliens* lors de son établissement dans la lagune .

De façon générale, les résultats de l'analyse isotopique confirment ceux issus de l'étude des contenus stomacaux de *L. saliens*, à l'exception notable des données obtenues sur les plus jeunes individus. En effet, il se pourrait que leur signature isotopique reflète des proies difficilement détectables par les analyses de contenu stomacal. A cet égard, les protozoaires peuvent contribuer de façon significative au régime alimentaires des jeunes larves finir (de Figueiredo et al. 2005, Fukami et al. 1999). Par ailleurs, en raison de leur entrée toute récente dans la lagune, les jeunes individus pourraient ne pas avoir assimilé la signature isotopique des proies locales (les raisons possibles sont discutées en détail dans le chapitre 3). Néanmoins, l'analyse isotopique s'est avérée particulièrement utile puisqu'elle a permis d'éviter de dresser des conclusions erronées auxquelles l'analyse des contenus stomacaux, seule, nous aurait conduit. En effet, malgré l'abondance de sédiment dans les estomacs des individus de plus de 30 mm, l'analyse isotopique montre que la MOS ne semble pas directement assimilée par *L. saliens*.

Dans la lagune Vassova, les nauplii et les copépodites harpacticoïdes sont vraisemblablement les proies principales des juvéniles de *L. saliens*. Le passage d'une

alimentation à base de proies planctoniques (nauplii) vers une alimentation dominée par des organismes benthiques (harpacticoïdes) survient lorsque les alevins atteignent 20 mm (LT). Par la suite et pour une taille (LT) devenant supérieure à 30 mm, les juvéniles semblent également ingérer des post-larves de bivalves (probablement de *Cerastoderma spp.*).

Le changement ontogénique du comportement alimentaire des jeunes *L. saliens* dans Vassova n'est pas fondamentalement différent de celui décrit dans d'autres milieux (Albertini-Berhaut 1980, Baldo & Drake 2002, Gisbert et al. 1996) et semble permettre d'éviter toute compétition pour la nourriture entre les individus de différentes cohortes (Yàñez-Aranbicia et al. 1994). Cependant, la nature des principales proies des juvéniles de *L. saliens* varie selon le milieu d'appartenance (lagune, estuaire, milieu côtier ) et reflète vraisemblablement les assemblages locaux de proies (Albertini-Berhaut 1980, Baldo & Drake 2002, Gisbert et al. 1996). Cette plasticité alimentaire traduit le caractère opportuniste du comportement des jeunes *L. saliens* et explique leur large distribution dans la plupart des milieux côtiers méditerranéens (ports, baies, estuaires, lagunes). Toutefois le coût énergétique de capture, l'apport calorique et la qualité nutritionnelle (en termes de composition biochimique) n'étant probablement pas équivalents entre les différentes proies, il est permis de s'interroger sur le potentiel de ces différents milieux à promouvoir la croissance des jeunes mugilidés.

Dès lors, une des perspectives liées à ce travail, serait de déterminer, dans différentes zones de nourrissage, la composition biochimique et la teneur calorique des proies potentiellement rencontrées par les juvéniles de *L. saliens*. Il serait également intéressant d'évaluer l'influence de la qualité nutritionnelle sur le recrutement futur des adultes de *L. saliens* en estimant la contribution proportionnelle des différentes zones de nourrissage au stock des individus adultes péchés en mer. Pour cela, l'analyse microchimique des otolithes semble particulièrement intéressante puisque elle permet d'associer les poissons adultes péchés en mer à leur zone de nourrissage (Thorrold et al. 1998). Toutefois, il semble difficile actuellement, de séparer l'influence de la nourriture des effets liés à la typologie du milieu ou à des interactions biotiques telles que la prédation.

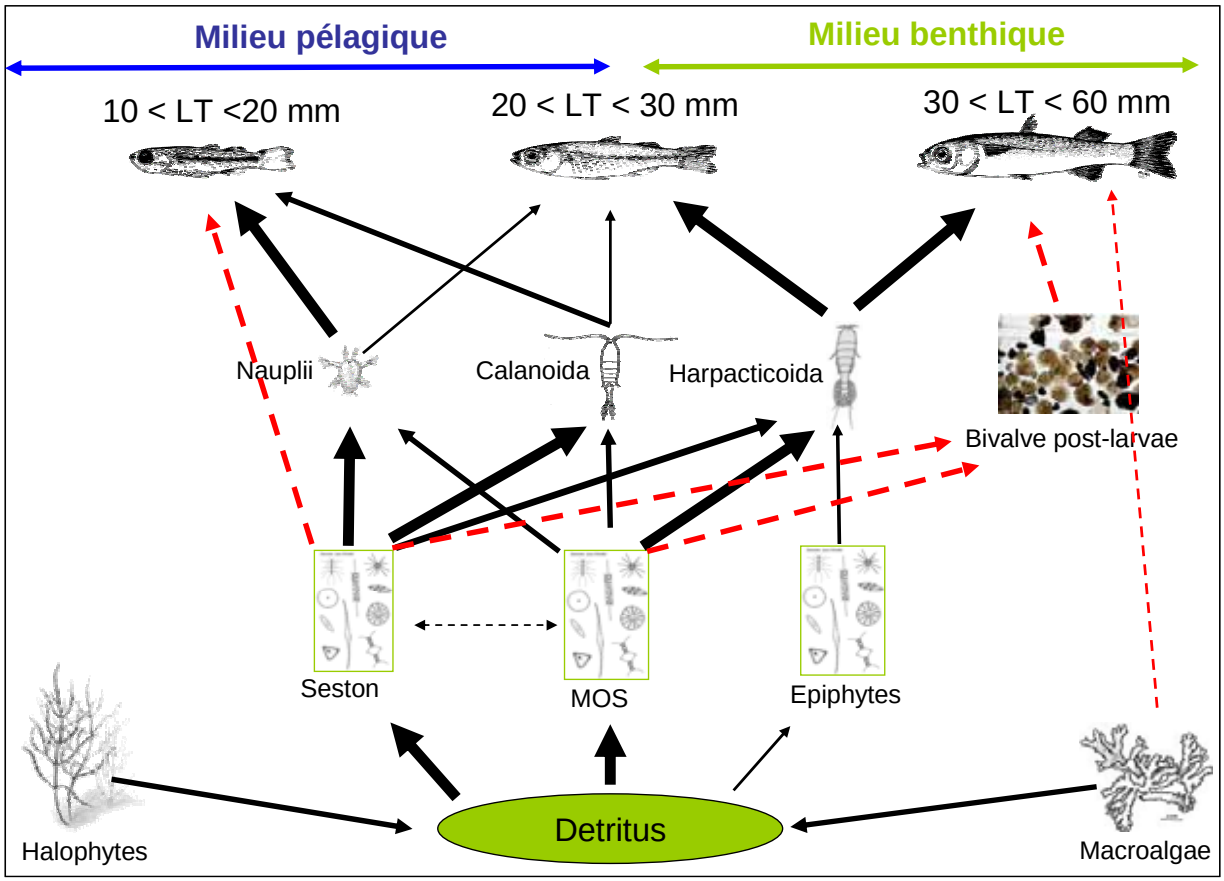



**Figure 6.1:** Synthèse de principaux résultats obtenus sur les liens entre les juvéniles de *L. saliens* et les autres compartiments trophiques de la lagune Vassova pour la période entre Juin et Novembre 2007. **Flèches noires** : voies trophiques mises en évidence dans le cadre de cette étude. **Flèches rouges** : voies trophiques potentielles

## 6.2. PRINCIPALES SOURCES DE MATIERE ORGANIQUE POUR LES JUVENILES DE *Liza saliens*

L'étude des compositions isotopiques de différents compartiments trophiques de la lagune Vassova (chapitre 3) tend à montrer que les flux de matière et d'énergie soutenant la croissance de *L. saliens,* au cours des premiers mois de vie lagunaire ont pour origine, le seston et la MOS (Fig. 6.1). En ce qui concerne les juvéniles mesurant plus de 30 mm (LT), la biomasse de macroalgues et les biofilms épiphytiques apparaissent également comme des ressources trophiques non négligeables mais toutefois secondaires. Les compositions en AG du seston et de la MOS indiquent qu'au cours de la période étudiée, ces compartiments trophiques sont en grande partie constitués de détritus d'origine macrophytique (macroalgale, végétaux terrestre) et de bactéries. La fraction liée aux microalgues semble peu abondante, en accord avec les faibles concentrations en Chl-*a* mesurées dans la colonne d'eau de Vassova (Orfanidis et al. 2005).

Le suivi des biomarqueurs lipidiques, a mis permis de mettre en évidence que la matière particulaire détritique est assimilée par les proies de *L. saliens* et soutient donc en partie sa croissance. Par ailleurs, l'abondance des AG bactériens détectés dans les lipides extraits de *L. saliens* et de ses proies, confirme l'importance de la chaîne alimentaire microbienne pour les consommateurs au sein des écosystèmes lagunaires (Vizzini & Mazzola 2005, Vizzini & Mazzola 2006). Les bactéries hétérotrophes permettraient d'une part, d'augmenter la qualité nutritionnelle et la labilité de la matière détritique (Phillips 1984, Tenore 1983) et d'autre part, de soutenir une importante biomasse de protistes bactérivores (Sherr & Sherr 2002). Cette biomasse, pourrait à son tour constituer une des principales sources de nourriture pour les copépodes du milieu (David et al. 2006, Hlaili et al. 2008). Par ailleurs, en raison de leur aptitude à synthétiser des AGPI à longue chaîne (Desvilettes & Bec 2009), ces protistes hétérotrophes pourraient, dans ce contexte de faible production phytoplanctonique, représenter une ressource majeure en AGPI alimentaires .

En perspective, il apparaît donc important d'identifier l'origine (micro-, macro-algale, végétaux terrestres) des substrats organiques qui soutiennent le réseau trophique microbien et de déterminer avec précision l'importance de ce dernier pour la production des métazoaires. Dans cette optique, l'analyse isotopique des différents AG biomarqueurs des bactéries et des microalgues au sein de la fraction lipidique polaire (représentative de la biomasse vivante) du *pool* particulaire (seston, MOS) pourrait permettre de clarifier la contribution relative de ces différents substrats au compartiment microbien (Boschker et al. 1999). De plus, la caractérisation isotopique des AG des protistes autotrophes et hétérotrophes permettrait

d'estimer leur contributions respectives aux teneurs en AGPI des proies planctoniques et épibenthiques ingérées par les juvéniles de *L. saliens* (Bec et al. soumis).

## 6.3. QUALITE NUTRITIONNELLE DES RESSOURCES ALIMENTAIRES POUR LES JUVENILES DE *Liza saliens*

Au moment de la colonisation de la lagune Vassova, le passage des juvéniles de *L. saliens* du milieu planctonique marin vers le milieu benthique lagunaire se traduit par une diminution sensible des apports alimentaires en DHA. Parallèlement, les apports en AGPI à 18 carbones semblent devenir plus importants et pourraient constituer une contrainte supplémentaire à l'intégration du DHA dans les tissus de *L. saliens* (Sargent et al. 1999). Dans un contexte de forte croissance somatique chez les jeunes *L. saliens*, ceci pourrait s'avérer préjudiciable, puisque le DHA est un constituant majeur des lipides membranaires nécessaires à la fabrication de nouveaux tissus. Par ailleurs, une carence en cet AGE au niveau des tissus nerveux pourrait affecter l'efficacité de prédation et d'évasion des juvéniles de *L. saliens,* les rendant ainsi moins aptes à se nourrir et plus sensibles à la prédation comme cela a pu être montré chez d'autres espèces (Bell & Sargent 1996, Masuda & Tsukamoto 1999).

Il apparaît donc qu'au cours de leur phase de vie lagunaire, les juvéniles de *L. saliens* sont confrontés à une diminution de la qualité nutritionnelle. Nos résultats confirment ceux obtenus pour d'autres espèces de poissons dans d'autres types de nourriceries tels que des estuaires ou des herbiers de zostère côtiers (Copeman et al. 2009, Copeman et al. 2008, Veloza 2005) et suggèrent que l'importance fonctionnelle des nourriceries n'est probablement pas justifiée dans tous les cas, en ce qui concerne l'hypothétique qualité nutritionnelle supérieure des ressources trophiques présentes. Ainsi, l'utilisation des nourriceries constituerait plutôt un compromis entre des apports nutritionnels de moindre qualité et des avantages tels qu'une plus grande abondance de proies, une moindre exposition à la prédation et aux forçages physiques, voire à des températures plus favorables au développement.

En perspective, Il apparaît important de s'interroger sur l'importance que représente la phase de vie larvaire pélagique de *L. saliens* dans les processus d'accumulation de DHA. De nombreuses études ont, en effet, démontré l'influence du passé nutritionnel acquis au cours de cette phase sur la survie des juvéniles après installation sur les nourriceries (Bergenius et al. 2002, Campana 1996, Hamilton 2008). De manière similaire, il a été montré que certains crustacés associées aux cheminées hydrothermales constituent d'importantes réserves d'AGPI pendant leur phase larvaire planctonique ; ce qui leur permet de faire face à l'absence de

nourriture riche en ces composés, une fois le stade de vie benthique atteint (Pond et al. 2000). L'hypothèse selon laquelle l'accumulation de DHA lors de la phase pélagique larvaire déterminerait grandement le recrutement en milieu lagunaire devrait donc être testée. L'injection d'élastomère visible (IEV) offre des perspectives très intéressantes pour les marquage des très petits poissons (Frederick 1997). En effet, ce type de marquage permet de marquer les alevins, persiste plusieurs mois et ne représente à priori aucune contrainte pour les jeunes poissons. Il serait donc envisageable d'implanter simultanément dans la lagune plusieurs lots d'alevins marqués présentant des teneurs corporelles en DHA manipulées en aquaculture. On pourrait ainsi, lors de la re-capture quelques semaines plus tard, estimer l'influence de la teneur corporelle en DHA sur leur taux de survie.

## 6.4. ORIGINE DES ACIDES GRAS ESSENTIELS AU DEVELOPPEMENT LES JUVENILES DE *Liza saliens*

Un des objectifs majeurs de ce travail était de déterminer l'origine des AG assimilés par *L. saliens* et plus particulièrement celle des AGPI. L'emploi de l'AICS s'est avéré d'un grand intérêt pour répondre à cet objectif. En effet nous avons pu, au fur à mesure de la colonisation de la lagune, associer les AG de *L. saliens* à une source benthique ou pélagique. Ces résultats nous ont permis de mieux cerner les causes de la forte diminution de DHA chez les alevins ayant adopté un régime alimentaire benthique. Il est ainsi apparu que, dans la lagune Vassova, cette molécule essentielle est synthétisée principalement par les microorganismes du compartiment planctonique. Dés lors et bien que nettement réduits après le passage vers un régime alimentaire benthique, les apports en DHA pour *L. saliens* sont restés d'origine planctonique.

De façon plus générale, notre étude montre que les sources de matière organique représentant un apport énergétique mineur pour un organisme, peuvent toutefois avoir une grande importance en tant que source principale d'un composé essentiel donné. Il reste donc à savoir si ce découplage entre transfert énergétique et transfert de composés essentiels (AG, stérols, acides aminés) est un phénomène courant dans les milieux aquatiques caractérisés par une forte hétérogénéité spatiale. Si tel était le cas, l'AICS se présenterait alors comme un outil analytique indispensable à la compréhension du fonctionnement des réseaux trophiques. Néanmoins, afin de pouvoir utiliser cette approche de façon optimale, il apparaît indispensable de pouvoir assigner un composé essentiel à sa source avec une précision taxonomique. Une telle précision nécessitera non seulement de connaitre le $\delta^{13}C$ du composé

recherché dans la source mais aussi de mieux comprendre les mécanismes de fractionnement isotopique lors de son transfert trophique.

## 6.5. DYNAMIQUE D'INTEGRATION DU SIGNAL ISOTOPIQUE DANS LES ACIDES GRAS ISSUS DES LIPIDES NEUTRES ET POLAIRES

Le suivi de la migration de *L. saliens* et l'étude des changements s'opérant au niveau de son régime alimentaire nous ont permis, d'étudier la dynamique de l'intégration du signal isotopique dans les lipides de ce poisson. En mettant en évidence une réponse plus rapide aux changements alimentaires du $\delta^{13}C$ des AG issus des LN nous avons pu montrer qu'ils présentaient un taux de renouvellement plus important que celui des LP. Il semble ainsi que l'analyse isotopique des AG provenant des LN permet un suivi plus fin des changements alimentaires que celle des AG issus du *pool* lipidique total. Cependant, nous avons observé une importante variabilité interindividuelle des $\delta^{13}C$ des AG issus des LN qui pourrait, dans certains cas, masquer des variations d'origine alimentaire. Cette variabilité pourrait refléter des états physiologiques différents entre les alevins. A l'heure actuelle, il est possible d'envisager que les fractionnements isotopiques qui ont lieu au cours du catabolisme des AG conduisent à un enrichissement en $^{13}C$ des AG résiduels (Vogler & Hayes 1979). De ce fait, le catabolisme plus ou moins intense d'un AG dans les LN pourrait conduire à une variabilité interindividuelle élevée. Ceci pourrait toutefois être vérifié expérimentalement sur des organismes soumis à un jeûne et obligés de cataboliser leurs réserves lipidiques (Veefkind 1997). En conséquence, l'utilisation du $\delta^{13}C$ des AG issus des LN en tant que biomarqueurs des relations trophiques nécessite que les nourritures considérées présentent des $\delta^{13}C$ suffisamment différents (Bec et al. soumis). A ce propos, les LP semblent offrir une mesure moins sensible mais également moins influencée par le « bruit de fond » métabolique individuel comme en témoignent les plus petits écarts-types calculés sur les $\delta^{13}C$ moyens des AG issus des LP de *Liza saliens*.

## 6.6 ROLE DES ACIDES GRAS POLYINSATURES DANS LE RESEAU TROPHIQUE DE LA LAGUNE VASSOVA

Dans le cadre de cette étude il a été mis en évidence que tous les AG ne sont pas retenus de la même manière dans le réseau trophique de Vassova. En effet, on observe à chaque niveau trophique un enrichissement préférentiel des lipides des consommateurs en AGPI. Cette accumulation préférentielle reflète, d'une part, la différence entre les besoins physiologiques des organismes et la composition de leur nourriture, et d'autre part, le

potentiel limitant de ces molécules dans cet écosystème. Afin de survenir à leurs besoins physiologiques, les organismes doivent donc ajuster leur composition corporelle en retenant certains AG de manière préférentielle (Hessen & Leu 2006). Dans le cas des crustacés planctoniques et épibenthiques qui se nourrissent sur des *pools* particulaires complexes, l'accumulation de certains AG pourrait également être le résultat d'une alimentation sélective et/ou de bioconversions. Dans la lagune Vassova, les crustacés épibenthiques semblent avoir un rôle central et tant que proies pour la plupart des espèces de poissons étudiées. En conséquence, leur aptitude à se développer sur des ressources pauvres en AGPI tout en accumulant ces molécules qui favorisent la croissance des poissons est un processus clé structurant les réseaux trophiques lagunaires.

Le DHA et l'EPA sont les principaux AGPI des LP chez les poissons marins et en conséquence considérés comme ceux qui sont le plus retenus (Tocher et al. 2008). Toutefois, nous avons montré que la rétention de l'ARA est au moins aussi élevée chez la plupart des poissons de la lagune soulignant également l'importance de ce composé pour les poissons estuariens. Il nous semble que la disponibilité de l'ARA doit être considérée, au même titre que celles du DHA et de l'EPA, comme un facteur nutritionnel déterminant pour la survie et la croissance des poissons dans la lagune Vassova. Chez plusieurs espèces de poissons les besoins en ARA semblent s'accroître à certaines phases de leur cycle de vie, notamment pendant des phases de stress physiologique ou de croissance intense (Bell & Sargent 2003). Ainsi, l'élucidation des raisons de la rétention de cet AGE par les espèces étudiées permettrait d'approfondir notre connaissance du rôle fonctionnel de la phase de vie lagunaire et des contraintes physiologiques qu'elle impose.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Abecasis D, Erzini K** (2008) Site fidelity and movements of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in a coastal lagoon (Ria Formosa, Portugal). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 79: 758-763

**Aberle N, Hansen T, Boettger-Schnack R, Burmeister A, Post A, Sommer U** (2009) Differential routing of "new" nitrogen toward higher trophic levels within the marine food web of the Gulf of Aqaba, Northern Red Sea. *Marine Biology*:

**Able KW** (2005) A re-examination of fish estuarine dependence: Evidence for connectivity between estuarine and ocean habitats. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 64: 5-17

**Ackman R** (1980) Fish lipids. In: Connell JJ (ed) Advances in fish science and technology. Fishing News Books, Farnham, pp 86-103

**Ackman R** (1989) Marine biogenic lipids, fats and oils. CRC Press, Boca Raton

**Ackman R** (1998) Lipids in marine and freshwater organisms. In: Arts M, Wainman BC (eds) Lipids in Freshwater Ecosystems. Springer, New York, pp 263-298

**Adams M** (1998) Ecological role of lipids in the health and success of fish populations. In: Arts MT, Wainman BC (eds) Lipids in freshwater ecosystems, pp 132-153

**Ahlgren G, Lundstedt L, Brett M, Forsberg C** (1990) Lipid-composition and food quality of some fresh-water phytoplankton for cladoceran zooplankters. *Journal of Plankton Research* 12: 809-818

**Ahlgren G, Van Nieuwerburgh L, Wanstrand I, Pedersen M, Boberg M, Snoeijs P** (2005) Imbalance of fatty acids in the base of the Baltic Sea food web - a mesocosm study. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62: 2240-2253

**Akin S, Buhan E, Winemiller KO, Yilmaz H** (2005) Fish assemblage structure of Koycegiz Lagoon-Estuary, Turkey: Spatial and temporal distribution patterns in relation to environmental variation. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 64: 671-684

**Albertini-Berhaut J** (1980) Biologie des stades juveniles de *Mugilidae* dans la région marseillaise: Croissance, régime alimentaire et activités enzymatiques digestives. PhD dissertation. In: Université d'Aix-Marseille II, p 156

**Albon SD, Langvatn R** (1992) Plant phenology and the benefits of migration in a temperate Ungulate. *Oikos* 65: 502-513

**Alfaro AC, Thomas F, Sergent L, Duxbury M** (2006) Identification of trophic interactions within an estuarine food web (northern New Zealand) using fatty acid biomarkers and stable isotopes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 70: 271-286

**Almany GR, Webster MS** (2006) The predation gauntlet: early post-settlement mortality in reef fishes. *Coral Reefs* 25: 19-22

**Almeida PR** (2003) Feeding ecology of *Liza ramada* (Risso, 1810) (Pisces, *Mugilidae*) in a south-western estuary of Portugal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 57: 313-323

**Amanieu M, Lasserre G** (1981) Niveaux de production des lagunes littorales méditerranéennes et contribution des lagunes à l'enrichissement des pêches démersales. In: Symposium on Management of Living Resources in the Mediterranean Coastal Area. Etudes et revues-Conseil général des pêches pour la Méditerranée, Palma de Mallorca, Spain, pp 75-85

**Arendt JD** (1997) Adaptive intrinsic growth rates: An integration across taxa. *Quarterly Review of Biology* 72: 149-177

**Arias A** (1980) Growth, food and reproductive habits of sea bream (*Sparus aurata* L.) and sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in the esteros (fish ponds) of Cadiz. *Investigacion Pesquera* 44: 59–83

**Arts M, Ackman R, Holub B** (2001a) "Essential fatty acids" in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58: 122-137

**Arts MT, Kohler C** (2009) Health and condition in fish: the influence of lipids on membrane competency and immune responce. In: Arts M, Brett M, Kainz M (eds) Lipids in Aquatic Ecosystems. Springer, New York, pp 237-255

**Arts MT** (1998) Lipids in freshwater zooplankton: selected ecological and physiological aspects. In: Wainman BC (ed) Lipids in freshwater ecosystems, pp 71-86

**Arts MT, Ackman RG, Holub BG** (2001b) " Essential fatty acids " in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 58: 122-137

**Atienza D, Calbet A, Saiz E, Alcaraz M, Trepat I** (2006) Trophic impact, metabolism, and biogeochemical role of the marine cladoceran *Penilia avirostris* and the co-dominant copepod *Oithona nana* in NW Mediterranean coastal waters. *Marine Biology* 150: 221–235

**Atkinson A** (1994) Diets and feeding selectivity among the epipelagic copepod community near South Georgia in summer. *Polar Biology* 14: 551–560

**Azovsky AI, Saburova MA, Chertoprood ES, Polykarpov G** (2005) Selective feeding of littoral harpacticoids on diatom algae: hungry gourmands? *Marine Biology* 148: 327–337

**Baldo F, Drake P** (2002) A multivariate aproach to the feeding habits of small fishes in the Guadalquivir Estuary. *Journal of Fish Biology* 61: 21-32

**Bec A** (2003) Flux de matiere dans le reseaux trophique planctonique du lac d'Annecy: Approche experimentale et *in situ* par des acides gras marqueurs et leurs rapports isotopiques (ä$^{13}$C). 216pp. *Thèse de Doctorat. Université de Savoie*:

**Bec A, Desvilettes C, Véra A, Fontvieille D, Bourdier G** (2003a) Nutritional value of different food sources for the benthic *Daphnidae Simocephalus vetulus*: role of fatty acids. *Archiv fur Hydrobiologie* 156: 145–163

**Bec A, Desvilettes C, Véra A, Lemarchand C, Fontvieille D, Bourdier G** (2003b) Nutritional quality of a freshwater heterotrophic flagellate: trophic upgrading of its microalgal diet for *Daphnia hyalina*. *Aquatic Microbial Ecology* 32: 203–207

**Bec A, Martin-Creuzburg D, Von Elert E** (2006) Trophic upgrading of autotrophic picoplankton by the heterotrophic nanoflagellate *Paraphysomonas sp*. *Limnology and Oceanography* 51: 1699-1707

**Bec A, Perga M, Koussoroplis A-M, Bardoux G, Desvilettes C, Bourdier G, Mariotti A** (soumis) Does the stable isotope composition of fatty acids in *Daphnia* reflect that of its diet? Implications for fatty acid specific stable isotope analyses to trace the dietary sources of consumers' fatty acids in the field.

**Beck M, Heck K, Able K et al.** (2001) The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *BioScience* 51: 633-641

**Bell JG, Sargent J** (1996) Lipid nutrition and fish recruitment. *Marine Ecology-Progress Series* 134: 315-316

**Bell JG, Sargent JR** (2003) Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218: 491-499

**Bell JG, Tocher DR, Farndale BM, Cox DI, McKinney RW, Sargent JR** (1997) The effect of dietary lipid on polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing Parr-Smolt transformation. *Lipids* 32: 515-525

**Bell MV, Batty R, Dick J, Fretwell K, Navarro J, Sargent J** (1995) Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L). *Lipids* 30: 443-449

**Bell MV, Tocher D** (2009) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. In: Arts M, Brett M, Kainz M (eds) Lipids in Aquatic Ecosystems. Springer, New York, pp 211-236

**Bell MV, Pond D** (1996) Lipid composition during growth of motile and coccolith forms of Emiliania huxleyi. *Phytochemistry* 41: 465-471

**Bergenius M, Meekan M, Robertson D, McCormick M** (2002) Larval growth predicts the recruitment success of a coral reef. *Oecologia* 131: 521–525

**Blanco S, Romo S, Villena MJ, Martinez S** (2003) Fish communities and food web interactions in some shallow Mediterranean lakes. *Hydrobiologia* 506: 473-480

**Bonga SEW** (1997) The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77: 591-625

**Boschker HTS, de Brouwer JFC, Cappenberg TE** (1999) The contribution of macrophyte-derived organic matter to microbial biomass in salt-marsh sediments: Stable carbon isotope analysis of microbial biomarkers. *Limnology and Oceanography* 44: 309-319

**Boschker HTS, Middelburg JJ** (2002) Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 40: 85-95

**Bosley KL, Wainright SC** (1999) Effects of preservatives and acidification on the stable isotope ratios (N-15 : N-14, C-13 : C-12) of two species of marine animals. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56: 2181-2185

**Bourdier G, Amblard C** (1989) Lipids in *Acanthodiaptomus denticornis* during starvation and fed on three different algae. *Journal of Plankton Research* 11: 1201-1212

**Bradford MJ, Cabana G** (1997) Interannual variability in stage specific survival rates and the causes of recruitment variation. In: Chambers RC, Trippel EA (eds) Early Life History and Recruitment in Fish Populations. Chapman & Hall, London, p 469–493

**Breteler W, Schogt N, Baas M, Schouten S, Kraay GW** (1999) Trophic upgrading of food quality by protozoans enhancing copepod growth: role of essential lipids. *Marine Biology* 135: 191-198

**Brett MT, Muller-Navara D, Perrson J** (2009) Crustacean zooplankton fatty acid composition. In: Arts M, Brett M, Kainz M (eds) Lipids in aquatic ecostystems. Springer, New York, pp 115-146

**Brett MT, Muller-Navarra D** (1997) The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic food web processes. *Freshwater Biology* 38: 483-499

**Budge SM, Parrish CC, Mckenzie CH** (2001) Fatty acid composition of phytoplankton, settling particulate matter and sediments at a sheltered bivalve aquaculture site. *Marine Chemistry* 76: 285-303

**Budge SM, Wooller MJ, Springer AM, Iverson SJ, McRoy CP, Divoky GJ** (2008) Tracing carbon flow in an arctic marine food web using fatty acid-stable isotope analysis. *Oecologia* 157: 117–129

**Bunn SE, Loneragan NR, Kempster MA** (1995) Effects of acid washing on stable-isotope ratios of C and N in penaeid shrimp and seagrass - Implications for food-web studies using multiple stable isotopes. *Limnology and Oceanography* 40: 622-625

**Cabana G, Rasmussen. J** (1994) Modelling food chain structure and contaminant bioaccumulation using stable nitrogen isotopes. *Nature* 372: 255-257

**Calder PC** (2009) Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie* 91: 791-795

**Campana S** (1996) Year-class strength and growth rate in young Atlantic cod *Gadus morhua*. *Marine Ecology-Progress Series* 135: 21–26

**Canuel EA, Freeman KH, Wakeham SG** (1997) Isotopic compositions of lipid biomarker compounds in estuarine plants and surface sediments. *Limnology and Oceanography* 42: 1 570-1583

**Carabel S, Godinez-Dominguez E, Verisimo P, Fernandez L, Freire J** (2006) An assessment of sample processing methods for stable isotope analyses of marine food webs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 336: 254-261

**Cardona L** (2006) Habitat selection by grey mullets (Osteichthyes : Mugilidae) in Mediterranean estuaries: the role of salinity. *Scientia Marina* 70: 443-455

**Cardona L, Hereu B, Torras X** (2008) Juvenile bottlenecks and salinity shape grey mullet assemblages in Mediterranean estuaries. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 77: 623-632

**Cardona L, Royo P, Torras X** (2001) Effects of leaping grey mullet *Liza saliens* (Osteichthyes, *Mugilidae*) in the macrophyte beds of oligohaline Mediterranean coastal lagoons. *Hydrobiologia* 462: 233–240

**Carlier A, Riera P, Amouroux J-M, Bodiou J-Y, Escoubeyrou K, Desmalades M, Caparros J, Grémare A** (2007a) A seasonal survey of the food web in the Lapalme Lagoon (northwestern Mediterranean) assessed by carbon and nitrogen stable isotope analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 73: 299-315

**Carlier A, Riera P, Amouroux J-M, Bodiou J-Y, Grémare A** (2007b) Benthic trophic network in the Bay of Banyuls-sur-Mer (northwest Mediterranean, France): An assessment based on stable carbon and nitrogen isotopes analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 72: 1-15

**Carman KR, Fry B** (2002) Small-sample methods for delta C-13 and delta N-15 analysis of the diets of marsh meiofaunal species using natural-abundance and tracer-addition isotope techniques. *Marine Ecology-Progress Series* 240: 85-92

**Castell J, Blair T, Neil S et al.** (2003) The effect of different HUFA enrichment emulsions on the nutritional value of rotifers (*Brachionus plicatilis*) fed to larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquaculture International* 11: 109-117

**Chamberlain PM, BulI Dl, Black HIJ, Ineson P, Evershed RP** (2004) Lipid content and carbon assimilation in Collembola: implications for the use of compound-specific carbon isotope analysis in animal dietary studies. *Oecologia* 139: 325–335

**Changrui G, Hollander D** (1997) Differential contribution of bacteria to sedimentary organic matter in oxic and anoxic environments, Santa Monica Bassin, California. *Organic Geochemistry* 26: 545-563

**Christie WW** (1982) Lipid analyses, 2nd ed. Pergamon.

**Chu FLE, Lund ED, Podbesek JA** (2008) Quantitative significance of n-3 essential fatty acid contribution by heterotrophic protists in marine pelagic food webs. *Marine Ecology-Progress Series* 354: 85-95

**Claustre H, Poulet SA, Williams R, Benmlih F, Martinjezequel V, Marty JC** (1992) Relationship between the qualitative nature of particles and copepod feces in the Irish Sea. *Marine Chemistry* 40: 231-248

**Copeman L, Parrish C, Gregory R, Jamieson E, Wells J, Whiticar M** (2009) Fatty acid biomarkers in coldwater eelgrass meadows: elevated terrestrial input to the food web of age-0 Atlantic cod *Gadus morhua*. *Marine Ecology-Progress Series* 386: 237-251

**Copeman L, Parrish C, Gregory R, Wells J** (2008) Decreased lipid storage in juvenile Atlantic cod ( *Gadus morhua* ) during settlement in cold-water eelgrass habitat. *Marine Biology* 154: 823-832

**Copeman LA, Parrish CC** (2003) Marine lipids in a cold coastal ecosystem: Gilbert Bay, Labrador. *Marine Biology* 143: 1213-1227

**Copeman LA, Parrish CC, Brown JA, Harel M** (2002) Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210: 285-304

**Cordier M, Brichon G, Weber J, Zwingelstein G** (2002a) Changes in the fatty acid composition of phospholipids in tissues of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*)

during an annual cycle. Roles of environmental temperature and salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 133: 281–288

**Costa C, Cataudella S** (2007) Relationship between shape and trophic ecology of selected species of *Sparidae* of the Caprolace coastal lagoon (Central Tyrrhenian Sea). *Environmental Biology of Fishes* 78: 115-123

**Coul BC** (1999) Role of meiofauna in estuarine soft-bottom habitats. *Australian Journal of Ecology* 24: 327–343

**Coull BC** (1990) Are members of the meiofauna food for higher trophic Levels. *Transactions of the American Microscopical Society* 109: 233-246

**Craig H** (1957) Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 12: 133-149

**Dahl TM, Falk-Petersen S, Gabrielsen GW, Sargent JR, Hop H, Millar RM** (2003) Lipids and stable isotopes in common eider, black-legged kittiwake and northern fulmar: a trophic study from an Arctic fjord. *Marine Ecology-Progress Series* 256: 257-269

**Dalsgaard J, St. John M, Kattner G, Müller-Navarra D, Hagen W** (2003) Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in Marine Biology* 46: 225-230

**David V, Sautour B, Galois R, Chardy P** (2006) The paradox high zooplankton biomass-low vegetal particulate organic matter in high turbidity zones: What way for energy transfer? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 333: 202-218

**Davis KB** (2006) Management of physiological stress in finfish aquaculture. *North American Journal of Aquaculture* 68: 116-121

**de Figueiredo G, Nash R, Montagnes D** (2005) The role of the generally unrecognised microprey source as food for larval fish in the Irish Sea. *Marine Biology* 148: 395-404

**Dembitsky VM, Rezanka T, Rozentsvet OA** (1993) Lipid-Composition of 3 Macrophytes from the Caspian Sea. *Phytochemistry* 33: 1015-1019

**DeNiro M, Epstein S** (1977) Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science* 197: 261–263

**DeNiro M, Epstein S** (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica Cosmochimica Acta* 42: 495-506

**Desvilettes C, Bec A** (2009) Formation and transfer of fatty acids in aquatic microbial food webs – role of heterotrophic protists. In: Arts M, Brett M, Kainz M (eds) Lipids in Aquatic Ecosystems. Springer, New York, pp 25-42

**Desvilettes C, Bourdier G, Amblard C, Barth B** (1997) Use of fatty acids for the assessment of zooplankton grazing on bacteria, protozoans and microalgae. *Freshwater Biology* 38: 629-637

**Desvilettes C, Bourdier G, Breton JC, Combrouze P** (1994) Fatty-acids as organic markers for the study of trophic relationships in littoral Cladoceran communities of a pond. *Journal of Plankton Research* 16: 643-659

**Dini ML, Carpenter SR** (1992) Fish predators, food availability and diel vertical migration in *Daphnia*. *J Plank Res* 14: 359-377

**Dolbeth M, Martinho F, Leitao R, Cabral H, Pardal MA** (2007) Strategies of *Pomatoschistus minutus* and *Pomatoschistus microps* to cope with environmental instability. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 74: 263-273

**Duarte CM, Cebrian J** (1996) The fate of marine autotrophic production. *Limnology and Oceanography* 41: 1758-1766

**Dunstan GA, Volkman JK, Barrett SM, Leroi JM, Jeffrey SW** (1994) Essential polyunsaturated fatty-acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Phytochemistry* 35: 155-161

**Dunstan GA, Volkman JK, Jeffrey SW, Barrett SM** (1992) Biochemical composition of microalgae from the green algal classes *Chlorophyceae* and *Prasinophyceae* .2. Lipid Classes and Fatty-Acids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 161: 115-134

**Economidis P, Koutrakis ET, Apostolou A, Vassilev M, Pehlivanov L** (2009) Atlas of river Nestos fish fauna. Prefectural Authority of Drama-Kavala-Xanthi, NAGREF-Fisheries Research Institute and Bulgarian Academy of Sciences, Kavala, Greece

**Ederington MC, McManus GB, Harvey RH** (1995) Trophic transfer of fatty acids, sterols, and a triterpenoid alcohol between bacteria, a ciliate, and the copepod *Acartia tonsa*. *Limnology and Oceanography* 40:

**Eldho NV, Feller SE, Tristram-Nagle S, Polozov IV, Gawrisch K** (2003) Polyunsaturated docosahexaenoic vs docosapentaenoic acid - Differences in lipid matrix properties from the loss of one double bond. *Journal of the American Chemical Society* 125: 6409-6421

**Elliott M, Hemingway KL, Costello MJ et al.** (2002) Links between fish and other trophic levels. In: Elliott M, Hemingway KL (eds) Fishes in Estuaries. Blackwell Science, Oxford, p 124–216

**El-Sabaawi R, Dower JF, Kainz M, Mazumder A** (2009) Characterizing dietary variability and trophic positions of coastal calanoid copepods: insight from stable isotopes and fatty acids. *Marine Biology* 156: 225-237

**FAO** (2006) Fishery statistics. **Fleurence J, Gutbier G, Mabeau S, Leray C** (1994) Fatty-Acids from 11 Marine Macroalgae of the French Brittany Coast. *Journal of Applied Phycology* 6: 527-532

**Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH** (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509

**Foster RA, Paytan A, Zehr JP** (2009) Seasonality of N2 fixation and nifH gene diversity in the Gulf of Aqaba (Red Sea). *Limnology and Oceanography* 54: 219–233

**Fountoulaki E, Alexis MN, Nengas I, Venou B** (2003) Effects of dietary arachidonic acid (20 : 4n-6), on growth, body composition, and tissue fatty acid profile of gilthead bream fingerlings (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 225: 309-323

**France RL** (1995) Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: foodweb implications. *Marine Ecology-Progress Series* 124: 307-312

**Franco A, Elliott M, Franzoil P, Torricellil P** (2008a) Life strategies of fishes in European estuaries: the functional guild approach. *Marine Ecology-Progress Series* 354: 219-228

**Franco A, Franzoi P, Malavasi S, Riccato F, Torricelli P, Mainardi D** (2006) Use of shallow water habitats by fish assemblages in a Mediterranean coastal lagoon. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 66: 67-83

**Franco A, Franzoi P, Torricelli P** (2008b) Structure and functioning of Mediterranean lagoon fish assemblages: A key for the identification of water body types. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 79: 549-558

**Frederick JL** (1997) Evaluation of fluorescent elastomer injection as a method for marking small fish. *Bulletin of Marine Science* 61: 399-408

**Fukami K, Watanabe A, Fujita S, Yamaoka K, Nishijima T** (1999) Predation on naked protozoan microzooplankton by fish larvae. *Marine Ecology-Progress Series* 185: 285-291

**Gibson RN** (1994) Impact of habitat quality and quantity on the recruitment of juvenile fishes. *Netherlands Journal of Sea Research* 32: 191–206

**Gibson RN, Robb L, Wennhage H, Burrows MT** (2002) Ontogenetic changes in depth distribution of juvenile flatfishes in relation to predation risk and temperature on a shallow-water nursery ground. *Marine Ecology-Progress Series* 229: 233-244

**Gifford D, Dagg M** (1991) The microzooplankton–mesozooplankton link: consumption of planktonic protozoa by the calanoid copepods *Acartia tonsa* (Dana) and *Neocalanus plumchrus* (Murkukawa). *Mar Microb Food Webs* 5: 161–177

**Gisbert E, Cardona L, Castelló F** (1996) Resource partitioning among planktivorous fish larvae and fry in a Mediterranean coastal lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 43: 723–735

**Goericke R, Montoya J, Fry BJ** (1994) Physiology of isotopic fractionation in algae and cyanobacteria. In: Lajtha K, Michener R (eds) table isotopes in ecology and environmental sciences. Blackwell Scientific publications, Oxford, pp 187-122

**Grey J** (2000) Trophic fractionation and the effects of diet switch on the carbon stable isotopic 'signatures' of pelagic consumers. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 27: 3187-3191

**Grol MGG, Dorenbosch M, Kokkelmans EMG, Nagelkerken I** (2008) Mangroves and seagrass beds do not enhance growth of early juveniles of a coral reef fish. *Marine Ecology-Progress Series* 366: 137-146

**Guillaume J, Kaushik S, Bergot P et al.** (1999) Nutrition et alimentation des poissons et des crustacés. INRA éditions, Ifremer, Paris

**Guschina I, Harwood J** (2009) Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. In: Arts M, Brett M, Kainz M (eds) Lipids in Aquatic Ecosystems. Springer, New York, pp 1-24

**Hall D, Lee SY, Meziane T** (2006) Fatty acids as trophic tracers in an experimental estuarine food chain: Tracer transfer. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 336: 42-53

**Hamilton S** (2008) Larval history influences post-metamorphic condition in a coral-reef fish. *Oecologia* 158: 449-461

**Hammer Ø, Harper, D.A.T., and P. D. Ryan,** (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica.* 4(1): 9pp

**Harwood J, Russel N** (1984) Lipids in plants and microbes, London

**Henderson RJ, Millar RM, Sargent JR** (1995) Effect of growth temperature on the positional distribution of eicosapentaenoic acid and trans hexadecenoic acid in the phospholipids of a *Vibrio* species of bacterium. *Lipids* 30: 181-185

**Henderson RJ, Tocher DR** (1987) The lipid-composition and biochemistry of fresh-water fish. *Progress in Lipid Research* 26: 281-347

**Herzka SZ, Holt SA, Holt GJ** (2002) Characterization of settlement patterns of red drum *Sciaenops ocellatus* larvae to estuarine nursery habitat: a stable isotope approach. *Marine Ecology-Progress Series* 226: 143-156

**Hessen DO, Leu E** (2006) Trophic transfer and trophic modification of fatty acids in high Arctic lakes. *Freshwater Biology* 51: 1987-1998

**Hesslein RH, Hallard KA, Ramlal P** (1993) Replacement of sulfur, carbon, and nitrogen in tissue of growing broad whitefish (*Coregonus-nasus*) in response to a change in Diet traced by delta-S-34, delta-C-13 and delta-N-15. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50: 2071-2076

**Hlaili AS, Grami B, Niquil N, Gosselin M, Hamel D, Troussellier M, Mabrouk HH** (2008) The planktonic food web of the Bizerte lagoon (south-western Mediterranean)

during summer: I. Spatial distribution under different anthropogenic pressures. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 78: 61-77

**Hoey AS, McCormick MI** (2004) Selective predation for low body condition at the larval-juvenile transition of a coral reef fish. *Oecologia* 139: 23-29

**Hurst TP** (2007) Causes and consequences of winter mortality in fishes. *Journal of Fish Biology* 71: 315-345

**Hurst TP, Conover DO** (2003) Seasonal and interannual variation in the allometry of energy allocation.in juvenile striped bass. *Ecology* 84: 3360-3369

**Hyslop EJ** (1980) Stomach contents analysis - a review of methods and their application. *Journal of Fish Biology* 17: 411-429

**Islam MS, Tanaka M** (2005) Nutritional condition, starvation status and growth of early juvenile Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) related to prey distribution and feeding in the nursery ground. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 323: 172-183

**Islam MS, Tanaka M** (2006) Spatial variability in nursery functions along a temperate estuarine gradient: role of detrital versus algal trophic pathways. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63: 1848-1864

**Islam MS, Tanaka M** (2009) Diet and prey selection in larval and juvenile Japanese anchovy *Engraulis japonicus* in Ariake Bay, Japan. *Aquatic Ecology* 43: 549-558

**Izquierdo MS, Socorro J, Arantzamendi L, Hernandez-Cruz CM** (2000) Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 22: 97-107

**Jacob U, Mintenbeck K, Brey T, Knust R, Beyer K** (2005) Stable isotope food web studies: a case for standardized sample treatment. *Marine Ecology-Progress Series* 287: 251-253

**Jaschinski S, Brepohl DC, Sommer U** (2008) Carbon sources and trophic structure in an eelgrass *Zostera marina* bed, based on stable isotope and fatty acid analyses. *Marine Ecology-Progress Series* 358: 103-114

**Jones WB, Cifuentes LA, Kaldy JE** (2003) Stable carbon isotope evidence for coupling between sedimentary bacteria and seagrasses
in a sub-tropical lagoon. *Marine Ecology Progress Series* 255: 15–25

**Kademoglou E** (2009) Feeding behavior and intraspecific competition of *Atherina boyeri* (Risso, 1810) in the Lagoons of Nestos River (Greece). In: Department of Biological Applications and Technology, Laboratory of Zoology. University of Ioannina, Ioannina, Greece

**Kainz M, Arts MT, Mazumder A** (2004) Essential fatty acids in the planktonic food web and their ecological role for higher trophic levels. *Limnology and Oceanography* 49: 1784-1793

**Kaluzny M, Duncan L, Merritt M, Epps D** (1985) Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *J. Lipid Res.* 26: 135-140

**Kattner G, Hirche HJ, Krause M** (1989) Spatial variability in lipid-composition of calanoid copepods from Fram Strait, the Arctic. *Marine Biology* 102: 473-480

**Kayama M, Araki S, Sato S, Imbs AB** (1989) Lipids of marine plants. In: RG A (ed) Marine biogenic lipids, fats, and oils, vol 2. CRC Press, Boca Raton, pp 3-48

**Kharlamenko V, Kiyashko S, Imbs A, Vyshkvartzev D** (2001) Identification of food sources of invertebrates from the seagrass *Zostera marina* community using carbon and sulfur stable isotope ratio and fatty acid analyses. *Marine Ecology-Progress Series* 220: 103–117

**Kheriji S, El Cafsi M, Masmoudi W, Castell JD, Romdhane MS** (2003) Salinity and temperature effects on the lipid composition of mullet sea fry (*Mugil cephalus*). *Aquaculture international* 11: 571–582

**KKhotimchenko SV, Vaskovsky VE, Titlyanova TV** (2002) Fatty acids of marine algae from the pacific coast of north California. *Botanica Marina* 45: 17-22

**Kjerfve B** (1994) Coastal Lagoon Processes. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.:

**Knoppers B** (1994) Aquatic primary production in coastal lagoons. In: Kjervfe B (ed) Coastal Lagoon Processes. Elseviers, Amsterdam, pp 243-275

**Knox G** (1986) Estuarine ecosystems: a sytems approach. CRC Press, Boca Raton

**Kokkinakis A, Theodoridou A, Kallianiotis A** (1997) Variation in the structure of fish production at the lagoons of Nestos river delta and proposals for improving fish production. In: 8th Panhellenic Conference on Ichthyology

**Koussoroplis A-M, Bec A, Perga M-E, Koutrakis E, Desvilettes C, Bourdier G** (2010) Nutritional importance of minor dietary sources during settlement for leaping grey mullet *Liza saliens* (mugilidae): insights from fatty acid $\delta^{13}C$ analysis. *Marine Ecology-Progress Series* 404:207-217

**Koussoroplis AM, Lemarchand C, Bec A, Desvilettes C, Amblard C, Fournier C, Berny P, Bourdier G** (2008) From aquatic to terrestrial food webs: Decrease of the docosahexaenoic Acid/Linoleic acid ratio. *Lipids* 43: 461-466

**Koutrakis E** ( 2000) Fishery management in the lagoons of North Greece. Problems and proposals. In: Proceedings of the 9th Panhell.Conference on Ichthyology, Mesologgi, Greece, p 133–136

**Koutrakis ET** (1994) Biology and Population dynamics of grey mullets (Pisces:*Mugilidae*) in the lake Vistonis and the Lagoon of Porto-Lagos. *PhD dissertation. Aristotle University of Thessaloniki, 233pp*:

**Koutrakis ET** (2004) Temporal occurrence and size distribution of grey mullet juveniles (Pisces, *Mugilidae*) in the estuarine systems of the Strymonikos Gulf (Greece). *Journal of Applied Icthyology* 20: 76-78

**Koutrakis ET, Tsikliras AC, Sinis AI** (2005) Temporal variability of the icthyofauna in a Northern Aegean coastal lagoon (Greece). Influence of environmental factors. *Hydrobiologia* 543: 245-257

**Koven W, van Anholt R, Lutzky S, Ben Atia I, Nixon O, Ron B, Tandler A** (2003) The effect of dietary arachidonic acid on growth, survival, and cortisol levels in different-age gilthead seabream larvae (*Sparus auratus*) exposed to handling or daily salinity change. *Aquaculture* 228: 307-320

**Lajtha K, Michener R** (1994) Stable isotopes in ecology and environmental sciences. Blackwell Scientific Publications, Oxford

**Lands W** (2009) Human life: caught in the food web. In: Arts M, Brett MT, Kainz M (eds) Lipids in Aquatic Ecosystems. Springer, New York, pp 327-345

**Langworthy DE, Stapleton RD, Sayler GS, Findlay RH** (1998) Genotypic and phenotypic responses of a riverine microbial community to polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3422-3428

**Lau DCP, Leung KMY, Dudgeon D** (2009) Evidence of rapid shifts in the trophic base of lotic predators using experimental dietary manipulations and assimilation-based analyses. *Oecologia* 159: 767-776

**Le Cren E** (1951) The length-weight relatioship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology* 20: 201-219

**Leal JCM, Dubois S, Orvain F, Galois R, Blin JL, Ropert M, Bataille MP, Ourry A, Lefebvre S** (2008) Stable isotopes (delta C-13, delta N-15) and modelling as tools to estimate the trophic ecology of cultivated oysters in two contrasting environments. *Marine Biology* 153: 673-688

**Lee RF, Nevenzel J, Paffenhöfer G-A** (1971b) Importance of wax esters and ther lipids in the marine food chain: phytoplankton and copepods. *Marine Biology* 9: 99-108

**Leitao R, Martinho E, Neto JM, Cabral H, Marques JC, Pardal MA** (2006) Feeding ecology, population structure and distribution of *Pomatoschistus microps* (Kroyer, 1838) and *Pomatoschistus minutus* (Pallas, 1770) in a temperate estuary, Portugal. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 66: 231-239

**Leonardos I** ( 2008) The feeding ecology of *Aphanius fasciatus* (Valenciennes, 1821) in the lagoonal system of Messolongi (western Greece). *Scientia Marina* 72: 393-401

**Leonardos I, Sinis A** (2000) Age, growth and mortality of *Atherina boyeri* Risso, 1810 (Pisces : *Atherinidae*) in the Mesolongi and Etolikon lagoons (W-Greece). *Fisheries Research* 45: 81-91

**Leveille JC, Amblard C, Bourdier G** (1997) Fatty acids as specific algal markers in a natural lacustrian phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 19: 469-490

**Long WC, Seitz RD** (2008) Trophic interactions under stress: hypoxia enhances foraging in an estuarine food web. *Marine Ecology-Progress Series* 362: 59-68

**Lund ED, Chu FLE, Harvey E, Adlof R** (2008) Mechanism(s) of long chain n-3 essential fatty acid production in two species of heterotrophic protists: *Oxyrrhis marina* and *Gyrodinium dominans*. *Marine Biology* 155: 23-36

**Maci S, Basset A** (2009) Composition, structural characteristics and temporal patterns of fish assemblages in non-tidal Mediterranean lagoons: A case study. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 83: 602-612

**Mann K** (1988) Production and use of detritus in various freshwater, estuarine, and coastal marine ecosytems. *Limnology and Oceanography* 33: 910-930

**Margalef R** (1985) Introduction to the Mediterranean. In: Margalef R (ed) Western Mediterranean. Pergamon Press, Oxford, pp 1-16

**Mariotti A** (1983) Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural N-15 abundance measurements. *Nature* 303: 685-687

**Marshall JA, Nichols PD, Hallegraeff GM** (2002) Chemotaxonomic survey of sterols and fatty acids in six marine raphidophyte algae. *Journal of Applied Phycology* 14: 255-265

**Masuda R, Tsukamoto K** (1999) School formation and concurrent developmental changes in carangid fish with reference to dietary conditions. *Environmental Biology of Fishes* 56: 243-252

**Mayzaud P, Eaton CA, Ackman RG** (1976) Occurrence and distribution of octadecapentaenoic acid in a natural plankton population - Possible food-chain index. *Lipids* 11: 858-862

**Mazzoldi C, Rasotto MB** (2001) Extended breeding season in the marbled goby, *Pomatoschistus marmoratus* (Teleostei: *Gobiidae*), in the Venetian Lagoon. *Environmental Biology of Fishes* 61: 175-183

**McConnaughey T, McRoy C** (1979) Food-web structure and the fractionation of carbon isotopes in the Bering Sea. *Marine Biology* 53: 257–262

**McCutchan JH, Lewis WM, Kendall C, McGrath CC** (2003) Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulphur. *Oikos* 102: 378–390

**Meekan M, Fortier L** (1996) Selection for fast growth during the larval life of Atlantic cod *Gadus morhua* on the Scotian shelf. *Marine Ecology-Progress Series* 137: 25–37

**Meier-Augenstein W** (2002) Stable isotope analysis of fatty acids by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 465: 63-79

**Merritt MV, Rosenstein SP, Loh C, Chou RHS, Allen MM** (1991) A Comparison of the major lipid classes and fatty-acid composition of marine unicellular cyanobacteria with fresh-water species. *Archives of Microbiology* 155: 107-113

**Miller TJ, Crowder LB, Rice JA, Marschall EA** (1988) Larval size and recruitment mechanisms in fishes toward a conceptual framework. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45: 1657-1670

**Minagawa M, Wada E** (1984) Stepwise enrichementof $^{15}N$ along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}N$ and animal age. *Geochimica Cosmochimica Acta* 48: 1135-1140

**Mourente G, Tocher DR** (1993) Incorporation and metabolism of C-14-labeled polyunsaturated fatty-acids in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) *in vivo*. *Fish Physiology and Biochemistry* 10: 443-453

**Mudge SM, East JA, Bebianno MJ, Barreira LA** (1998) Fatty acids in the Ria Formosa Lagoon, Portugal. *Organic Geochemistry* 29: 963-977

**Murphy DE, Abrajano TA** (1994) Carbon Isotope Compositions of Fatty Acids in Mussels from Newfoundland Estuaries. *Estuar Coast Shelf Sci* 39: 261-272

**Nanton DA, Castell JD** (1998) The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe* sp, for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture* 163: 251-261

**Napolitano GE** (1998a) Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems. *In: Arts, M.T. & Wainman, B.C. eds. Lipids in freshwater ecosystems*: 21-44.

**Napolitano GE** (1998b) Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems. In: Wainman BC (ed) Lipids in freshwater ecosystems, pp 21-44

**Navarro J, Sargent J** (1992) Behavioural differences in starving herring *Clupea harengus* L. Larvae correlate with body levels of essential fatty acids. *Journal of Fish Biology* 41: 509-513

**Nichols PD, Jones GJ, Deleeuw JW, Johns RB** (1984) The fatty acid and sterol composition of 2 marine dinoflagellates. *Phytochemistry* 23: 1043-1047

**Nichols PD, Volkman JK, Hallegraeff GM, Blackburn SI** (1987) Sterols and fatty acids of the red tide flagellates *Heterosigma akashiwo* and *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). *Phytochemistry* 26: 2537-2541

**Nixon S** (1981) Nutrient dynamics, primary production and fisheries yields of lagoons. In: International symposium on coastal lagoons. Oceanologica Acta, Bordeaux, France, pp 357-371

**Olsen Y** (1998) Lipids and essential fatty acids in aquatic food webs. In: Arts MT, Wainman BC (eds) Lipids in freshwater ecosystems, pp 161-202

**Orfanidis S, Panayotidis P, Stamatis N** (2001) Ecological evaluation of transitional and coastal waters: A marine benthic macrophyte-based model. *Mediterranean Marine Science* 2: 45-65

**Orfanidis S, Stamatis N, Ragias V, Schramm W** (2005) Eutrophication patterns in an eastern Mediterranean coastal lagoons: Vassova, Delta Nestos, Macedonia, Greece. *Mediterranean Marine Science* 6: 17-30

**Orfanidis S, Stamatis N, Tsiagga Å, Ragias V, Schramm W** (2000) Eutrophication and marine benthic vegetation in the Lagoon of Vassova. In: 6th National Symposium of Oceanography and Fisheries, Prefecture of Kavala, Greece, pp 429-433

**Panfili J, Durand JD, Diop K, Gourene B, Simier M** (2005) Fluctuating asymmetry in fish otoliths and heterozygosity in stressful estuarine environments (West Africa). *Marine and Freshwater Research* 56: 505-516

**Pangle KL, Sutton TM, Kinnunen RE, Hoff MH** (2004) Overwinter survival of juvenile lake herring in relation to body size, physiological condition, energy stores, and food ration. *Transactions of the American Fisheries Society* 133: 1235-1246

**Parnell A, Inger R, Bearhop S, Jackson A** (2008) Stable isotope analysis in R. In:

**Parrish C** (2009) Essential fatty acids in aquatic food webs. In: Arts M, Brett M, Kainz M (eds) Lipids in aquatic ecosystems. Springer, New York, pp 309-326

**Passi S, Cataudella SF, Di Marco P, De Simone F, Rastrelli L** (2002) Fatty acid composition and antioxidant levels in muscle tissue of different Mediterranean marine species of fish and shellfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7314-7322

**Pedersen BH** (1997) The cost of growth in young fish larvae, a review of new hypotheses. *Aquaculture* 155: 259-269

**Pepin P, Dower J** (2007) Variability of the trophic position of larval fish in a coastal pelagic ecosystem based on stable isotope analysis. *Journal Plankton Research* 29: 727-737

**Perga ME, Gerdeaux D** (2005) 'Are fish what they eat' all year round? *Oecologia* 144: 598-606

**Perga ME, Kainz M, Matthews B, Mazumder A** (2006) Carbon pathways to zooplankton: insights from the combined use of stable isotope and fatty acid biomarkers. *Freshwater Biology* 51: 2041–2051

**Perry GJ, Volkman JK, Johns RB, Bavor HJ** (1979) Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 43: 1715-1725

**Persic A, Roche H, Ramade F** (2004) Stable carbon and nitrogen isotope quantitative structural assessment of dominant species from the Vaccares Lagoon trophic web (Camargue Biosphere Reserve, France). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 60: 261-272

**Phillips NW** (1984) Role of different microbes and substrates as potential suppliers of specific, essential nutrients to marine detritivores. *Bulletin of Marine Science* 35: 283–298

**Pita C, Gamito S, Erzini K** (2002) Feeding habits of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) from the Ria Formosa (southern Portugal) as compared to the black seabream (*Spondyliosoma cantharus*) and the annular seabream (*Diplodus annularis*). *Journal of Applied Ichthyology* 18: 81-86

**Planes S, Lecchini D, Romans P, Mills SC** (2009) Effects of post-settlement mortality on size and parasite load in juvenile *Diplodus vulgaris* and *D. sargus* in the Mediterranean. *Aquatic Biology* 6: 153-158

**Poizat G, Rosecchi E, Chauvelon P, Contournet P, Crivelli AJ** (2004) Long-term fish and macro-crustacean community variation in a Mediterranean lagoon. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 59: 615-624

**Pond D, Dixon D, Bell M, Fallick A, Sargent J** (1997a) Occurrence of 16:2(n-4) and 18:2(n-4) fatty acids in the lipids of the hydrothermal vent shrimps R*imicaris exoculata* and *Alvinocaris markensis*: nutritional and trophic implications. *Marine Ecology-Progress Series* 156: 167-174

**Pond DW, Gebruk A, Southward EC, Southward AJ, Fallick AE, Bell MV, Sargent JR** (2000) Unusual fatty acid composition of storage lipids in the bresilioid shrimp *Rimicaris exoculata* couples the photic zone with MAR hydrothermal vent sites. *Marine Ecology-Progress Series* 198: 171-179

**Pond DW, Harris RP** (1996) The lipid composition of the coccolithophore *Emiliania huxleyi* and its possible ecophysiological significance. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 76: 579-594

**Pond DW, Leakey RJG, Fallick AE** (2006) Monitoring microbial predator-prey interactions: an experimental study using fatty acid biomarker and compound-specific stable isotope techniques. *Journal of Plankton Research* 28: 419-427

**Pond DW, Segonzac M, Bell MV, Dixon DR, Fallick AE, Sargent JR** (1997b) Lipid and lipid carbon stable isotope composition of the hydrothermal vent shrimp *Mirocaris*

*fortunata*: evidence for nutritional dependence on photosynthetically fixed carbon. *Marine Ecology-Progress Series* 157: 221-231

**Post D** (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods and assumptions. *Ecology* 83: 703-718

**Post DM, Layman CA, Arrington DA, Takimoto G, Quattrochi J, Montana CG** (2007) Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia* 152: 179-189

**Rainuzzo JR, Reitan KI, Olsen Y** (1997) The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 155: 103-115

**Raven J, Johnston A, Newman J, Scrimgeour C** (1994) Inorganic carbon acquisition by aquatic photolithotrophs of the Dighty Burn, Angus, U.K.: uses and limitations of natural abundance measurements of carbon isotopes. *New Phytologist* 127: 271-286

**Razinkovas A, Gasiunaité Z, Viaroli P, Zaldivar JM** (2008) Preface: European lagoons—need for further comparison across spatial and temporal scales. *Hydrobiologia* 611: 1–4

**Recks MA, Seaborn GT** (2008) Variation in fatty acid composition among nine forage species from a southeastern US estuarine and nearshore coastal ecosystem. *Fish Physiology and Biochemistry* 34: 275-287

**Reuss N, Poulsen LK** (2002) Evaluation of fatty acids as biomarkers for a natural plankton community. A field study of a spring bloom and a post-bloom period off West Greenland. *Marine Biology* 141: 423-434

**Richoux N, Froneman P** (2008) Trophic ecology of dominant zooplankton and macrofauna in a temperate, oligotrophic South African estuary: a fatty acid approach. *Marine Ecology-Progress Series* 357: 121–137

**Rieley G, Dover CLV, Hedrick DB, Eglinton G** (1999) Trophic ecology of *Rimicaris exoculata*: a combined lipid abundance/stable isotope approach. *Marine Biology* 133: 495-499

**Rittenhouse TAG, Semlitsch RD, Thompson FR** (2009) Survival costs associated with wood frog breeding migrations: effects of timber harvest and drought. *Ecology* 90: 1620-1630

**Roff JC, Turner JT, Webber MK, Hopcroft RR** (1995) Bacterivory by tropical copepod nauplii : extent and possible significance. *Aquatic Microbial Ecology* 9: 165-175

**Ronnestad I, Thorsen A, Finn RN** (1999) Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture* 177: 201-216

**Ruiz GM, Hines AH, Posey MH** (1993) Shallow-water as a refuge habitat for fish and crustaceans in nonvegetated estuaries - an example from Chesapeake Bay. *Marine Ecology-Progress Series* 99: 1-16

**Russo T, Costa C, Cataudella S** (2007) Correspondence between shape and feeding habit changes throughout ontogeny of gilthead sea bream *Sparus aurata* L., 1758. *Journal of Fish Biology* 71: 629-656

**Rypel AL, Layman CA, Arrington DA** (2007) Water depth modifies relative predation risk for a motile fish taxon in Bahamian tidal creeks. *Estuaries and Coasts* 30: 518-525

**Sargent J, Bell G, McEvoy L, Tocher D, Estevez A** (1999a) Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177: 191–199

**Sargent J, Bell MV, Tocher DR** (1993a) Docosohexaenoic acid and the development of brain and retina in marine fish. In: Drevon C, Baksaas I, Krokan H (eds) Omega-3 Fatty Acids: Metabolism and Biological Effects. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp 139-149

**Sargent J, Henderson RJ, Tocher DR** (1989) The lipids. In: Halver JE (ed) Fish nutrition. Academic Press, San Diego, pp 153-218

**Sargent J, McEvoy L, Estevez A, Bell G, Bell M, Henderson J, Tocher D** (1999b) Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179: 217–229

**Sargent J, Parkes R, Mueller Harvey I, Henderson J** (1987) Lipid markers in marine ecology. In: Sleigh M (ed) Microbes in the sea. Ellis Horwood, Chicester, pp 54-64

**Sargent J, Whittle K** (1981) Lipids and hydrocarbons in the marine food web. In: Longhurst A (ed) Analysis of marine ecosystems, pp 491-533

**Sargent JR, Bell JG, Bell MV, Henderson RJ, Tocher DR** (1993b) The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. In: Lahlou B, Vitiello P (eds) Aquaculture: Fundamental and applied research. American Geophysical Union, Washington, pp 103-124

**Sargent JR, Bell JG, Bell MV, Henderson RJ, Tocher DR** (1995) Requirement criteria for essential fatty acids. *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie* 11: 183-198

**Sauriau P-G, Kang C-K** (2000) Stable isotope evidence of benthic microalgae-based growth and secondary production in the suspension feeder *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia) in the Marennes-Oleron Bay. *Hydrobiologia* 440: 317-329

**Schmitz G, Ecker J** (2008) The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research* 47: 147-155

**Scribe P, Fillaux J, Laureillard J, Denant V, Saliot A** (1991) Fatty-acids as biomarkers of planktonic inputs in the stratified estuary of the Krka River, Adriatic Sea - relationship with pigments. *Marine Chemistry* 32: 299-312

**Searcy SP, Sponaugle S** (2001) Selective mortality during the larval-juvenile transition in two coral reef fishes. *Ecology* 82: 2452-2470

**Sfriso A, Marcomini A** (1996) Decline of *Ulva* growth in the lagoon of Venice. *Bioresource technology* 58: 299-307

**Sherr EB, Sherr BF** (2002) Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81: 293-308

**Skalli A, Robin JH, Le Bayon N, Le Delliou H, Person-Le Ruyet J** (2006) Impact of essential fatty acid deficiency and temperature on tissues' fatty acid composition of European sea bass (Dicentrarchus labrax). *Aquaculture* 255: 223-232

**Sogard SM** (1997) Size-selective mortality in the juvenile stage of teleost fishes: a review. *Bulletin of Marine Sciences* 60: 1129–1157

**Sorokin J** (1981) Microheterotrophic organisms isn marine ecosystems:. In: Longhurst A (ed) Analysis in Marine Ecosystems. Academic Press, London, pp 293-342

**St. John M, Lund ED** (1996) Lipid biomarkers: linking the utilisation of frontal plankton biomass to enhaced conditions of juvenile North Sea cod. *Marine Ecology-Progress Series* 131: 75-85

**Suau P, Lopez J** (1976) Contribution to knowledge of biology of Gilt-Head (*Sparus aurata* L.). *Investigacion Pesquera* 40: 169–199

**Sylaios G, Theocharis V** (2002) Hydrology and nutrient enrichment at two coastal lagoon systems in Northern Greece. *Water Resources Management* 16: 171-196

**Sylaios G, Tsihrintzis VA, Akratos C, Tsikliras A, Haralambidou K** (2003) Residual currents and fluxes though the mouth of Vassova coastal lagoon. *Mediterranean Marine Science* 4: 4-17

**Taylor J, Parkes RJ** (1983) The cellular fatty-acids of the sulfate-reducing bacteria, *Desulfobacter* sp, *Desulfobulbus* sp and *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of General Microbiology* 129: 3303-3309

**Tenore K** (1983) What controls the availability to animals of detritus derived from vascular plants — organic nitrogen enrichment or caloric availability. *Marine Ecology-Progress Series* 10: 307–309

**Thorrold SR, Jones CM, Swart PK, Targett TE** (1998) Accurate classification of juvenile weakfish *Cynoscion regalis* to estuarine nursery areas based on chemical signatures in otoliths. *Marine Ecology-Progress Series* 173: 253-265

**Tocher DR** (2003) Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* 11: 107-184

**Tocher DR, Bell JG, Dick JR, Henderson RJ, McGhee F, Michell D, Morris PC** (2000) Polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation and the effects of dietary linseed and rapeseed oils. *Fish Physiology and Biochemistry* 23: 59-73

**Tocher DR, Bendiksen EÅ, Campbell PJ, Bell JG** (2008) The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture* 280: 21-34

**Trobajo R, Quintana XD, Moreno-Amich R** (2002) Model of alternative predominance of phytoplankton-periphyton-macrophytes in lentic waters of Mediterranean coastal wetlands. *Archiv fur Hydrobiologie* 154: 19-40

**Tsihrintzis VA, Sylaios GK, Sidiropoulou M, Koutrakis ET** (2007) Hydrodynamic modeling and management alternatives in a Mediterranean, fishery exploited, coastal lagoon. *Aquacultural Engineering* 36: 310–324

**Turich C, Freeman KH, Bruns MA, Conte M, Jones AD, Wakeham SG** (2007) Lipids of marine Archaea: Patterns and provenance in the water-column and sediments. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 71: 3272-3291

**Van Anholt RD, Spanings EAT, Koven WM, Nixon O, Bonga SEW** (2004) Arachidonic acid reduces the stress response of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Journal of Experimental Biology* 207: 3419-3430

**Van den Meersche K, Van Rijswijk P, Soetaert K, Middelburg J** (2009) Autochthonous and allochthonous contributions to mesozooplankton diet in a tidal river and estuary: Integrating carbon isotope and fatty acid constraints. *Limnology and Oceanography* 54: 62–74

**Vander Zanden MJ, Casselman JM, Rasmussen JB, ,** (1999) Stable isotope evidence for the food web consequences of species invasions in lakes. *Nature* 401: 464–467

**Vanni MJ, Lampert W** (1992) Food Quality Effects on Life-History Traits and Fitness in the Generalist Herbivore Daphnia. *Oecologia* 92: 48-57

**Vargas MA, Rodriguez H, Moreno J, Olivares H, Del Campo JA, Rivas J, Guerrero MG** (1998) Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *Journal of Phycology* 34: 812-817

**Veefkind RJ** (2003) Carbon isotope ratios and composition of fatty acids: Tags and trophic markers in pelagic organisms., 279 pp. *PhD Thesis. Utrecht University*:

**Veloza AJ** (2005) Tranfert of essential fatty acids by marine plankton. In: Faculty of the School of Marine Science. William and Mary College, Gloucesters point, VA, p 106

**Veloza AJ, Chu FL, Tang KW** (2006) Trophic modification of essential fatty acids by heterotrophic protists and its effects on the fatty acid composition of the copepod *Acartia tonsa*. *Marine Biology* 148: 779-788

**Vinagre C, Salgado J, Costa MJ, Cabral HN** (2008) Nursery fidelity, food web interactions and primary sources of nutrition of the juveniles of *Solea solea* and *S. senegalensis* in the Tagus estuary (Portugal): A stable isotope approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76: 255-264

**Viso AC, Marty JC** (1993) Fatty acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry* 34: 1521–1533

**Vizzini S, Mazzola A** (2003) Seasonal variations in the stable carbon and nitrogen isotope ratios ($^{13}C/^{12}C$ and $^{15}N/^{14}N$) of primary producers and consumers in a western Mediterranean coastal lagoon. *Marine Biology* 142: 1009–1018

**Vizzini S, Mazzola A** (2005) Feeding ecology of the sand smelt *Atherina boyeri* (Risso 1810) (Osteichthyes, *Atherinidae*) in the western Mediterranean: evidence for spatial variability based on stable carbon and nitrogen isotopes. *Environmental Biology of Fishes* 72: 259–266

**Vizzini S, Mazzola A** (2006) Sources and transfer of organic matter in food webs of a Mediterranean coastal environment: Evidence for spatial variability. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 66: 459-467

**Vizzini S, Mazzola A** (2008) The fate of organic matter sources in coastal environments: a comparison of three Mediterranean lagoons. *Hydrobiologia* 611: 67-79

**Vizzini S, Savona B, Do Chi T, Mazzola A** (2005) Spatial variability of stable carbon and nitrogen isotope ratios in a Mediterranean coastal lagoon. *Hydrobiologia* 550: 73–82

**Vogler E, Hayes J** (1979) Carbon isotopic compositions of carboxyl groups of biosynthesized fatty acids. In: Douglas A, Maxwell J (eds) Advances in Organic Geochemistry. Pergamon Press, pp 679-704

**Volkman JK, Barrett SM, Blackburn SI** (1999) Fatty acids and hydroxy fatty acids in three species of freshwater eustigmatophytes. *Journal of Phycology* 35: 1005-1012

**Volkman JK, Barrett SM, Blackburn SI, Mansour MP, Sikes EL, Gelin F** (1998) Microalgal biomarkers: A review of recent research developments. *Organic Geochemistry* 29: 1163-1179

**Volkman JK, Dunstan GA, Jeffrey SW, Kearney PS** (1991) Fatty-acids from microalgae of the genus *Pavlova*. *Phytochemistry* 30: 1855-1859

**Volkman JK, Jeffrey SW, Nichols PD, Rogers GI, Garland CD** (1989) Fatty-acid and lipid-composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 128: 219-240

**Volkman JK, Johns RB** (1977) geochemical significance of positional isomers of unsaturated-acids from an intertidal zone sediment. *Nature* 267: 693-694

**Volkman JK, Johns RB, Gillan FT, Perry GJ, Bavor HJ** (1980) Microbial lipids of an inter-tidal sediment .1. Fatty acids and hydrocarbons. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 44: 1133-1143

**Wassall SR, Brzustowicz MR, Shaikh SR, Cherezov V, Caffrey M, Stillwell W** (2004) Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids - The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation. *Chemistry and Physics of Lipids* 132: 79-88

**Wysujack K, Greenberg LA, Bergman E, Olsson IC** (2009) The role of the environment in partial migration: food availability affects the adoption of a migratory tactic in brown trout Salmo trutta. *Ecology of Freshwater Fish* 18: 52-59

**Yamashita Y, Tominaga O, Takami H, Yamada H** (2003) Comparison of growth, feeding and cortisol level in *Platichthys bicoloratus* juveniles between estuarine and nearshore nursery grounds. *Journal of Fish Biology* 63: 617-630

**Yàñez-Aranbicia A, Dominguez AL, Pauly D** (1994) Coastal lagoons as fish habitats. In: Coastal Lagoon Processes. Elsevier science publishers. edited by Kjervfe B. Amsterdam. 363-373

**Zehr JP, Waterbury JB, Turner PJ, Montoya JP, Omoregie E, Steward GF, Hansen A, Karl DM** (2001) Unicellular cyanobacteria fix N2 in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature* 412: 635–638

**Zhukova NV, Aizdaicher NA** (1995) Fatty-acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry* 39: 351-356

**Zhukova NV, Kharlamenko VI** (1999) Sources of essential fatty acids in the marine microbial loop. *Aquatic Microbial Ecology* 17: 153-157