



HAL
open science

**Origine et flux de carbone dans les réseaux trophiques
lacustres : Etude par analyse de la composition en
isotopes stables du carbone et de l'azote du zooplancton
et des poissons.**

Marie Elodie Perga

► **To cite this version:**

Marie Elodie Perga. Origine et flux de carbone dans les réseaux trophiques lacustres: Etude par analyse de la composition en isotopes stables du carbone et de l'azote du zooplancton et des poissons.. Ecologie, Environnement. Université de Savoie, 2004. Français. NNT: . tel-00139878

HAL Id: tel-00139878

<https://theses.hal.science/tel-00139878>

Submitted on 3 Apr 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE SAVOIE

THESE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR EN
BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ECOSYSTEMES

PAR

MARIE-ELODIE PERGA
SOUTENUE PUBLIQUEMENT
LE 7 OCTOBRE 2004

**ORIGINES ET FLUX DE CARBONE DANS LES RESEAUX TROPHIQUES
LACUSTRES :**

ETUDE PAR ANALYSE DE LA COMPOSITION EN ISOTOPES STABLES DU
CARBONE ET DE L'AZOTE DU ZOOPLANCTON ET DES POISSONS.

JURY

Thierry Caquet, Chargé de Recherche, INRA Rennes	Rapporteur
Daniel Gerdeaux, Directeur de Recherche, UMR CARRTEL INRA	Directeur de thèse
Jonathan Grey, Chargé de Recherche, Max Planck Institute for Limnology	Examineur
Marina Manca, Chargée de Recherche, CNR - Istituto per lo Studio degli Ecosistemi	Examineur
André Mariotti, Professeur, Université Pierre et Marie Curie	Examineur
Claude Miaud, Maître de conférence, Université de Savoie	Invité
Dolors Planas, Professeur, GEOTOP, Université du Québec à Montréal	Rapporteur et Présidente

REMERCIEMENTS

La représentation est terminée et le rideau tombe !

J'ai vécu ces trois années de thèse comme d'autres vivent la mise en place d'un spectacle. Au début, les idées semblent floues et les échéances lointaines. Les premières initiatives, les premières déceptions aussi, font apparaître les débuts poussifs et laborieux. Puis les idées mûrissent et les premiers succès permettent d'enfin ressentir sa partition et de coller au rôle. Enfin la première... avec son adrénaline... Et le spectacle qui ne s'achève que pour laisser place au prochain.

Comme pour tout spectacle aussi, il y a ceux qui ne sont pas sur les planches mais qui contribuent largement à l'écriture des dialogues et à la mise en place des scènes. Ma reconnaissance et mes remerciements vont donc à toute la « troupe » qui m'a soutenue au cours de la construction de cette pièce :

Le metteur en scène et responsable du casting, mon directeur de thèse Daniel Gerdeaux, pour avoir su me faire confiance, lors des enjeux les plus importants et les initiatives les plus hasardeuses, pour avoir su aussi canaliser cette énergie pas toujours bien utilisée. Je le remercie aussi pour sa disponibilité lors des discussions impromptues qui ne s'arrêtent que lorsque le téléphone rappelle à l'ordre.

L'accessoiriste-technicienne Valérie Hamet, pour son aide précieuse et sa patience au broyeur et à la balance, et pour son rire inimitable. Je lui souhaite un beau bébé et beaucoup de bonheur.

Les mentors que sont les membres du comité de thèse et les rapporteurs :

Dolors Planas, pour sa disponibilité, malgré un emploi du temps chargé, et ses critiques constructives notamment sur la composition isotopique des producteurs primaires

Thierry Caquet pour avoir accepté d'être rapporteur et soulevé des points importants dans ces travaux,

Gérard Lacroix pour nos discussions quant à la méthode isotopique,

Gilbert Cabana, pour ses commentaires sur le travail engagé,

Jean-Jacques Albaret pour m'avoir initiée à la biologie des poissons africains et pour ses relectures attentives de mes manuscrits.

Les critiques artistiques que sont les membres du jury : Marina Manca, Jon Grey, André Mariotti et Claude Miaud pour leur participation au jury,

Les producteurs : comme le théâtre, la recherche ne se fait pas sans financement. J'ai eu la chance au cours de cette thèse de faire de nombreux voyages, desquels je suis revenue des idées plein la tête et animée d'une nouvelle énergie. Merci donc à R. Arfi pour avoir misé sur la technique isotopique dans l'étude des réservoirs africains et pour avoir gardé confiance dans mon travail même après un cuisant échec. J'espère l'avoir convaincu de la puissance de ce merveilleux outil.

Les responsables de l'ambiance en coulisses : Orlane Anneville, Michel Colon, Jean Guillard, Leslie Lainé, Véronique Mottin, Damien Zanella, François Massol, Sébastien Personnic et Charlotte Verges pour l'ambiance et les rires, pour avoir su supporter les calembours et les mauvaises blagues, pour les vendredis midis moins le quart. Merci aussi pour le soutien dans les moments moins faciles et les conseils... un remerciement tout particulier à Orlane, François et Jean pour leurs relectures attentives, en plein week-end, qui ont permis d'améliorer considérablement cette synthèse. Une autre mention spéciale à Damien, Orlane et François qui ont survécu à la cohabitation et qui ont toujours su partager avec le sourire mon manque d'ordre, mes révoltes dérisoires et mes quarts d'heure de folie.

Je remercie aussi l'équipe RAP (Luis Tito de Morais, Jean Raffray et Jacques Panfil) qui a su si chaleureusement m'accepter sur le terrain, me familiariser avec la systématique des poissons africains et m'apprendre à gérer dans un calme relatif tous les impondérables des campagnes en Afrique (« où est le bateau ? il a coulé... Et le matériel ? bloqué à la douane... Et les filets ? déchirés... »). Je tiens aussi à adresser ma reconnaissance au Professeur G. Lebrun, du Conservatoire Botanique de Genève, pour

avoir consacré autant de temps et de passion à l'identification des plantes récoltées sur les rives des deux réservoirs maliens.

Une mention particulière aux figurants : les 2767 poissons sacrifiés, au cours de cette thèse, sur l'autel de la recherche.

Et enfin il y a tous ceux qui n'appartiennent pas directement à la troupe mais qui contribuent tout autant à la réussite :

Les Indécis Décidés, nombreux sous ce nom de scène, pour leur soutien et leur intérêt permanents, pour avoir toujours su apprécier (au moins tolérer) cet humour et ce rire si particuliers, pour avoir su me donner ma chance sur les planches de la désormais célèbrissime salle de Peyset-Nancroix, au risque de me faire abandonner la carrière scientifique pour celle de meneuse de revue.

Mes parents et ma famille, qui malgré la lourde hérédité concernant la sus-citée irrépressible tendance aux mauvais calembours et aux rires explosifs, m'ont accordé leur confiance (et leur mécénat), leur inconditionnel soutien, quels que soient mes choix professionnels et personnels. Merci aussi de m'avoir légué leur goût de l'aventure et du voyage.

Sébastien, pour toujours avoir su, au bon moment, me rattraper par le revers du pantalon et me recoller les pieds sur la terre ferme, pour toutes les concessions qu'il a faites, pour son soutien sans faille et enfin pour avoir accepté de me suivre Outre-Atlantique.

Et enfin, comme il n'y a pas de bon spectacle sans musique, je terminerai sur la bande originale : tous ces vrais artistes qui ont participé, sans le savoir, à toutes ces heures de broyage, de pesée et de rédaction : Massive Attack, Miossec et Antonin Dvöřák.

ABBREVIATIONS

AA	Acides aminés
AG	Acides Gras
AICS	Analyse Isotopique de Composés Spécifiques
AIS	Analyse des Isotopes Stables
ANOVA	Analyse de Variance
C	Carbone
CI	Carbone Inorganique
CID	Carbone Inorganique Dissous
GC-IRMS	Gas Chromatography-Isotope Ratio Mass Spectrometer
MO	Matière Organique
MOP	Matière Organique Particulaire
MOPS	Matière Organique Particulaire en Suspension
N	Azote
Ptot	Phosphore Total
SD	Standard Deviation
SE	Standard Error

*“Isotopes everywhere, excitement at every
turn, every twist in the road, every hair follicle”*

Brian Fry, Isotopes for isopodes

AVANT PROPOS

Ce travail doctoral est le produit d'idées et d'opportunités. Lorsque j'ai débuté ma thèse, les analyses de la composition isotopique étaient essentiellement utilisées comme une technique de reconstitution des réseaux trophiques dans un lac donné. Très peu d'études transversales étaient alors recensées. Or, après avoir constaté que la composition isotopique du corégone était particulièrement variable d'un lac à l'autre, nous avons l'idée que cette variabilité cachait une signification en terme de fonctionnement trophique des lacs, signification encore alors à expliquer. L'hypothèse sous-jacente était que la composition en isotopes stables des poissons pourrait constituer un indicateur de fonctionnement des lacs. Puis l'opportunité d'appliquer la technique isotopique sur des réservoirs tropicaux s'est présentée, dans le cadre d'une coopération avec l'IRD. Cette occasion nous a permis de tester notre hypothèse dans un autre type de système, soumis à des contraintes environnementales différentes de celles rencontrées sur les lacs alpins. Enfin, ces expériences ont soulevé des réflexions d'ordre méthodologique auxquelles nous avons tenté de répondre.

Présenter cette thèse sous forme d'articles nous a paru être le format le plus approprié pour exposer l'ensemble de nos travaux. Ce document comporte une revue relative à l'utilisation de la composition isotopique des poissons comme indicateur fonctionnel. Je désirais que cette synthèse puisse être lue indépendamment des articles issus du travail doctoral. J'ai donc choisi d'y inclure un chapitre regroupant l'ensemble de mes résultats afin que le fil conducteur de ce travail apparaisse plus clairement que si je ne l'avais présenté uniquement sous la forme d'articles. Enfin, cet exposé s'achève sur une réflexion relative à l'implication de nos travaux ainsi que sur les perspectives d'application de la méthode. J'espère que ce choix « stratégique » convaincra le lecteur des potentialités qu'offre l'utilisation des isotopes stables à l'échelle des communautés de poissons.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
ABBREVIATIONS	4
AVANT PROPOS	5
TABLE DES MATIÈRES	6
INTRODUCTION	10
1. ANALYSE DES ISOTOPES STABLES COMME MÉTHODE D'ÉTUDE DES FLUX DE CARBONE DANS LES RÉSEAUX TROPHIQUES.	13
1.1. Les fondements de la méthode	13
1.1.1. Isotopes et expression de la composition isotopique.	13
1.1.2. Modifications des compositions isotopiques entre compartiments : le fractionnement isotopique	15
1.1.2.1. Fractionnement trophique : Relations entre compositions isotopiques de la nourriture, des tissus et des produits d'excrétion du consommateur	15
1.1.2.2. Fractionnement photosynthétique : Signatures des producteurs primaires	18
1.1.2.3. Fractionnement isotopique du carbone lors des processus de méthanogénèse-méthanotrophie	22
1.2. Applications à l'étude des réseaux trophiques et des flux de carbone	23
1.2.1. Discrimination et transmission de la signature des sources de carbone le long des réseaux trophiques :	23
1.2.1.1. La théorie	23
1.2.1.2. La pratique... : Utilisation d'intégrateurs	24
1.2.2. Modèles de mélange et longueur des chaînes trophiques	27
1.3. Critiques et limites de la méthode : la justification d'une approche comparative.	29
1.3.1. Analyse isotopique et contenus stomacaux : une réelle concurrence ?	29
1.3.2. AIS et Quantification absolue	31
1.3.2.1. Assimilation des nutriments et routage isotopique	31
1.3.2.2. Variabilité sur le fractionnement trophique.	32
1.3.3. La considération de ces limites dans une nouvelle approche de l'AIS	34
1.3.3.1. Analyse Isotopique des Composés Spécifiques aux faibles niveaux trophiques	34
1.3.3.2. Prise en compte de la variabilité du fractionnement trophique aux niveaux trophiques les plus élevés	36
1.3.3.3. Comparaison des informations isotopiques au cours du temps ou entre systèmes	37
2. LA COMPOSITION EN ISOTOPES STABLES DES POISSONS COMME INDICATEUR DU FONCTIONNEMENT TROPHIQUE DES LACS	38
2.1. La composition isotopique du corégone : variabilité et signification	38
2.1.1. Variabilité de la composition en isotopes stables du corégone entre les lacs alpins : implications fonctionnelles.	38
2.1.1.1. Hypothèses et modèles	38
2.1.1.2. L'étude réalisée	41

2.1.1.3.	<i>Influence de la taille et du statut trophique des lacs</i>	42
2.1.2.	Intégration de carbone issu de la boucle microbienne au réseau pélagique : le carrefour zooplanctonique	43
2.1.2.1.	<i>Contexte de l'étude</i>	43
2.1.2.2.	<i>L'étude réalisée</i>	43
2.1.3.	Les processus d'intégration du signal isotopique de la nourriture dans les tissus du corégone	47
2.1.3.1.	<i>Contexte de l'étude et problématique.</i>	47
2.1.3.2.	<i>L'étude réalisée</i>	47
2.1.4.	La composition isotopique du corégone : un indicateur fonctionnel?	48
2.2.	La composition isotopique des poissons comme un indicateur de l'impact de perturbations sur le fonctionnement trophique d'un lac.	49
2.2.1.	Modifications du statut trophique : Eutrophisation-réoligotrophisation	49
2.2.1.1.	<i>Contexte de l'étude</i>	49
2.2.1.2.	<i>L'étude réalisée</i>	49
2.2.2.	Marnage dans deux réservoirs africains	52
2.2.2.1.	<i>Contexte de l'étude</i>	52
2.2.2.2.	<i>L'étude réalisée</i>	53
2.2.3.	Conclusion : impact des perturbations et indicateur fonctionnel	55
3.	DISCUSSION	56
3.1.	Intégrateurs et ligne de base pélagique	56
3.1.1.	Corégone et ligne de base pélagique	57
3.1.2.	Bivalves filtreurs et ligne de base pélagique	57
3.2.	Les lacs péri-alpins : un cas particulier de la Limnologie internationale ?	58
3.3.	Pertinence du modèle biologique employé	59
3.4.	Perspectives d'utilisation de la composition isotopique des poissons comme indicateur fonctionnel.	60
3.4.1.	Modification anthropique du statut trophique et approche écosystémique	61
3.4.2.	Bio-manipulations-espèces invasives.	62
3.4.2.1.	<i>Bio-manipulations</i>	62
3.4.2.2.	<i>Espèces invasives</i>	64
	CONCLUSION	65
	ARTICLES	66
	Article 1. Using the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of whitefish scale for retrospective ecological studies: Changes in isotope signatures during the restoration of Lake Geneva, 1980-2001	68
	Article 2. Changes in the $\delta^{13}\text{C}$ of pelagic food webs: the influence of lake area and trophic status on the isotopic signature of whitefish (<i>Coregonus lavaretus</i>)	81
	Article 3. Seasonal variability in the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the crustacean zooplankton taxa in two alpine lakes: differences in the baselines and trophic structures of the two lakes, and their seasonal variations	95
	Article 4. Changes in whitefish $\delta^{13}\text{C}$ during eutrophication and re-oligotrophication in three subalpine lakes.	112

Article 5. Comparison of the monthly patterns of ^{13}C and ^{15}N natural compositions of Whitefish tissues and diet in lake Geneva: integration of isotopes from food into tissues in natural environments. _____	126
Article 6. Seasonal and spatial variations in the stable carbon and nitrogen isotope ratios of fish in a tropical reservoir, Sélingué (Mali) _____	143
Article 7. Seasonal variations in fish $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in two West African reservoirs, Sélingué and Manantali (Mali): modifications of trophic links in relation to water level. _____	168
<i>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i> _____	182

SYNTHESE

ORIGINES ET FLUX DE CARBONE DANS LES RESEAUX TROPHIQUES LACUSTRES :

ETUDE PAR ANALYSE DE LA COMPOSITION EN ISOTOPES STABLES DU
CARBONE ET DE L'AZOTE DU ZOOPLANCTON ET DES POISSONS.

INTRODUCTION

« Qui mange qui et comment ? » dans un écosystème est un os que les écologues ne se lassent pas de ronger. Cette question, d'apparence simple, a trait en fait à la problématique complexe de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques dans les écosystèmes, que les études récentes abordent sous plusieurs de leurs aspects. La longueur des chaînes trophiques est considérée pour le rôle qu'elle joue dans les fonctions-clés de l'écosystème, telles que le recyclage des nutriments, la productivité ainsi que sur la bioaccumulation de contaminants (Post 2002a). La « connectance » entre les différents niveaux trophiques est étudiée notamment pour son influence sur la réponse du système à l'enrichissement en nutriments (Hulot *et al.* 2000) ainsi que sur sa stabilité face aux perturbations (De Angelis *et al.* 1975; Solow *et al.* 1999). Notre réflexion porte, quant à elle, sur la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques en terme de voies de transferts de carbone dans les systèmes.

Comme les autres branches de l'écologie, la Limnologie a évolué autour du débat concernant le rôle des facteurs biotiques et abiotiques sur la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques. Dans une certaine mesure, les lacs sont des milieux idéaux pour étudier l'influence de ces facteurs à l'échelle d'un écosystème. Les limites du lac sont relativement claires et la difficulté de définir la taille du système, problème récurrent en écologie, est amenuisée (Carpenter et Kitchell 1993). L'étude des lacs a par conséquent joué un rôle prédominant dans le développement de l'écologie théorique (Forbes 1887; Carpenter et Kitchell 1993). Le paradigme majeur des limnologues a été l'étude de la composante pélagique, la chaîne trophique issue de la production phytoplanctonique (Vander Zanden et Vadeboncoeur 2002). Cette conception pélagique-centrée est un héritage de l'étude des processus d'eutrophisation, une des motivations majeures de la Limnologie dans la deuxième partie du XX^{ème} siècle (Bertola 1998). L'intérêt de la théorie des cascades trophiques et ses applications en terme de contrôle de l'eutrophisation des lacs par le biais de biomanipulations ont été un motif essentiel de l'intérêt prédominant accordé aux processus pélagiques (Mehner *et al.* 2001).

Pourtant, au sein d'un écosystème lacustre, d'autres sources de carbone, telles que les productions littorale, benthique et même allochtone sont susceptibles de soutenir la production secondaire pélagique (Hecky et Hesslein 1995; Vander Zanden et Vadeboncoeur 2002). Plusieurs auteurs plaident actuellement pour une conception écosystémique qui intégrerait tous les habitats lacustres dans la compréhension du fonctionnement trophique (Hecky et Hesslein 1995; Lake *et al.* 2000; Palmer *et al.* 2000; Schindler et Scheuerell 2002; Vadeboncoeur *et al.* 2002; Vander Zanden et Vadeboncoeur 2002). L'analyse de la composition en isotopes stables du carbone et de l'azote est un outil qui permet d'aborder les réseaux trophiques dans le cadre d'une approche écosystémique (Schindler et Scheuerell 2002).

Les communautés piscicoles sont situées au sommet des réseaux trophiques. La façon dont les poissons acquièrent le carbone qui les constitue dépend, de ce fait, de l'ensemble des voies de transferts de carbone aux niveaux inférieurs du réseau trophique. Cette position dans le réseau leur confère ainsi un rôle potentiel d'intégrateurs des processus sous-jacents, à l'échelle écosystémique. De plus, la composition en isotopes stables du carbone d'un organisme dépend des voies qui transfèrent le carbone jusqu'à cet organisme. Réciproquement, la variabilité temporelle ou intersystème de la composition isotopique d'une même espèce implique que les voies de transferts du carbone qui mènent à cet organisme sont différentes. Nous nous sommes par conséquent demandé, au cours de cette thèse, dans quelle mesure la composition en isotopes stables des poissons peut constituer un indicateur relatif de fonctionnement trophique des lacs.

La démarche scientifique adoptée a été la suivante. Nous avons employé, dans un premier temps, le corégone, *Coregonus lavaretus* (L.), comme modèle biologique. Le corégone est un salmoniforme commun des lacs alpins, dont la biologie est à présent bien connue (Giussani et De Bernardi 1977; Ponton et Gerdeaux 1988; Hartmann et Quoss 1993; Mookerji *et al.* 1998; Caranhac 1999; Heikinheimo *et al.* 2000; Gerdeaux *et al.* 2002). Le corégone est essentiellement zooplanctonophage dans les lacs alpins. Il occupe ainsi une position élevée dans le réseau trophique pélagique. Une étude préalable avait révélée que la composition en isotopes stables du carbone de corégonos provenant de sept lacs alpins était très variable (Dufour 1999). Selon notre hypothèse, cette variabilité serait le reflet de différences dans les voies de transferts du carbone dans les réseaux trophiques de ces lacs. Ces différences peuvent cependant intervenir à de nombreux niveaux du réseau trophique. Pour comprendre ce que traduisait cette variabilité isotopique, nous avons d'abord étudié si elle était le fait de facteurs intrinsèques aux lacs (taille du système et statut trophique). Cette étude nous a ensuite conduit à approfondir le rôle joué par le compartiment zooplanctonique dans les transferts de carbone vers le corégone. Nous nous sommes enfin penchés sur la représentativité de la composition isotopique du corégone : reflète-t-elle les transferts de carbone sur l'ensemble de l'année ? Au terme de cette première partie, la composition isotopique du corégone s'est montrée être effectivement un indicateur du fonctionnement trophique des lacs.

Les perturbations peuvent modifier les voies de transferts du carbone dans les réseaux trophiques. Si les poissons sont des intégrateurs efficaces des voies de transferts du carbone, l'impact des perturbations devraient alors résulter en une modification de leur composition isotopique. L'effet de deux perturbations d'origine anthropique sur la composition isotopique des poissons a alors été analysée : la première est relative à l'eutrophisation-restauration de deux lacs alpins, la seconde concerne le marnage dans deux réservoirs africains.

L'exposé se compose de trois chapitres. Le premier est une revue de la conception actuelle de l'analyse des isotopes stables dans l'étude des réseaux trophiques. Il permet de justifier la démarche comparative adoptée. Le second est une synthèse des résultats obtenus au cours de ce travail de doctorat. Enfin, le dernier chapitre débat des potentialités et des perspectives de l'utilisation de la composition isotopique des consommateurs supérieurs comme un indicateur du fonctionnement trophique des lacs.

Sept articles succèdent à cet exposé

1. PERGA, M. E. and D. GERDEAUX. 2003. Using fish scales $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ for retrospective ecological studies : the example of the evolution of Whitefish isotopic signature during re-oligotrophication of lake Geneva, 1980-2001. *Journal of Fish Biology* **63**: 1197-1207.
2. PERGA, M.-E. and D. GERDEAUX. Changes in the $\delta^{13}\text{C}$ of pelagic food webs: the influence of lake area and trophic status on the isotopic signature of Whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* (accepté)
3. PERGA, M.-E. and D. GERDEAUX. Seasonal variations in zooplankton species isotopic composition in two lakes of different trophic status. *Acta Oecologia*. Soumis.
4. GERDEAUX, D. and M.-E. PERGA. Alteration of pelagic $\delta^{13}\text{C}$ during eutrophication and re-oligotrophication in three subalpine lakes. *Limnology and Oceanography*. accepté.
5. PERGA, M.-E. and D. GERDEAUX. Comparison of the monthly pattern of ^{13}C and ^{15}N natural compositions of Whitefish tissues and food in the lake Lemman : Conditions of the food isotopic signal integration into tissues in natural environments. *Oecologia*. Soumis.
6. PERGA, M.-E., R. ARFI and D. GERDEAUX. Seasonal and spatial variations in the stable carbon and nitrogen isotope ratios of fish in a tropical reservoir, Sélingué (Mali). *Canadian Journal of Zoology*. En révision.
7. PERGA, M.-E., R. ARFI and D. GERDEAUX. Seasonal variations in fish $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in two west African reservoirs, Sélingué and Manantali (Mali) : modifications of trophic links in relation to water level. *Stable Isotopes in Environmental and Health Studies*. Soumis.

1. ANALYSE DES ISOTOPES STABLES COMME METHODE D'ETUDE DES FLUX DE CARBONE DANS LES RESEAUX TROPHIQUES.

Ce chapitre expose les fondements de l'Analyse des Isotopes Stables (AIS), en rappelant dans un premier temps la notion d'isotopes et l'expression mathématique de la composition isotopique. L'AIS repose sur l'étude des variations de composition isotopique des compartiments biogéochimiques (carbonés en ce qui concerne notre problématique), qui sont d'autant d'informations sur les processus biologiques sous-jacents. Ce volet méthodologique détaille les mécanismes à la base des variations de composition isotopique entre compartiments et définit le cadre des informations qui peuvent être issues de l'interprétation de l'AIS. Ces propriétés isotopiques sont, par la suite, appliquées à l'analyse des réseaux trophiques. La dernière partie est consacrée à un regard critique sur la méthode. L'AIS appliquée à l'étude des réseaux trophiques est sujette à certaines objections et à certaines limites qui nous ont encouragés à l'employer dans le cadre d'une démarche comparative.

1.1. **Les fondements de la méthode**

1.1.1. Isotopes et expression de la composition isotopique.

Deux isotopes sont deux formes légèrement différentes d'un même élément chimique A_ZX . L'élément chimique A_ZX est défini par son numéro atomique Z , qui est le nombre de protons (ou d'électrons, l'atome étant électriquement neutre). A , nombre de masse, est la somme du nombre de protons et de neutrons du noyau. Les isotopes d'un même élément X ont le même numéro atomique mais un nombre de neutrons différent. Deux isotopes d'un même élément diffèrent essentiellement par leur masse : on parle d'isotopes « légers » et « lourds ».

La notion d'isotopes est apparue avec le premier spectromètre de masse, conçu par F. W. Aston il y a 100 ans. A la fin des années 1910, Aston découvre que le néon est constitué non pas d'un seul élément, mais d'un triplet isotopique (${}^{20}\text{Ne}$, ${}^{21}\text{Ne}$ et ${}^{22}\text{Ne}$). Les mesures supplémentaires révèlent que de nombreux autres éléments chimiques comportent des formes isotopiques (jusqu'à 12 isotopes pour un même élément chimique) et que peu d'éléments n'ont qu'un seul isotope (parmi eux, le fluor). Aston obtient le prix Nobel de Chimie en 1922 (Fry *in press*).

Le ou les neutrons supplémentaires de certains isotopes leur confèrent une instabilité énergétique. Le retour à une forme isotopique stable se fait par l'émission d'une particule : ce sont les isotopes radioactifs. D'autres isotopes ont une configuration constante : ce sont les **isotopes stables** (selon E. Wada, « **Safe, Silent and Stable** » isotopes (Fry *in press*)). Pour un même élément peuvent cohabiter des formes stables et radioactives. Le carbone, par exemple, a trois isotopes : ${}^{12}\text{C}$, abondant,

léger et stable ; ^{13}C , rare, lourd et stable et ^{14}C rare, lourd et radioactif. L'azote a lui 12 isotopes dont deux formes stables: ^{14}N , abondant et léger et ^{15}N , lourd et rare (Pereck 2004).

L'isotope léger du carbone, ^{12}C , représente 98.89% du stock global de carbone et par conséquent ^{13}C seulement 1.11%. De même, 99.64% de l'azote global est composé de la forme légère ^{14}N contre 0.36% pour la forme lourde ^{15}N (Mariotti 1995). Les variations des abondances isotopiques naturelles sont de fait très faibles. La mesure de la composition isotopique en carbone ou azote de la matière organique est effectuée par spectrométrie de masse à flux continu couplée à des analyses élémentaires (Lajtha et Michener 1994; Peterson 1999). Le spectromètre de masse isotopique mesure la composition isotopique de gaz purs, obtenus grâce au passage des échantillons dans l'analyseur élémentaire. Les fractions à analyser sont préalablement lyophilisées, éventuellement délipidifiées ou décalcifiées, puis broyées. Carbone et azote organiques des échantillons solides sont convertis en CO_2 et N_2 par oxydation à l'oxygène dans une atmosphère d'hélium dans l'analyseur élémentaire placé en amont du spectromètre. Les gaz issus de cette combustion sont séparés dans une colonne de chromatographie gazeuse intégrée dans l'analyseur élémentaire et le pic d'intérêt passe ensuite, poussé par un flux d'hélium, dans le spectromètre où les gaz purs sont ionisés (Ghashghaie *et al.* 2001). Lors du passage du flux d'ions dans un champ électromagnétique, la différence d'inertie entre isotopes conduit à des trajectoires différentes, permettant ainsi leur séparation. Les ions ainsi séparés finissent leur course dans des collecteurs réglés pour collecter les masses molaires 44, 45 et 46 pour le CO_2 ou 28, 29 et 30 pour le N_2 . L'arrivée des ions génère un signal électrique dépendant de la quantité d'ions dans chaque collecteur (Ghashghaie *et al.* 2001).

Les variations des abondances isotopiques naturelles sont très faibles. Leurs mesures ne doivent pas donc être affectées par les fluctuations de l'électronique. Elles ne sont donc pas exprimées en valeurs absolues mais en valeurs relatives. Les compositions isotopiques des échantillons sont comparées à celles de références internationales normalisées par l'Agence Internationale de l'Energie Atomique et choisies dans le réservoir terrestre le plus abondant de l'élément mesuré. Pour le carbone, il s'agit du V-PDB (Pee-Dee Belemnite), rostre de bélemnite fossile (*Belemnita americana*) provenant de la Pee Dee Formation aux Etats Unis. Les teneurs isotopiques en azote sont, quant à elles, exprimées par rapport à l'azote atmosphérique N_2 (Mariotti 1995). Ainsi, les fluctuations électroniques s'appliquant de façon égale aux deux échantillons, la différence entre les rapports isotopiques sera constante. Ce principe de mesure introduit l'utilisation de l'unité relative delta (δ) (unité :‰), différence relative de rapport isotopique entre l'échantillon et la référence :

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{échantillon}} = \left(\frac{R^{15}\text{N}_{\text{échantillon}}}{R^{15}\text{N}_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \text{ avec } R^{15}\text{N} = \frac{\left[\begin{array}{c} ^{15}\text{N} \\ ^{14}\text{N} \end{array} \right]}{\left[\begin{array}{c} ^{15}\text{N} \\ ^{14}\text{N} \end{array} \right]}$$

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{échantillon}} = \left(\frac{R^{13}\text{C}_{\text{échantillon}}}{R^{13}\text{C}_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \text{ avec } R^{13}\text{C} = \frac{\left[\begin{array}{c} ^{13}\text{C} \\ ^{12}\text{C} \end{array} \right]}{\left[\begin{array}{c} ^{13}\text{C} \\ ^{12}\text{C} \end{array} \right]}$$

La précision de la mesure est de 0,2‰ (Ghashghaie *et al.* 2001).

1.1.2. Modifications des compositions isotopiques entre compartiments : le fractionnement isotopique

« Electrons rule the world of chemistry » (Fry *in press*). Les isotopes d'un même élément ont les mêmes propriétés chimiques, mais la différence de masse, qui dépend du nombre de neutrons dans le noyau de l'atome, engendre des propriétés cinétiques et thermodynamiques légèrement différentes. Autrement dit, les isotopes d'un même élément X participent aux mêmes réactions chimiques, mais la vitesse de réaction ou les concentrations à l'équilibre thermodynamique seront plus ou moins grandes selon qu'il s'agit des isotopes légers ou lourds (Mariotti 1995). Beaucoup de processus physiques, chimiques ou biochimiques sont susceptibles d'induire un fractionnement isotopique, c'est-à-dire de modifier les rapports isotopiques des produits par rapport à ceux des réactifs. Les composés contenant l'isotope le plus lourd présentent une plus forte énergie de dissociation par rapport aux molécules contenant l'isotope léger et sont par conséquent plus stables. Dans les réactions rapides, incomplètes ou unidirectionnelles, les molécules légères seront plus rapidement recombinaées que les molécules lourdes. Ainsi, le fractionnement cinétique ne sera observable que sur des réactions incomplètes. Dans les réactions à l'équilibre, l'isotope lourd s'accumule dans le composé le plus stable (Mariotti 1995). On parle alors de fractionnement thermodynamique.

En définitive, toutes les réactions biogéochimiques impliquées dans le fonctionnement lacustre sont susceptibles d'apposer une signature isotopique au carbone ou à l'azote qu'elles manipulent. Les flux entre compartiments carbonés en lac, de nature trophique (entre deux compartiments organiques), minéralisatrice (du compartiment organique au compartiment inorganique) ou photosynthétique (du compartiment inorganique au compartiment organique), sont signés de fractionnements isotopiques caractéristiques.

1.1.2.1. Fractionnement trophique : Relations entre compositions isotopiques de la nourriture, des tissus et des produits d'excrétion du consommateur

Les atomes constitutifs des êtres vivants proviennent des atomes de leur nourriture : il y aurait par conséquent une relation déterministe entre la composition isotopique de la nourriture et celle du consommateur. Dans l'objectif de retracer les flux de carbone en lac, il semble évident d'étudier le devenir (ou fractionnement) des isotopes du carbone lors d'une transition trophique.

□ Fractionnement isotopique du carbone au cours d'une transition trophique

De Niro et Epstein (1978) ont analysé les relations entre la signature isotopique de la nourriture et celle des consommateurs à plusieurs échelles : à l'échelle du corps entier de l'animal, des tissus et enfin des fractions biochimiques (protéines, lipides et glycogène). L'analyse a été menée sur 13 espèces d'animaux (des arthropodes aux vertébrés supérieurs) élevés en laboratoire avec des aliments à composition isotopique connue et constante. La composition isotopique de l'ensemble du corps de l'animal reflétait la composition isotopique de la nourriture, avec un enrichissement moyen en ^{13}C de $0,8\text{‰} \pm 1,1\text{‰}$. Le $\delta^{13}\text{C}$ du corps de l'animal fournit donc une information sur le $\delta^{13}\text{C}$ de la nourriture. En contrepartie, le carbone provenant de la nourriture qui est perdu par respiration est, selon la loi des équilibres de masse, très légèrement appauvri en ^{13}C .

A l'échelle des fractions biochimiques, la composition en isotopes du carbone des protéines est proche de celle de la nourriture tandis que celle des lipides est significativement appauvrie en éléments lourds. Ces différences résultent des processus d'anabolisme. Peu d'acides aminés sont synthétisés *de novo* dans les tissus du prédateur. La majeure partie des acides aminés proviennent de la nourriture et ne subissent donc que peu de transformations métaboliques : leur composition isotopique est conservative. Au contraire, les voies de néosynthèses lipidiques sont nombreuses et des fractionnements isotopiques peuvent se produire lors de certaines étapes de cette synthèse (telles que l'oxydation du pyruvate par l'acétylcoenzyme A (De Niro et Epstein 1977)). Si certains acides gras essentiels sont issus exclusivement de la nourriture, d'autres acides gras sont synthétisés *de novo* à partir des autres fractions biochimiques. La multiplication des étapes métaboliques dans la synthèse *de novo* des lipides contribue à les appauvrir en ^{13}C . Ainsi, les relations entre la composition isotopique carbone des tissus analysés séparément et celle de la nourriture dépendent de la composition biochimique de ces tissus : les tissus les moins gras ont une composition isotopique proche de celle de la nourriture. Pour les animaux volumineux (et dans notre objectif, les poissons), l'analyse de la composition isotopique des muscles squelettiques débarrassés de leurs lipides (ou composition isotopique corrigée pour la teneur en lipides) fournit l'estimation la plus juste de la composition isotopique de leur nourriture. L'analyse des tissus riches en collagène (poils, ongles ou griffes, dents, écailles préalablement décalcifiées) peut aussi être utilisée, dans la mesure où le fractionnement isotopique entre nourriture et tissus est connue (Sholto-Douglas *et al.* 1991; Perga et Gerdeaux 2003).

Par cette étude, De Niro et Epstein ont jeté les bases de l'approche isotopique des réseaux trophiques, en montrant la transmission de la signature isotopique en carbone le long des chaînes trophiques.

Les résultats de cette étude fondatrice ont encouragé de nombreuses AIS en laboratoire et/ou en milieu naturel, qui ont fourni des mesures isotopiques pour de nombreux couples prédateurs-proies. Une des critiques majeures de l'AIS concernait la signification de ce fractionnement isotopique, établi en laboratoire, sur un nombre limité d'espèces. Post (2002b) et Mc Cutchan *et al.* (2003) ont mené des études statistiques à partir des compositions isotopiques de, respectivement, 107 et 111 couples

prédateurs-proies recensés dans la bibliographie. Les valeurs moyennes de fractionnement isotopique estimées par les deux études sont similaires avec 0,39‰ (SD =1,3) pour Post (2002b) et 0,5 ‰ (SD = 1,3) pour Mc Cutchan *et al.* (2003), et d'autre part du même ordre que celle trouvée expérimentalement par De Niro et Epstein (1978). On considère donc traditionnellement qu'au cours d'une transition trophique prédateur-proie, l'enrichissement en isotope lourd ^{13}C est négligeable.

Carbone et azote circulent de pair de la proie au prédateur (la matière organique est essentiellement composée de C, H, O, N). L'analyse des isotopes du carbone est alors très souvent couplée à celle de l'azote puisque le fractionnement isotopique de l'azote lors d'un transfert trophique (contrairement à celles de l'oxygène ou de l'hydrogène) en fait un marqueur intéressant des relations prédateurs-proies.

□ *Fractionnement isotopique de l'azote au cours d'une transition trophique*

Des études similaires (De Niro et Epstein 1981; Minagawa et Wada 1984) ont été menées sur le devenir de la signature $\delta^{15}\text{N}$ dans les réseaux trophiques. Si les producteurs primaires montrent des signatures très variables, les consommateurs (zooplancton, poissons et oiseaux dans l'étude de Minagawa et Wada (1984) montrent un enrichissement en ^{15}N en moyenne similaire à chaque niveau trophique. $\delta^{15}\text{N}$ permet de suivre uniquement le devenir des protéines (contrairement au $\delta^{13}\text{C}$) de la proie au prédateur, puisqu'il s'agit des seuls constituants biochimiques comportant de l'azote. Le pas d'enrichissement unitaire en ^{15}N est de 3,4‰ \pm 1,1‰. La balance isotopique est conservée par l'appauvrissement en ^{15}N des produits d'excrétion azotée. L'analyse de la composition isotopique de l'excrétion ammoniacale de guppys en laboratoire a conduit à la conclusion que l'enrichissement en ^{15}N du prédateur était compensé par l'excrétion préférentielle de ^{14}N au cours de la transamination et désamination des protéines (Minagawa et Wada 1984).

Pour les animaux volumineux, le muscle squelettique est, comme pour le $\delta^{13}\text{C}$, utilisé pour estimer le $\delta^{15}\text{N}$ de l'ensemble du corps. L'étude statistique de Post (2002b), sur 56 couples prédateurs proies aboutit à un enrichissement trophique en ^{15}N d'une valeur moyenne similaire (3,4‰, SD=0,98) à celle des études de De Niro et Epstein (1981). Post (2002b) n'observe aucune différence significative entre herbivores et carnivores. Par contre, Mc Cutchan *et al.* (2003) estiment la valeur de l'enrichissement trophique à 2,0‰ (SD= 1,8‰) sur 83 couples proies-prédateurs et détectent des différences de fractionnements trophiques selon le type d'alimentation (invertébrés, végétaux, alimentation à haute teneur protéique).

Puisque la composition isotopique des prédateurs peut être prédite par la composition isotopique de la nourriture, la principale source naturelle de variabilité de composition isotopique dans

l'environnement se situe à la base des réseaux trophiques, au niveau des producteurs primaires (Lajtha et Marshall 1994).

1.1.2.2. Fractionnement photosynthétique : Signatures des producteurs primaires

□ $\delta^{13}\text{C}$ des producteurs primaires

Le $\delta^{13}\text{C}$ des végétaux s'étale sur une gamme de valeurs de -10 à -50‰ (Craig 1953). Leur signature isotopique est déterminée par la combinaison du fractionnement imposé lors des mécanismes de fixation du carbone et de la signature de la source de carbone inorganique utilisée (Fig. 1).

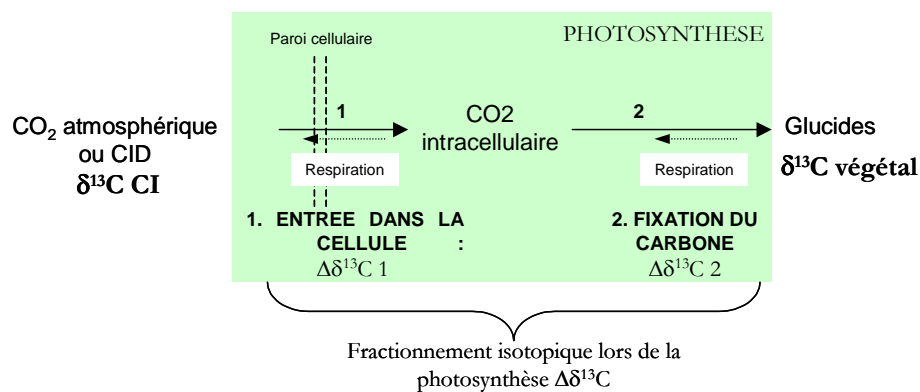


Figure 1. Déterminisme de la composition isotopique $\delta^{13}\text{C}$ des producteurs primaires. CI: Carbone Inorganique, CID: Carbone Inorganique Dissous

▪ Origines du fractionnement.

Les tissus végétaux sont appauvris en ^{13}C par rapport à la source de carbone inorganique (CI) utilisée pour la photosynthèse car il existe une discrimination négative vis-à-vis de l'isotope lourd lors des processus physiques _entrée dans la cellule photosynthétique_ et enzymatiques _fixation du carbone_ (Raven *et al.* 1987; Lajtha et Marshall 1994; Raven *et al.* 1994). Le plus souvent, l'entrée du carbone inorganique (CI) à l'intérieur de la cellule photosynthétique s'opère par diffusion. Les isotopes légers diffusent plus rapidement au travers de la paroi cellulaire (fractionnement cinétique) et le CO₂ intracellulaire est par conséquent appauvri en ^{13}C par rapport au CO₂ (atmosphérique ou dissous) d'environ 4‰. C'est le cas général des végétaux terrestres et des algues dans des conditions où le CO₂ dissous n'est pas limitant (Lajtha et Marshall 1994).

En milieu aquatique, dans des conditions où le CO₂ dissous est limitant (lors des pics photosynthétiques par exemple), certaines espèces végétales, telles que certaines diatomées, prélèvent

directement les ions bicarbonates, enrichis d'environ 9‰ par rapport au CO₂ dissous (Goericke *et al.* 1994; Riebesell 2000; Johnston *et al.* 2001). Le fractionnement résiduel est donc un enrichissement de l'ordre de 5‰ entre CO₂ dissous et CO₂ intracellulaire. D'autres espèces algales importent, par un transporteur actif, du CO₂ dans leur cellule. Ce processus ne fractionne pas mais augmente les concentrations intracellulaires à des taux 100 à 1000 fois supérieurs aux concentrations dans le milieu (Goericke *et al.* 1994; Riebesell 2000; Johnston *et al.* 2001), ce qui aura des répercussions sur le fractionnement enzymatique. Ainsi, quelle que soit l'espèce algale, des conditions où le CO₂ dissous est limitant réduisent le fractionnement isotopique entre la source de carbone inorganique et le carbone organique algal.

L'étape de fixation photosynthétique du CI entraîne, elle aussi, un fractionnement qui dépend de divers facteurs. La voie de fixation photosynthétique impose essentiellement un fractionnement au cours de la phase de fixation du carbone (Wong et Sackett 1978; Mariotti 1995). Les plantes en C₃ (plantes terrestres des milieux tempérés ou la plupart des algues) ont une voie photosynthétique dont la première étape est la carboxylation du Ribulose Bi-Phosphate par l'enzyme RuBisco (Ribulose Biphosphate Carboxylase Oxygénase). L'enzyme en jeu contre-sélectionne largement les isotopes lourds. Les expériences biochimiques menées à l'échelle de l'enzyme ont montré un fractionnement maximum de -29‰ (Lajtha et Marshall 1994). Les plantes en C₄ (less plantes terrestres adaptées à la sécheresse, certaines diatomées et certaines cyanobactéries en conditions de CO₂ limitant) ont une voie de fixation photosynthétique qui engage, dans la première étape, la β -carboxylation du Phosphoénolpyruvate (PEP) à partir d'ions bicarbonates. Au cours de cette étape, le fractionnement isotopique entre le CO₂ dissous et le carbone organique algal, beaucoup plus faible, est de l'ordre de -6‰ (Lajtha et Michener 1994).

Ces fractionnements isotopiques enzymatiques sont CO₂-dépendants. Plus la concentration en CO₂ intracellulaire est faible, moins les éléments lourds seront contre-sélectionnés : le fractionnement isotopique diminue et les $\delta^{13}\text{C}$ augmentent. Ainsi, tous les facteurs qui limitent la disponibilité du CO₂ sont susceptibles de réduire le fractionnement isotopique lors de la photosynthèse.

- **Milieu aérien/milieu aquatique** : En milieu aérien, la limitation de la pénétration du CO₂ par diffusion est minimale. Par conséquent la concentration en CO₂ au site de carboxylation est optimale et le fractionnement enzymatique, important, est de l'ordre de -18‰ pour une plante en C₃ (France 1995a). Par rapport à un végétal terrestre de morphologie comparable, l'approvisionnement en carbone inorganique (CI) est limité chez un végétal aquatique submergé, qu'il soit en eaux stagnantes ou courantes. Si les concentrations en CI sont relativement comparables entre air et eau, la différence majeure provient du coefficient de diffusion du CI 10000 fois plus faible en milieu aquatique qu'en milieu aérien. La couche limite de diffusion des gaz est, de fait, plus fine et les échanges plus limités. La concentration intracellulaire en CO₂ au site de la Rubisco est donc plus faible pour les végétaux submergés que pour les aériens, conduisant à un fractionnement plus faible. (Raven *et al.* 1994).

- **Turbulence hydrodynamique** : Au sein des végétaux aquatiques, le degré de turbulence hydrodynamique a aussi un effet sur le fractionnement isotopique lors de la photosynthèse. L'épaisseur de la couche limite de diffusion dépend du degré de turbulence hydrodynamique : le renouvellement de l'eau, et donc du carbone inorganique dissous (CID), au contact de la surface d'échanges favorise la diffusion, augmente les concentrations intracellulaires de CO₂ et, de ce fait, accroît la discrimination vis-à-vis du ¹³C. Ainsi, les producteurs primaires aquatiques sont d'autant plus appauvris en ¹³C qu'ils se situent dans une zone de forte turbulence : les algues pélagiques (phytoplancton) sont en moyenne appauvries d'environ 7‰ en ¹³C par rapport aux algues benthiques (France 1995a).
- **Morphologie algale** : Les échanges de CO₂ entre milieux intra et extra cellulaires dépendent aussi de la taille de l'algue. Les petites algues ont une surface d'échanges relativement plus importante que les algues de plus grande taille. Elles ont par conséquent de plus fortes concentrations internes en CO₂ et sont souvent appauvries en ¹³C (Popp *et al.* 1998; Burkhardt *et al.* 1999).
- **Taux de croissance algale** : le δ¹³C algal est positivement corrélé avec la croissance algale (Takahashi *et al.* 1991 ; Francois *et al.* 1993 ; Laws *et al.* 1995 ; Bidigare *et al.* 1997). Ainsi, en contexte de forte demande en CO₂ pour la photosynthèse (lors des pics de production), le fractionnement diminue et les algues s'enrichissent en ¹³C (Gu et Schelske 1996).

En définitive, le fractionnement isotopique total entre la source de carbone inorganique et le carbone végétal est sous le contrôle de nombreux facteurs. Le fractionnement enzymatique, CO₂-dépendant, a le plus d'influence sur le fractionnement total. Les concentrations en CO₂ atmosphérique sont relativement stables et, par conséquent, les végétaux terrestres ont des gammes de δ¹³C relativement restreintes et qui dépendent majoritairement de la voie photosynthétique (C3 ou C4). Les concentrations en CID sont par contre sujettes à de fortes fluctuations en fonction des saisons et de la stratification des eaux (Quay *et al.* 1986). Les fractionnements isotopiques algaux s'étalent donc sur une large gamme. Pour toutes les algues cependant, une augmentation de productivité primaire se traduit par une diminution du fractionnement isotopique, tant à l'échelle des processus d'entrée du CO₂ qu'à celle de la carboxylation.

- Signature de la source de carbone inorganique :

Les végétaux terrestres fixent le carbone atmosphérique, dont la signature isotopique, de l'ordre de -7,8‰, est quasi-homogène à l'échelle de l'écosystème.

Les producteurs primaires aquatiques submergés exploitent le Carbone Inorganique Dissous (CID = CO₂ dissous ou bicarbonates). Le CID provient de trois processus différents. Une fraction de CID provient de la dissolution du substrat, sa valeur de δ¹³C peut être considérée comme constante pour un lac donné. Le CID issu de la dissolution de CO₂ atmosphérique a une valeur de δ¹³C élevée,

aux alentours de 0‰ (la dissolution opère un fractionnement isotopique positif, de l'ordre de 8‰, en favorisant la dissolution des molécules de CO₂ comportant l'isotope lourd ¹³C). Enfin, une fraction du CID provient des processus de minéralisation de la matière organique. Comme mentionné précédemment, la respiration fractionne peu. Le CID issu de cette minéralisation a donc un δ¹³C proche de celui de la matière organique dont il est issu. Mais cette matière organique, suite au fractionnement isotopique fort lors des processus de fixation photosynthétique, est toujours appauvrie en ¹³C par rapport au CID atmosphérique. De ce fait, le CID issu de la minéralisation de cette matière organique est lui aussi appauvri par rapport au CID d'origine atmosphérique (Keough *et al.* 1995).

La signature isotopique du CID subit des variations spatiales (notamment une stratification verticale) et saisonnières marquées (Quay *et al.* 1986; Zohary *et al.* 1994), qui traduisent les variations de contributions relatives du carbone inorganique atmosphérique ou issu de minéralisation. Le δ¹³C du CID dépend par conséquent des rapports photosynthèse/respiration dans les différentes régions du lac ou selon les saisons (France *et al.* 1997; Post 2002b; Bade *et al.* 2004).

La combinaison de la signature isotopique du carbone inorganique et du fractionnement isotopique imposé par la photosynthèse conduit à une large gamme de δ¹³C des producteurs primaires. (Fig. 2)

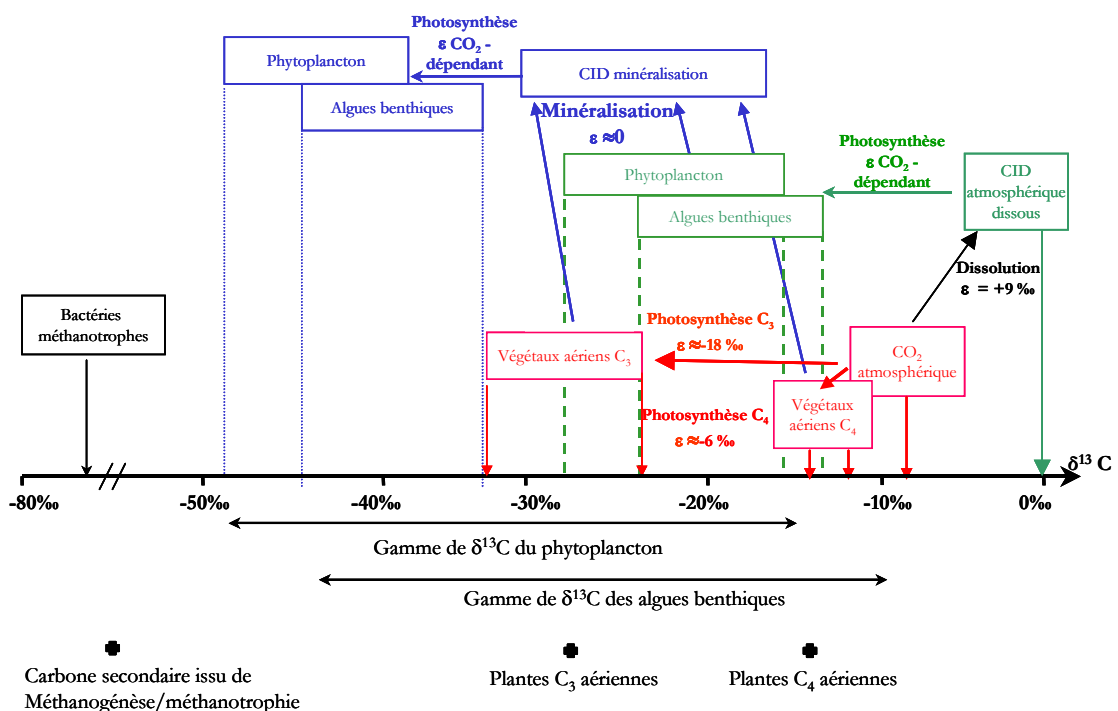


Figure 2: Gamme de variations du δ¹³C des producteurs primaires en milieu lacustre. Par souci de synthèse, les bactéries méthanotrophes (traitées dans le chapitre suivant) ont été ajoutées à ce schéma. ε : fractionnement isotopique

- $\delta^{15}\text{N}$ des producteurs primaires.

Comme pour le carbone, la signature $\delta^{15}\text{N}$ des producteurs primaires couvre une large gamme et dépend de la signature de la source inorganique utilisée et du fractionnement lors de la fixation. Les sources d'azote utilisables par les végétaux sont variées (azote atmosphérique, ammonium, nitrates...) et de nombreux processus sont susceptibles d'affecter la signature des sources inorganiques : processus microbiens de nitrification, dénitrification et apports anthropiques (Cabana et Rasmussen 1996; Cole *et al.* 2004). Le fractionnement isotopique dépend de la croissance algale et de la nature du substrat utilisé (Lajtha et Marshall 1994). Comme pour le carbone, le $\delta^{15}\text{N}$ des producteurs primaires informe sur le substrat inorganique utilisé, son origine et les conditions de fixation (Leggett *et al.* 2000; Carmichael *et al.* 2004; Cole *et al.* 2004) mais l'objectif de ce travail ne s'attache pas à décrire le cycle de l'azote. Par contre, la forte variabilité des signatures $\delta^{15}\text{N}$ des sources de carbone primaire peut être utile lorsqu'elle permet de discriminer des sources de natures différentes _benthique, phytoplanctonique, anthropique, terrestre_ (France 1995c).

- Variabilité temporelle et spatiale des $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ des producteurs primaires en lac.

Les compositions isotopiques des producteurs primaires reflètent les conditions environnementales. En milieu terrestre, concentrations et signatures des sources inorganiques (azote et carbone) sont relativement constantes et la signature des végétaux terrestres plutôt stable. Dans les lacs au contraire, la stratification agit fortement sur la concentration et sur la composition isotopique des sources inorganiques. De plus, les algues ont un temps de renouvellement de l'ordre de quelques jours ou semaines. Elles présentent en outre de fortes variations de productivité et subissent des cycles de successions spécifiques. En conséquence, la composition isotopique des algues varie largement, non seulement entre les milieux mais aussi au sein d'un même lac au cours du temps : l'amplitude des variations saisonnières du $\delta^{13}\text{C}$ phytoplanctonique sur un même lac peut atteindre 20 ‰ (Zohary *et al.* 1994).

1.1.2.3. Fractionnement isotopique du carbone lors des processus de méthanogénèse-méthanotrophie

Dans les zones oxiques, le carbone organique est minéralisé par respiration, avec un fractionnement faible entre carbone organique et CO_2 produit. Dans les zones hypoxiques ou anoxiques des lacs (sédiments ou zone inférieure de l'hypolimnion), l'absence d'oxygène favorise une minéralisation par des processus d'oxydation anaérobie de la matière organique. Cette oxydation est couplée à l'utilisation de différents accepteurs d'électrons dans le sens des potentiels oxydo-réducteurs

décroissants (NO_3^- , MnO_x , $\text{Fe}(\text{OH})_3$, SO_4^{2-}). Le dernier stade de la minéralisation est la fermentation, de l'acétate en particulier, qui conduit à la formation de méthane _méthanogénèse_ (Lazerte 1981). La méthanogénèse est un processus qui contre-sélectionne fortement les isotopes lourds ^{13}C , avec un fractionnement maximal de -95% (Whiticar 1999). CO_2 et CH_4 produits diffusent jusqu'à l'oxycline où une partie du méthane est oxydée en CO_2 par les bactéries méthanotrophes, à métabolisme aérobie. Le fractionnement isotopique supplémentaire du ^{13}C introduit lors de l'oxydation du méthane par les bactéries conduit à des $\delta^{13}\text{C}$ exceptionnellement bas pour la biomasse des méthanotrophes ($\leq -70\%$). Le recyclage de la matière organique par le processus de méthanogénèse-méthanotrophie conduit à une signature $\delta^{13}\text{C}$ typique des méthanotrophes (Fig 2). Ces bactéries méthanotrophes peuvent contribuer aux régimes alimentaires des macroinvertébrés lacustres (Kiyashko *et al.* 2001).

Les origines ainsi que les transformations subies par le carbone lors du cycle biogéochimique, sont signées, via le fractionnement isotopique : on entrevoit alors dans quelle mesure la signature isotopique peut constituer un outil puissant d'investigation des voies de transferts du carbone en lac.

1.2. Applications à l'étude des réseaux trophiques et des flux de carbone

1.2.1. Discrimination et transmission de la signature des sources de carbone le long des réseaux trophiques :

1.2.1.1. La théorie

Les sources de carbone primaire benthiques et planctoniques, ainsi que le carbone organique recyclé par voie méthanogénétique, peuvent être discriminés par leur $\delta^{13}\text{C}$ (France 1995a; Kiyashko *et al.* 2001). Par contre, la discrimination entre carbone allochtone et autochtone sur la base du $\delta^{13}\text{C}$ n'est pas possible dans tous les systèmes. Dans la plupart des lacs oligo ou mésotrophes, la signature $\delta^{13}\text{C}$ phytoplanctonique est suffisamment négative pour être distincte de la signature terrestre (-26%). Dans les lacs eutrophes, le $\delta^{13}\text{C}$ phytoplanctonique, sous l'effet de la plus grande productivité primaire (et donc d'un fractionnement photosynthétique moindre), est moins négatif et tend à converger vers la signature $\delta^{13}\text{C}$ du carbone terrestre (France 1996b). Dans le cas d'un lac eutrophe, le $\delta^{15}\text{N}$ peut éventuellement être un outil de discrimination isotopique entre des sources dont les $\delta^{13}\text{C}$ sont similaires (France 1995c). On peut aussi avoir recours, dans le cas de petits lacs expérimentaux, à l'addition de CI enrichi en ^{13}C , qui conduit à une signature $\delta^{13}\text{C}$ des producteurs primaires autochtones artificiellement élevée et qui permet de discriminer entre les sources de carbone de différentes natures (Cole *et al.* 2002; Kritzberg *et al.* 2004; Pace *et al.* 2004). La composition isotopique des sources se transmet le long des chaînes trophiques, et signe, à chaque niveau, la provenance du carbone. De plus, l'enrichissement en ^{15}N des organismes à chaque niveau trophique permet de positionner un organisme

dans le réseau trophique. La combinaison des deux indicateurs fournit par conséquent une image des flux majeurs de carbone dans le réseau trophique, à condition que les compositions isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ des sources de carbone soient connues.

1.2.1.2. La pratique... : Utilisation d'intégrateurs

La mesure des compositions isotopiques des sources de carbone soutenant potentiellement le réseau trophique pose deux difficultés :

□ Obtention du producteur primaire pur

Lors des prélèvements sur le terrain, il est difficile d'isoler le phytoplancton ou les algues benthiques des autres particules (bactéries, ciliés, détritiques, matière minérale). La plupart du temps, la composition isotopique du « phytoplancton » provient de mesures faites sur de la matière organique particulaire en suspension (MOPS) ou de plancton collectés sur des filtres à mailles fines ($<30\mu\text{m}$), sous l'hypothèse implicite que la majeure partie de ce matériel est composé d'algues (Del Giorgio et France 1996; Grey *et al.* 2000). La MOPS est pourtant un mélange complexe de bactéries, de microorganismes hétérotrophes, de détritiques d'origines diverses, de phytoplancton et éventuellement de petit zooplancton. Le $\delta^{13}\text{C}$ de la MOPS fine est donc particulièrement hétérogène. Dans la plupart des lacs (en particulier oligo-, méso- ou hypereutrophes), il n'y a aucune corrélation entre les $\delta^{13}\text{C}$ de la MOPS et celle du phytoplancton pur (Del Giorgio et France 1996; Grey *et al.* 2000). L'utilisation de la MOPS comme approximation de la signature phytoplanctonique n'est donc pas satisfaisante et a conduit à des incompréhensions ou de mauvaises interprétations des flux trophiques.

De même, les biofilms benthiques ou les algues épipéliques sont intimement liés au support (organique ou inorganique) et souvent en association avec des communautés microbiennes (Vadeboncoeur *et al.* 2003). Le grattage des supports peut conduire à l'obtention d'un mélange de carbone présentant des valeurs hétérogènes de $\delta^{13}\text{C}$.

De plus, parmi les particules présentes dans ces mélanges (MOPS ou issu du grattage des supports benthiques), toutes ne sont pas susceptibles d'entrer dans les réseaux trophiques. Les consommateurs primaires sont effectivement capables de sélectionner les particules phytoplanctoniques ou bactériennes (souvent appauvries en ^{13}C) et d'exclure la majorité des particules détritiques (enrichies en ^{13}C). On observe donc couramment un appauvrissement du $\delta^{13}\text{C}$ du zooplancton par rapport à celui de la MOP incompatible avec l'enrichissement trophique attendu. Cette observation confirme le fait que la mesure du $\delta^{13}\text{C}$ de la MOP ne fournit pas une estimation appropriée de celle du phytoplancton (Del Giorgio *et France* 1996; Grey *et al.* 2000).

□ *Intégration de la variabilité temporelle et spatiale*

La composition isotopique des producteurs primaires varie rapidement sous l'effet des changements saisonniers de production primaire, des successions spécifiques, des phénomènes de brassage de la colonne d'eau, de la profondeur à laquelle se situent les organismes, et enfin des éventuels apports en nutriments du bassin versant (Zohary *et al.* 1994; Post 2002b; Cole *et al.* 2004). Le temps de renouvellement isotopique, c'est à dire le délai nécessaire pour que la composition isotopique d'un organisme soit à l'équilibre avec celui de sa nourriture, est de l'ordre de quelques jours pour le microplancton (Cabana et Rasmussen 1996). Généralement, il dépend directement du taux de renouvellement cellulaire de l'organisme et donc de la taille de l'organisme considéré (Cabana et Rasmussen 1996). Les organismes positionnés plus hauts dans le réseau trophique ont par conséquent des temps de renouvellement isotopiques plus élevés, de l'ordre de la semaine pour le zooplancton (Grey 2000) et du mois pour le tissu musculaire des poissons (Hesslein *et al.* 1991; Hesslein *et al.* 1993). La composition isotopique des tissus d'un organisme correspond donc à la moyenne de la signature isotopique de sa nourriture au cours d'une période correspondant au temps de renouvellement de cet organisme (Post 2002b). Les expériences de De Niro et Epstein (1978, 1981) ont été menées dans des conditions où la composition isotopique de la nourriture était constante. Par contre, en milieu naturel, si les temps d'intégration ne sont pas pris en compte, il y a peu de chances que les organismes appartenant à une même chaîne trophique présentent des compositions isotopiques instantanées dans les gammes de fractionnements isotopiques de De Niro et Epstein (1978; 1981) (Fig. 3). Il est donc nécessaire de comparer des compositions isotopiques relatives à des échelles d'intégration similaires (O'Reilly *et* Hecky 2002).

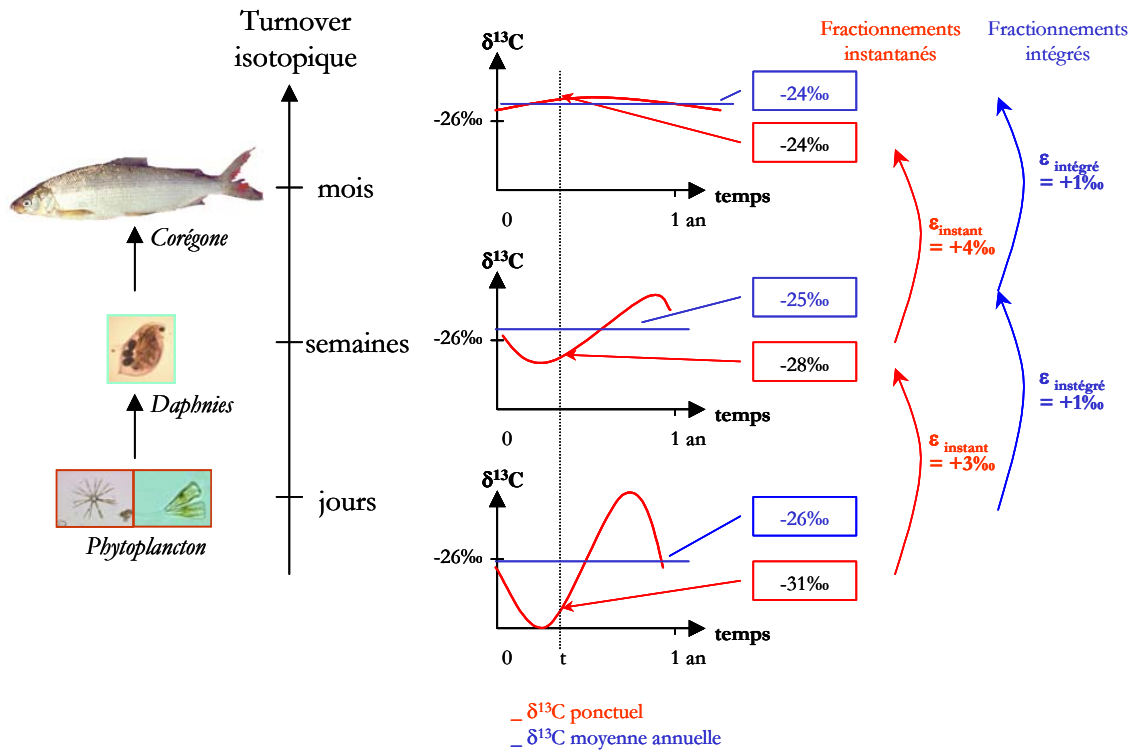


Figure 3 : Fractionnements entre compositions isotopiques instantanées et intégrées. Les différents organismes de cette chaîne trophique ont des temps de renouvellement isotopique croissants du phytoplancton au poisson. Les variations saisonnières de la composition isotopique du phytoplancton sont transmises avec retard et amortissement dans les niveaux supérieurs de la chaîne. Les différences entre les compositions isotopiques instantanées au sein de cette chaîne trophique linéaire ne sont pas dans la gamme de variations prédites par les expériences de De Niro et Epstein (1978). Les compositions isotopiques moyennes sur l'année, par contre, présentent des fractionnements, à chaque étape trophique, similaires à ceux de De Niro et Epstein (1978).

Pour contourner ces deux difficultés, Cabana et Rasmussen (1996) puis Post *et al.* (2000 ; 2002b) proposent d'utiliser des organismes intégrateurs. Pour étudier les flux de carbone à l'échelle des poissons par exemple, il est nécessaire de comparer des organismes avec des temps de renouvellement isotopiques de l'ordre du mois ou de l'année. La composition isotopique moyenne des sources de carbone primaire (ou **ligne de base**) est estimée en utilisant celle de consommateurs primaires, à longue durée de vie. Classiquement, les mollusques filtreurs, comme les unionidés ou les moules zébrées, sont considérés comme des organismes intégrateurs de la signature phytoplanctonique _ligne de base pélagique_ et les gastéropodes, tels que les limnées, ceux de la signature périphytique _ligne de base benthique_ (Post 2002b). Post (2002b) a montré que la composition isotopique tissulaire de ces organismes était égale à la moyenne des variations saisonnières de la source considérée (zooplancton en milieu pélagique et périphyton en milieu littoral) sur la saison de croissance des organismes. Puisqu'il s'agit d'organismes peu sélectifs (filtreurs ou racleurs), leur composition isotopique reflèterait au mieux la composition isotopique de la matière organique susceptible d'être intégrée dans les réseaux. Les

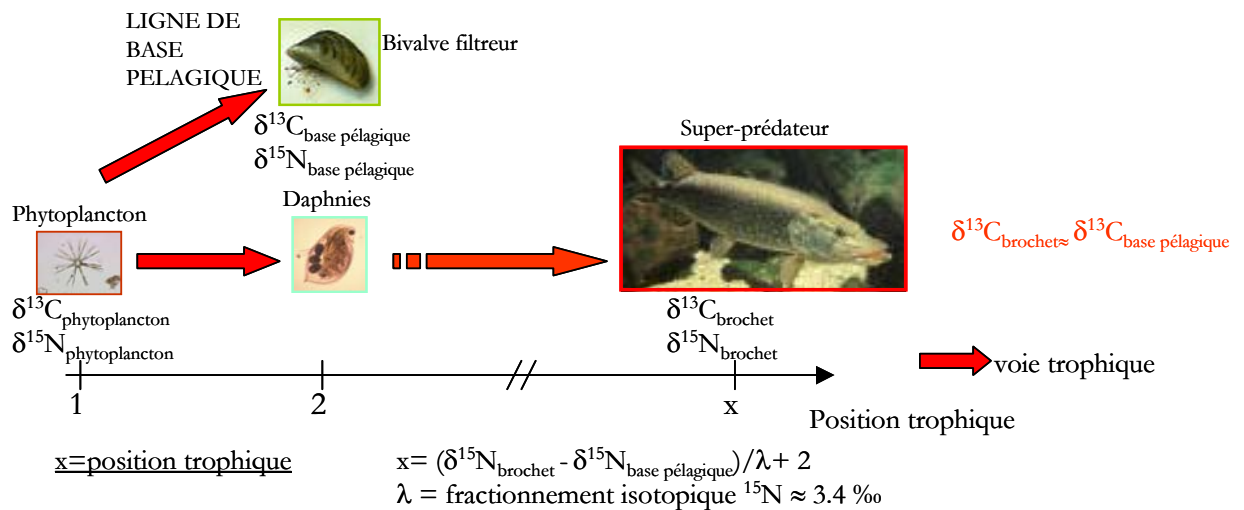
compositions isotopiques de ces intégrateurs définissent la « ligne de base » isotopique des réseaux trophiques.

Lorsqu'il s'agit de comparer sur des échelles de temps plus courtes (quelques semaines), le zooplancton est utilisé comme ligne de base isotopique. Parmi les espèces zooplanctoniques, Matthews et Mazumder (2003) préconisent l'utilisation des organismes filtreurs, tels que les Daphnies, comme ligne de base.

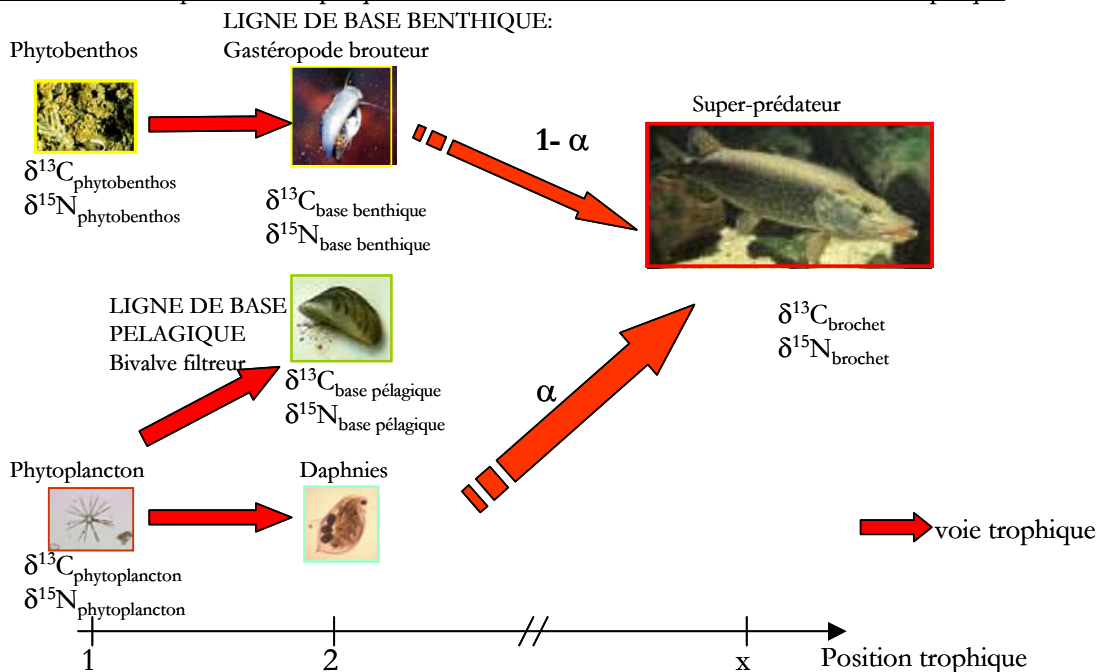
1.2.2. Modèles de mélange et longueur des chaînes trophiques

Si on dispose des lignes de base isotopiques adéquates (benthique, phytoplanctonique et éventuellement terrestre), il semble alors réalisable de déterminer d'où provient le carbone à la base des voies trophiques menant à un organisme et combien de transitions trophiques ont eu lieu depuis le niveau des producteurs primaires (Vander Zanden *et al.* 1999b; Post 2002b) (Fig. 4).

1. Estimation des positions trophiques : une source de carbone soutenant la voie trophique



2. Estimation des positions trophiques : deux sources de carbone soutenant la voie trophique



$\alpha = \text{contribution du carbone pélagique}$ (modèle de mélange)

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{brochet}} \approx \alpha * \delta^{13}\text{C}_{\text{base pélagique}} + (1 - \alpha) * \delta^{13}\text{C}_{\text{base benthique}}$$

$$\alpha = (\delta^{13}\text{C}_{\text{brochet}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{base benthique}}) / (\delta^{13}\text{C}_{\text{base pélagique}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{base benthique}})$$

$X = \text{position trophique}$

$$x = (\delta^{15}\text{N}_{\text{brochet}} - (\alpha * \delta^{15}\text{N}_{\text{base pélagique}} + (1 - \alpha) * \delta^{15}\text{N}_{\text{base benthique}})) / \lambda + 2$$

$\lambda = \text{fractionnement isotopique } ^{15}\text{N} \approx 3.4 \text{ ‰}$

Figure 4 Modèles de mélanges et de calculs de positions trophiques issus de (Post et al. 2000)

L'estimation ainsi obtenue de la position trophique est censée refléter l'ampleur des flux d'énergie ou de masse le long des différentes voies trophiques et prendre en compte les interactions trophiques complexes telles que l'omnivorie. Elle donne aussi une image intégrée dans le temps et l'espace. D'après ce modèle, l'analyse des isotopes stables fournirait une mesure quantitative des

différents flux, de la longueur des chaînes trophiques dans un système et de la contribution relative du pélagique et du benthique dans le carbone à la base des voies trophiques menant à un organisme (Post *et al.* 2000; Vander Zanden et Vadeboncoeur 2002).

1.3. Critiques et limites de la méthode : la justification d'une approche comparative.

Dans une introduction biographique de son ouvrage de synthèse sur les isotopes (*in press*), B. Fry regarde avec humour sa « carrière isotopique ». Il en tire une histoire de l'évolution du scientifique au contact de l'analyse isotopique. La première étape est celle du débutant curieux face aux techniques isotopiques, qu'il nomme « isodope ». Face aux principes de l'analyse isotopique, ce débutant devient un expérimentateur enthousiaste de l'analyse isotopique ou « Isotopeeter ». A force d'expérimentations plus ou moins cadrées, cet expérimentateur enthousiaste essuie des échecs et se doit finalement d'affronter le fait que la méthode isotopique n'est pas la panacée, qu'elle connaît elle aussi ses limites. Il devient alors un « isotopiste », un peu amer et déçu en prenant conscience des faiblesses de la méthode. Enfin, il prend du recul et évalue conjointement la puissance et la limite de la méthode pour atteindre l'échelon d'« Isotopologiste ». Ce paragraphe vise un objectif « isotopologiste ». Il a pour but de discuter des faiblesses et des limites de l'analyse isotopique pour proposer un cadre d'utilisation de cette méthode dans lequel, selon nous, elle sera la plus puissante et la plus informative.

1.3.1. Analyse isotopique et contenus stomacaux : une réelle concurrence ?

De nombreuses publications relatives à l'analyse isotopique des réseaux trophiques opposent méthodes des contenus stomacaux et analyse isotopique (Wainright *et al.* 1993; Vander Zanden *et al.* 1997; Beaudoin *et al.* 1999; Vander Zanden et Vadeboncoeur 2002). Cette opposition est-elle justifiée dans le cadre de notre problématique ?

A l'échelle d'un organisme dans un écosystème, l'analyse isotopique fournit une estimation de l'origine (plutôt benthique, plutôt pélagique, plutôt terrestre) du carbone qui parvient jusqu'à cet organisme et de la distance de cet organisme aux bases du réseau trophique. Cette estimation est intégrée dans le temps (selon le turnover isotopique de l'organisme ou du tissu de l'organisme sur lequel a été réalisée la mesure isotopique) et dans l'espace (zones et profondeurs d'alimentation de l'organisme). L' AIS donnerait une image de la nourriture non pas ingérée mais réellement assimilée (ce dont on discutera plus loin).

L'analyse des contenus stomacaux procure la composition spécifique du bol alimentaire d'un organisme. Elle atteint donc une résolution taxonomique bien supérieure à celle de l' AIS. Contrairement à l'analyse isotopique, il s'agit cependant d'un instantané de l'alimentation d'un individu. Elle n'apporte donc des informations fiables que dans le cas d'espèces dont le régime alimentaire est stable ou si l'analyse est répétée de façon saisonnière (Grey *et al.* 2002). De plus, tout ce qui est ingéré

n'est pas assimilé, mais l'analyse des fécès, si elle est réalisée conjointement, peut pallier à ce biais. Il s'agit cependant d'une méthode qui nécessite beaucoup de temps et qui est parfois difficilement réalisable sur des organismes de petite taille ou sur des proies partiellement digérées (Hyslop 1980).

Ces deux méthodes sont relatives à des objets voisins et sont souvent déclarées comme concurrentes (Persson et Hansson 1999) ou complémentaires (Vander Zanden *et al.* 1997; Beaudoin *et al.* 1999). Répondent-elles finalement aux mêmes problématiques ?

L'analyse isotopique informe sur les flux de matière (C et N) mais ses capacités sont limitées en ce qui concerne l'étude du régime alimentaire et la reconstitution des réseaux trophiques. Elle ne fournit pas, par elle seule, des informations relatives aux relations prédateurs proies, sauf dans des écosystèmes à faible biodiversité et à réseaux trophiques très simples (Kling *et al.* 1992b). On peut prédire, à quelques 1/10èmes de ‰, la composition isotopique d'un individu nourri avec une proie de composition isotopique connue, mais on ne peut pas déduire des analyses isotopiques avec certitude quelle a été la proie d'un individu (Fig. 5).

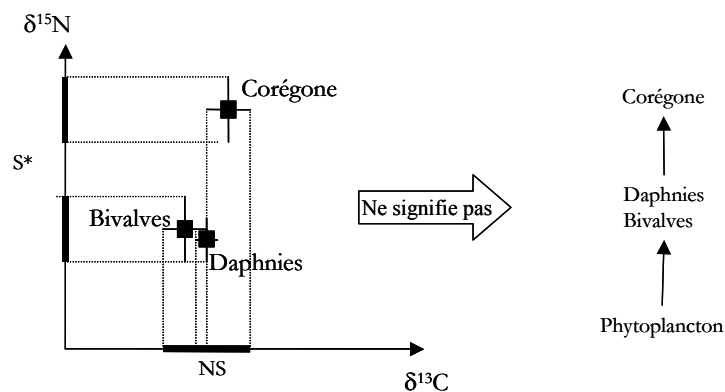


Figure 5: AIS et relations prédateurs proies.

Dans l'exemple, zooplancton et bivalves filtreurs occupent la même position trophique dans la chaîne pélagique : ils auront par conséquent des $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ (lorsque rapportés à la même échelle de temps) similaires. Le Corégone sera enrichi en ^{15}N d'environ 3.4‰ et aura un $\delta^{13}\text{C}$ similaire à celui des bivalves et du zooplancton. Des compositions isotopiques, on peut construire un raisonnement ascendant : ces trois espèces appartiennent à un même réseau trophique, alimenté par la production primaire pélagique. Les bivalves et le zooplancton occupent le deuxième niveau trophique et le Corégone le troisième. Par contre, le raisonnement descendant peut conduire à un raisonnement erroné : la consommation de bivalves par une espèce conduirait à une composition isotopique similaire à celle du corégone, mais ce n'est pas parce le corégone a une composition isotopique compatible avec celle d'un consommateur de bivalves qu'il en mange... Cette information ne peut être issue que de l'analyse de contenus stomacaux.

De même, l'analyse des contenus stomacaux permet difficilement d'estimer quelle est la nature de la production primaire qui soutient le réseau trophique aboutissant au corégone. L'analyse du contenu stomacal du corégone, par exemple, donnera la composition spécifique de ses proies zooplanctoniques. Mais le zooplancton peut consommer des particules de nature hétérogène, selon des proportions différentes tout au long de l'année (Grey *et al.* 2001). Il faudrait alors analyser les contenus

stomacaux des espèces zooplanctoniques ou passer par analyse isotopique (cf (Grey *et al.* 2002)) pour identifier la nature et l'origine des particules à l'intérieur des estomacs selon un système de poupées russes.

En définitive, la question du « qui mange qui ? » est plus facilement résolue par les analyses des contenus stomacaux tandis que celle de l'origine du carbone qui soutient la voie trophique menant à un organisme est plutôt du ressort des analyses des compositions isotopiques.

1.3.2. AIS et Quantification absolue

L'AIS a beaucoup été utilisée dans des démarches quantitatives (proportions de telle ou telle source de carbone dans l'alimentation d'une espèce, calcul du niveau trophique d'un organisme dans une chaîne, estimation de la longueur de chaînes trophiques ...). Ces approches cependant s'appuient sur des hypothèses qui n'ont pas fait systématiquement l'objet de vérification ou qui peuvent être contestées. La plupart de ces écueils ont été soulevés par des physiologistes ou des écophysiologistes (Gannes *et al.* 1997; Focken et Becker 1998; Gaye-Siessegger *et al.* 2004) .

La quantification des contributions des sources de nourriture à l'alimentation d'un organisme a recours à l'utilisation de modèles de mélanges, comme décrit au paragraphe 1.2.2. L'hypothèse sous-jacente à un modèle de mélange est que la composition isotopique d'un tissu d'un consommateur est égale à la moyenne pondérée des compositions isotopiques des constituants de la nourriture. Cette hypothèse comprend par conséquent plusieurs implications :

1. l'assimilation des composants alimentaires est identique, quelle que soit la source ;
2. le fractionnement isotopique lors d'une relation trophique est similaire, quels que soient le consommateur et la source de nourriture ;
3. les compositions isotopiques du tissu utilisé de la proie et de celui du prédateur ont des temps de renouvellement isotopiques comparables.

Les hypothèses sous-jacentes à un modèle de calcul d'un niveau trophique ou d'une longueur de chaîne trophique (Post *et al.* 2000) sont identiques. Par la suite, ces hypothèses seront discutées dans le but d'évaluer dans quelle mesure l'analyse isotopique peut prétendre à une approche quantitative.

1.3.2.1. Assimilation des nutriments et routage isotopique

Lors de l'application de l'AIS dans une des démarches quantitatives évoquées précédemment, l'hypothèse d'une assimilation uniforme des nutriments, quelles que soient les sources de nourriture et /ou la période de consommation, est tacitement émise. Elle suppose que la composition isotopique des nutriments assimilés est systématiquement reflétée dans celles des tissus du consommateur (ou routage isotopique uniforme). L'exemple suivant persuade de l'écueil caché derrière une telle hypothèse.

L'ours de Gannes et al (1997)

Il s'agit d'un exemple théorique mais plausible d'une espèce d'ours omnivore (l'ours brun *Ursus arctos*) dans un environnement côtier. La proximité du milieu marin lui permet d'accéder aux poissons, qui lui fournissent protéines et lipides, tandis que l'environnement terrestre lui fournit des baies, sources de glucides. Les lipides sont alors stockés tandis que les glucides sont catabolisés directement. Les protéines alimentaires sont, quant à elles, utilisées dans la construction et le renouvellement des protéines tissulaires. Par conséquent la composition isotopique des tissus dépendra uniquement de celle des protéines du poisson : la composition isotopique des tissus de cet ours sous-estimera largement la contribution des sources terrestres de nourriture dans son alimentation.

L'AIS est souvent considérée comme une méthode qui fournit des informations sur la nourriture assimilée. En fait, parmi les nutriments assimilés, seuls ceux qui participent à la synthèse tissulaire peuvent être tracés par AIS. En définitive, la composition isotopique d'un tissu révèle celle des nutriments de la nourriture à partir desquels ce tissu a été synthétisé.

1.3.2.2. Variabilité sur le fractionnement trophique.

La valeur du fractionnement trophique suscite un débat continu. Dans l'ensemble, les études postérieures aux travaux de De Niro et Epstein (1978-1981) ont confirmé les valeurs moyennes du fractionnement trophique estimées originellement (Post 2002b; Mc Cutchan *et al* 2003 ; Vanderklift et Ponsard 2003). Elles ont toutefois souligné l'importance de la variabilité observée sur le fractionnement trophique (Fig. 6).

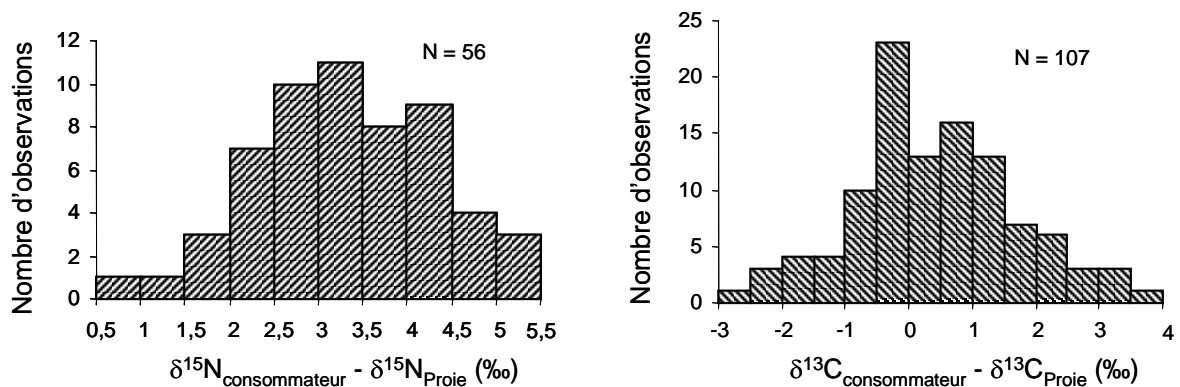


Figure 6 Distributions des fractionnements trophiques en $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ par niveau trophique. Les moyennes sont 3,4 ‰ pour $\delta^{15}\text{N}$ ($SD = 0,98$, $n = 56$) et 0,39‰ pour $\delta^{13}\text{C}$ ($SD = 1,3$, $n = 107$). Les distributions ne sont pas significativement différentes d'une distribution normale. Issu de Post (2002b).

□ Variabilité du $\delta^{15}\text{N}$

Même si la variabilité du fractionnement trophique $\delta^{15}\text{N}$ est large, un enrichissement du consommateur en ^{15}N est toujours constaté au cours d'une transition trophique. Vanderklift et Ponsard (2003) ont testé différentes sources potentielles de variation de l'enrichissement trophique en ^{15}N . Cette démarche avait pour but d'évaluer dans quelle mesure cette variabilité était aléatoire ou résultait, au contraire, d'influences spécifiques et surtout prédictibles. Parmi les facteurs étudiés figure la forme d'excrétion azotée. En effet, l'enrichissement trophique a été très tôt attribué au fractionnement isotopique lors de la transamination des protéines au cours des processus de catabolisme des protéines (Minagawa et Wada 1984). Vanderklift et Ponsard (2003) montrent que la forme d'excrétion azotée est le premier facteur de variabilité de l'enrichissement trophique. Les différences d'enrichissement trophique résulteraient par conséquent du nombre d'étapes impliquées dans la synthèse des différentes formes biochimiques des produits d'excrétion azotée. Les plus petits fractionnements isotopiques ont été observés chez les aphides qui excrètent l'azote sous forme d'acides aminés (-0,93‰) et les plus forts fractionnements chez les organismes à excrétion uréotélique (+3,11‰). La deuxième source de variabilité, envisagée dans plusieurs études est la composition de la source de nourriture (Vander Zanden et Rasmussen 2001; Post 2002b; Vanderklift et Ponsard 2003). Les résultats sont contradictoires lorsqu'il s'agit de comparer les fractionnements trophiques entre herbivores/carnivores/détritivores. Par contre, les résultats concernant la composition en azote, estimée par le rapport C/N, sur le fractionnement trophique sont cohérents (Adams et Sterner 2000; Vanderklift et Ponsard 2003). Le fractionnement trophique serait plus faible pour les nourritures à C/N fort. Ces résultats sont interprétés en terme de stress nutritionnel (Hobson et Clark 1992a; Gannes *et al.* 1997; Gaye-Siessegger *et al.* 2004). Lorsque la ressource en azote serait limitée, voire absente dans le cas de jeûne, les animaux puiseraient dans « leurs propres tissus », introduisant ainsi un fractionnement supplémentaire. Enfin, l'enrichissement dépend du tissu considéré, en fonction de sa composition en acides aminés et de son temps de renouvellement isotopique (Gannes *et al.* 1997).

□ Variabilité du $\delta^{13}\text{C}$

Les sources de variabilité du fractionnement trophique ^{13}C ont été largement débattues mais peu éclaircies encore. Comme pour le ^{15}N , la composition biochimique des tissus est susceptible de modifier le fractionnement trophique en fonction du tissu du consommateur étudié (De Niro et Epstein 1978; Focken et Becker 1998). Post (2002b) envisage, d'autre part, l'influence de la qualité de la nourriture mais n'a pas pu vérifier ses hypothèses. Gaye-Siessegger *et al.* (2004) ont récemment montré l'importance de la quantité de nourriture sur le fractionnement trophique ^{13}C , mais aussi ^{15}N . Cependant, les relations entre quantité de nourriture et valeur du fractionnement trophique sont non linéaires et difficilement prédictibles.

□ *Fractionnement isotopique dans les micro-organismes*

Les micro-organismes ont des fractionnements encore mal définis, qui dépendent notamment de leur fonction biochimique. Les bactéries impliquées dans les fonctions de méthanotrophie/méthanogénie ou dans celles de nitrification/dénitrifications ont montré des fractionnements importants lors de l'assimilation du carbone ou de l'azote (Whiticar 1999; Lehmann *et al.* 2003). Dans l'ensemble cependant, les relations entre compositions isotopiques des bactéries et de leur substrat, ainsi que celles entre compositions isotopiques des bactéries et celles de protistes, sont mal connues. Certaines études relatives à la boucle microbienne marine ou lacustre admettent un fractionnement isotopique similaire à celui observé lors des transitions trophiques des métazoaires (Coffin *et al.* 1994; Karlsson *et al.* 2003) mais peu d'études fournissent des preuves de la validité de cette supposition. Le manque d'études concernant le fractionnement isotopique au niveau bactérien pourrait résulter du fait, qu'en milieu naturel, il est difficile d'isoler les bactéries du stock de matière détritique. L'évaluation des transferts de carbone aurait alors recours à l'utilisation de techniques alternatives telles que l'analyse de composés spécifiques, voire l'analyse isotopique sur composés spécifiques, plutôt qu'à l'analyse isotopique simple.

Face aux limites exposées précédemment, la tentation de sombrer dans un état d'esprit « isotopiste » est forte ! Les imprécisions quant aux modèles de mélange, aux fractionnements trophiques et aux lignes de base remettent largement en question la valeur quantitative de l'AIS.

1.3.3. La considération de ces limites dans une nouvelle approche de l'AIS

L'AIS est peu efficace dans le cadre de démarches visant une quantification absolue, par exemple, des proportions de carbone phytoplanctonique et non phytoplanctonique au stock de carbone d'un organisme. Le contact avec les physiologistes et la prise de conscience des faiblesses de l'AIS poussent ses utilisateurs à renouveler leur approche d'analyse pour pallier les difficultés évoquées dans le paragraphe précédent. Nous proposons d'adapter la démarche de l'analyse isotopique en fonction des niveaux trophiques d'intérêt.

1.3.3.1. Analyse Isotopique des Composés Spécifiques aux faibles niveaux trophiques

L'analyse isotopiques des composés spécifiques (AICS) est permise par le développement de la GC-C-IRMS (Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry). A la base, l'analyse isotopique des biomarqueurs avait pour but de discriminer les groupes microbiens au sein des sédiments. Au lieu de séparer les micro-organismes de la matrice, seules la présence et la concentration de molécules spécifiques sont mesurées au sein du mélange de matière organique. Les biomarqueurs

sont idéalement des macromolécules dont la synthèse est restreinte à certains groupes. Il s'agit donc de molécules à forte spécificité. La détection de ces biomarqueurs traduit la présence d'un groupe de micro-organismes (algues, champignons, bactéries...) et leur concentration informe sur la biomasse bactérienne. L'analyse de la composition isotopique de ces biomarqueurs peut permettre d'augmenter leur pouvoir discriminant. Depuis, l'analyse isotopique des composés spécifiques a été étendue à l'étude des réseaux trophiques. Largement appliquées 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; Boschler et Middelburg 2002). Parmi les composés spécifiques étudiés, figurent les acides aminés (Fantle *et al.* 1999; McClelland et Montoya 2002; Savidge et Blair 2004) et les acides gras des phospholipides (Bec 2003). L'idée générale de l'AICS appliquée à l'étude des réseaux trophiques repose sur la notion de nutriments essentiels ou non essentiels et les fractionnements isotopiques associés. Les fractionnements isotopiques utilisés dans l'analyse isotopique, dite « classique », entre la nourriture et un tissu ou le corps entier du consommateur font l'hypothèse que tous les acides aminés ou tous les acides gras subissent le même devenir métabolique et montrent, par conséquent, le même fractionnement isotopique lors d'une transition trophique. Or certains acides gras ou acides aminés sont dits essentiels, c'est à dire qu'ils ne font pas l'objet de synthèse *de novo* dans l'organisme, faute d'équipement enzymatique adéquat. D'autres, non essentiels, peuvent soit provenir de la nourriture, soit être synthétisés *de novo* à partir d'autres acides aminés ou d'acides gras. Plusieurs expériences montrent que les fractionnements isotopiques des acides aminés ou des acides gras essentiels lors d'une transition trophique sont très faibles, voire nuls car ils ne subissent aucune transformation entre la digestion des tissus de la proie et leur intégration dans les tissus du consommateur. Au contraire les nutriments non essentiels ont les plus forts fractionnements isotopiques puisqu'ils subissent de nouvelles synthèses, les plus variables aussi puisque les synthèses dépendent de la qualité nutritionnelle de la nourriture. Les AICS sont encore rares, surtout en milieu aquatique, et nécessitent encore un certain nombre d'expérimentations préalables, mais elles ont fourni des résultats encourageants dans le traçage des flux au sein des compartiments microbiens ou planctoniques (Fantle *et al.* 1999; McClelland et Montoya 2002). Aux bas niveaux trophiques (boucle microbienne-phytoplancton-zooplancton), les fractionnements isotopiques lors des transitions trophiques sont les plus variables : c'est donc à cette échelle que l'AICS est la plus justifiée. Il s'agit cependant d'une analyse qui reste onéreuse. Pour les niveaux trophiques supérieurs, la prise en considération de la variabilité du fractionnement isotopique permettrait d'obtenir des résultats satisfaisants pour des coûts plus modiques.

1.3.3.2. *Prise en compte de la variabilité du fractionnement trophique aux niveaux trophiques les plus élevés*

La variabilité interindividuelle et interspécifique observée sur le fractionnement trophique commence à présent à être incluse dans les AIS à l'initiative de Ponsard et Ardit (2000) en milieu terrestre, puis repris par Matthews et Mazumder (2003). Cette méthode permet de mettre en évidence des différences trophiques au sein de groupes de taxons ou d'individus en comparant la variabilité observée sur les $\delta^{13}\text{C}$ ou $\delta^{15}\text{N}$ de ce groupe à la variabilité attendue sur le fractionnement trophique. L'hypothèse sous-jacente est que, dans un groupe d'individus exploitant la même source de nourriture, la variabilité individuelle des compositions isotopiques ne peut résulter que de la variabilité observable sur le fractionnement trophique (SD = 1,3‰ pour le fractionnement trophique ^{13}C et 1,1‰ pour le fractionnement trophique ^{15}N (Post 2002b)). Si, dans un groupe, la variabilité interindividuelle des $\delta^{13}\text{C}$ et des $\delta^{15}\text{N}$ est supérieure à celle qui ne serait due qu'à des variations interindividuelles de fractionnement trophique, alors ce groupe est hétérogène et rassemble des individus qui exploitent des sources de carbone différentes et/ou qui n'occupent pas les mêmes niveaux trophiques.

Les modèles de mélange sont aussi particulièrement controversés (Hilderbrand *et al.* 1998; Phillips 2001; Phillips et Gregg 2001; Koch et Phillips 2002; Phillips et Koch 2002; Phillips et Gregg 2003) et l'« ours de Gannes » a fait coulé beaucoup d'encre. Il en est de même pour les modèles d'estimation de positions trophiques. Depuis, ces modèles ont été améliorés et intègrent à présent de plus en plus la conservation des équilibres de masse (Phillips 2001), la variabilité de la composition isotopique des sources (Phillips et Gregg 2001) ou du fractionnement trophique en fonction du C/N (Koch et Phillips 2002; Phillips et Koch 2002). Ils atteignent aussi une approche probabiliste (Phillips et Gregg 2003). Les proportions estimées par ces modèles sont alors accompagnées d'un intervalle de confiance (Post 2002b; Phillips et Gregg 2003). Les études de sensibilité montrent que les estimations de positions trophiques sont particulièrement sensibles à la variabilité sur le fractionnement trophique ^{15}N . Dans l'étude de Post (2002b), par exemple, la prise en compte de la variabilité du fractionnement trophique dans l'estimation de la longueur de la chaîne trophique conduit à un très large intervalle de confiance : la déviation introduite est de l'ordre de 25%. Pour $\delta^{13}\text{C}$, les études de sensibilité montrent que, dans la mesure où les sources de carbone ont des signatures suffisamment distinctes, le modèle de mélange souffre peu de la variabilité sur la facteur de fractionnement trophique ^{13}C (Post 2002b).

1.3.3.3. Comparaison des informations isotopiques au cours du temps ou entre systèmes

Les problèmes relatifs aux temps de renouvellement isotopique, croissant avec la taille des organismes (Cabana et Rasmussen 1996), la difficulté à obtenir une signature phytoplanctonique pure ainsi que la méconnaissance des fractionnements trophiques chez les micro-organismes font que l'AIS n'est pas très efficace dans le traçage des transferts de carbone au bas du réseau trophique (boucle microbienne-phytoplancton). Par contre, travailler à des niveaux plus élevés dans la chaîne (zooplancton-poissons) permet d'obtenir une image globale des transferts de carbone en s'affranchissant d'une variabilité spatiale et/ou temporelle qui pourrait complexifier l'interprétation. L'image des transferts de carbone alors obtenue n'a que peu d'intérêt en soi puisqu'elle ne permet d'obtenir qu'une estimation des transferts entachée d'erreurs suite aux biais de l'AIS. En contrepartie, ces biais sont les mêmes d'un lac à l'autre ou sur un même lac au cours du temps. Ainsi, bien qu'une AIS réalisée de façon isolée n'ait que peu d'intérêt en elle-même, le profil de variation des compositions isotopiques au cours du temps ou entre systèmes est au contraire particulièrement informatif. Dans une démarche comparative, l'AIS fournit des quantifications relatives sur les modifications des transferts de carbone dans les réseaux trophiques entre lacs ou suite à une perturbation.

2. LA COMPOSITION EN ISOTOPES STABLES DES POISSONS COMME INDICATEUR DU FONCTIONNEMENT TROPHIQUE DES LACS

2.1. *La composition isotopique du corégone : variabilité et signification*

2.1.1. Variabilité de la composition en isotopes stables du corégone entre les lacs alpins : implications fonctionnelles.

2.1.1.1. *Hypothèses et modèles*

□ *$\delta^{13}\text{C}$ du corégone et ligne de base pélagique*

Le corégone a un régime alimentaire zooplanctonophage plutôt constant, au moins pendant sa saison de croissance (Mookerji *et al.* 1998; Heikinheimo *et al.* 2000; Enz *et al.* 2001; Gerdeaux *et al.* 2002). Par conséquent, le $\delta^{13}\text{C}$ du corégone représente une intégration à long terme de celui du zooplancton crustacéen qu'il consomme. Mais que représente le $\delta^{13}\text{C}$ zooplanctonique ? S'ouvre alors le débat concernant la ligne de base pélagique.

Le zooplancton exerce une prédation sur la boucle microbienne, qui est elle même susceptible de métaboliser du carbone organique d'origines diverses, et non pas seulement phytoplanctonique. Cependant, selon l'efficacité que l'on accorde à ces transferts de carbone du compartiment microbien au compartiment zooplanctonique, on privilégie l'un des deux modèles présentés dans la Figure 7. En fonction du modèle adopté, les variations intersystèmes du $\delta^{13}\text{C}$ du zooplancton et, par conséquent, du corégone auront des significations différentes.

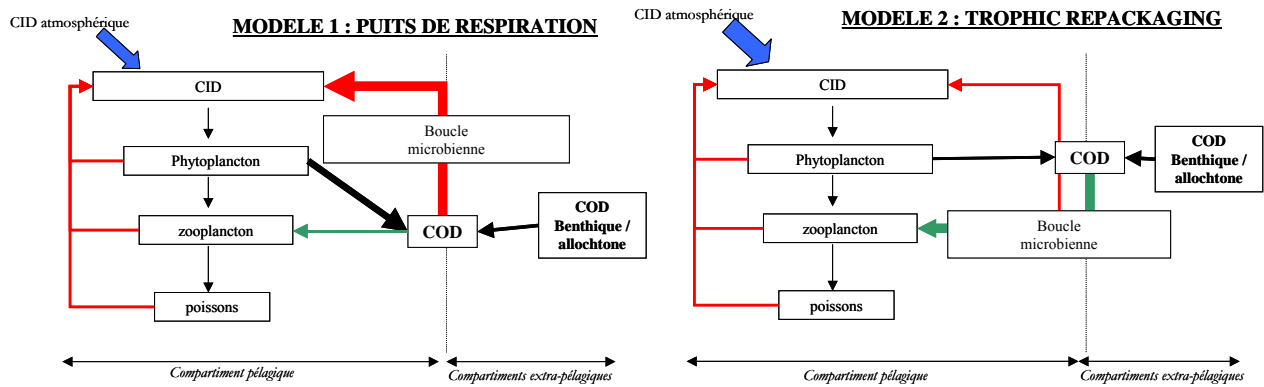


Figure 7. Deux modèles théoriques d'intégration du carbone microbien dans les réseaux trophiques pélagiques. L'épaisseur des flèches traduit l'importance relative des flux. Le premier modèle, conforme aux résultats de Cole *et al.* (2002) est caractérisé par une boucle microbienne à forte efficacité de minéralisation de la matière organique. Le carbone recyclé est essentiellement intégré sous forme inorganique au réseau pélagique, mais ne contribue pas à la production secondaire des invertébrés et des poissons. Dans le modèle 2, conforme aux résultats de Jones *et al.* (1999), la boucle microbienne a une forte efficacité de transferts du carbone organique aux organismes supérieurs. Le carbone non-phytoplanktonique contribue à la production secondaire des niveaux trophiques supérieurs. Modifié de Wetzel (2001).

Dans le premier modèle, conforme aux résultats de Cole *et al.* (2002), la boucle microbienne est un puits de respiration. Le fonctionnement de la boucle microbienne produit un CID appauvri en ^{13}C par rapport au CO_2 atmosphérique (Rau 1978; Keough *et al.* 1998). Les modifications dans le recyclage de la matière organique interviennent à l'échelle du $\delta^{13}\text{C}$ du CID et ces modifications sont ensuite transmises le long de la chaîne pélagique Schindler *et al.* (1997a). Dans ce modèle, les $\delta^{13}\text{C}$ du zooplancton et des poissons zooplanctonophages reflètent une ligne de base pélagique.

Dans le second modèle, la boucle microbienne joue le rôle de « trophic repackaging » (Gifford 1991), c'est à dire qu'elle transforme le COD en nourriture consommable par le zooplancton. Ce modèle est conforme aux résultats de Jones *et al.* (1999). Le carbone non-phytoplanktonique (c'est à dire benthique ou allochtone) est enrichi en ^{13}C par rapport au phytoplancton. Or, on considère que le fractionnement des isotopes lors du passage dans la boucle microbienne est nul (Coffin *et al.* 1994; Karlsson *et al.* 2003). Dans ce modèle, le $\delta^{13}\text{C}$ zooplanctonique ne reflète pas une ligne de base pélagique mais un mélange de $\delta^{13}\text{C}$ de carbone d'origines diverses.

Quel modèle privilégier dans le cadre de lacs alpins ?

La prédation du zooplancton sur la boucle microbienne et la dépendance de celui-ci vis-à-vis du carbone non-phytoplanktonique ont été plus largement étudiées à l'échelle du zooplancton dans les lacs humiques (Meili *et al.* 1996; Grey *et al.* 2000; Grey *et al.* 2001; Cole *et al.* 2002), sous l'*a priori* que le carbone allochtone, représentant 90% de la MOP dans ces lacs, devait constituer une source majeure de carbone pour le zooplancton. L'hypothèse, souvent tacite dans le cas de lacs clairs tels que les lacs

alpines, est que cette contribution est beaucoup moins importante (Karlsson *et al.* 2003). Nous avons donc considéré, dans un premier temps, que le carbone métabolisé dans la boucle microbienne contribuait peu à la production secondaire zooplanctonique. Nous avons privilégié l'hypothèse de transferts de carbone selon le modèle de puits de respiration, ce qui sera débattu par la suite. En définitive, sous l'hypothèse d'une structure de réseau trophique pélagique selon le modèle de Cole *et al.* (2002), le $\delta^{13}\text{C}$ du corégone représente une ligne de base pélagique, intégrée sur un large intervalle de temps. La durée sur laquelle le corégone intègre le signal de sa nourriture sera aussi l'objet de discussions dans un paragraphe ultérieur.

□ *Facteurs de variabilité de la ligne de base pélagique.*

Plusieurs études ont comparé la composition isotopique de différents organismes ou compartiments pélagiques entre lacs. Deux facteurs sont susceptibles d'affecter la composition isotopique $\delta^{13}\text{C}$ de la ligne de base pélagique : le statut trophique et la taille du lac. L'hypothèse de l'influence prépondérante du statut trophique sur le $\delta^{13}\text{C}$ pélagique a été longtemps privilégiée. (Gu *et al.* 1996) montrent les premiers la relation croissante entre statut trophique et $\delta^{13}\text{C}$ (à l'échelle du phytoplancton et des sédiments). Gu *et al.* (1996) interprètent ce profil en terme de diminution du fractionnement isotopique lors de la photosynthèse lorsque la productivité primaire augmente. Schindler *et al.* (1997a) montrent d'autre part que l'augmentation de la productivité primaire s'accompagne d'un afflux de CO_2 atmosphérique, enrichi en ^{13}C , lorsque les processus hétérotrophes ne suffisent plus à soutenir la demande en carbone inorganique des producteurs primaires. Ainsi, quelle que soit la cause attribuée à la relation entre production primaire et $\delta^{13}\text{C}$ pélagique (diminution du fractionnement isotopique lors de la photosynthèse ou entrée de carbone atmosphérique), ces deux études nous conduisent à attendre une corrélation positive entre $\delta^{13}\text{C}$ pélagique et statut trophique des lacs dans notre étude.

Une seule publication avait, jusqu'à présent, considéré l'effet de la taille du lac sur la composition isotopique de la ligne de base pélagique. (Post 2002b) montre une relation positive entre le $\delta^{13}\text{C}$ de bivalves filtreurs et la surface du système. Il l'interprète en terme de changement du rapport autotrophie/hétérotrophie. La composition isotopique du stock de CID serait plus négative dans les petits lacs en raison d'une plus grande hétérotrophie. Cette prédominance des processus hétérotrophes résulterait des apports du bassin versant, qui, plus important dans les petits que dans les grands lacs stimulerait les processus de minéralisation par la boucle microbienne (Schindler et Scheuerell 2002). On s'attend par conséquent à une corrélation positive entre taille du lac et $\delta^{13}\text{C}$ du corégone.

Jusqu'à présent, l'effet conjoint de la taille et du statut trophique des lacs sur la composition de la ligne de base pélagique n'avait pas été approfondi.

2.1.1.2. L'étude réalisée

□ Gamme de lacs étudiés

Des Corégones *Coregonus lavaretus* ont été échantillonnés sur 22 lacs péri-alpins Français, Suisses, Allemands et Italiens, à raison de dix individus par lacs (Fig. 8). La variabilité du $\delta^{13}\text{C}$ des corégones a été mise en relation avec la taille et le statut trophique des lacs (pour les détails, se référer à l'article 2).

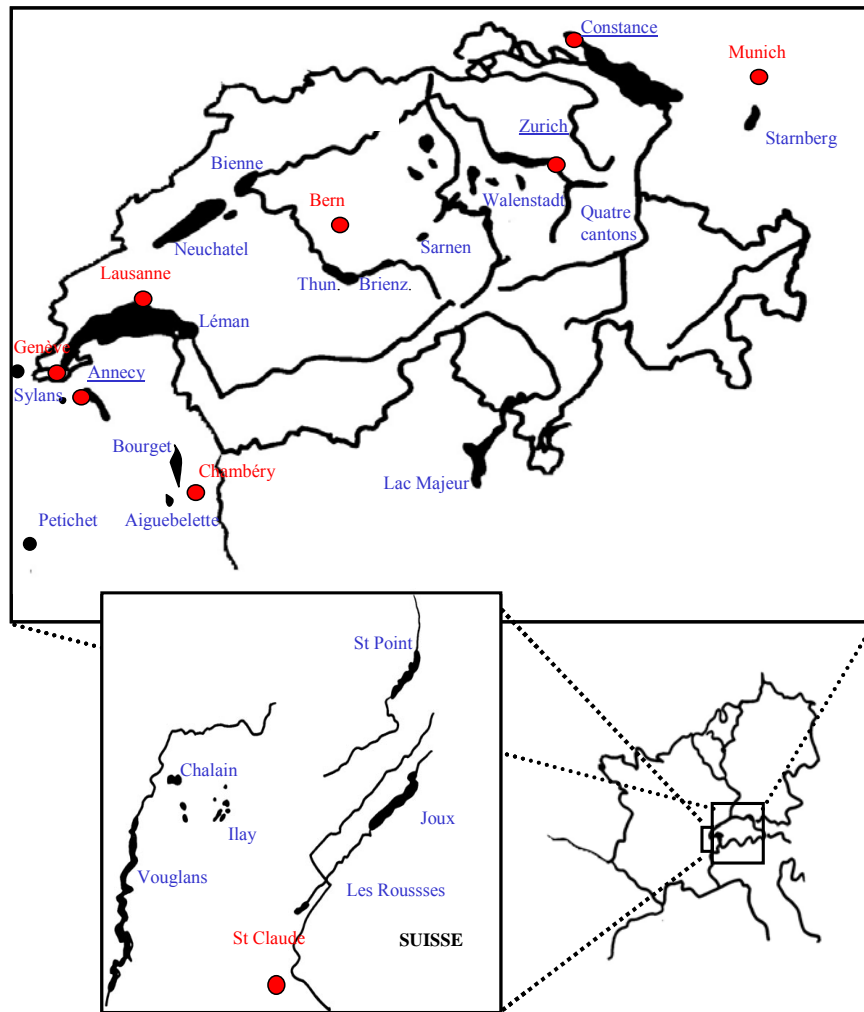


Figure 8 : Localisation géographique des 22 lacs péri-alpins de cette étude.

2.1.1.3. Influence de la taille et du statut trophique des lacs

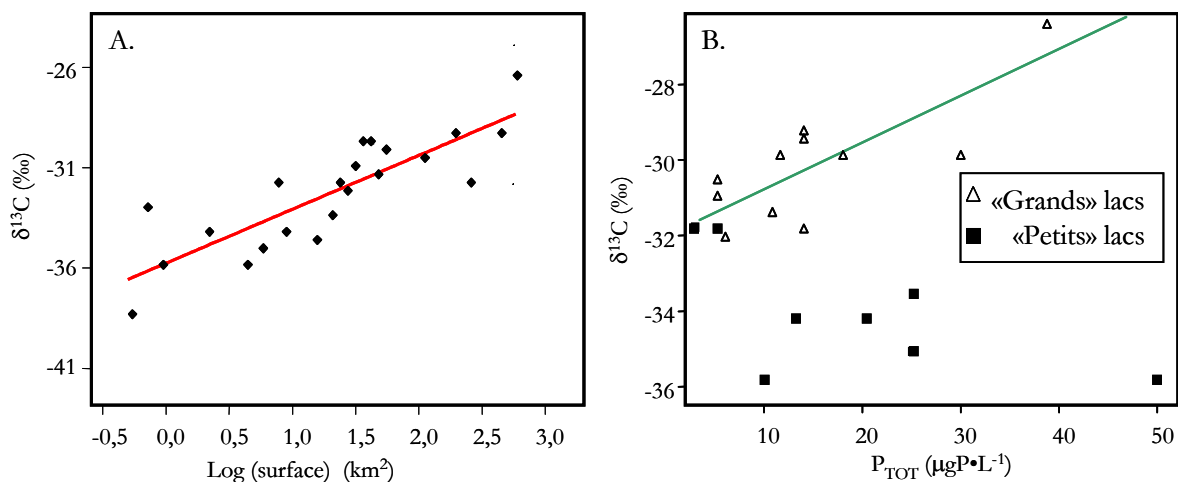


Figure 9. Relations entre $\delta^{13}\text{C}$ moyen des corégones, taille et statut trophique des lacs, dans 22 lacs alpins. Les lacs ont été séparés en deux groupes, de part et d'autre de la valeur médiane de la surface ($25,8 \text{ km}^2$)

Le profil de variation du $\delta^{13}\text{C}$ du corégonne avec la taille du lac correspond à ce qui avait été envisagé (Fig. 9 A). Taille et statut trophique n'étant pas corrélés sur cette gamme de lac, ce profil ne peut vraisemblablement pas résulter d'une modification sur le fractionnement isotopique lors de la photosynthèse. La taille du lac a par conséquent un effet prédominant sur la composition isotopique du stock de carbone inorganique dissous et par extension sur le degré d'autotrophie/hétérotrophie des lacs. Non seulement les apports du bassin versant seraient plus importants dans les petits lacs, mais la contribution des habitats benthiques et littoraux serait aussi plus forte (Schindler et Scheuerell 2002). Le profil observé tend aussi à renforcer l'idée que la boucle microbienne agit essentiellement comme un puits de respiration dans ces lacs péri-alpins. Ces résultats ont été très récemment confirmés par ceux d'une étude comparant le $\delta^{13}\text{C}$ du CID sur une large gamme de lacs (Bade *et al.* 2004). Il est cependant probable que, répétée sur une gamme de lacs humiques dans lesquels le carbone métabolisé par la boucle microbienne contribue à la production zooplanctonique (modèle 2), cette expérience conduise à un profil différent.

L'effet du statut trophique sur le $\delta^{13}\text{C}$ pélagique dépend alors de la taille du système considéré (Fig. 9. B). Le $\delta^{13}\text{C}$ pélagique répond au profil attendu, c'est-à-dire une corrélation positive avec le statut trophique, uniquement dans les grands lacs. Dans les petits lacs, aucune relation significative n'a pu être mise en évidence entre statut trophique et $\delta^{13}\text{C}$ pélagique. Ce profil pourrait résulter des deux processus suivants. D'une part, dans ces petits lacs, les processus hétérotrophes bénéficieraient de l'augmentation des processus autotrophes : l'augmentation de la matière organique disponible stimulerait les processus de minéralisation. D'autre part, l'intégration de carbone organique dans le réseau trophique ne suivrait plus le modèle de « puits de respiration » (modèle 1) dans les plus petits lacs. L'incorporation de carbone non phytoplanctonique, qu'il soit allochtone, benthique ou littoral, à

l'échelle du compartiment zooplanctonique, selon le modèle de « trophic repackaging » (modèle 2), serait alors aussi à prendre en compte. Ainsi, dans les petits lacs, l'aptitude du corégone à refléter la composition isotopique de la ligne de base pélagique serait réduite.

2.1.2. Intégration de carbone issu de la boucle microbienne au réseau pélagique : le carrefour zooplanctonique

2.1.2.1. Contexte de l'étude

D'après les résultats de la partie précédente, la voie de transfert du type « trophic repackaging » du carbone non phytoplanctonique via la boucle microbienne serait susceptible d'intervenir essentiellement dans les lacs de petite taille, même lorsqu'il s'agit de lacs clairs. Karlsson *et al.* (2003) montrent que la dépendance du zooplancton vis à vis du carbone allochtone n'est pas liée à la quantité des apports externes à la MOP. Ainsi, contrairement à ce qui était souvent tacitement considéré, le zooplancton est susceptible d'intégrer du carbone non phytoplanctonique autant dans les lacs clairs qu'humiques. L'influence du statut trophique est aussi contestée (Carignan *et al.* 2000; Karlsson *et al.* 2003). Certains résultats montrent que la dépendance du zooplancton vis à vis du carbone non-phytoplanctonique serait plus forte dans les lacs oligotrophes que dans ceux de statut trophique supérieur (Grey *et al.* 2000).

Dans l'objectif d'évaluer si le « trophic repackaging » pouvait intervenir dans les chaînes pélagiques de certains des lacs étudiés dans la partie précédente, nous avons approfondi l'étude des transferts de carbone au sein des communautés mésozooplanctoniques de deux de ces lacs : le lac d'Annecy, un petit (selon le critère de l'étude précédente) lac oligotrophe et le Léman, un grand lac mésotrophe.

2.1.2.2. L'étude réalisée

□ Principe et hypothèses

Certains taxons sont plus susceptibles de consommer du carbone non-phytoplanctonique via le broutage sur les organismes de la boucle microbienne que d'autres (Wetzel 2001). D'autre part, le recours au carbone non-phytoplanctonique est susceptible de varier en fonction des saisons (Grey *et al.* 2001). Si le « trophic repackaging » conduit à un apport significatif de carbone non phytoplanctonique pour certains taxons ou à certaines périodes, cela devrait se manifester à l'échelle de sa composition isotopique. Nous avons par conséquent mesuré la composition isotopique en azote et en carbone des taxons crustacéens du zooplancton (Daphnies, copépodes cyclopidés et les grands cladocères prédateurs *Bythotrephes longimanus* et *Leptodora kindtii*) des lacs Léman et Annecy sur une base mensuelle au cours des années 2002-2003.

Cependant, d'autres facteurs sont susceptibles d'introduire des changements saisonniers dans la composition isotopique des taxons. Les producteurs primaires pélagiques montrent des changements

saisonniers de leur composition isotopique (Zohary *et al.* 1994). Pourtant, si les causes de variations de la ligne de base pélagique entre lacs a déjà fait l'objet d'étude (cf paragraphe précédent), les facteurs contrôlant ces variations saisonnières n'ont encore pas été totalement élucidés. Plusieurs facteurs, tels que la température, la production primaire, le recyclage des nutriments inorganiques sont connus pour avoir un impact sur le $\delta^{13}\text{C}$ et le $\delta^{15}\text{N}$ phytoplanctonique mais aucun lien n'a encore été réellement fait sur le terrain entre la variation saisonnière de ces facteurs et ceux de la ligne de base pélagique (Altabet et Deuser 1985; Zohary *et al.* 1994; Gu et Schelske 1996; Burkhardt *et al.* 1999; Gu *et al.* 1999; Needoba *et al.* 2003). La difficulté réside donc dans le fait de discriminer les effets trophiques (ceux que nous cherchons) de ceux des changements saisonniers de la ligne de base pélagique, pour expliquer les variations saisonnières de la signature isotopique des taxons zooplanctoniques dans ces deux lacs.

Au regard des résultats du paragraphe précédent, on s'attend à ce que les réseaux trophiques mésozooplanctoniques des deux lacs étudiés soient contrastés, en terme de contribution du carbone non-phytoplanctonique à la production secondaire zooplanctonique. Parmi les taxons crustacéens, Matthews et Mazumder (2003) suggèrent d'utiliser la composition isotopique des Daphnies comme ligne de base pélagique, car pour eux, le comportement trophique des Daphnies serait le plus constant entre saisons et entre lacs. Nous nous sommes par conséquent appuyés sur l'étude des variations saisonnières de la composition isotopique des Daphnies pour aborder celles de la ligne de base pélagique. Nous avons étudié ses variations en fonction de celles de variables physiques, chimiques et biologiques susceptibles de contrôler le $\delta^{13}\text{C}$ et le $\delta^{15}\text{N}$ du phytoplancton. Comme ces lacs abritent des communautés relativement similaires, nous nous attendions à ce que les facteurs contrôlant les variations saisonnières de la ligne de base soient les mêmes dans les deux lacs.

Puisque les Daphnies sont supposées conserver une même position trophique au cours des saisons (Matthews et Mazumder 2003), les compositions isotopiques des autres taxons ont été comparées à celles des Daphnies dans l'objectif de mettre en évidence d'éventuelles variations dans leur position trophique au cours du temps. La première hypothèse est que si un taxon zooplanctonique exploite uniquement le carbone phytoplanctonique, alors son $\delta^{13}\text{C}$ doit être similaire à celui des Daphnies, avec une variabilité résiduelle « tolérée » du même ordre que celle résultant de différences dans le facteur de fractionnement trophique ($\text{SD}=1,3\text{‰}$ (Post 2002b)), comme suggéré par Matthews et Mazumder (2003). Dans ce contexte, la variation saisonnière du $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ de la ligne de base doit être transmise à ce taxon.

Si le cas de figure inverse est observé (variabilité de la signature du taxon supérieure à la variabilité attendue sur le fractionnement trophique ou variations saisonnières de la ligne de base mal reproduite dans celle du taxon considéré), on en conclue que le taxon considéré consomme, au moins pour une part, des sources de carbone à signatures isotopiques différentes de celles exploitées par les Daphnies.

Les modifications dans les positions trophiques relatives des taxons ont été étudiées en utilisant leur $\delta^{15}\text{N}$. Si un taxon conserve la même position trophique toute l'année, alors la différence

$\Delta_N = \delta^{15}N_{\text{taxa}} - \delta^{15}N_{\text{Daphnia}}$ devrait rester constante au cours du temps (à la variabilité observée sur le fractionnement trophique près (SD=1,0‰ (Post 2002b)). Des variations significatives du Δ_N pendant l'année signifieraient que le taxon considéré ne consomme pas la même source de nourriture ou change de position trophique au cours du temps.

□ Résultats

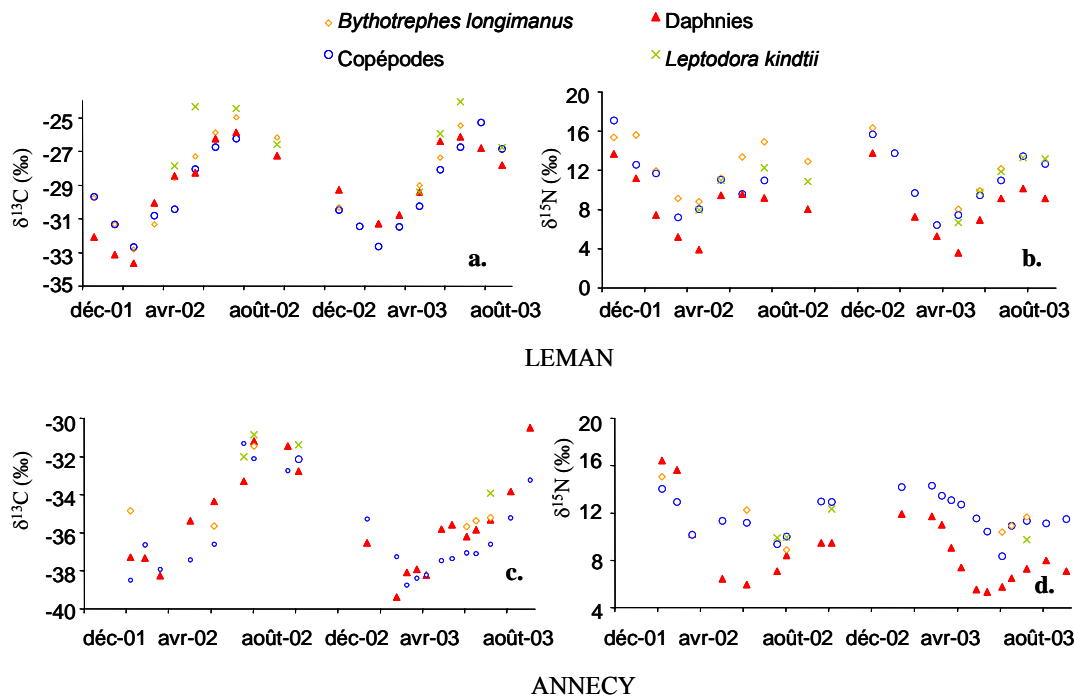


Figure 10. Compositions isotopiques des taxons du zooplancton crustacéen des lacs Léman et Annecy aux dates d'échantillonnage. Pour le détail des statistiques, se référer à l'article 3.

Dans le lac Léman, les $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ des taxons sont très corrélés. Statistiquement, leur $\delta^{13}C$ sont similaires à celui des Daphnies et les différences Δ_N sont constantes au cours du temps. Ainsi, sous l'hypothèse que les Daphnies constituent la ligne de base pélagique, tous les taxons du mésozooplancton exploitent le carbone phytoplanctonique dans le lac Léman et leurs positions trophiques sont constantes (Fig. 10).

Dans le lac d'Annecy, au contraire, les corrélations sont toujours significatives mais beaucoup plus faibles. Statistiquement, les $\delta^{13}C$ des taxons ne sont pas identiques et les différences Δ_N ne sont pas constantes au cours du temps (Fig. 10). Ces résultats tendent à montrer que si, dans le lac Léman, le réseau trophique crustacéen est linéaire et repose sur l'exploitation du carbone phytoplanctonique, il est beaucoup plus complexe dans le lac d'Annecy, avec la consommation par les taxons de sources de carbone ayant des compositions isotopiques différentes. Il est cependant difficile, à cet état de l'analyse, d'attribuer une origine à ces sources de carbone de compositions isotopiques différentes dans le lac d'Annecy. L'hétérogénéité des $\delta^{13}C$ zooplanctoniques ne résulte pas forcément d'une contribution

différente du carbone non-phytoplanctonique à la production secondaire de ces taxons. En effet, au sein même du compartiment phytoplanctonique, la composition isotopique des algues peut varier en fonction de leur profondeur (Lampert et Grey 2003) ou de leur taille (Popp *et al.* 1998). Il se pourrait que les taxons exploitent différentes classes de taille d'algues ou broutent à différentes profondeurs. Des éléments de réponse sont cependant fournis par l'analyse de la variabilité saisonnière de la signature isotopique des Daphnies.

Contrairement à nos attentes, la variation saisonnière de la composition isotopique des Daphnies n'est pas liée aux mêmes facteurs dans les deux lacs. La variabilité du $\delta^{13}\text{C}$ des Daphnies est expliquée à 80% par la température de l'épilimnion dans le lac Lemman, contre seulement 58% dans le lac d'Annecy. Les résultats sont encore plus contrastés en ce qui concerne la variabilité du $\delta^{15}\text{N}$. Elle est expliquée par les processus de recyclage de l'azote dans le lac Lemman mais par la température et la concentration en O_2 dans le lac d'Annecy. Ces résultats suggèrent par conséquent que la pertinence de la « soit-disant » ligne de base (la composition isotopique des Daphnies) n'est pas la même dans les deux lacs. Dans le lac Lemman, les résultats soutiennent l'idée que la composition isotopique des Daphnies est effectivement une ligne de base pélagique satisfaisante. Dans le lac d'Annecy par contre, elle est beaucoup moins dépendante des conditions environnementales, portant ainsi à croire qu'elle représente l'assimilation, par les Daphnies, de carbone d'origines diverses, à la fois phytoplanctonique, mais potentiellement aussi littorale ou benthique, voire allochtone. Les résultats de l'analyse de la composition en acides gras des Daphnies montrent d'ailleurs que le broutage des Daphnies du lac d'Annecy sur la boucle microbienne contribue largement à leur production secondaire (Bec 2003).

Une nouvelle fois, le problème de la ligne de base est soulevé. L'exploitation de sources de carbone non phytoplanctonique via la prédation sur la boucle microbienne et le « trophic repackaging » sont très probables dans le cas du lac d'Annecy. Ce phénomène doit de même intervenir dans certains des autres lacs oligotrophes de notre gamme de lacs. Cependant, Carignan *et al.* (2000) et Karlsson *et al.* (2003) montrent qu'il ne s'agit pas d'une condition *sine qua none* des lacs oligotrophes. Cette observation pourrait expliquer l'absence de corrélation entre $\delta^{13}\text{C}$ du corégone et statut trophique dans les petits lacs dans l'étude précédente.

L'aptitude du corégone à refléter la ligne de base pélagique dépend des réseaux trophiques du zooplancton crustacéen. Dans le cas des grands lacs, le $\delta^{13}\text{C}$ du corégone représente une ligne de base pélagique, que, traditionnellement, on considère intégrée sur l'année. Que représente réellement, en terme de temps, la composition isotopique du muscle du corégone ?

2.1.3. Les processus d'intégration du signal isotopique de la nourriture dans les tissus du corégone

2.1.3.1. Contexte de l'étude et problématique.

L'intégration du signal isotopique de la nourriture dans les tissus du corégone est la conséquence du renouvellement des protéines au sein de ces tissus, par l'incorporation de nouvelles protéines synthétisées à partir de la nourriture. Le renouvellement isotopique est défini comme le changement, à la suite d'un changement de nourriture, de la composition isotopique d'un tissu résultant de la croissance et du remplacement métabolique (Mac Avoy *et al.* 2001). Le temps de renouvellement isotopique définit le délai nécessaire pour que la composition isotopique d'un tissu atteigne l'équilibre avec celle de sa nourriture. Le taux de renouvellement isotopique a fait l'objet de nombreuses études sur des animaux élevés en captivité (Tieszen *et al.* 1983; Pinnegar et Polunin 1999; Kurlle 2002; Kurlle et Worthy 2002). Concernant les poissons, l'essentiel des études a été réalisé en laboratoire, dans des conditions contrôlées de nourriture et de température, permettant une croissance constante des individus (Hesslein *et al.* 1993; Pinnegar et Polunin 1999). Or, sur le terrain, les animaux, et en particulier les ectothermes, subissent des phases métaboliques différentes au cours du temps, avec des phases de croissance somatique, gonadique ou de métabolisme de maintien, pendant laquelle la croissance somatique est nulle. Pour le corégone dans les lacs alpins, la croissance somatique a lieu entre Mars et Septembre (Caranhac 1999). Or, le renouvellement isotopique dans le muscle des poissons résulte essentiellement des processus de croissance somatique (Hesslein *et al.* 1993). Ainsi, pendant les phases de croissance gonadique ou de métabolisme de maintien, le signal isotopique de la nourriture ne serait pas intégré dans le muscle dorsal. Le foie est, quant à lui, un tissu métaboliquement actif toute l'année, qui pourrait potentiellement intégrer le signal isotopique de la nourriture régulièrement et rapidement au cours de l'année. Les résultats concernant le turnover du foie sont pourtant contradictoires. En définitive, que représente la composition isotopique du muscle et du foie du corégone ? Reflète-t-elle ce qu'il mange tout au long de l'année ou seulement pendant la phase de croissance somatique ? Qu'en est-il du temps de renouvellement isotopique du muscle de corégones dans les lacs alpins que nous étudions ?

2.1.3.2. L'étude réalisée

Nous avons reconstitué, dans un premier temps, la composition isotopique de la nourriture du corégone, sur le terrain (le Léman) sur une base mensuelle. Les profils d'évolution au cours du temps de la composition isotopique du muscle et du foie ont été comparés à celui de la nourriture.

Comme nous l'attendions, le temps de renouvellement isotopique du muscle est discontinu au cours de l'année. Par contre, le temps de renouvellement du foie semble continu et, pendant la période de croissance, est 2 à 3 fois supérieur à celui du muscle. Pendant la période de croissance somatique (Mars-Septembre), la composition isotopique du muscle varie avec celle de la nourriture. Le taux de

renouvellement isotopique est cependant trop faible pour que la composition isotopique du muscle puisse atteindre un équilibre avec celle de la nourriture. De la fin de l'été à la fin de l'hiver, lorsque la croissance somatique s'arrête, le taux de renouvellement isotopique du muscle est quasiment nul. La composition isotopique du muscle reflète, pendant cette période, celle de la nourriture consommée au cours de la précédente phase de croissance somatique. Par conséquent, la composition isotopique de la nourriture consommée pendant cette période n'est pas reflétée dans la composition isotopique du muscle. Il s'agit de surcroît d'une période pendant laquelle le corégone peut consommer des chironomes. Le recours aux proies benthiques n'apparaît pas dans la composition isotopique du corégone.

En définitive, la composition isotopique du muscle dorsal du corégone fournit une image intégrée à long terme (4-5 mois) de la composition isotopique de la nourriture consommée pendant la période de croissance, de mars à septembre, pendant laquelle les nutriments de la nourriture sont alloués à la croissance somatique. Les estomacs ne sont pas vides pendant les 5 autres mois, mais comme les nutriments sont alloués à d'autres fonctions, leurs compositions isotopiques ne sont pas reflétées dans celle du muscle.

2.1.4. La composition isotopique du corégone : un indicateur fonctionnel?

L'étude de la variabilité entre lacs de la composition isotopique $\delta^{13}\text{C}$ du corégone a permis de mettre en évidence des différences de fonctionnement trophique des lacs alpins en fonction de leur taille et de leur statut trophique. Néanmoins, expliquer ces différences et déceler à quel niveau du fonctionnement trophique elles interviennent nécessitent des investigations supplémentaires, comme nous l'avons fait en passant ensuite à l'échelle zooplanctonique. C'est donc à ce titre que la composition isotopique du corégone peut être utilisée comme un indicateur fonctionnel : elle indique des différences, mais ne permet pas systématiquement de les expliquer directement. L'étape suivante a consisté à tester la pertinence de l'utilisation de la composition isotopique des poissons en tant qu'indicateur de fonctionnement trophique dans le cadre de deux perturbations auxquelles sont sujettes les lacs : les modifications d'origine anthropique du statut trophique ainsi que le marnage.

2.2. La composition isotopique des poissons comme un indicateur de l'impact de perturbations sur le fonctionnement trophique d'un lac.

2.2.1. Modifications du statut trophique : Eutrophisation-réoligotrophisation

2.2.1.1. Contexte de l'étude

Dans l'étude précédente, nous avons établi que dans les grands lacs alpins, la composition isotopique du corégone pouvait être utilisée comme une ligne de base pélagique. Nous avons aussi montré, que pour des grands lacs, statut trophique et $\delta^{13}\text{C}$ du corégone étaient corrélés positivement. Ainsi, les phénomènes d'eutrophisation et de re-oligotrophisation, qui affectent la plupart des lacs, devraient être enregistrés à l'échelle des $\delta^{13}\text{C}$ des poissons zooplanctonophages.

Tester cette hypothèse nécessite de disposer d'une collection d'échantillons couvrant une longue période. Les paléolimnologues ont été les premiers à étudier de façon rétrospective l'évolution trophique des lacs à partir du $\delta^{13}\text{C}$ de la matière organique ou des carbonates des sédiments (Schelske 1991; Schelske et Hodell 1991; Schelske et Hodell 1995; Schaus *et al.* 1997). Les biologistes étaient, eux, confrontés à la difficulté d'obtenir des collections d'échantillons dont la composition isotopique ne serait pas altérée par l'utilisation de conservateur chimique. Rares sont les collections de muscle de poisson séché ou congelé comparables à celle de Kiriluk *et al.* (1999) mais par contre les laboratoires d'ichtyologie regorgent de collections d'écailles archivées, originellement destinées aux études de croissance. L'idée d'utiliser les écailles avait été émise assez tôt (Estep et Vigg 1985; Wainright *et al.* 1993), mais les résultats souffraient du manque d'un protocole clair de décalcification des écailles. Nous avons donc dans un premier temps établi le protocole permettant d'utiliser les écailles comme support d'analyse isotopique (pour plus de détails, se référer à l'article 1).

2.2.1.2. L'étude réalisée

Une fois ce protocole établi, des collections d'écailles de Corégone ont pu être utilisées pour reconstituer le profil de variation du $\delta^{13}\text{C}$ de corégones de deux grands lacs alpins ayant subi des histoires trophiques similaires et synchrones. (Fig. 11 et 12 ; Tableau 1).

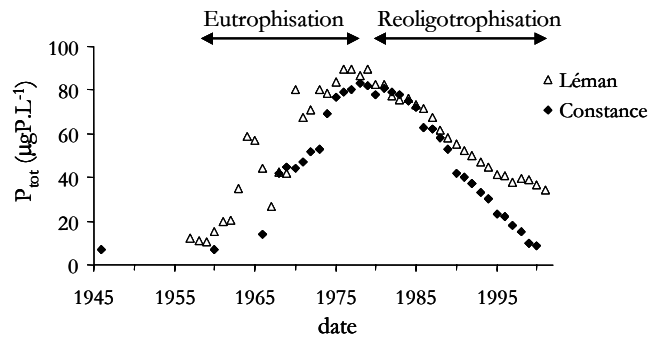


Figure 11. Modification des concentrations moyennes annuelles en Phosphore total des lacs Léman et Constance.

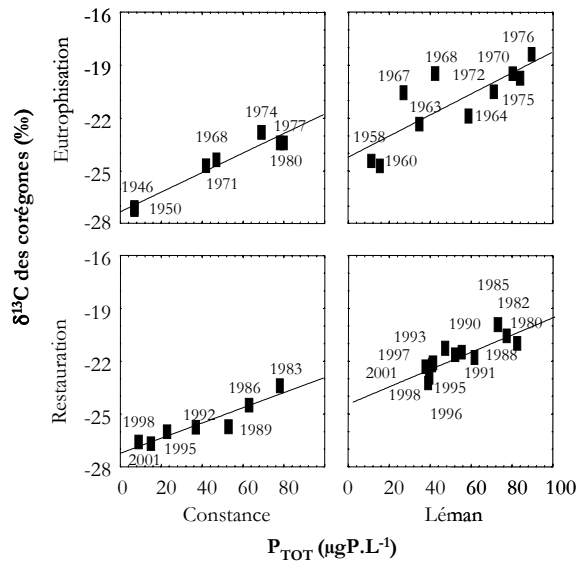


Figure 12. Relations entre $\delta^{13}C$ des corégones et concentrations en phosphore total lors de l'eutrophisation et de la restauration des lacs Léman et Constance.

N°		r^2	p	pen	Ordonnée à l'origine	T-Test	p -value Comparaison de pen	p -value Comparaison des ordonnées à l'origine
1	Eutrophisation du lac Léman	0.661	0.0043	0.0598	-24.23	1 vs 2	0.480	0.000
2	Eutrophisation du lac de Constance	0.923	0.0004	0.0554	-27.33	2 vs 4	0.004	0.291
3	Re-oligotrophisation du lac Léman	0.692	0.0080	0.0488	-24.33	1 vs 3	0.037	0.762
4	Re(oligotrophisation du lac de Constance	0.861	0.0016	0.0430	-27.22	3 vs 4	0.216	

Tableau 1 Valeurs des coefficients et des paramètres des régressions entre le $\delta^{13}C$ des corégones et la concentration en P_{tot} , en fonction de la direction de la modification du statut trophique.

Modifications du $\delta^{13}\text{C}$ au cours de l'eutrophisation et de la restauration des lacs

La composition isotopique du corégone reproduit l'évolution trophique des lacs avec une augmentation des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ lorsque le lac s'eutrophise et une diminution lorsque le lac se rapproche de son statut trophique initial.

La réponse du $\delta^{13}\text{C}$ pélagique vis-à-vis des variations de production primaire implique plusieurs mécanismes, dont les effets sur le $\delta^{13}\text{C}$ agissent dans la même direction. Certains de ces mécanismes ont des effets à l'échelle du fractionnement isotopique lors de la photosynthèse, d'autres à l'échelle de la composition isotopique du stock de carbone inorganique.

D'une part, l'élévation des $\delta^{13}\text{C}$ avec le niveau de trophie du lac est le fait de la diminution du fractionnement isotopique photosynthétique. Le fractionnement isotopique imposé lors de la photosynthèse est d'autant plus bas que la concentration en CO_2 est faible, ce qui se produit en condition de forte productivité primaire (Goericke *et al.* 1994). De plus, certaines espèces phytoplanctoniques, comme les diatomées, seraient capables de passer d'un métabolisme en C_3 à un métabolisme en C_4 lorsque le CO_2 aqueux devient limitant (Johnston *et al.* 2001). Or, les algues qui fonctionnent en C_4 ont un $\delta^{13}\text{C}$ plus élevé que celles en C_3 (cf I. 1. 2. 2). Les modifications de la communauté algale avec le niveau de trophie du lac peuvent aussi être évoquées puisque l'eutrophisation a conduit, dans ces deux lacs, à l'apparition d'algues filamenteuses (Anneville 2001; Anneville *et al.* 2002), qui, parce qu'elles sont plus grandes, présenteraient un moindre fractionnement isotopique (Popp *et al.* 1998).

La composition isotopique du stock de carbone inorganique montre aussi un enrichissement en ^{13}C sous l'effet d'une productivité primaire plus intense. D'une part, comme les producteurs primaires sélectionnent le CID « léger » (comportant l'isotope ^{12}C), le CID « lourd » s'accumule dans le milieu. Le CID s'enrichit en ^{13}C au fur et à mesure que la productivité primaire augmente. Lehmann *et al.* (2004) montrent que cet effet, dit « de Rayleigh », contribue fortement à l'augmentation du $\delta^{13}\text{C}$ du phytoplancton avec la production primaire. L'augmentation de la demande en carbone inorganique par le phytoplancton conduit d'autre part à une entrée de carbone atmosphérique, enrichi en ^{13}C (Lee *et al.* 1987; Schindler *et al.* 1997b). De plus, la diminution de la concentration en CO_2 suite au « pompage » par le phytoplancton, conduit à modifier le pH de l'épilimnion et à déplacer l'équilibre de solubilité des carbonates (Wetzel 2001). Ce phénomène produit d'intenses épisodes de précipitations carbonatées dans les lacs alpins, qui favorisent d'autant plus l'entrée de CO_2 atmosphérique dans l'épilimnion (Wanninkhof et Knox 1996).

Tous ces phénomènes sont susceptibles d'intervenir et d'expliquer la réponse du signal $\delta^{13}\text{C}$ pélagique avec la modification du niveau de trophie du lac.

Synchronisme des réponses

Les profils d'évolution du $\delta^{13}\text{C}$ des corégones de lacs ayant subi des histoires trophiques semblables sont similaires (Fig. 11 et 12). Les lacs de Constance et Léman ont des évolutions en $\delta^{13}\text{C}$ décrites par des droites de régression statistiquement parallèles en eutrophisation comme en restauration (Tableau 1, Fig. 12). Les lacs ont par conséquent des réactions identiques aux modifications de leur statut trophique. Pour les deux lacs, la valeur de la pente de ces droites de régression est plus faible lors de la phase de restauration que lors de la phase d'eutrophisation (Tableau 1, Figure 12). Ainsi, le lac en phase de restauration n'effectue pas le « trajet inverse » de celui effectué en eutrophisation, ce qui pourrait s'apparenter à un phénomène d'hysteresis. Ce profil pourrait effectivement résulter de la modification des communautés phytoplanctoniques observées sur ces lacs alpins. En effet, Anneville *et al.* (2002) ont montré qu'une synergie entre re-oligotrophisation et réchauffement global engendre un décalage temporel des successions phytoplanctoniques. La phase des eaux claires et l'apparition des espèces automnales, de type filamenteuses, seraient plus précoces après eutrophisation qu'avant, pour des concentrations identiques en P_{tot} . Ce décalage temporel permet le maintien des espèces filamenteuses, malgré la diminution observée des concentrations en nutriments. Or, ces espèces filamenteuses ont une valeur de $\delta^{13}\text{C}$ plus haute que les algues de plus petite taille et leur maintien pourraient contribuer à freiner la diminution du $\delta^{13}\text{C}$ de la ligne de base pélagique, lors de la phase de re-oligotrophisation.

En définitive, l'histoire isotopique du corégone raconte l'histoire trophique du lac. Cette technique pourrait permettre de retracer l'histoire trophique de lacs n'ayant pas bénéficié, contrairement aux deux lacs étudiés, de programme de surveillance à long terme de la qualité physico-chimique de leurs eaux.

2.2.2. Marnage dans deux réservoirs africains

2.2.2.1. Contexte de l'étude

La modification des structures trophiques en fonction des hauteurs d'eau n'a fait l'objet, jusqu'à présent, que d'études isotopiques en plaines d'inondations ou en zones humides de milieux tropicaux (Lewis *et al.* 2001; Wantzen *et al.* 2002). L'hypothèse sous-jacente à ces travaux est que la plaine inondée, en hautes eaux, fournit à la communauté pisciaire un spectre étendu de sources potentielles de carbone allochtone. Les modifications de composition isotopique des communautés piscicoles du Pantanal (Brésil) entre basses et hautes eaux ont été attribuées à l'utilisation de diverses sources de carbone allochtone en hautes eaux ainsi qu'à une modification de la structure du réseau trophique entre les deux saisons hydrologiques (Wantzen *et al.* 2002). La diversification des sources de carbone consommées serait pourtant réservée aux espèces aux comportements alimentaires les moins spécialisés. Au contraire, dans la plaine d'inondation de l'Orénoque, au Venezuela, bien que les détritus allochtones composent l'écrasante majorité de la matière organique disponible, la communauté

piscicole reste essentiellement dépendante de la production autochtone benthique et pélagique (Lewis *et al.* 2001).

Bien que les réservoirs soient affectés par de fortes modifications de cote, peu d'études isotopiques n'ont encore été consacrées aux modifications de structure trophique qui pourraient en résulter. La hauteur d'eau a un impact à la fois sur les densités de poissons et sur les ressources disponibles. Elle est donc susceptible d'agir tant par des contrôles ascendants que descendants sur les flux trophiques. Selon Winemiller et Jepsen (1998), dont les travaux s'appliquent aux rivières tropicales, en basses eaux, les fortes densités de poissons conduiraient à une augmentation du comportement piscivore, tandis qu'en hautes eaux, les densités plus faibles favoriseraient un comportement omnivore. La deuxième partie de l'hypothèse de Winemiller et Jepsen (1998), validée dans le contexte des travaux de Wantzen *et al.* (2002), stipule que les ressources trophiques sont plus abondantes et plus diversifiées en hautes eaux qu'en basses eaux grâce à l'inondation des marges végétalisées.

2.2.2.2. L'étude réalisée

Nous avons testé l'hypothèse de Winemiller et Jepsen (1998) dans deux réservoirs maliens soumis à une large saisonnalité hydrologique. Si l'hypothèse de Winemiller est vérifiée, les chaînes trophiques devraient être plus longues en basses eaux qu'en hautes eaux. Une modification dans la longueur des chaînes trophiques s'illustrerait à l'échelle des signatures $\delta^{15}\text{N}$ de la communauté piscicole. De plus, une modification du spectre des sources utilisées suite à l'inondation des zones de marnage végétalisées conduirait à une modification des signatures $\delta^{13}\text{C}$ de la communauté piscicole (Fig. 13).

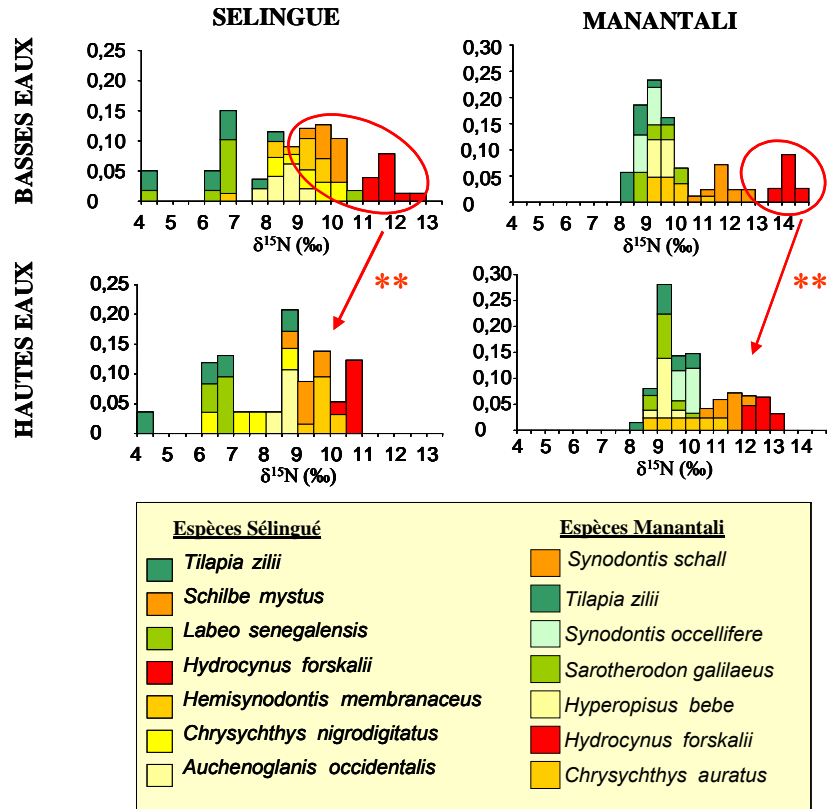


Figure 13. Distribution des compositions isotopiques $\delta^{15}\text{N}$ des sept espèces pisciaires les plus abondantes sur les réservoirs de Sélingué et de Manantali en basses et hautes eaux. Dans le réservoir de Sélingué, en hautes eaux, les $\delta^{15}\text{N}$ de *H. membranaceus*, *S. mystus* et *H. forskalii* sont significativement inférieurs à ceux observés en basses eaux (t -test, $p < 10^{-3}$). Dans le réservoir de Manantali, *H. forskalii* a un $\delta^{15}\text{N}$ inférieur en hautes eaux à celui observé en basses eaux (t -test, $p < 10^{-3}$).

Sur les deux lacs, les résultats de l'analyse isotopique des sept espèces les plus abondantes dans la communauté de poissons suggèrent un allongement de la chaîne trophique en basses eaux, de l'ordre d'un demi niveau trophique (Fig. 13), confirmant ainsi la première partie de l'hypothèse de Winemiller et Jepsen (1998). Par contre, les signatures $\delta^{13}\text{C}$ n'indiqueraient qu'une faible diversification des ressources utilisées, avec un recours à des sources de carbone littorales ou allochtones assez limité en hautes eaux (résultats non présentés). Nous envisageons cependant que la faible réponse $\delta^{13}\text{C}$ pourrait résulter d'un échantillonnage circonscrit aux zones profondes des barrages et probablement pas suffisamment intense dans les zones submergées. Il faut cependant noter que la mise en évidence de changements trophiques entre deux saisons n'est réalisable qu'en zones climatiques tropicales dans lesquelles la croissance des poissons est continue et par conséquent les temps de renouvellement isotopiques musculaires rapides.

2.2.3. Conclusion : impact des perturbations et indicateur fonctionnel

Les deux perturbations étudiées laissent des traces isotopiques de leur passage. Dans chacun des cas, le profil isotopique des poissons enregistre non seulement leurs impacts mais renseigne aussi, dans une certaine mesure, sur les processus sous-jacents (hystérésis, modification de la longueur de la chaîne trophique). En tant qu'indicateur fonctionnel, l'information isotopique n'est évidemment pas suffisante en elle-même pour expliquer la totalité des phénomènes mais elle permet de cibler les niveaux du réseau trophique sur lesquelles la perturbation a le plus d'impact.

3. **DISCUSSION**

Au cours de nos travaux, la variabilité de la composition isotopique du corégone a pu être interprétée en terme de différences de fonctionnement trophique d'un lac à l'autre, ou sur un lac au cours du temps. A ce titre, la composition isotopique du corégone peut être considérée comme un indicateur fonctionnel des voies de transferts au sein de l'habitat pélagique des lacs péri-alpins. Il semblerait cependant que le $\delta^{13}\text{C}$ des corégones ne reflète pas les mêmes processus dans les grands et les « petits » lacs alpins étudiés. En effet, les informations fournies par la composition isotopique $\delta^{13}\text{C}$ du corégone dépendent de sa capacité à traduire les variations à l'échelle de la ligne de base pélagique. Cette observation soulève certaines questions concernant l'utilisation de la composition isotopique d'organismes intégrateurs, que ce soit le corégone mais aussi les Unionidés ou les Daphnies, dans le but d'estimer la composition isotopique de la ligne de base pélagique. Ce sujet sera abordé dans une première partie de cette discussion.

D'autre part, nos travaux sont concentrés sur les lacs péri-alpins, de grands lacs profonds et alcalins. Or, la majeure partie des lacs mondiaux sont petits et peu profonds (90% des lacs mondiaux ont une surface inférieure à 1 km²) et situés sur des substrats granitiques (Wetzel 2001). La géomorphologie et l'alcalinité particulières des lacs alpins par rapport à l'ensemble des écosystèmes lacustres pourraient limiter la généralisation de nos travaux. Cette question fera l'objet du second point de cette discussion.

La pertinence du modèle biologique employé sera ensuite examinée. Le corégone *Coregonus lavaretus*, de part son habitat et son comportement alimentaire, est un intégrateur restreint à la zone pélagique. Dans l'objectif d'atteindre une conception écosystémique des flux de carbone en lac, ne serait-il plus pertinent d'avoir recours à un modèle biologique plus omnivore que le corégone?

Enfin, l'utilisation de la composition isotopique des poissons comme indicateur fonctionnel, à la fois entre systèmes ou au cours du temps, ouvre de larges perspectives de recherche que nous exposerons dans une dernière partie.

3.1. Intégrateurs et ligne de base pélagique

Les différences de temps de renouvellement isotopique entre les différents organismes d'un réseau trophique et la difficulté à mesurer directement la composition isotopique des producteurs primaires ont favorisé l'utilisation d'organismes intégrateurs, c'est-à-dire des organismes dont la composition isotopique est une moyenne, à plus ou moins long terme, de celle d'un producteur primaire (ou ligne de base). (cf I.2.1.2). Unionidés et Daphnies sont traditionnellement considérés comme des intégrateurs de la ligne de base pélagique. Est-il raisonnable d'envisager qu'un organisme puisse constituer un intégrateur de la ligne de base pélagique fiable quel que soit le lac considéré ?

3.1.1. Corégone et ligne de base pélagique

Les résultats de nos travaux montrent que, bien que zooplanctonophage, le corégone n'en est pas pour autant un intégrateur absolu du $\delta^{13}\text{C}$ de la ligne de base pélagique. Sa capacité à refléter la composition isotopique du phytoplancton dépend de la configuration du réseau trophique zooplanctonique et de ses relations avec la boucle microbienne. Ainsi dans les petits lacs, une part significative du carbone qui soutient la production du zooplancton, et donc celle des poissons zooplanctonophages, peut provenir de sources benthiques, littorales ou allochtones. Il en est probablement de même pour les autres organismes utilisés comme intégrateurs de la ligne de base.

3.1.2. Bivalves filtreurs et ligne de base pélagique

Cabana et Rasmussen (1996) ont été les premiers à mentionner cette notion d'intégrateurs, à partir de signatures isotopiques de l'azote. Les organismes intégrateurs utilisés étaient, dans cette étude, des « unionidés filtreurs de microseston utilisateurs d'azote inorganique comme le phytoplancton et les bactéries ». Les unionidés auraient par conséquent un $\delta^{15}\text{N}$ qui reflèterait une image intégrée spatialement (sur toute la colonne d'eau) et temporellement du $\delta^{15}\text{N}$ phytoplanctonique. Depuis, l'utilisation des unionidés ou des bivalves filtreurs comme intégrateurs a été étendue au $\delta^{13}\text{C}$ (Post *et al.* 2000; Post 2002b). Cependant, en milieu naturel, les unionidés filtrent des particules de différentes origines (algues, bactéries et particules détritiques) mais assimileraient préférentiellement le carbone bactérien, et dans une moindre mesure le carbone algal (Nichols et Garling 2000). Le $\delta^{13}\text{C}$ des unionidés est donc un mélange du $\delta^{13}\text{C}$ phytoplanctonique et non phytoplanctonique, dont les proportions ne seraient pas constantes entre les milieux (Nichols et Garling 2000). De plus, les signatures $\delta^{15}\text{N}$ au sein d'une communauté d'unionidés ne sont pas homogènes et certaines espèces se positionneraient sur des niveaux trophiques supérieurs à d'autres. Entre les milieux, les unionidés ne se nourrissent pas toujours comme des consommateurs primaires. Au contraire, les positionnements trophiques et l'origine du carbone des unionidés pourraient varier d'un milieu à l'autre (Nichols et Garling 2000), ce qui remet en question l'utilisation des bivalves filtreurs comme intégrateurs de la signature isotopique du phytoplancton.

Post (2002b) a tenté de valider l'utilisation des unionidés comme ligne de base pélagique. Pour ce faire, il a analysé les relations entre signatures isotopiques du zooplancton et celles des bivalves filtreurs. Dans ses résultats, la composition isotopique du bivalve correspondait à la médiane des variations saisonnières de celles du zooplancton. Il en déduisit que le bivalve était un intégrateur pélagique valide. Cependant, le zooplancton, au même titre que les bivalves filtreurs, a un positionnement trophique et des sources de carbone qui varient en fonction de la composition de la communauté zooplanctonique et les lacs (Matthews et Mazumder 2003). La composition isotopique des bivalves filtreurs ou de taxon zooplanctonique ne reflète donc pas systématiquement la composition isotopique des producteurs primaires à la base du réseau pélagique. Ainsi, il n'existe pas

d'organismes intégrateurs du $\delta^{13}\text{C}$ de la ligne de base pélagique au sens défini par Cabana et Rasmussen (1996) puis par Post (2000, 2002b) et Matthews et Mazumder (2003), c'est à dire d'organismes dont la composition isotopique est une intégration à long terme de celle du phytoplancton quel que soit le lac considéré. En fait, le $\delta^{13}\text{C}$ des bivalves et zooplancton représentent des images à long et moyen terme de la composition isotopique du mélange de matière organique, parfois d'origines diverses, intégrée dans le réseau pélagique.

Dans les modèles de mélange utilisés par Post *et al.* (2000), Post (2002b), Vander Zanden et Vadeboncoeur (2002), Vadeboncoeur *et al.* (2003), la contribution benthique à la production secondaire de consommateurs en fin de chaîne trophique est estimée à partir des lignes de bases pélagique (unionidés) et benthiques (gastéropodes) (cf I.2.2). Or, la ligne de base «pélagique» intègre très vraisemblablement une part du carbone benthique, notamment dans les petits lacs. En conséquence, la contribution du carbone non-phytoplanctonique, ainsi que son importance fonctionnelle, est probablement sous-estimée par ce type de démarche scientifique.

3.2. Les lacs péri-alpins : un cas particulier de la Limnologie internationale ?

Les lacs que nous avons étudiés sont grands, creux et à bassin carbonaté. Les ratios périmètre/surface et surface/volume sur la gamme de ces lacs sont faibles, traduisant ainsi une large prédominance de l'habitat pélagique sur les habitats littoraux et benthiques (Schindler et Scheuerell 2002). De plus, ces lacs alpins sont caractérisés par des eaux claires, avec peu d'apports de matière organique particulière et humique en provenance du bassin versant. Les apports externes à la zone pélagique sont, de fait, limités et les réseaux trophiques pélagique et benthique relativement indépendants (Schindler et Scheuerell 2002). La signature du corégone dépend donc essentiellement de celle du phytoplancton. Ses variations, entre lacs ou au cours du temps, en sont d'autant plus faciles à interpréter. Deux variables (taille du lac et concentration en phosphore total) suffisent pour expliquer plus de 70% de cette variabilité. De plus, les phénomènes de précipitations carbonatées pourraient encore amplifier les variations du $\delta^{13}\text{C}$ avec le statut trophique en favorisant les entrées de carbone atmosphérique (Wanninkof et Knox 1996). La précipitation des carbonates rendrait par conséquent la réponse du $\delta^{13}\text{C}$ des corégones vis-à-vis des modifications de statut trophique encore plus nettes. Les lacs alpins présentaient donc un cadre idéal pour nos travaux mais ils ne sont pas représentatifs de la majorité des lacs dans le monde. En effet, le lac «moyen» est petit et peu profond et sur substrat granitique. Le couplage entre les habitats pélagiques et benthiques y est plus important. La précipitation carbonatée y intervient dans une moindre mesure que dans le cas des lacs alpins (Wetzel 2001). Pour toutes ces raisons, on pourrait imaginer que les profils de variations du $\delta^{13}\text{C}$ des poissons y soient d'une part plus complexes, et d'autre part contrôlés par d'autres facteurs environnementaux.

L'utilisation de la composition isotopique des poissons comme indicateur fonctionnel est alors susceptible d'y être d'approche moins simple que dans la gamme de lacs étudiés. Répondre à cette question nécessiterait de répéter les études de variabilité du $\delta^{13}\text{C}$, en conservant le modèle biologique, sur une gamme de lacs peu profonds et éventuellement humiques : on pourrait alors envisager de travailler sur les corégones des lacs scandinaves.

3.3. Pertinence du modèle biologique employé

Non seulement le corégone est inféodé à l'habitat pélagique dans notre gamme de lacs, mais il présente de plus un comportement alimentaire relativement constant. Ces caractéristiques sont cependant à double-tranchant.

D'une part, le corégone serait un indicateur fonctionnel plutôt limité aux processus pélagiques. Il n'est, par conséquent, pas le modèle le plus approprié dans le cadre d'une démarche écosystémique, puisqu'il ne rend que très peu compte des éventuelles modifications des flux de carbone dans les habitats benthiques. Le corégone a une répartition géographique assez large, puisqu'il est présent dans les lacs de l'arc alpin et de la Scandinavie (Bruslé et Quignard 2001) mais aussi du Canada (Espèce *Coregonus clupeaformis*). Cependant, le corégone est un poisson-proie benthique dans les lacs Canadiens (Vander Zanden *et al.* 1999a). Les différences dans l'écologie du corégone entre les lacs Canadiens et Européens sont susceptibles de complexifier l'interprétation de la variabilité de sa signature isotopique entre ces écosystèmes. Il est donc peu adapté à une démarche scientifique globale. Ne serait-il pas plus pertinent d'utiliser une espèce à forte plasticité alimentaire, ubiquiste et à large répartition géographique, comme modèle biologique ?

Les espèces omnivores et piscivores exploitent la ressource la plus abondante, indépendamment de l'habitat (Vander Zanden et Vadeboncoeur 2002). Ces espèces opportunistes auraient, de ce fait, des compositions isotopiques qui refléteraient les voies majeures de transferts de carbone sur l'ensemble des habitats (Vander Zanden et Vadeboncoeur 2002). En utilisant, de plus, une espèce à large répartition géographique, les études de variabilité pourraient être étendues à de nombreux lacs en conservant le même modèle biologique. Le gardon, *Rutilus rutilus*, répond à toutes les conditions précédemment citées. Il s'agit d'une espèce ubiquiste d'eaux stagnantes ou à faible courant. Sa rusticité lui permet de survivre même dans des milieux très eutrophes ou très pollués. Le gardon est omnivore, opportuniste, peu sélectif et à haute plasticité alimentaire. Il a de plus une grande capacité adaptative (Bruslé et Quignard 2001). Il pourrait alors devenir un modèle biologique intéressant dans la mesure où sa composition isotopique devrait refléter les origines et flux de carbone majoritaires dans un lac.

Par contre, la variabilité de la signature isotopique des espèces opportunistes, telles que le gardon, pourrait être difficile à interpréter. En effet, les modifications de composition isotopique, entre lacs ou au cours du temps, peuvent résulter soit de changements de comportement trophique du

modèle biologique, et/ou de modifications sur la composition isotopique des lignes de bases. Discriminer les effets trophiques des effets de lignes de base peut constituer un obstacle majeur à l'interprétation des résultats, comme en témoigne l'étude de Kiriluk *et al.* (1999), sur le doré jaune (*Stizostedion vitreum*).

Kiriluk *et al.* (1999), sur une collection de muscle de doré jaune, observent des modifications significatives tant dans le $\delta^{13}\text{C}$ que dans le $\delta^{15}\text{N}$ sur une période de 17 ans (1978-1995). Cependant, aucune conclusion fonctionnelle n'a pu être issue de ce travail car les changements observés de composition isotopique du doré pouvaient être la conséquence de plusieurs facteurs : une modification dans la composition isotopique $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ de la ligne de base, induite par l'eutrophisation et l'installation de la dreissène, et/ou d'un changement de comportement trophique du doré. Le régime alimentaire du doré n'ayant pas bénéficié de suivi au cours de la période d'étude, Kiriluk *et al.* (1999) se sont alors heurtés à la difficulté à différencier la variabilité de la composition isotopique due aux changements de la ligne de base de celle due aux modifications possibles du régime alimentaire du Doré.

En utilisant le corégone comme modèle biologique, nous nous sommes affranchis des effets trophiques. Les modifications observées de sa valeur de $\delta^{13}\text{C}$ ne pouvaient résulter que de changements aux niveaux inférieurs du réseau trophique (zooplancton et poissons). Cette « propriété » du modèle biologique « Corégone » a considérablement simplifié l'interprétation des profils de variations. A présent que nous disposons d'une référence relative à l'évolution des lignes de base, il serait envisageable de renouveler l'étude de la variabilité du $\delta^{13}\text{C}$ d'une espèce plus omnivore afin d'obtenir des informations à l'échelle écosystémique.

3.4. Perspectives d'utilisation de la composition isotopique des poissons comme indicateur fonctionnel.

La variabilité de la composition isotopique du corégone entre lacs ou au cours du temps reflète des changements des voies de transferts de carbone dans le réseau trophique des lacs alpins. La variabilité de la composition isotopique des espèces majoritaires de la communauté pisciaire de deux réservoirs maliens illustre des changements dans l'origine du carbone exploité et dans la structure du réseau trophique. D'après ces résultats, la composition isotopique des poissons, ou par extension, des consommateurs terminaux, peut être vue comme un indicateur du fonctionnement trophique des lacs, fournissant des informations d'ordre relatif.

Les flux au sein des réseaux trophiques subissent des contrôles ascendants, par la ressource, et/ou descendants, par la prédation (Carpenter *et al.* 1985). Ainsi, les flux de carbone dans le réseau trophique lacustre peuvent être modifiés par un impact de l'homme à la base du réseau, au niveau de la quantité de ressource disponible (modification du statut trophique), sur la configuration du réseau

trophique (introduction d'espèces invasives ou biomanipulations) ou les deux à la fois (modifications des hauteurs d'eau dans un réservoir). L'étude des modifications des compositions isotopiques des poissons permet d'évaluer l'impact de ces perturbations sur les flux de carbone au sein des réseaux trophiques.

La possibilité récente d'utiliser les collections d'écaillés archivées (Perga et Gerdeaux 2003) ou les tissus formolés (Sarakinis *et al.* 2002) dans les analyses isotopiques permet à présent de mener des études rétrospectives de l'impact de perturbations sur les réseaux trophiques lacustres. Parmi ces perturbations, les modifications de statut trophique, mais aussi les invasions d'espèces ou des biomanipulations.

3.4.1. Modification anthropique du statut trophique et approche écosystémique

Notre étude ne porte que sur les effets de l'eutrophisation et de la restauration des lacs à la base du réseau trophique pélagique. Nous n'abordons pas, au cours de ce travail, les effets des changements de statut trophique sur les interactions trophiques. Pourtant, la modification de la charge interne en nutriments affecte autant les habitats benthiques que pélagiques (Mehner et Benndorf 1995; Carpenter *et al.* 2001). En effet, les productions primaires benthiques et pélagiques montrent des réponses inverses à l'enrichissement. La production périphtyque diminue lorsque le lac s'eutrophise (Vadeboncoeur *et al.* 2003). L'enrichissement en nutriments modifie par conséquent la contribution de la production périphtyque à la production primaire totale. Alors que la production périphtyque prédomine dans un lac oligotrophe, la production phytoplanctonique devient dominante dans un lac eutrophisé (Vadeboncoeur *et al.* 2003). De plus, l'enrichissement en nutriment conduit à la dégradation de l'habitat littoral, avec la perte des abris macrophytiques, une augmentation de prédation par les poissons et une hypoxie néfaste à la faune macrobenthique (Vadeboncoeur *et al.* 2003). En modifiant les rapports production phytoplanctonique/production benthique et les habitats littoraux, la modification du statut trophique a très vraisemblablement un impact sur les réseaux trophiques à l'échelle de l'écosystème et non pas seulement à l'échelle de l'habitat pélagique (Schindler et Scheuerell 2002).

En étudiant la composition isotopique des macroinvertébrés brouteurs et prédateurs du zoobenthos de lacs danois, Vadeboncoeur *et al.* (2003) montrent que le $\delta^{13}\text{C}$ des consommateurs du zoobenthos convergent vers celui des consommateurs pélagiques le long d'un gradient de niveau de trophie. Ce profil de variation traduit le fait que lorsque le lac s'eutrophise, les macroinvertébrés benthiques, dont l'alimentation était à l'origine périphtyque, se tournent vers la ressource phytoplanctonique. Cette étude montre que le réseau trophique littoral est modifié sous l'effet de l'enrichissement en nutriment. La modification du statut trophique du lac agit en fait sur la force relative des deux réseaux trophiques (pélagique et benthique) qui coexistent dans les lacs.

Les communautés piscicoles sont largement soutenues par la production littorale (Hecky et Hesslein 1995). Les effets des modifications du niveau de trophie du lac sur le réseau trophique littoral et benthique sont susceptibles de se transmettre jusqu'aux communautés piscicoles. Les poissons ont cependant un comportement alimentaire extrêmement plastique. La réponse du réseau trophique à l'échelle du lac à la modification de la charge en nutriments n'est, de ce fait, pas prévisible. Il s'agit là d'une problématique pour laquelle l'analyse de la composition isotopique des communautés piscicoles, qu'elle soit rétrospective ou comparative, peut apporter de nombreuses informations.

3.4.2. Biomanipulations-espèces invasives.

Les modifications anthropiques des communautés de consommateurs (espèces invasives ou biomanipulations) sont susceptibles de se répercuter, par le jeu des cascades trophiques, sur les niveaux trophiques inférieurs (Carpenter *et al.* 1985). Dans le cas des biomanipulations par exemple, l'augmentation de broutage sur les algues est supposé être atteint par des modifications apportées sur la communauté de poissons, soit en ôtant les poissons zooplanctivores, soit en augmentant la pression de prédation sur les zooplanctivores en introduisant des espèces piscivores. Les espèces invasives rentrent, elles, souvent en compétition avec les espèces autochtones, augmentant ainsi la prédation sur le niveau trophique inférieur. La modification des biomasses des différents composants des réseaux trophiques, engendrée par invasion d'espèces ou biomanipulations, a non seulement des répercussions en terme de prédation ou de compétition, mais affecte aussi d'autres processus de façon parfois imprévisible. En effet, les macroinvertébrés (Vadeboncoeur *et al.* 2003) et les poissons (Vander Zanden et Vadeboncoeur 2002) peuvent aussi répondre aux changements de communautés par une modification de leur alimentation ou de leur habitat. L'impact des biomanipulations et de l'introduction d'espèces ont des « effets pervers » et imprévisibles sur la structure du réseau trophique qu'il convient d'étudier à l'échelle du lac.

3.4.2.1. Biomanipulations

Malgré les potentialités qu'offrent les isotopes stables dans l'étude des impacts des biomanipulations, seules deux études utilisant cette méthode en milieu naturel ont pu, à ma connaissance, être recensées (Persson et Hansson 1999; Johnson *et al.* 2002).

La première est relative à l'impact de *Mysis relicta*, un crustacé autochtone dans les régions circumpolaires (Grands lacs du Canada et du Nord des Etats Unis, Allemagne, Royaume Uni, Scandinavie et Russie). Son introduction a été réalisée la première fois en 1964 dans un lac de Colombie Britannique dans le but d'augmenter le stock de nourriture disponible pour les salmonidés. Cependant, au lieu de favoriser la productivité des poissons d'intérêt pour la pêche amateur, l'introduction de *M. relicta* a conduit à l'effet inverse de celui escompté, c'est à dire à un effondrement des stocks de salmonidés (Foster 1999). En appliquant l'AIS à l'échelle des communautés pisciaires de

deux réservoirs froids du Colorado, Johnson *et al.* (2002) mettent en évidence l'impact de *Mysis relicta* sur les flux de carbone. Ils comparent les compositions isotopiques des différentes espèces de la communauté pisciaire entre ces deux réservoirs, dont l'un contient *M. relicta*. Leurs résultats montrent qu'au lieu de diversifier la structure trophique en fournissant une source de nourriture alternative pour les poissons zooplanctivores d'intérêt halieutique, *M. relicta* court-circuite la voie énergétique qui transfère originellement la production phytoplanktonique aux poissons, via le zooplancton. Aucun poisson ne consomme *M. relicta*. Toute la communauté pisciaire se tourne vers la ressource benthique ou adopte un comportement piscivore, conduisant de fait à une forte compétition interindividuelle.

Dans la deuxième étude, Persson et Hansson (1999), dans un lac suédois, avaient pour objectif de suivre l'évolution des comportements alimentaires du gardon et de la brème suite à un retrait de poisson visant à diminuer la compétition. Ils ont analysé conjointement le $\delta^{15}\text{N}$ et les contenus stomacaux des deux espèces. Les contenus stomacaux ont montré qu'après biomanipulation, les deux espèces avaient une plus forte dépendance vis à vis de l'habitat benthique. Ce changement d'habitat n'a cependant pu être mis en évidence dans le $\delta^{15}\text{N}$ des deux espèces. La contrainte temporelle liée au temps de renouvellement isotopique n'a pas été prise en compte dans cette étude. Le temps de renouvellement isotopique est très lent pour les espèces de poissons de lacs scandinaves. Or les études isotopiques avant-après biomanipulation couvrent moins d'une année. De plus, seul $\delta^{15}\text{N}$ a été pris en compte. Il est fort probable que les auteurs s'attendaient à un changement dans le niveau trophique occupé par les espèces dans la chaîne trophique pélagique plutôt qu'à un changement d'habitat, ce qui les a conduit à utiliser $\delta^{15}\text{N}$ plutôt que $\delta^{13}\text{C}$. Les résultats de cette étude sont par conséquent mitigés, notamment sur l'efficacité des mesures isotopiques dans ce type de problématique mais souffrent aussi de l'absence de la prise en compte des contraintes précédemment citées.

Les modifications d'alimentation ou d'habitat lors de biomanipulations est un phénomène couramment observé mais encore peu étudié (Schindler et Scheuerell 2002). Les poissons piscivores, introduits dans l'objectif de produire l'effet en cascade descendant, consomment leurs proies de prédilection tant qu'elles sont abondantes. Une fois qu'elles sont devenues rares, les poissons piscivores sont susceptibles de se tourner vers les invertébrés benthiques. Par conséquent, la ressource benthique stabilise la population de piscivores en découplant leur dynamique de celles de leurs proies originelles (Schindler et Scheuerell 2002). Ce comportement opportuniste limite fortement l'effet des biomanipulations mais reste encore imprévisible et difficile à étudier. L'utilisation des isotopes stables se révèle adéquate pour la mise en évidence de ces « dommages collatéraux ». En définitive, il semble que l'utilisation de mesures isotopiques pour la mise en évidence de modifications des structures trophiques suite à des biomanipulations est un champ prometteur qui reste à explorer, tant par des études en mésocosmes que sur le terrain.

3.4.2.2. Espèces invasives

L'introduction, volontaire ou non, d'espèces exotiques est un phénomène largement répandu qui a pour conséquences l'extinction d'espèces autochtones, l'effondrement de pêcheries indigènes et la perte de l'intégrité écologique ou du fonctionnement de certains écosystèmes (Vander Zanden *et al.* 1999a). Il est cependant difficile de prédire, de détecter, de mesurer ou encore de prévoir l'impact écologique de l'invasion d'espèces, en tout cas par des méthodes traditionnelles. Les isotopes stables se sont cependant révélés être une méthode idéale pour mettre en évidence les conséquences sur les réseaux trophiques de l'introduction d'espèces dans les écosystèmes.

Les études des modifications des structures trophiques lacustres suite à l'introduction plus ou moins légales et plus ou moins volontaires (certaines populations de poissons introduits dans les lacs proviennent des fuites des viviers) par analyse isotopique sont essentiellement issues des travaux de Vander Zanden *et al.* sur les lacs Canadiens et Nord Américains (Vander Zanden *et al.* 1999a; Vander Zanden *et al.* 2003; Vander Zanden *et al.* 2004a; Vander Zanden *et al.* 2004b). La problématique générale de ces travaux concerne l'impact de l'achigan à petite bouche « smallmouth bass » (*Micropterus dolomieu*) et du Crapet de roche « rock bass » (*Ambloplites rupestris*) sur le comportement alimentaire (et par extension la dynamique démographique) de la truite de lac. Selon les résultats de Vander Zanden *et al.* (1999a), l'impact des espèces invasives dépend de la configuration initiale du réseau trophique. La truite de lac et les deux espèces invasives peuvent entrer en compétition pour les poissons proies benthiques, mais la truite se révèle être le prédateur le moins efficace. Dans les lacs où les proies benthiques sont peu nombreuses, la truite est pélagique, indépendamment de la présence d'espèces invasives (Vander Zanden *et al.* 1999a ; Vander Zanden *et al.* 2004b). Par contre, dans les lacs où les poissons-proies benthiques sont présents (éperlan, corégone), le comportement trophique de la truite est modifié par la présence d'espèces invasives. En absence des espèces invasives (lacs de référence), la truite a une signature isotopique qui reflète une position de super-prédateur de poissons benthiques, avec une contribution faible du zooplancton dans l'alimentation. En présence des espèces invasives, la truite de lac montre des $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ plus bas que dans les lacs de références, illustrant un passage vers un comportement zooplanctonophage prédominant. Dans les lacs « envahis », les truites deviennent pélagiques et occupent alors un niveau trophique plus bas que dans les lacs sans espèces invasives. Ce changement de nourriture se répercute sur la dynamique de population de la truite : des populations plus limitées occupent les lacs envahis et les individus sont en moyenne plus petits que dans les lacs de référence. Enfin, ce travail a abouti à la constitution d'un modèle permettant de prédire l'occurrence et l'impact de l'achigan à petite bouche sur une gamme de 3000 lacs Canadiens (Vander Zanden *et al.* 2004a).

CONCLUSION

Après avoir été « dogmatique », l'AIS est actuellement en pleine phase de « maturation ». De nombreux articles publiés récemment sont consacrés à des réflexions méthodologiques sur l'AIS. Dans cette thèse, les travaux relatifs aux protocoles d'utilisation des écailles ainsi que la réflexion sur la signification de la composition isotopique du foie et du muscle de corégones s'inscrivent dans le cadre de cette prise de recul vis à vis de l'outil isotopique et de la définition d'un cadre optimal d'utilisation.

Ces études critiques contribuent à définir à la fois les limites mais aussi le cadre optimal d'utilisation de l'AIS. Pour ma part, je considère que l'AIS révèle toute sa puissance dans les démarches comparatives. L'AIS seule ne me paraît pas être une technique adéquate pour étudier les interactions trophiques fines à la base des réseaux trophiques, problématique pour laquelle par contre l'Analyse Isotopique de Composés Spécifiques semble particulièrement informative. Utilisée à l'échelle des niveaux trophiques supérieurs (zooplancton et poissons), l'analyse isotopique est par contre un outil de synthèse fiable dans la mesure où elle s'inscrit dans le cadre d'une démarche comparative. L'outil isotopique permet une approche écosystémique mais, comme tout outil synthétique, l'AIS est sensible à certains biais et ne peut prétendre à l'obtention de quantifications absolues. Il s'agit cependant d'un outil relativement simple et de plus en plus accessible qui permet d'identifier des modifications de flux de carbone à l'échelle d'un système entier ainsi que les facteurs de contrôle des flux de carbone en lac.

La pertinence de la démarche comparative ainsi que le développement de nouveaux tissus-supports d'analyse isotopique, tels que les écailles ou les échantillons formolés, redynamisent l'AIS et ouvrent des champs d'investigation prometteurs et stimulants. L'analyse de collections d'écailles ou d'échantillons formolés peut permettre de répondre aux problématiques scientifiques contemporaines relatives à l'impact des pressions de pêche, de la restauration des milieux ou du changement global sur les structures trophiques. Sa simplicité d'utilisation à l'échelle des poissons et du zooplancton et sa capacité à détecter des changements de flux à l'échelle du système pourraient aussi en faire un outil efficace de surveillance des écosystèmes.

ARTICLES



Article 1. Using the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of whitefish scale for retrospective ecological studies: Changes in isotope signatures during the restoration of Lake Geneva, 1980-2001

Marie Elodie PERGA et Daniel GERDEAUX

JOURNAL OF FISH BIOLOGY (2003) 63 : 1197-1207

RUNNING HEAD : WHITEFISH SCALES ISOTOPE SIGNATURES

ABSTRACT

The scales of whitefish *Coregonus lavaretus* were used in place of dorsal muscle, which necessitates killing the fish, to study food webs from the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotopic ratios in the organic fraction. As scales are composed of both organic and calcified fractions, a protocol for scale decalcification was first devised. The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the decalcified scales were then shown to be closely correlated to those of the dorsal muscle, demonstrating that scales could be used in place of muscle to study food webs. Changes in the $\delta^{13}\text{C}$ of whitefish were determined from a scale collection that extended over the period during which the trophic state of Lake Geneva was recovering.

KEY WORDS: $\delta^{13}\text{C}$; $\delta^{15}\text{N}$; fish scales; whitefish; food web; trophic status; Lake Geneva.

INTRODUCTION

Scales are skeletal structures that can provide a record of biological and chemical events in fishes. They have long been used for age and growth studies (Lee 1920; Bagenal 1973; Tion 1978). More recently, they have also been used in genetic studies (Miller and Kapuscinski 1996; Miller and Kapuscinski 1997). Scales are one of the few structures that are accessible without killing the fish, and many archives contain extensive collections of scales that could be used for retrospective studies.

Isotopic analysis has been employed in studies of the structure and interactions of food webs (Kling *et al.* 1992b; Cabana and Rasmussen 1994; Hobson and Welch 1995; Gu and Schelske 1996). Stable isotopes can be used as tracers of carbon fluxes in terrestrial (Ehleringer *et al.* 2002) and aquatic ecosystems (Quay *et al.* 1986; Davenport and Bax 2002; Ehleringer *et al.* 2002). $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values are passed on from the food source to consumers with characteristic enrichment. $\delta^{13}\text{C}$ changes little from prey to predator (De Niro and Epstein 1978; De Niro and Epstein 1981; France and Peters 1997), with a mean trophic fractionation of +0.39‰ in lake food webs (Post 2002b). In contrast, in the case of $\delta^{15}\text{N}$, consumers are enriched compared to the food, with a typical fractionation of +3.4‰ in lake food webs (Post 2002b). Consequently, $\delta^{15}\text{N}$ is useful for describing the structure of the food web (Post *et al.* 2000), and $\delta^{13}\text{C}$ can be used to track the carbon source from its origin at the base of the food web (France 1995a; Schindler *et al.* 1997a; Post *et al.* 2000). Many lakes have undergone important changes in their trophic status over the last 50 years, with a period of eutrophication followed by a recovery period after restoration. It is very likely that the trophic structure and carbon source were altered during recovery, leading to a change in the isotopic signatures of fishes. In this study, changes in the isotopic signatures of whitefish *Coregonus lavaretus* (L.), a fish at the top of the pelagic food web, were investigated.

Previous isotopic studies on fishes were based on the isotopic signature of dorsal muscle. Dorsal muscle $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values are considered to match those of the food closely (De Niro and Epstein, 1978). The use of fish scale isotopic signature is rare (Estep and Vigg 1985; Wainright *et al.*

1993) and poorly documented. As far as is known, there is no literature setting the baseline or the bias for using scales for isotopic purposes. One retrospective study was conducted previously from a frozen-muscle collection (Kiriluk *et al.* 1999) but this kind of collection are quite uncommon. In contrast, some fish scale collections have been archived over long periods for growth studies, providing an opportunity for retrospective studies. A fish scale is of mixed origin, with both organic and inorganic fractions. The organic constituents are essentially proteins, such as collagen and keratin, and the inorganic constituents are essentially carbonates and apatite. The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of scale proteins, like those of muscle, should mirror the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of the food source. The origin of carbonates in scales is very variable and could involve a mix of food and dissolved inorganic carbon (DIC) (Hoie *et al.* 2003). This inorganic fraction should be removed prior to isotopic analyses.

The aim of this study was to establish a protocol for using these scale collections, and compare the isotopic signatures of scales to those of muscle. Fish scales were then used for retrospective isotopic studies, using *C. lavaretus* scales from a collection corresponding to the restoration period of Lake Geneva (1980-2001).

MATERIALS AND METHODS

FISH SAMPLED

Whitefish is zooplanktivorous in Lake Geneva (Gerdeaux and Hamelet 2001). It grows rapidly and maturity of females is usually reached at the end of their third year of life, at a total length (L_T) of 35-40 cm.

To test the protocol for scale decalcification, fish from 14 different sub-alpine lakes were collected in 2000-2002 from commercial fishermen, providing a broad range of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values (Table I).

The long-term collection in Lake Geneva corresponded to fish originating from the special catches that are made each year in December, during spawning, to collect eggs for restocking purposes. Scales collected from these spawning fish were used for ageing fish, and then dry-preserved and archived. These fish ranged from 34.5 to 49.5 cm (L_T).

DECALCIFICATION OF THE SCALES

The carbonates were removed by treating the fish scales with 1.2 N HCl. The scales were then rinsed in distilled water and dried at ambient temperature. Decalcification times ranged from 0 s (i. e. no immersion in HCl) to 2 min.

DETECTION OF THE RESIDUAL CALCIUM BY ELECTRONIC MICROSCOPY AND DISPERSIVE SPECTROSCOPY

Residual calcium, in scales that had been exposed to HCl for 0, 15 and 30 s, and 1 and 2 min, was analysed by scanning electron microscopy coupled with energy dispersive spectroscopy in the MAGIE Laboratory of Paris VI University. Concentrations of P, Si, Cl and Ca were measured (in counts per second, cps) at specific points along the section of the scale or by scanning 1 cm² of the surface.

$\delta^{13}\text{C}$ AND $\delta^{15}\text{N}$ ANALYSIS

Samples of 1.5 mg of decalcified scales or 1.0 mg of dried and finely ground dorsal muscle were weighed in 6 x 4 mm tin cups for CF-IRMS analysis using a Europa Scientific ANCA-NT 20-20 Stable Isotope Analyser with a NCA-NT Solid/Liquid Preparation Module (PDZ Europa Ltd., Crewe, U. K.). The analytical precision, estimated from 5 standards analysed along with the samples, was 0.2 ‰. Working standards for analytical precision consisted of 1.5 or 1.0 mg leucine prepared by freeze drying 50 ml of a 20 mg ml⁻¹ stock solution in the tin cups, and calibrated against 'Europa flour' and IAEA standards N1 and N2. All stable isotope values are reported in the δ notation:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = [({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C})_{\text{sample}} / ({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C})_{\text{standard}} - 1] \times 10^3 \text{ and}$$

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = [({}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N})_{\text{sample}} / ({}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N})_{\text{standard}} - 1] \times 10^3.$$

Standard for C is Pee Dee belemnite and standard for N is atmospheric nitrogen.

COLLECTION OF WHITEFISH SCALES DURING THE RECOVERY PHASE OF LAKE GENEVA

Scales from eight to ten mature adults (aged by scalimetry) caught in 1980, 1982, 1985, 1988, 1990, 1991, 1993, 1995, 1996, 1997, 1998 and 2001 were decalcified and analysed. The year 1980 corresponded to the peak of eutrophication, with a total mean annual concentration of phosphorus of 82.5 $\mu\text{gP l}^{-1}$. This concentration has subsequently decreased to reach 34.2 $\mu\text{gP l}^{-1}$ in 2001.

Statistical analyses were performed on S-PLUS 6.0 (Insightful 2001).

RESULTS

REMOVING CARBONATES FROM THE FISH SCALES

Scanning electron microscopy and energy dispersive spectroscopy

Energy dispersive spectroscopy clearly demonstrated that calcium is the main component of the untreated scale [Fig. 1(a), (b)]. The second highest peak in the spectrum was phosphorus, corresponding to the apatite content [Fig 1 (a), (b)]. After 1 min in dilute HCl, calcium and phosphorus were no longer detected on the surface of the scale [Fig 1(c)], but were still present in the deepest layers [Fig 1(d)]. In the surface spectrum, carbon, oxygen, sulphur and chlorine peaks were

then visible [Fig 1(c)]. After exposure to HCl for 2 min, only the C, O, S and Cl peaks could be detected in the scale [Fig 1(e), (f)]. Chlorine was a residue derived from the HCl treatment. Sulphur remained detectable at the same level (5 cps) after the 2 min-exposure, and was derived from sulphur-bearing amino-acids.

Isotopic ratios of untreated and treated scales.

The origin of the carbonates (food or dissolved inorganic carbon) present in fish scales is not known (Hoie *et al.*, 2003). The $\delta^{13}\text{C}$ of carbonates could be different from that of proteins, introducing a bias into the isotopic analysis. To evaluate the isotopic ratios of carbonates, the isotopic signatures of untreated and HCl-treated scales were compared (Fig. 2).

The relationship between $\delta^{13}\text{C}$ values of treated and untreated scales was linear and significant ($r^2=0.90$, $n=11$, $P<0.001$, [Fig. 2(a)]). The slope was significantly inferior to 1 ($P=0.016$). Scales treated for 2 min are enriched in ^{13}C ($+1.3\text{‰} \pm 0.6$) compared to untreated scales in the range measured.

The relationship between $\delta^{15}\text{N}$ values of treated and untreated scales was linear and significant ($r^2=0.82$, $n=11$, $P<0.001$, [Fig. 2(b)]). Acid washing increased the mean $\delta^{15}\text{N}$ of fish scales ($+1.3\text{‰} \pm 0.3$). The slope was significantly inferior to 1 ($P=0.011$).

Comparison between the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of fish scales and muscle

The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of muscle and of decalcified scales from 144 whitefish originating from 14 different lakes were measured simultaneously (Table I). The various origins resulted in a broad range of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values, from -32.3 to -21.8‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and from 6.4 to 19.6‰ for $\delta^{15}\text{N}$ (Table I).

The relationships between the $\delta^{13}\text{C}$ values for fish dorsal muscle and decalcified scales was linear, although there was a wide scatter of points ($r^2=0.70$, $n=144$, $P<0.001$, [Fig. 3(a)]). The intercept was not significantly different from 0 ($P=0.8554$), but had a very wide CI ($\pm 2.98\text{‰}$). Over the range of $\delta^{13}\text{C}$ values, the decalcified scales are enriched compared to the muscle (mean enrichment= 4‰ , S.D.= 1.26 , $n=144$).

There was a significant linear relationship between the $\delta^{15}\text{N}$ values for fish scale and dorsal muscle ($r^2=0.937$, $n=144$; $P<0.001$) [Fig. 3(b)]. The slope of the relationship was not significantly different from 1 ($P=0.90$), and the intercept was equal to 0 ($P=0.07$).

CHANGES IN THE $\delta^{13}\text{C}$ AND $\delta^{15}\text{N}$ OF WHITEFISH SCALES IN LAKE GENEVA DURING ITS RECOVERY PERIOD (1980-2001)

$\delta^{15}\text{N}$ values changed with time (ANOVA, d.f.=(1; 116), $P=0.002$), but showed no trends [Fig. 4(a)]. Whitefish scale $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values were not significantly correlated ($r^2=0.026$, $P=0.076$, [Fig. 4(c)]).

Fish scales became increasingly depleted in ^{13}C , with $\delta^{13}\text{C}$ falling from -20 to -23 ‰ [Fig. 4(b)], and the total phosphorus content decreasing from 82 to 34 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Fig. 5). The fish were 2 to 3 years old. Consequently, relationships between scales $\delta^{13}\text{C}$ and the mobile mean of the last three years phosphorus concentrations were analysed by linear regression (Fig. 5). The phosphorus concentration and isotopic signature of fish scales were significantly and strongly correlated ($r^2=0.71$, $P=0.0005$).

DISCUSSION

Exposure to HCl for 2 min was enough to remove all the carbonates, even from the deepest layers of the scale. Both the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of fish scales were different before and after the acid treatment.

As the $\delta^{13}\text{C}$ of organic molecules is not changed by HCl washing (Bosley & Wainright, 1999; Bunn *et al.*, 1995), the change in the $\delta^{13}\text{C}$ of fish scales after acidification may correspond solely to the release of carbonates. The organic and inorganic compounds of scales result from different synthetic processes. As a result, the $\delta^{13}\text{C}$ of carbonates is more positive than the $\delta^{13}\text{C}$ of proteins, meaning that carbonates are enriched in ^{13}C . If carbonates originate from food, then the allocation of dietary elements to muscle and to scale carbonates, i.e. the isotopic routing of food, is different (Gannes *et al.* 1997; Lorrain *et al.* 2002). If carbonates originate from dissolved inorganic carbon, their $\delta^{13}\text{C}$ may depend on the watershed substratum and on the extent of the microbial loop, and may vary considerably between lakes (Keough *et al.* 1998).

Changes in the $\delta^{15}\text{N}$ of organic matter as a result of acid treatment has already been reported (Bunn *et al.* 1995) and was attributed to a loss of ^{15}N -depleted molecules. The shift produced by acid treatment corresponds to about half a trophic level. If this was due to the attack on the amine groups of proteins, it could preclude the use of decalcified fish scales for isotopic studies. Sulphur concentrations suggest that sulphur-bearing amino acids were not removed by acidification. The $\delta^{15}\text{N}$ of decalcified scales still closely matched the $\delta^{15}\text{N}$ of muscle after treatment, with no change and no further enrichment. Acid-treated fish scales can be used as a proxy for fish dorsal muscle for determining the ^{15}N signature. The isotopic routing of ^{15}N in proteins should be the same for scales and muscles. The modification of $\delta^{15}\text{N}$ by the acid treatment may be a consequence of the release of essentially non-protein molecules. Finally, the acid treatment may preserve the protein $\delta^{15}\text{N}$.

The correlation between $\delta^{13}\text{C}$ of the fish scale and dorsal muscle was significant. Scales are enriched in ^{13}C compared to muscle, with a mean difference of 4 ‰ in the present range of isotopic signatures, but this enrichment can vary considerably, because the interval of confidence of the intercept is large. Whitefish muscle has a high lipid content (Dabrowski and Champigneulle 1985), from 20 to 30%, the ratio depending on the individual, the lake and the sampling period. In contrast, scales contain no lipids. Lipids are depleted in ^{13}C compared to proteins (Tieszen *et al.* 1983). The presence of lipids in muscle could therefore account for the difference observed between the $\delta^{13}\text{C}$ values of muscle and scale. Moreover, there is no tissue turnover in whitefish scales, whereas fish

muscle has a turnover time of about 6 months (Tieszen *et al.* 1983). Decalcified scales reflect the origin of the carbon integrated over the whole life of the fish, whereas muscle reflects only the origin of food during 6 months. From one year to another, the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures of food sources, especially plankton, may vary (Zohary *et al.* 1994). This difference in the time-scale of signature integration could also explain some of the differences between scale and muscle, but does not significantly affect the general relationship between scale and muscle signatures. Whitefish scales can, therefore, be used as a non-lethal alternative to dorsal muscle for isotopic analysis.

Fish scales were analysed for isotopes for a long period, covering the restoration of Lake Geneva. According to the data, *C. lavaretus* scales became increasingly depleted in ^{13}C as the lake recovered. $\delta^{15}\text{N}$ also changed over this time, but did not display any obvious trend. Changes in $\delta^{13}\text{C}$ could be the result of a change in the length of the pelagic food chain or a trophic shift from a pelagic to a benthic food source (Wainright *et al.* 1993; Kiriluk *et al.* 1999). If the pelagic food chain length has changed, then $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ should be correlated, which is not what was observed. The whitefish is a pelagic zooplanktivorous fish, but could be opportunistic and rely on the most abundant food source (Mookerji *et al.* 1998; Enz *et al.* 2001; Gerdeaux *et al.* 2002). Studies on the stomach contents revealed no major change in the whitefish diet between the 1980s and 2001 (Ponton 1986; Gerdeaux and Hamelet 2001), and they were still showing a preference for cladocerans (*Daphnia* spp.) and predator species of zooplankton (*Bythotrephes longimanus* and *Leptodora kindtii*).

As whitefish dietary preferences and trophic chain length were not altered, and as the $\delta^{13}\text{C}$ is passed on with little alteration from predator to prey, changes in $\delta^{13}\text{C}$ must be mainly influenced by changes in the signature of the phytoplankton at the base of the food web.

Photosynthesis preferentially fixes ^{12}C , which leads to a $\delta^{13}\text{C}$ of phytoplankton more negative than that of DIC (Raven *et al.* 1994). The $\delta^{13}\text{C}$ of phytoplankton depends both on the $\delta^{13}\text{C}$ of the inorganic carbon source and on the fractionation rate imposed by photosynthesis.

The $\delta^{13}\text{C}$ of DIC is more positive when it originates from atmospheric CO_2 dissolution (Schindler *et al.* 1997a) and is more ^{13}C -depleted when the contribution of respired carbon is high (Post, 2002b). In a context of high carbon demand, atmospheric CO_2 invasion increases, leading to a ^{13}C -enriched DIC stock (Schindler *et al.* 1973; Schindler *et al.* 1997a). Once fixed, this enriched DIC leads to ^{13}C -enriched organic matter in the pelagic food web.

The fractionation rate imposed by photosynthesis varies between -4 and -29‰, decreasing as the concentration of DIC decreases and it becomes limiting when primary production is high (Raven *et al.* 1994).

To conclude, the $\delta^{13}\text{C}$ of phytoplankton depends on the intensity of primary production, because it affects the fractionation rate and the signature of DIC in the same way. The $\delta^{13}\text{C}$ of the organic matter in sediments is used in paleolimnology as a proxy for lacustrine productivity (Schelske and Hodell 1991; Schelske and Hodell 1995; Hodell *et al.* 1998). Accordingly, the correlation observed between $\delta^{13}\text{C}$ of fish scales and phosphorus load can be considered as an indication of the variation of

productivity. The trophic state and the productivity changes in the lake were transmitted to the top of the food web and reflected in fish scales.

The carbon isotopic ratio changes in whitefish scales could be considered to indicate the change in primary production levels as Lake Geneva underwent 're-oligotrophication'. Many extensive scales collections are stored in many of the laboratories working on fisheries. Using fish scales could be a way of reconstructing the lake trophic state history when other data are not available.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to all the scientists who were involved in this work by helping with the collection of samples: B. Büttiker (OFEFP), G. Giussani and G. Morabito (Istituto Italiano di Idrobiologia, Verbania Pallanza), D. Hefti (OFEFP), M. Klein (Bayerische Landesanstalt für Fischerei), C. Küg and P. Friedli (Fischerinspektorat, Bern), R. Müller (EAWAG), C. Rühlé (Service de la Chasse et de la Pêche du Canton de Saint Gal). We thank D. Post and an anonymous reviewer for their advice based on an initial version. This work has been supported by Action Concertée Incitative "Ecologie Quantitative" of the French Ministry of Research.

TABLES

Table I. Mean (\pm S.D.) of whitefish $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ for decalcified scales and muscles. Whitefish were obtained from 14 Swiss (ch), Italian (it) and French (fr) sub-alpine lakes.

Lake	n	Decalcified scale		Muscle	
		Mean $\delta^{13}\text{C}$ (\pm S.D.)	Mean $\delta^{15}\text{N}$ (\pm S.D.)	Mean $\delta^{13}\text{C}$ (\pm S.D.)	Mean $\delta^{15}\text{N}$ (\pm S.D.)
Hallwill (ch)	11	-24.9 (\pm 1.0)	19.6 (\pm 0.5)	-29.1 (\pm 1.3)	18.6 (\pm 0.6)
Come (it)	10	-21.8 (\pm 0.2)	12.2 (\pm 0.4)	-25.2 (\pm 1.4)	11.0 (\pm 0.3)
Sarnen (ch)	11	-28.8 (\pm 0.4)	7.1 (\pm 0.8)	-31.8 (\pm 0.2)	7.2 (\pm 0.3)
Sempach (ch)	12	-24.4 (\pm 0.8)	17.2 (\pm 0.5)	-28.9 (\pm 0.8)	17.1 (\pm 0.5)
Quatre Cantons (ch)	12	-27.4 (\pm 0.7)	9.3 (\pm 0.7)	-30.8 (\pm 1.8)	9.4 (\pm 0.6)
Starnberg (ch)	10	-26.6 (\pm 0.3)	11.1 (\pm 0.5)	-29.8 (\pm 0.2)	11.3 (\pm 0.6)
Neuchatel (ch)	8	-27.6 (\pm 0.6)	14.9 (\pm 0.5)	-31.8 (\pm 0.5)	14.8 (\pm 0.3)
Rousses (fr)	6	-32.3 (\pm 0.6)	9.8 (\pm 0.6)	-35.8 (\pm 1.0)	10.0 (\pm 0.2)
Joux (ch)	10	-29.9 (\pm 0.8)	14.7 (\pm 0.7)	-34.3 (\pm 1.3)	15.5 (\pm 0.7)
Brienzen (ch)	10	-27.7 (\pm 0.5)	7.9 (\pm 1.2)	-30.9 (\pm 1.1)	8.1 (\pm 0.4)
Thune (ch)	9	-27.4 (\pm 0.5)	9.5 (\pm 0.5)	-31.8 (\pm 0.8)	9.9 (\pm 0.4)
Bienne (ch)	13	-28.0 (\pm 0.5)	16.1 (\pm 0.8)	-31.2 (\pm 1.3)	16.8 (\pm 0.9)
Zurich (ch)	13	-29.8 (\pm 1.0)	13.1 (\pm 1.2)	-33.5 (\pm 1.1)	13.7 (\pm 1.0)
Walensstadt (ch)	9	-23.7 (\pm 1.6)	6.4 (\pm 1.5)	-31.5 (\pm 0.6)	8.4 (\pm 0.8)
Total, mean (\pm S.D.)	144	-27.0 (\pm 2.6)	12.3 (\pm 4.0)	-31.0 (\pm 2.6)	12.5 (\pm 3.8)

FIGURES

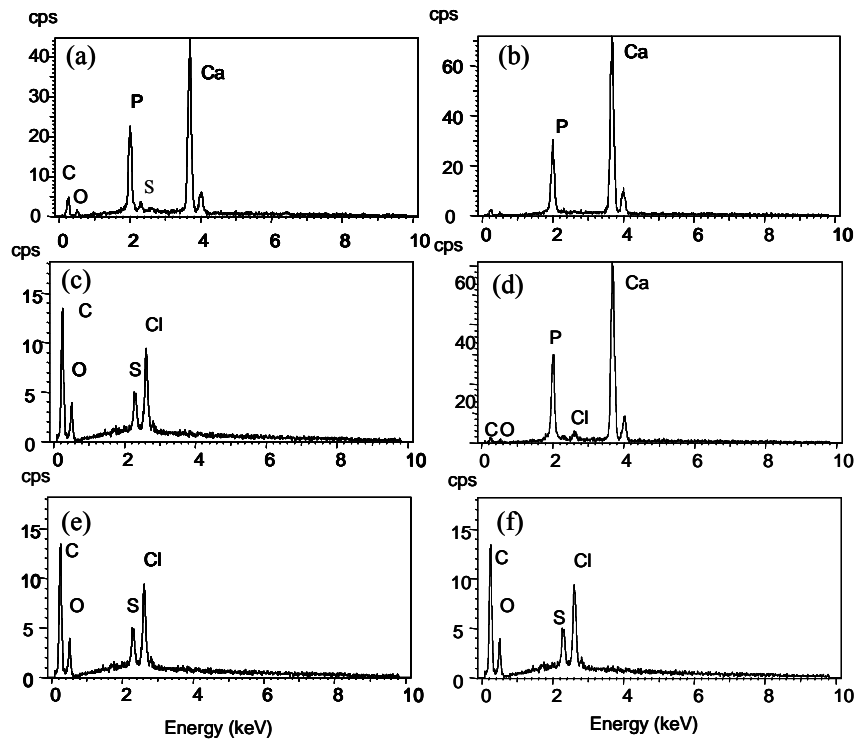


FIG. 1. Energy dispersive spectra of whitefish scales. (a), (c), (e) : spectra on 1 cm^2 of the surface of one scale. (b), (d), (f) : spectra in the middle point of the section. (a), (b) untreated scale, (c), (d) after 1 minute in 1.2 N HCl, and (e), (f) after 2 minutes in 1.2 N HCl. (cps = counts per second)

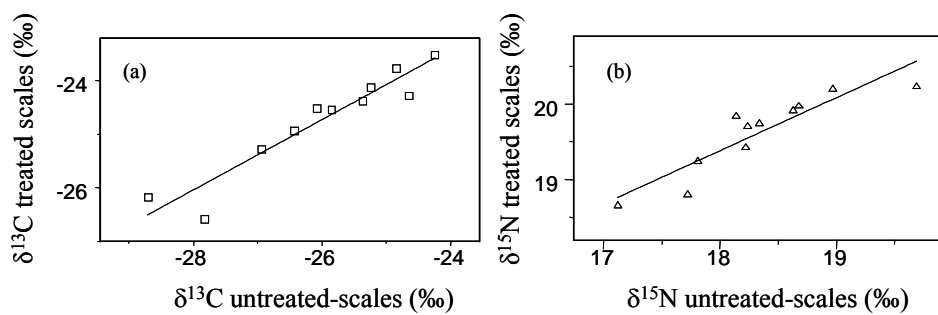


FIG. 2. Comparison between whitefish untreated scales and scales treated by HCl for 2 min of (a) $\delta^{13}\text{C}$ and (b) $\delta^{15}\text{N}$. The regression lines were fitted by : (a) $y = 0.656 x - 7.67$ and (b) $y = 0.70 x + 6.67$.

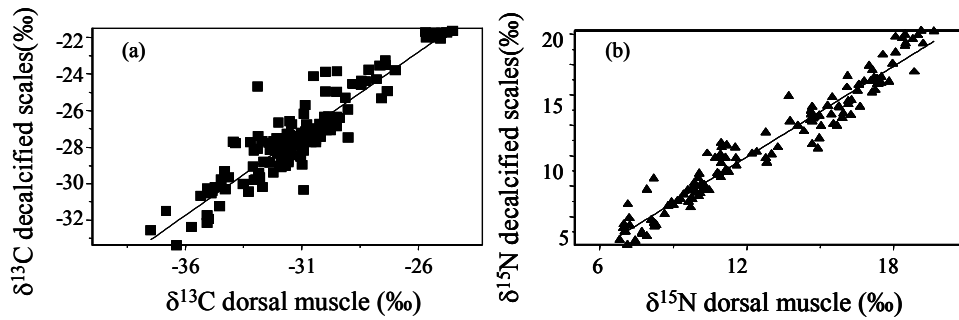


FIG. 3. Comparison between whitefish dorsal muscle and decalcified scales of (a) $\delta^{13}\text{C}$ and (b) $\delta^{15}\text{N}$. The regression lines were fitted by (a) $y = 0.86x - 0.27$ and (b) $y = 1.02x - 0.53$.

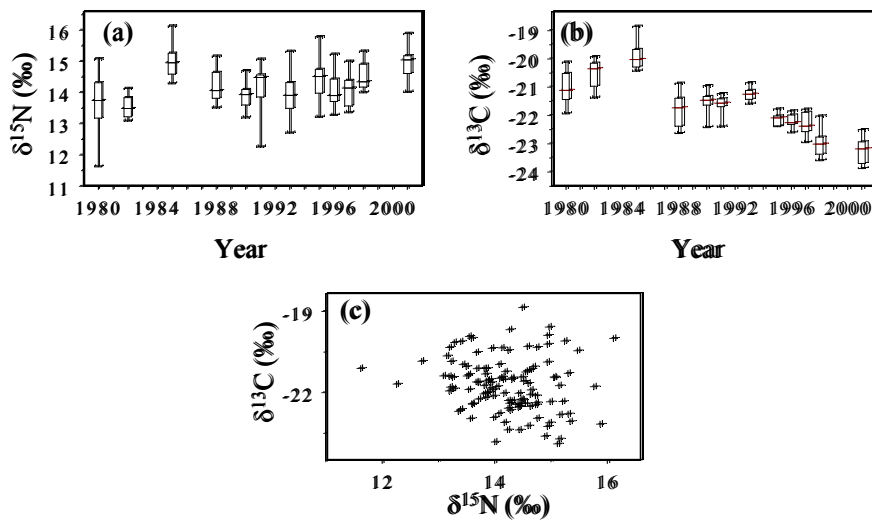


FIG. 4. Changes in (a) $\delta^{15}\text{N}$ and (b) $\delta^{13}\text{C}$ and (c) the relationships between $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in whitefish scales from Lake Geneva between 1980 and 2001. The line through the box in the box-plot is at the median level, the bottom of the box is the first quartile ($Q1$) and the top is the third quartile ($Q3$). The whiskers are the lines that extend from the top and bottom of the box to the adjacent values, i.e. the lowest and highest value reported that are still within the zone defined by the lower limit of $Q1 - 1.5(Q3 - Q1)$ and by the upper limit of $Q1 + 1.5(Q3 - Q1)$.

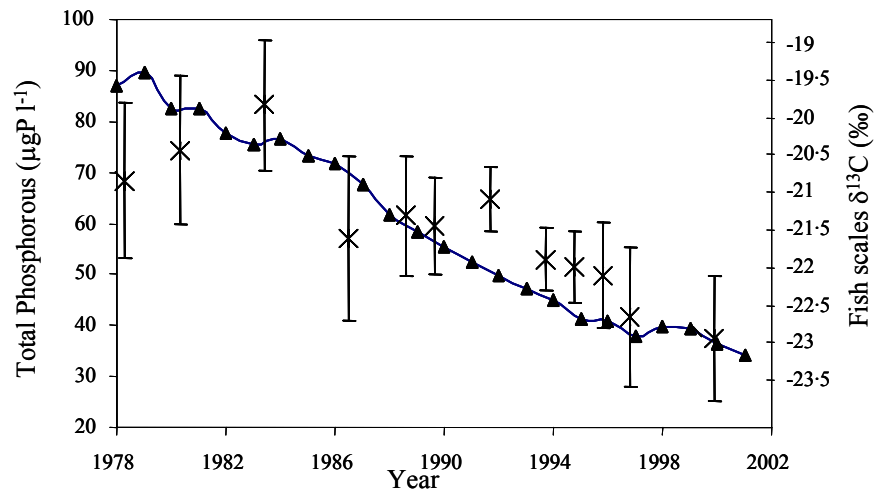
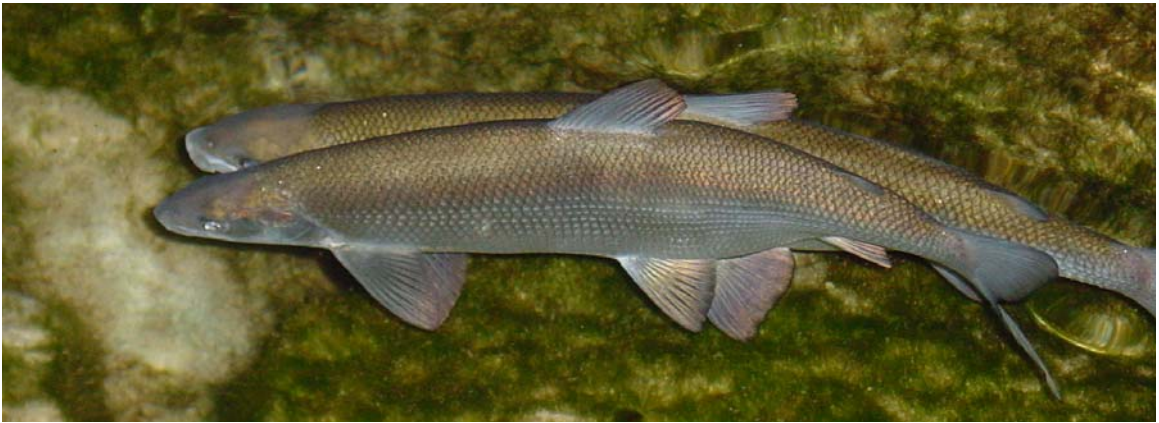


FIG. 5. Changes in lake total phosphorus (\blacktriangle) and the mean $\delta^{13}\text{C}$ (and C. I.) of fish scales (\times) during the re-oligotrophication period of Lake Geneva (1980-2001).



Article 2. Changes in the $\delta^{13}\text{C}$ of pelagic food webs: the influence of lake area and trophic status on the isotopic signature of whitefish (*Coregonus lavaretus*)

Marie Elodie PERGA et Daniel GERDEAUX

CANADIAN JOURNAL OF FISHERIES AND AQUATIC SCIENCES (*in press*)

RUNNING TITLE : WHITEFISH $\delta^{13}\text{C}$ VARIATIONS

ABSTRACT

We investigated the relationships between the pattern of variation of $\delta^{13}\text{C}$ in pelagic food webs and various morphologic and trophic characteristics of peri-alpine lakes. We used the $\delta^{13}\text{C}$ of whitefish (*Coregonus lavaretus*), a long-living zooplanktivorous fish, to assess the isotopic ratio of dissolved inorganic carbon (DIC) at the origin of the pelagic food web. The $\delta^{13}\text{C}$ of DIC depends on its origin, which may be atmospheric or result from the mineralization of organic matter. A synchronic study of 22 peri-alpine lakes shows that the area of the lake accounts for much of the variability of the $\delta^{13}\text{C}$ of pelagic food webs ($r^2 = 0.76$). $\delta^{13}\text{C}$ increases with lake size, suggesting that the origin of the DIC integrated into the pelagic food web depends on lake size. To separate the trophic status influence from morphological effects, a diachronic study was then performed on the $\delta^{13}\text{C}$ of a collection of fish scales, covering the 20-year-re-oligotrophication of lake Geneva. The $\delta^{13}\text{C}$ of whitefish increased with phosphorous concentration ($r^2 = 0.71$). This pattern is related to the growing demand for atmospheric DIC when primary production increases.

RESUME

Nous avons étudié le profil de variation du $\delta^{13}\text{C}$ des réseaux trophiques pélagiques en fonction de différentes caractéristiques morphologiques et trophiques de lacs péri-alpins. Nous avons utilisé la signature isotopique du Corégone, *Coregonus lavaretus*, un poisson zooplanctonophage à longue durée de vie, pour obtenir une estimation de la signature du carbone inorganique dissous (CID) à l'origine du réseau trophique pélagique. Le $\delta^{13}\text{C}$ du CID dépend de son origine ; atmosphérique ou issu des processus de minéralisation de la matière organique. Par une étude synchrone sur 22 lacs péri-alpins, nous avons montré que la surface est le facteur qui explique la plus grande part de la variabilité du $\delta^{13}\text{C}$ ($r^2 = 0.76$). La signature $\delta^{13}\text{C}$ du corégone augmente avec la taille du lac, indiquant que l'origine du CID intégré dans le réseau pélagique dépend de la taille du système. Pour étudier l'influence du statut trophique en se dégageant de l'influence de la taille du lac, nous avons mené une étude diachronique, à partir d'une collection d'écaillés couvrant la période de re-oligotrophisation du lac de Genève. Le $\delta^{13}\text{C}$ du corégone augmente avec la concentration en phosphore ($r^2 = 0.71$), en relation avec un besoin croissant en CID d'origine atmosphérique lorsque la production primaire augmente.

KEYWORDS: whitefish, lake size, $\delta^{13}\text{C}$, phosphorus.

INTRODUCTION

Stable Isotope Analysis (SIA) has been used with great success over the past twenty last years, because it is very useful for studying food webs and energy flows in both terrestrial and aquatic ecosystems, and especially in lakes (Yoshioka *et al.* 1994; Zohary *et al.* 1994; Grey *et al.* 2001). Many studies have been conducted on individual lake food webs throughout the world, yielding measurements of the two main isotopic ratios used in SIA. The ratio of stable isotopes of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) in the consumer is typically enriched by 3-4‰ relative to the diet and can be used to estimate trophic positions (De Niro and Epstein 1981; Minagawa and Wada 1984). In contrast, the ratio of stable isotopes of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) is transmitted with little change from the diet to the consumer (De Niro and Epstein 1978), which makes it helpful for tracking the ultimate sources of the carbon in an organism, on condition that the isotopic signatures of the sources are different (France 1995a; France 1995b). Cross-system examination of these isotopic data reveals high between-lake differences in the isotopic signatures of food webs (Gu *et al.* 1996; France *et al.* 1997; France 2000). In pelagic food webs, for example, $\delta^{13}\text{C}$ ranges from -20‰ (Quay *et al.* 1986) to -50‰ (Rau 1978).

The $\delta^{13}\text{C}$ of organisms reflects the $\delta^{13}\text{C}$ of the carbon at the base of the food web (Fry and Sherr 1984; Peterson and Fry 1987), and this depends on the $\delta^{13}\text{C}$ of the primary carbon sources (phytoplankton, benthic- or littoral-attached algae, detritus...) and the proportions in which they are exploited by the pelagic food web (Grey *et al.* 2000). Moreover, the $\delta^{13}\text{C}$ of the primary producers is imposed by the nature of the inorganic carbon, IC, used (atmosphere, carbonates dissolution and/or respiration) and by IC limitation (Raven *et al.* 1994; France 1996a).

$\delta^{13}\text{C}$ therefore encapsulates a lot of information about the carbon supply processes in the food web. By studying the pattern of variation of pelagic $\delta^{13}\text{C}$ in lakes, we hope to tease out the lake factors that exert a major influence on carbon sources in pelagic food webs.

We could have used zooplankton (France *et al.* 1997), sediment or plankton (Gu *et al.* 1996) to estimate the $\delta^{13}\text{C}$ of the organic matter exploited by the pelagic food web. However, the isotopic signatures of short living organisms are subjects to strong temporal variability (Yoshioka *et al.* 1994; Zohary *et al.* 1994). Moreover, zooplankton operates vertical migrations, but is not very mobile on the horizontal plane, and is also subject to marked spatial variability. To get round these problems, we used a spatial and temporal integrator (Post 2002b) of pelagic signatures: a long-living zooplanktivorous fish, *Coregonus lavaretus*. Fish dorsal muscle reflects dietary $\delta^{13}\text{C}$, with nearly no fractionation (De Niro and Epstein 1978). Scales are 4‰ enriched in ^{13}C compared to muscle (S.D. =1.26) and can also be used as a 4‰ translated proxy of food $\delta^{13}\text{C}$ (Perga and Gerdeaux 2003). As these tissues are low turnover tissues, the variability of $\delta^{13}\text{C}$ of the pelagic food web is integrated over the year by the muscle and over the life span by the scales (Tieszen *et al.* 1983).

The pattern of variation of $\delta^{13}\text{C}$ was studied in two different ways. The first used a synchronic approach, by identifying relationships between the $\delta^{13}\text{C}$ of the pelagic food web and some morphological and trophic variables in a panel of 22 alpine lakes. A diachronic study was performed then on the $\delta^{13}\text{C}$ of a collection of fish scales, covering the 20-year re-oligotrophication of lake Geneva in order to distinguish between the influence of the trophic status and morphological effects.

MATERIALS AND METHODS

For the comparative study, whitefish, caught in experimental or commercial gear, were sampled in 22 lakes located on the peri-alpine part of the Alps in France, Switzerland, Germany and Italy. To avoid variability due to a potential ontogenic shift, we sampled individuals belonging to a similar age class. The homogeneity in age was checked by scalimetry. A small section of dorsal muscle was taken for isotopic analyses. The area of the lakes ranged from 0.72 to 582 km², and they contained 2 to 60 $\mu\text{gP}\cdot\text{L}^{-1}$ total phosphorus. The attributes of the lakes are shown in Table 1. For the study centered on lake Geneva, whitefish scales were obtained from a collection made from spawning fish (1980-2001). Scales from 8 to 10 mature adults caught in 1980, 1982, 1985, 1988, 1990, 1991, 1993, 1995, 1996, 1997, 1998 and 2001 were decalcified and analyzed (Perga and Gerdeaux 2003). Samples were freeze-dried and finely ground in a ball mill. 1 mg samples of muscle and 1.5 mg samples of scale were weighed in 6 x 4 mm tin cups for CF-IRMS (Continuous Flow Isotope Ratio Mass Spectrometry) analysis using a Europa Scientific ANCA-NT 20-20 Stable Isotope Analyzer with a NCA-NT Solid/Liquid Preparation Module (PDZ Europa Ltd., Crewe, UK). The analytical precision was 0.2‰ estimated from 5 standards analyzed along with the samples. The working standards used were 1 mg leucine, prepared by freeze drying 50 mL of a 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ stock solution in the tin cups, and calibrated against 'Europa flour' and International Atomic Energy Agency (IAEA) standards N1 and N2. All stable isotope values are reported using the δ notation:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left(\left[\frac{{}^{13}\text{C}_{\text{sample}}/{}^{12}\text{C}_{\text{sample}}}{{}^{13}\text{C}_{\text{standard}}/{}^{12}\text{C}_{\text{standard}}} \right] - 1 \right) \cdot 10^3$$

Muscle lipid content varies between individuals, and so the $\delta^{13}\text{C}$ values were corrected using Mc Connaughey's formula (Mc Connaughey and Mc Roy 1979). The normality of distribution was tested by the Kolmogorov test, and variables were log-transformed to ensure normality when necessary. Relationships between the $\delta^{13}\text{C}$ and other variables were described by linear regression. A stepwise regression was performed to check whether the model could be improved by adding other explanatory variables. Environmental variables were first screened for correlations, and six explanatory variables that were not strongly correlated were used in a stepwise regression. Cp statistics were calculated, and each term successively added to and dropped from the current model. Statistical analyses were performed using S-PLUS 6.0 (Insightful 2001).

RESULTS

BETWEEN-LAKES COMPARISON

Whitefish $\delta^{13}\text{C}$ values ranged from -38.5 to -26.5 ‰ (Table 1). The $\delta^{13}\text{C}$ was correlated with all the variables linked to the system size (Table 2), with the best correlation being obtained for the log of the lake area ($n = 22$, $r^2 = 0.76$, $p < 10^{-7}$) (Fig. 1). Phosphorus concentration was not significantly correlated with the $\delta^{13}\text{C}$ in whitefish ($n = 17$, $r^2 = 0.01$, $p = 0.68$ (Table 1)). The area of the lake accounts for 76% of the total variation of $\delta^{13}\text{C}$, and is the best predictor, among all the variables tested, of the $\delta^{13}\text{C}$ isotopic signature of whitefish (Table 1). Total phosphorus and lake surface are not correlated ($r^2 = 0.08$, $p = 0.70$).

All the variables relative to the system size (area, volume, length...) are strongly correlated, whereas chemical variables, residence time and altitude are more independent. The model is not improved by adding these variables to the regression model (Table 3).

In contrast to previous studies (Gu *et al.*, 1996; France *et al.*, 1997), we found no relationship between whitefish $\delta^{13}\text{C}$ and total phosphorus concentration. We stratified the lakes by area (greater or smaller than the median area), and found that $\delta^{13}\text{C}$ was positively related to P_{TOT} for the larger lakes ($r^2 = 0.71$ for area > 25.80 km², ($p = 0.001$, $n = 10$)) but not for the smaller ones ($r^2 = 0.44$ for area < 25.80 km², ($p = 0.07$, $n = 7$)) (Fig. 2). The absence of correlation for the smaller lakes is not due to a smaller range of P_{TOT} . Mean P_{TOT} concentrations in the two groups (small lakes, large lakes) were not significantly different (One-way ANOVA $F_{(1;17)} = 0.395$, $p = 0.538$).

LAKE GENEVA

The $\delta^{13}\text{C}$ of fish scales decreased from -20 ‰ to -23 ‰, and the total phosphorus load decreased from $90 \mu\text{gP} \cdot \text{L}^{-1}$ to $30 \mu\text{gP} \cdot \text{L}^{-1}$ (Fig. 3a). The total phosphorus and isotopic signature of the fish scales were significantly and strongly correlated ($r^2 = 0.71$, $p = 0.0005$) (Fig. 3b).

DISCUSSION

Our findings are based on the assumption that the $\delta^{13}\text{C}$, and thus, the source of the DIC integrated into the pelagic food web, can be assessed from the $\delta^{13}\text{C}$ of whitefish. Whitefish is usually assumed to be a strictly zooplanktivorous fish, and this is corroborated by all the studies done on whitefish diet in large peri-alpine lakes. In lakes Constance, Lucerne, Maggiore and Geneva, whitefish preferentially eat the biggest forms of zooplankton: *Bythotrephes* spp., *Leptodora* spp., *Daphnia* spp., and possibly *Bosmina* spp. and copepods (Giussani and De Bernardi 1977; Becker and Eckmann 1992; Mookerji *et al.* 1998). Yet, in smaller lakes, whitefish can occasionally be benthic consumers. In several Nordic studies, some ecotypes eat benthic preys, but zooplankton clearly remains their main food (Heikinheimo *et al.* 2000). The depth of the lakes where whitefish ate chironomids was often less than 20 m, even if they covered a large surface area. In fact, the fish fed opportunistically, on the most

abundant food source, but preferred crustacean zooplankton (Enz *et al.* 2001; Gerdeaux *et al.* 2002). During winter and early spring, chironomid nymphae consumption has been observed in Lake Annecy (Gerdeaux *et al.* 2002). However the fish do not grow during this season (Wilson and Pitcher 1984; Fechhelm *et al.* 1992; Rudstam *et al.* 1994). We can therefore assume that the isotopic signal of this food is not integrated into the muscle. In contrast, whitefish do consume pelagic zooplankton during the period of the somatic growth, when we can assume that the isotopic signature of the diet is integrated into the tissues.

A second assumption is that the trophic position of the whitefish is the same in all the lakes. Depending on the ratio of herbivorous zooplankton (*Daphnia* spp.) to predator zooplankton (*Bythotrephes* spp., *Leptodora* spp.), the trophic position of whitefish could actually vary, although not by more than one trophic level. The fractionation of $\delta^{13}\text{C}$ in aquatic field experiments was settled as inferior to 0.5‰ (Post 2002b), and about 0.2‰ in freshwater ecosystems (France *et al.* 1997). This means that even if the trophic position of whitefish is not exactly the same in all the lakes, the $\delta^{13}\text{C}$ variability introduced will remain negligible. Consequently, whitefish can be used as an integrator of the pelagic chain $\delta^{13}\text{C}$. $\delta^{13}\text{C}$ at the top of the pelagic food web increased with lake size, the most explanatory variable being the surface area. This result is consistent with the relationship established by Post (2002b) on the $\delta^{13}\text{C}$ of mussels. The correlation between the two variables was closer in our study. Even though the $\delta^{13}\text{C}$ of primary producers depends on numerous factors, the variation of $\delta^{13}\text{C}$ with lake area was attributed to a change in the signature of the DIC pool rather than to a modification of isotope fractionation during photosynthesis (Post 2002b). DIC originates from atmospheric dissolution, carbonates or a process of the mineralization organic matter. The DIC derived from atmospheric dissolution has a high $\delta^{13}\text{C}$, close to 0‰. The photosynthesis process fractionates by preferentially fixing ^{12}C , which leads to a $\delta^{13}\text{C}$ in the phytoplankton of around -20‰ (Raven *et al.* 1994). DIC resulting from mineralization or respiration has a $\delta^{13}\text{C}$ comparable to that of the organic matter mineralized, which is already impoverished in ^{13}C (De Niro and Epstein 1978): endogenous DIC has a lower $\delta^{13}\text{C}$ than atmospheric DIC, which leaves photosynthetic matter still more impoverished (France *et al.* 1997; Keough *et al.* 1998). The high $\delta^{13}\text{C}$ in autotrophs illustrates the photosynthetic fixation of atmospheric inorganic carbon, whereas the very low $\delta^{13}\text{C}$ of autotrophs is associated with high levels of microbial respiration (France 1999).

Relationships between $\delta^{13}\text{C}$ and lake area could be attributable to a change in the origin of the inorganic carbon sustaining pelagic primary production. The relative contributions of endogenous and atmospheric inorganic carbon to the pelagic food web may depend on lake size. In smaller lakes, the pelagic food web relies to a significant extent on recycled carbon. In contrast, in larger lakes the ratio of the contribution of atmospheric over endogenous carbon is higher.

The relationships observed between $\delta^{13}\text{C}$ and lake area could first result from a greater influence of atmosphere in larger lakes. Large surface waterbodies are thought to react much more quickly with the atmosphere than small ones because the physics of gas exchange and turbulence

regimes are enhanced (Wanninkhof 1992). Then, in larger lakes, endogenous DIC, with low $\delta^{13}\text{C}$, could be "diluted" by atmospheric CO_2 , ^{13}C enriched. In that context, the observed pattern could result more from gas exchange between lake and atmosphere than from specific effect of food web. However, pCO_2 patterns of variations with lake size gave evidence that biological effects can also be involved. Kelly *et al.* (2001) measured lower pCO_2 in large Canadian lakes and higher pCO_2 in small ones. To explain this pattern, Kelly *et al.* (2001) evoked the physical effects mentioned above. However, as DOC was also negatively correlated with lake size in their set of lakes, higher inputs of organic carbon to smaller lakes could also explain the higher pCO_2 . DOC measures were not available for our set of lakes but the importance of exogenous carbon in supporting lake food webs is more and more obvious (Pace *et al.* 2004).

Post (2002b) attributed also the relationship between $\delta^{13}\text{C}$ and lake size to the fact that terrestrial inputs is higher in small lakes than in large ones. In the absence of strong anthropogenic pressure, the effects of the watershed on the lake, and notably the contribution of allochthonous inputs, can often be assessed from the ratio between the area of the lake and the watershed. Our set of lakes included some highly urbanized ones, and all of them had undergone a phase of eutrophication (Ofefp 1994). The values of the lake area/watershed area ratio are not representative of the influence of the watershed on the lake, and do not provide reliable information about the contribution of the terrestrial inputs in our set. This made it impossible to draw any conclusion about the influence of the terrestrial inputs. Yet, benthic and sediment respiration have been shown to make a significant contribution to CO_2 production (Jonsson *et al.* 2003). The greater stock of respired carbon could also be derived from the mineralization of littoral or benthic inputs to the pelagic zone, which is more important in smaller lakes than in larger ones.

In lakes, the habitat colonizable by littoral or benthic algae depends on light attenuation. Consequently, proportion of the littoral or benthic zone to the pelagic zone depends on water transparency and mean depth (Vadeboncoeur *et al.* 2001). In our set of lakes, the mean depth and lake size are strongly correlated. The largest lakes are also the deepest ones. This means that the large lakes have a greater proportion of pelagic zone than smaller ones. In the large lakes, the littoral ecotone may therefore have less influence on the pelagic zone than in small ones. Littoral and benthic zones are very productive systems, with very effective bacterial mineralization (Vadeboncoeur *et al.* 2002), and can therefore contribute to the carbon supply of pelagic food webs. Consequently, the relative contribution of benthic or littoral DIC to the pelagic food web may be strongly influenced by lake size in our set of lakes. In small lakes, the contribution of endogenous carbon processing from mineralization of anthropogenic, terrestrial, benthic or littoral carbon would make up a larger proportion of in the pelagic carbon supply. In large lakes, atmospheric inorganic carbon sustains the pelagic food web.

The strong influence of area on the $\delta^{13}\text{C}$ may mask potential relationships with the trophic status. When the lakes were divided into two groups, around the median area value, two relationships

were found. The positive relationship between $\delta^{13}\text{C}$ and P_{TOT} for the large lakes in the synchronic study, is consistent with the results of previous studies, with a coefficient of correlation slightly higher than those reported in the literature ($r^2=0.40$ (France *et al.* 1997)). When focusing on a single large lake in the diachronic study of lake Geneva (surface = 582 km²), this correlation was stronger, illustrating the influence of nutrient concentration on the $\delta^{13}\text{C}$ of the pelagic food web. The pattern observed with P_{TOT} increase could be attributable to 1) a shift in the trophic position of whitefish, 2) a lower fractionation rate during photosynthesis or 3) a greater contribution from atmospheric carbon, enriched in ^{13}C .

Two studies of whitefish diet were conducted: one in the early 80s during the peak of eutrophication (Ponton and Gerdeaux 1988), and the other in 2000 (Gerdeaux and Hamelet 2001). They show no major change in diet, whitefish were still relying mainly on cladocerans. Thus, the observed pattern of $\delta^{13}\text{C}$ variation cannot originate from a shift in the trophic position of whitefish.

In nearly all temperate lakes, primary production is phosphorus-limited, and the total phosphorus gives a good estimation of pelagic primary productivity. Phytoplanktonic production/planktonic respiration increases when P_{TOT} concentration increases (Del Giorgio and Peters 1993). When primary production increases, DIC decreases dramatically in the epilimnion. Fractionation by the Rubisco (Raven *et al.* 1994) depends on the DIC concentration at the boundary layer. When the DIC stock decreases, fractionation may be reduced and may lead to a less negative $\delta^{13}\text{C}$ in the phytoplankton. Moreover, when phytoplankton production is high, dissolved CO_2 concentration in the epilimnion drops below atmospheric saturation, resulting in a rise of pH. The very low dissolved CO_2 causes a large net influx of atmospheric carbon, enriched in ^{13}C . During invasion, some of the CO_2 that enters the epilimnion is transformed into HCO_3^- (Emerson 1975). The resulting increase of ^{13}C in the pelagic food web would then be attributed to the invasion by atmospheric carbon dioxide, enriched in ^{13}C , which compensates for the DIC fixed by photosynthesis (Schindler *et al.* 1973; Schindler *et al.* 1997a). In large lakes, eutrophication leads to a greater contribution of atmospheric carbon than of endogenous carbon.

This pattern of $\delta^{13}\text{C}$ variation with P_{TOT} is only valid for large lakes. For small ones, influence of P_{TOT} on $\delta^{13}\text{C}$ is less clear. Benthic primary production has been shown to decrease when the lake is fertilized (Vadeboncoeur *et al.* 2001). However, the benthic community respiration may actually increase, as pelagic inputs, as a result of sedimentation, are higher (Denicola *et al.* 2003). Moreover, in small lakes, the benthic DIC makes a significant contribution to pelagic photosynthesis (Jonsson *et al.* 2003). The response of small lakes to eutrophication may be a combination of higher pelagic primary production plus higher DIC contribution of benthic respiration to pelagic production.

In conclusion, the between-lake variation in whitefish $\delta^{13}\text{C}$ has important implications in terms of the carbon supply of the pelagic food web. $\delta^{13}\text{C}$ is mainly determined by lake size. In small lakes, the watershed, and benthic and littoral influences on the pelagic zone are very important, supplying the pelagic food web with endogenous inorganic carbon resulting from the mineralization of the

allochthonous, benthic or littoral production. With increasing size, the contributions of the watershed and littoral zone decreases; the endogenous DIC is no longer sufficient to sustain photosynthetic demand and consequently, pelagic primary producers exploit dissolved atmospheric carbon.

Primary production, assessed from the total phosphorous, has less effect on the carbon source of pelagic food web. Eutrophication increases the DIC-demand of pelagic primary producers, enhancing the invasion of atmospheric CO_2 in large lakes. The response of small lakes to an alteration in the trophic status seems to be more complex. However whitefish, and indeed fishes in general, may be too mobile, moving between the littoral and pelagic zones, to be used as satisfactory models for integrating pelagic $\delta^{13}\text{C}$ in very small lakes. In this context, it could be more appropriate to use filter-feeding mollusks, such as mussels, to assess the $\delta^{13}\text{C}$ of the pelagic autotrophs (Post 2002b).

This study illustrates the links between allochthonous, littoral, benthic and pelagic carbon flows, via the circulation of DIC, and could provide a further argument in favor of reintegrating these habitats in future food web studies in lakes (Vadeboncoeur *et al.* 2002).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to all the scientists who have been involved in this work by helping in the collection of samples or supplying environmental data: B. Buttiker (OFEFP), Prof. G. Giussani and G. Morabito (Istituto Italiano di Idrobiologia, Verbania Pallanza), A. Groleau (IPJP), D. Hefti (OFEFP), M. Klein (Bayerische Landesanstalt für Fischerei), C. Küg and P. Friedli (Fischerinspektorat, Bern), R. Müller (EAWAG), T. Pelte (RMC Water Agency), C. Rühle (Service de la Chasse et de la Pêche du Canton de Saint Gal). We thank the two anonymous reviewers and the Associate Editor for their comments and questions about an earlier draft. This work was supported by Action Concertée Incitative “Ecologie Quantitative” of the French Research Ministry.

TABLES

Table 1. Morphological, trophic data and mean whitefish isotopic signature of the set of peri-alpine lakes studied. Max. dpth: maximum depth, Mn. dpth: mean depth, , Max. lgth: Maximal length, Max. wdth: Maximal width, Sh.: Shoreline, Vol.: Volume, Res. Time: Residence time, Wd area: Watershed area, O₂ min : minimal O₂ concentration at the bottom. (CH=Switzerland, F= France, G=Germany, I=Italy, NA= not available).

Lake	Country	Max. dpth. (m)	Mn. dpth. (m)	Max. lgth. (km)	Max. wdth (km)	Sh (km)	Area (km ²)	Vol. (km ³)	Res. time (year)	Wd Area (km ²)	P _{TOT} ($\mu\text{gP}\cdot\text{L}^{-1}$)	NO ₃ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	O ₂ min ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	<i>n</i>
4 Cantons	CH	214	104	1	3.6	144.0	114	11.80	1.0	1, 831	5	0.57	3.4	-30.5	12
Aiguebelette	F	71	30	4	3.0	14.2	5.5	1.60	2.9	60	25	0.44	0.4	-35.2	11
Annecy	F	65	41	15	3.2	32.0	27.6	1.10	3.8	277	6	0.25	0.5	-32.1	10
Bienne	CH	74	30	15	4.1	50.0	39.3	1.20	0.2	8, 305	18	1.52	0.5	-29.8	5
Bourget	F	145	81	18	3.0	44.8	42.0	3.60	3.8	560	30	0.71	0.1	-29.8	10
Brienze	CH	261	173	14	2.8	36.0	29.8	5.20	2.7	1, 127	5	0.39	9.3	-30.9	10
Chalain	F	32	16	3	1.1	7.5	2.3	0.04	0.9	42	20	0.25	0.0	-34.1	20
Constance	CH-G	254	100	63	14.8	160.0	476.0	47.70	4.3	10, 500	14	0.41	6.0	-29.6	20
Ilay	F	32	11	2	0.4	5.0	0.7	0.01	1.0	5	NA	0.11	0.2	-32.8	9
Joux	CH	32	15	9	1.2	24.0	8.7	0.13	3.2	1, 994	13	0.54	3.2	-34.3	10
Geneva	CH-F	309	152	72	13.5	200.2	582.0	89.0	11.4	7, 393	39	0.56	3.0	-26.5	20
Maggiore	I	372	178	66	10.1	140.0	212.5	37.50	4.1	6, 386	14	0.81	6.0	-29.2	8
Neuchâtel	CH	152	64	38	8.1	95.0	217.9	13.98	8.2	2, 670	14	0.54	3.2	-31.8	10
Rousses	F	18	8	2	0.5	4.1	0.9	0.01	1.0	13	10	0.12	4.4	-35.8	9
Sarnen	CH	52	32	17	3.6	15.3	7.6	0.24	0.7	267	5	0.58	5.5	-31.8	12
Starnberg	CH	128	53	7	1.1	49.2	56.4	3.00	21.0	314	12	0.54	1.4	-29.8	10
St Point	F	41	19	20	2.8	14.2	4.2	0.08	0.5	241	50	0.35	3.0	-35.9	8
Sylans	F	20	10	2	0.2	3.9	0.5	0.01	3.8	1, 994	NA	1.30	0.0	-38.9	15
Thune	CH	217	135	17	3.5	50.0	48.4	17.50	1.9	2, 490	11	0.53	7.6	-31.4	11
Vouglans	F	100	38	30	0.8	78.0	16.0	0.60	0.5	1, 120	NA	NA	8.1	-34.6	10
Walensstadt	CH	145	103	21	2.9	34.1	24.1	2.52	1.5	1, 061	3	0.16	6.1	-31.6	11
Zurich	CH	48	23	39	3.9	30.1	20.3	0.47	0.2	1, 564	25	0.71	1.1	-33.5	13

Table 2. Correlation between $\delta^{13}\text{C}$ of Whitefish and the different variables studied. All the variables, except P_{tot} , were log-transformed before linear regression.

Variables	r^2	p
Altitude	0.17	0.052
Maximal depth	0.69	$< 10^{-5}$
Mean depth	0.67	0.0009
Shoreline	0.61	$< 10^{-5}$
Maximal length	0.43	0.0009
Maximal width	0.72	$< 10^{-5}$
Surface	0.76	$< 10^{-5}$
Volume	0.70	$< 10^{-5}$
Residence time	0.19	0.040
Watershed surface	0.24	0.020
O_2	0.06	0.243
NO_3	0.00	0.954
P_{TOT}	0.01	0.680

Table 3. Results of the stepwise multiple regression analysis of the relationships between Whitefish $\delta^{13}\text{C}$ and environmental variables. The current model is the single regression between $\delta^{13}\text{C}$ and $\log(\text{area})$. The first line, labeled "none" gives the parameters for the current model. The best model is the one which reduced C_p the most. Adding any of the other variables leads to a higher C_p . The current model is not improved by adding another explanatory variable.

Variable added	Sum of squares	Residual sum of squares	C_p
None		331.78	427.24
P_{tot}	0.40	331.38	474.57
NO_3	2.25	329.53	472.72
Alt	1.21	330.57	473.75
Residence time	27.34	304.44	447.63
O_2	0.42	331.35	474.55

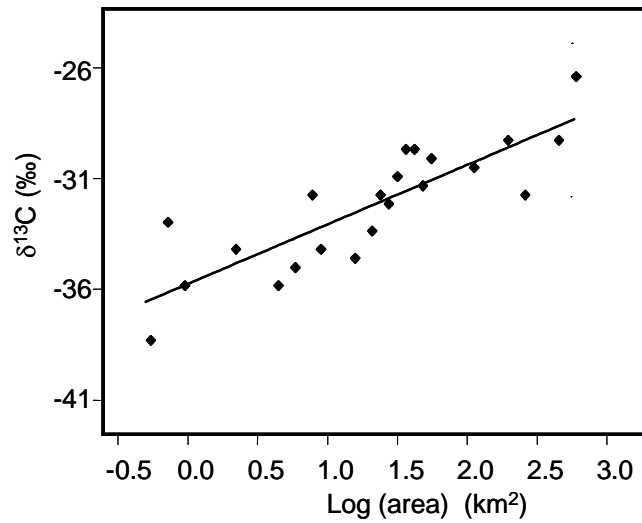


Fig. 1. Relationships between $\delta^{13}\text{C}$ and the logarithm of lake area (km^2). Equation of regression: $\delta^{13}\text{C} = -35.99 + 1.21 \cdot \log(\text{area})$, $r^2 = 0.766$, $p = 10^{-7}$.

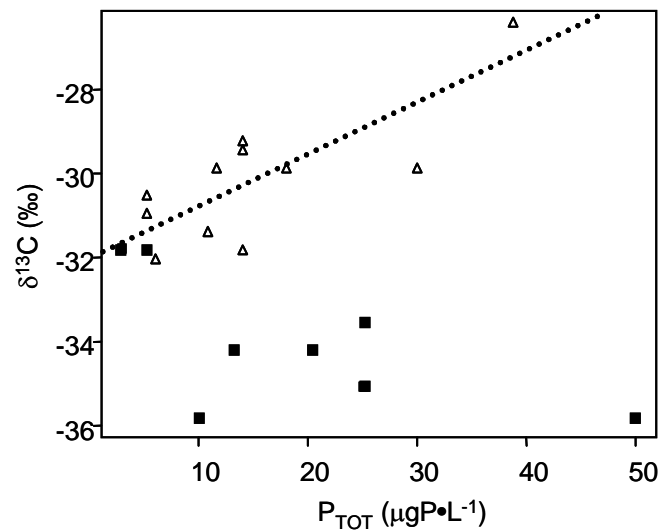


Fig. 2. Relationships between $\delta^{13}\text{C}$ and P_{TOT} , for small lakes (solid squares, area $< 25.8 \text{ km}^2$, $r^2 = 0.4425$, $p = 0.072$, $n = 7$) and large lakes (open triangles, area $> 25.8 \text{ km}^2$, equation of regression: $\delta^{13}\text{C} = -31.93 + 0.12 \cdot P_{\text{TOT}}$, $r^2 = 0.71$, $p = 0.001$, $n = 10$)

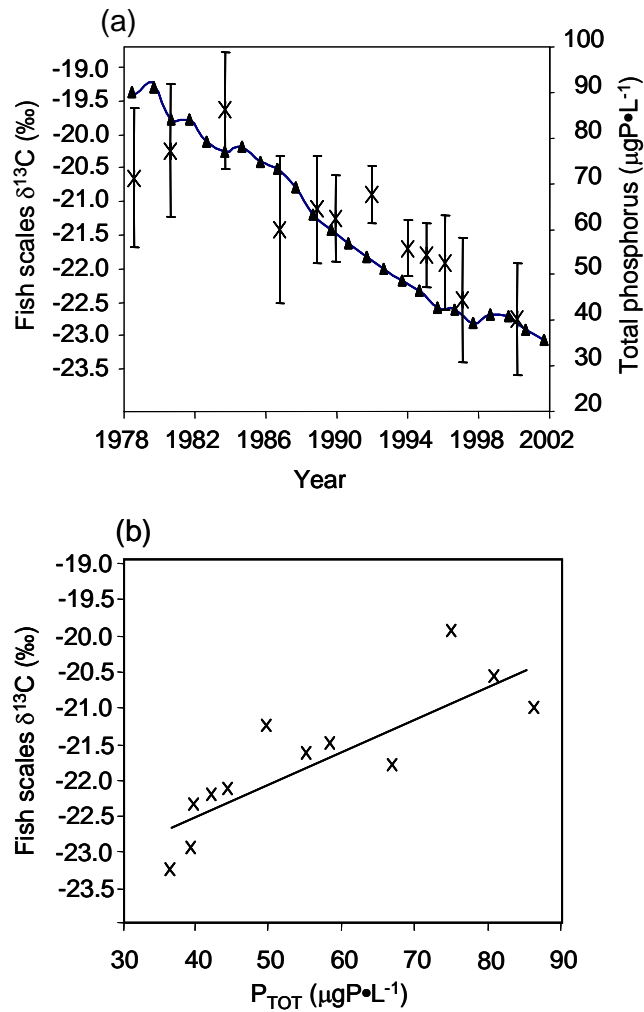
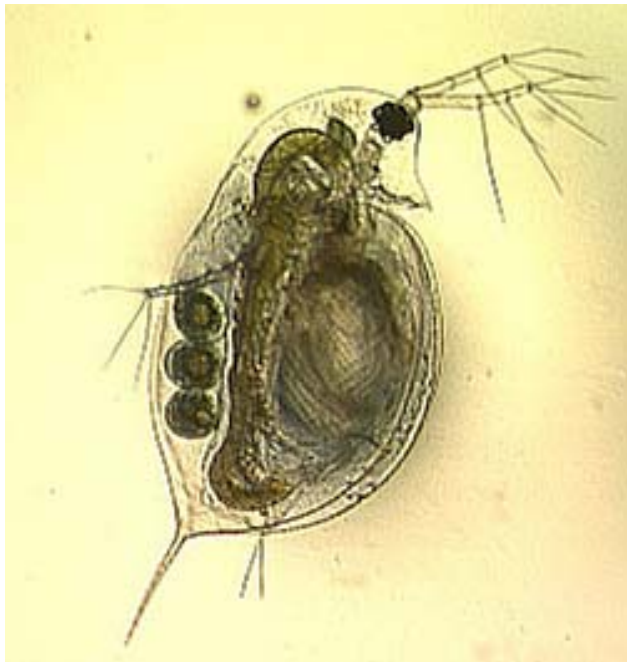


Fig. 3. Relationships between $\delta^{13}\text{C}$ and total phosphorous load during the re-oligotrophication phase of lake Geneva (1980-2001). (a) Evolution of the mean $\delta^{13}\text{C}$ (and C.I.) of fish scales (crosses) and the total phosphorus load (black triangles). (b) Relationships between the mean total phosphorus load over the last past three years and mean $\delta^{13}\text{C}$ of fish scales. Equation of regression : $\delta^{13}\text{C} = -24.30 + 0.046 * P_{\text{TOT}}$, $r^2 = 0.71$, $p = 0.0005$.



Article 3. Seasonal variability in the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the crustacean zooplankton taxa in two alpine lakes: differences in the baselines and trophic structures of the two lakes, and their seasonal variations

Marie Elodie PERGA et Daniel GERDEAUX

Soumis à ACTA OECOLOGICA

RUNNING TITLE : *STABLE ISOTOPE COMPOSITION OF ZOOPLANKTON*

ABSTRACT

$\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in crustacean taxa were measured once a month in two alpine lakes over a two-year period in order to address seasonal changes in the isotope composition of the zooplankton. *Daphnia spp.* was used as the pelagic baseline, as it is thought to occupy a similar trophic position between lakes. Seasonal changes resulting from modifications in the feeding behavior of other crustacean taxa were assessed by comparing their seasonal $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values to those of *Daphnia*. Baseline modifications were addressed by relating them to physical, chemical and biological changes in the epilimnion. In Lake Geneva, a large and mesotrophic lake, the crustacean food web was shown to be linear and simple, with all the crustacean taxa relying on phytoplankton production. The trophic structure was constant throughout the year, with no significant changes in the trophic positions of the taxa. In contrast, in Lake Annecy, which is smaller and oligotrophic, the crustacean food web was found to be much more complex. The crustacean taxa, including *Daphnia*, probably consumed phytoplanktonic and non-phytoplanktonic carbon sources, in differing proportions. The trophic positions of the crustacean taxa changed during the year. This study raises the question of how the pelagic baseline should be defined.

KEY WORDS: pelagic baseline, *Daphnia*, copepods, *Bythotrephes*, *Leptodora*, littoral, food web, zooplankton, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, seasonal changes, trophic position.

INTRODUCTION

Stable isotope studies were efficient revealing diversity and complexity of the zooplanktonic food web in different lakes (Kling *et al.* 1992a; Grey and Jones 1999; Karlsson *et al.* 2003; Matthews and Mazumder 2003). Stable isotope studies have been used to distinguish between phytoplanktonic and non-phytoplanktonic carbon sources (benthic, littoral and allochthonous), in many lacustrine systems, and have provided evidence that the degree to which the zooplankton relies on non-phytoplanktonic carbon depends on the lake trophic status (Grey *et al.* 2000; Vadeboncoeur *et al.* 2003), its size (Vadeboncoeur *et al.* 2002), the season (Grey *et al.* 2001) and the N/P ratio (Karlsson *et al.* 2003).

However, when stable isotopes were used to investigate the trophic structure of the zooplankton, it was quite difficult to investigate differences in the isotopic composition of the zooplankton within a given lake. Differences in the $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$ of the zooplankton may result from a shift in the pelagic baseline, i.e. the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotope compositions of the pelagic primary producers (Matthews and Mazumder 2003). Interlake pelagic baseline differences between the lakes have been addressed: lake size (Perga, accepted for publication; Post, 2002b) and trophic status (Gu *et al.* 1996; Perga and Gerdeaux 2003) were both shown to influence the baseline $\delta^{13}\text{C}$, whereas nitrogen inputs and inorganic nutrient $\delta^{15}\text{N}$ were found to alter the $\delta^{15}\text{N}$ baseline (Lake *et al.* 2001; Cole *et al.* 2004). However, the factors controlling seasonal variations in the pelagic baseline have yet to be clearly identified. Many factors, such as temperature, primary production, and inorganic nutrient recycling, are known to affect the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the phytoplankton, but no links have so far been established in the field between their seasonal patterns and that of the pelagic baseline (Altabet and Deuser 1985; Zohary *et al.* 1994; Gu *et al.* 1996; Burkhardt *et al.* 1999; Gu *et al.* 1999; Needoba *et al.* 2003). Another possibility is that within-lake modifications in the zooplankton isotope composition may also result from changes in the feeding behavior of the taxa (their trophic position) with the seasons and the availability of resources (Grey *et al.* 2001). It is not actually very easy to discriminate between the effects of baseline or trophic position on changes in the isotope composition of the zooplankton during the year.

This study was intended to investigate changes in the isotope composition of the crustacean community during a two-year survey in two alpine lakes, Lakes Geneva and Annecy. These lakes have differing size and trophic status, and, according to the work of Grey (Grey *et al.* 2000) and of Vadeboncoeur (Vadeboncoeur *et al.* 2002; Vadeboncoeur *et al.* 2003), this can result in different levels of contribution of the non-phytoplankton carbon (benthic, littoral or allochthonous), to that of the zooplankton. The zooplankton food webs were therefore expected to be quite different. Matthews and Mazumder (2003) suggested using the isotopic composition of *Daphnia* as a pelagic baseline in lakes, as *Daphnia* feeding behavior appeared to be fairly consistent, both at different seasons and in different lakes. We therefore used the isotope composition of *Daphnia* over two annual cycles to study baseline changes in relation to physical, chemical and biological variables that could potentially control seasonal

differences in the phytoplankton $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$. As these two lakes contain similar communities, the factors controlling these shifts in baseline were also expected to be the same in both.

As crustacean taxa exhibit differing feeding behaviors and preferences (Wetzel 2001), they were examined separately in this study. Potential modifications in their trophic positions during the survey were investigated by comparing the isotopic compositions of these taxa to the baseline (isotopic composition of *Daphnia*). The first assumption is that if a taxon relies solely on the pelagic baseline, then the $\delta^{13}\text{C}$ of this taxon should be similar to that of *Daphnia*, with a residual variability lower or equal to that expected for the ^{13}C trophic fractionation factor ($\text{SD}=1.3\text{‰}$ (Post 2002b)), as suggested by (Matthews and Mazumder 2003). If the inverse pattern of isotope changes was observed ($\delta^{13}\text{C}$ values of the taxon under consideration statistically different to that of *Daphnia* and/or a residual variability higher than expected) this would suggest that the taxon concerned must rely, at least to some extent, on different carbon sources exhibiting differing $\delta^{13}\text{C}$.

Changes in the relative trophic positions of the zooplanktonic taxa were investigated based on their $\delta^{15}\text{N}$. If a taxon occupies the same trophic position throughout the year, then the difference $\Delta_{\text{N}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{taxa}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Daphnia}}$ should remain constant, and exhibit less variability than the ^{15}N trophic fraction factor ($\text{SD}=1.0\text{‰}$ (Post 2002b)). Significant changes in Δ_{N} during the year would mean either that the taxon does not rely on the same carbon source throughout the year, or that it does not occupy the same trophic position all year round.

METHODS

STUDY SITES

Located on the Swiss-French border, Lake Geneva is the largest lake in Western Europe (area = 582 km², max depth = 309 m), with a catchment area of 7400 km². This lake, which was initially classified as being oligotrophic, had switched to being eutrophic by the end of the 1970s. Steps were taken to reduce P inputs in the early 1980s. The mean phosphorus concentrations fell between 1980 and 2004, to reach 35 $\mu\text{g P}\cdot\text{L}^{-1}$. Lake Annecy is located in the French Alps, 60 km south of Lake Geneva. It has a catchment area of 302 km², a surface area of 28 km² and a maximum depth of 65 m. It was ultra-oligotrophic before 1970, with phosphorus concentrations of less than 2 $\mu\text{gP}\cdot\text{L}^{-1}$, but became oligo-mesotrophic, with 5-7 $\mu\text{gP}\cdot\text{L}^{-1}$ by the end of the 1970s. Current phosphorus concentrations are 1 to 3 $\mu\text{gP}\cdot\text{L}^{-1}$. Both lakes are subjected to a monthly or bi-monthly biomonitoring, which is carried out by the CIPEL (Commission Internationale pour la Protection des Eaux du Lemman) for Lake Geneva, and the SILA (Syndicat Intercommunal du Lac d'Annecy) for Lake Annecy. These organizations provided the physico-chemical and biological variables that we used. These lakes contain similar communities.

ZOOPLANKTON COLLECTION AND ANALYSIS

From January 2002 to June 2003, the lakes were sampled once a month, or twice a month during the productive season, by vertical hauls from 40 m to the surface using a 200 μm meshed net. The zooplankton was kept in filtered water for gut clearance overnight, and individuals were then sorted into the following taxa using a binocular microscope: *Daphnia* spp, *Bythotrephes longimanus*, *Leptodora kindtii*, and copepods (consisting essentially of cyclopoids in both lakes). Samples were then freeze-dried, and 1-mg fractions of the samples were weighed into 6 x 4 mm tin cups for CF-IRMS analysis using a Europa Scientific ANCA-NT 20-20 Stable Isotope Analyser with a NCA-NT Solid/Liquid Preparation Module (PDZ Europa Ltd., Crewe, UK) by C. Scrimgeour at the Scottish Crop Research Institute (Dundee, Scotland). The analytical precision (SD) was 0.2‰, as estimated from 5 standards analyzed along with the samples. Working standards were 1 mg of leucine prepared by freeze-drying 50 ml of a 20 mg/ml stock solution in the tin cups, and calibrated against 'Europa flour' and IAEA standards N1 and N2. The $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, and percentage carbon and nitrogen contents of the samples were determined. Changes in fat content were assessed from the C/N ratios.

STATISTICAL ANALYSIS

Baseline seasonal changes were related to those in physical-chemical and biological factors such as temperature, nutrient concentrations (nitrates, ammonium, nitrites, total phosphorus and PO_4), and zooplankton taxon densities. The O_2 and chlorophyll *a*. C:N ratios of samples were also included as explanatory variables, because the fat content is known to affect body $\delta^{13}\text{C}$ (Kling *et al.* 1992a; Meili *et al.* 1996) (Table I). The linear model providing the best explanation of seasonal variations of the baseline was identified by stepwise regressions. The variability accounted for by each selected control factor was assessed using an ANOVA model. Relationships between taxa and baseline isotopic compositions were investigated by linear regressions. Slope coefficients values were compared to 1 by a t-test. Residual variability values, obtained from the corresponding ANOVA model, were compared to the variability predicted from the trophic fractionation of ^{13}C and ^{15}N (SD = 1.3 and 1.0 ‰) by F tests (Matthews and Mazumder 2003).

RESULTS

SEASONAL FLUCTUATIONS OF BASELINE

In both lakes, the only factor controlling seasonal changes in the $\delta^{13}\text{C}$ baseline was the temperature (0-20 m layer). In the Lake Geneva, temperature accounted for more than 80% of the $\delta^{13}\text{C}$ variability of *Daphnia* (Fig. 1, Table II). The $\delta^{13}\text{C}$ values of all the other taxa were closely correlated to that of *Daphnia* (Fig. 1, Table III). Values of the slope coefficients of the regression were not significantly different from 1, and the intercept values were not significantly different from 0. Moreover, the residual variability of *B. longimanus*, Copepods and *L. kindtii* was lower than predicted by

^{13}C trophic fractionation (F-test, $F = 0.67$; 0.93 and 1.26 , p -values = 0.74 ; 0.51 and 0.28). These findings were consistent with a common $\delta^{13}\text{C}$ value for all the crustacean taxa in Lake Geneva, with a variability resulting only from trophic fractionation.

In contrast, in Lake Annecy, temperature accounted for only 58% of the $\delta^{13}\text{C}$ variability of *Daphnia* (and only 35% of that of the Copepods) (Table II). Adding any other variables did not significantly improve the explanatory power of the model (Table II). The $\delta^{13}\text{C}$ value of *B. longimanus* was not correlated to that of *Daphnia*, whereas that of the Copepods was weakly but significantly correlated (Table IV). Contrary to our expectations, the residual variability in the *Daphnia*-copepods model was not higher than predicted by the trophic fractionation ($F=0.92$, p -value= 0.56). However, these findings suggest that the crustacean taxa in Lake Annecy have different $\delta^{13}\text{C}$ values.

In Lake Geneva, 60% of *Daphnia* $\delta^{15}\text{N}$ variability could be accounted for by the total crustacean density and NH_4 concentrations. In contrast, the controlling factors in Lake Annecy were the epilimnion temperature and O_2 concentrations, which accounted for 68% of the $\delta^{15}\text{N}$ variability (Table II).

TROPHIC POSITIONS

In Lake Geneva, all the taxa exhibited $\delta^{15}\text{N}$ values, which were closely strongly correlated with those of *Daphnia* (Fig. 2, Table V). The values of regression slopes were not significantly different from 1, indicating that *Daphnia* $\delta^{15}\text{N}$ seasonality was transmitted upwards through the food web. Variations in the $\delta^{15}\text{N}$ values of all the taxa were mainly explained by seasonal variations of the baseline. The intercepts were all positive, and the residual variability was lower than predicted by the trophic fractionation factor (F-test, $F = 1.31$; 1.51 and 0.64 , p -values = 0.24 ; 0.19 ; 0.83), indicating that all the taxa were located above *Daphnia* in the food chain, and that their trophic position remained similar throughout the survey.

In Lake Annecy, the $\delta^{15}\text{N}$ values of the copepods and *Daphnia* were less closely correlated, and the correlation between the $\delta^{15}\text{N}$ values of *Bythotrephes* and *Daphnia* was not significant (Fig 2, Table VI). The values of the regression slope for *Daphnia* and the copepods were significantly lower than 1, meaning that the difference between *Daphnia* and copepods $\delta^{15}\text{N}$ was not constant. Residual variability was significantly higher than that predicted by the trophic fractionation factor ($F = 1.68$, p -value= 0.06 , significant at $\alpha=10\%$). This implied that baseline $\delta^{15}\text{N}$ seasonality was not well transmitted through the zooplanktonic food web. The data suggests that during the survey these taxa either relied, to some extent at least, on different carbon sources or had switched their trophic position.

DISCUSSION

Lakes Geneva and Annecy are of similar origin and age, and contain similar communities. They differ in size (Lake Geneva is twenty times bigger than Lake Annecy) and in trophic status (Lake Geneva is meso-eutrophic, whereas Lake Annecy is oligotrophic). The contribution of the littoral carbon to the total carbon pool available to the zooplankton was expected to be very different in these two lakes. In Lake Annecy, the photic layer, which determines the depth down to which littoral primary producers can develop (Wetzel 2001), is 18 m for a mean depth of the lake of 42 m. In Lake Geneva, the photic layer has a similar depth (around 16 m), but the lake has a mean depth of 172 m, this means that a much higher percentage of the area of the lake can be colonized by littoral primary producers in Lake Annecy than in Lake Geneva. Phytoplankton production is more limited in Lake Annecy than in Lake Geneva. Furthermore, because of these differences, the zooplankton in Lake Annecy was expected to rely on non-phytoplankton carbon sources (benthic, littoral or allochthonous) to a greater extent than Lake Geneva, and this should be reflected in differing baselines and food web structure.

ZOOPLANKTONIC FOOD WEB STRUCTURE

The isotope composition of *Daphnia* was assumed to reflect the pelagic baseline, as suggested by (Matthews and Mazumder 2003). In Lake Geneva, the copepods, *B. longimanus* and *L. kindtii* exhibited $\delta^{13}\text{C}$ values similar to that of *Daphnia*. This pattern of variation would indicate that all the crustacean taxa in Lake Geneva rely on the same pelagic baseline and that the crustacean food web is supported solely by phytoplankton production. The $\delta^{15}\text{N}$ patterns indicate that *Daphnia*, copepods, *L. kindtii* and *B. longimanus* occupy different trophic positions in the zooplanktonic food web, but that the $\delta^{15}\text{N}$ variations of the taxa result solely from seasonal modifications of the baseline. This indicated that the trophic positions occupied by the taxa remained stable all year round.

To conclude, in Lake Geneva the crustacean food web is quite simple, with the entire crustacean community relying on the same carbon source, which was identified as the pelagic baseline, and the structure of the crustacean food web remained virtually unchanged throughout the year.

In contrast, in Lake Annecy the absence of any correlation between the $\delta^{13}\text{C}$ values of *B. longimanus* and of *Daphnia* clearly indicates that these two taxa probably rely on different carbon sources. The $\delta^{13}\text{C}$ values of *Daphnia* and of the copepods were weakly but significantly related, but, in contrast to the patterns observed in Lake Geneva, in Lake Annecy the $\delta^{13}\text{C}$ values for *Daphnia* and copepods cannot be assumed to be the same. According to our assumptions, this would be consistent with the fact that all the crustacean taxa are not feeding on a single baseline. Carbon sources from various origins and with differing isotope compositions are very likely to be contributing to crustacean productivity, but to a different extent for each taxon. These alternative carbon sources, which have isotopic signatures differing from that of the carbon consumed by *Daphnia*, cannot be identified with

certainty from our data. This carbon may be phytoplankton or non phytoplankton carbon. In fact, within the pelagic habitat, the $\delta^{13}\text{C}$ of phytoplankton may vary with the depth at which it grows (Leggett *et al.* 1999) and with cell size (Popp *et al.* 1998). Depending on the zooplankton-grazing depth and the size of particles selected, the zooplanktonic taxa may exhibit different $\delta^{13}\text{C}$. The alternative carbon sources can also be non-phytoplanktonic, i.e. of benthic, littoral and/or allochthonous origin. Results reported by Grey *et al.* (2000) and Vadeboncoeur *et al.* (2002; 2003) tend to support the idea that the non-phytoplanktonic carbon contribution to the zooplanktonic food web in Lake Annecy is significantly greater than that in Lake Geneva. As there are multiple carbon sources, the high residual variability in the patterns of $\delta^{15}\text{N}$ may result from shifts in the baseline $\delta^{15}\text{N}$ and/or in the trophic positions of the taxa.

However, the fact that these two taxa probably did not have the same carbon sources did not lead to greater residual variability than that predicted by the $\delta^{13}\text{C}$ trophic fractionation factor. This lack of sensitivity towards differences in the carbon sources could result from the fact that trophic fractionation factors, for ^{13}C as well as for ^{15}N , are embedded with a high variability. The variability attributed to these trophic fractionation rates was identified by Post's (2002b) study of 107 and 56 predator-prey pairs (for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively), ranging from invertebrates to mammals, and determined in various ecosystems and experimental laboratory systems. Trophic fractionation was shown to vary, between species and individuals, with physiological conditions (Gannes *et al.* 1997), nitrogen excretion (Vanderklift and Ponsard 2003), fat content (De Niro and Epstein 1977), type of aquatic ecosystems (France and Peters 1997), temperature (Power *et al.* 2003), and food C:N ratio (Adams *et al.* 2003). It is however very likely that within the crustacean community of these alpine lakes the variability associated with trophic fractionation may be lower than that reported by Post (2002b) in such wide ranging species. We were comparing similar communities in similar ecosystems, and many of the factors known to affect the variability of trophic fractionation, such as nitrogen excretion, would be absent. In our study, the fat content was included in the form of the C/N ratio of the taxa, but did not make any significant contribution to the $\delta^{13}\text{C}$ differences between copepods and *Daphnia*. The residual variability could be the result of changes in the trophic fractionation as a result of the carbon source, C:N ratio or lake temperature. As a result, the variability associated with trophic fractionation was probably over-estimated for both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, and was useless detecting differences in the origin of carbon for *Daphnia* and copepods in Lake Annecy. The sensitivity of our analysis could then benefit from re-assessment of the trophic fractionation factor, and the variability associated with it, within the zooplankton community.

To conclude, the zooplanktonic trophic structure was indeed quite different in these two lakes, as we had initially assumed. In the meso-eutrophic Lake Geneva, the crustacean food web is quite simple and constant, whereas that of Lake Annecy is much more complex and variable over the year, with crustacean taxa exploiting various carbon sources.

SEASONAL PATTERN OF BASELINE VARIATIONS

According to the definition of a pelagic baseline, the isotope composition of *Daphnia* should reflect the isotope composition of the phytoplankton in both lakes (Matthews and Mazumder 2003). We therefore expected the seasonal variations of *Daphnia* to be controlled by similar factors in both. In Lake Geneva, 80% of *Daphnia* $\delta^{13}\text{C}$ variability was related to the temperature in the epilimnion. Thermal stratification, which affects the production cycle and chemical stratification, was shown to have a marked effect on the $\delta^{13}\text{C}$ of the phytoplankton (Zohary *et al.* 1994). The pelagic $\delta^{13}\text{C}$ increased during the stratification period. The increasing primary productivity, and the consequent scarcity in CO_2 in the epilimnion, led to a decrease in photosynthetic fractionation. In autumn and winter, the pelagic $\delta^{13}\text{C}$ decreased as a result of gradual destratification and the renewal of DIC from the hypolimnion, and reached its nadir during the overturn (Zohary *et al.* 1994). In Lake Annecy, however, temperature determined only 58% of the $\delta^{13}\text{C}$ of *Daphnia*, suggesting that processes were not the same in the two lakes. However, the contrast in controlling factors was still greater in the case of $\delta^{15}\text{N}$. In Lake Geneva, the $\delta^{15}\text{N}$ of *Daphnia* was related to the zooplankton density and concentration of NH_4 in the epilimnion. Zooplankton excretes ammonium, and the NH_4 excreted is rapidly assimilated by primary producers. NH_4 assimilation by phytoplankton modifies their $\delta^{15}\text{N}$. To compensate for trophic ^{15}N enrichment in ^{15}N , excretion products, as NH_4 , are impoverished in ^{15}N (Minagawa and Wada 1984), leading then to ^{15}N -depletion of the phytoplankton. Seasonal variations in the pelagic baseline in Lake Geneva were thus related to nitrogen recycling by the zooplankton in the epilimnion. In contrast, in Lake Annecy, the factors controlling $\delta^{15}\text{N}$ were temperature and O_2 concentration, but the relationships between baseline $\delta^{15}\text{N}$ and these two factors are less clear. Differences in the factors controlling seasonal variations of *Daphnia* $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in the two lakes strongly suggest that the isotope composition of *Daphnia* may not have the same significance in both lakes. Our data support the hypothesis that the isotope composition of *Daphnia* mirrors that of the phytoplankton in Lake Geneva and so, in this lake, it constitutes an appropriate baseline. However, in Lake Annecy, the isotope composition of *Daphnia* is less dependent on the environmental conditions in the lake, which supports the hypothesis that *Daphnia* relies on a carbon pool of mixed phytoplankton and non-phytoplankton origin. Consequently, the isotope composition of *Daphnia* did not have the same significance in Lake Annecy as in Lake Geneva.

Matthews and Mazumder (2003) have shown that bulk zooplankton does not provide a reliable baseline, as differences in feeding behavior between the taxa leads to variability of the isotope composition of the zooplankton. *Daphnia* was shown to have more consistent feeding behavior than the other taxa. Copepods have a high lipid content, and their $\delta^{13}\text{C}$ may display seasonal changes or vary from lake to lake in response to changes in lipid storage. This means that they cannot be used as a baseline. Moreover, *Daphnia* omnivory among- and within lakes may be less variable than that of the

calanoids. *Daphnia* therefore emerged from their study as the most appropriate taxon for use as the pelagic baseline.

However, our study shows that the isotope composition of *Daphnia* does not necessarily reflect that of the phytoplankton, but in oligotrophic lakes such as in Lake Annecy, may reflect the isotope composition of a pool of carbon from a variety of sources. The differences observed between Lakes Geneva and Annecy have two functional consequences for the SIA of zooplankton in lakes.

Firstly, zooplankton dependence on non-phytoplankton carbon sources was shown to depend on the trophic status of the lake (Grey *et al.* 2000) and on the N/P ratio (Karlsson *et al.* 2003). This suggests that it would be interesting to test the significance of the isotope composition of *Daphnia*, and its potential use as a pelagic baseline in a range of lakes with differing trophic status and N/P ratio. It is likely that *Daphnia* is the most appropriate taxon to use as a baseline for studying temporal variations within a single lake as it is the least selective taxa, and is not subject to the same problems as calanoids and copepods (Matthews and Mazumder 2003). *Daphnia* isotope composition could be useful for studying the relative trophic positions of other zooplanktonic taxa, as we did in this study. However, the isotope composition of *Daphnia* cannot be used to compare pelagic baselines between different lakes, and especially between lakes with differing trophic statuses, as it does not have the same significance in different lakes.

The use of mussels as a pelagic baseline was tested by comparing the isotope composition of mussels to that of zooplankton (Post 2002b). Moreover, mussels and, in particular, unionids have been shown to assimilate bacterial carbon in preference to phytoplanktonic carbon (Nichols and Garling 2000). Consequently, the isotope compositions of mussels and zooplankton already account, to some extent, for the non-phytoplankton isotope composition in oligotrophic lakes. However, zooplankton and mussels are usually used as a baseline to assess the contribution of phytoplanktonic versus allochthonous or littoral carbon to fish carbon (Post *et al.* 2000; Post 2002b). Consequently, in oligotrophic lakes, the non-phytoplankton contribution to the carbon pathways in the lake could have been underestimated as the “baselines” are not purely pelagic. This raises the question of how the pelagic baseline should be defined. In our study, the ability of *Daphnia* to reflect the pelagic baseline was obvious only in Lake Geneva. It is then likely that organisms usually used as “baselines” are not appropriate ones in every lakes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the ACI “Ecologie Quantitative” from the French Ministry of Research. We thank Valerie Hamelet for her help for sorting zooplankton taxa each month.

TABLES

Table I: Physical, chemical and biological variables selected to explain $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ seasonal variability in crustacean zooplankton.

Variables		Definition
<u>Physical</u>	T°	Average temperature in the 0-20m layer
<u>Chemical</u>	[O ₂]	Average O ₂ concentration in the 0-20m layer
	[NO ₃]	Average nitrates concentration in the 0-20m layer
	[NO ₂]	Average nitrites concentration in the 0-20m layer
	[NH ₄]	Average ammonium concentration in the 0-20m layer
	TP	Average Total Phosphorus concentration in the 0-20m layer
	[PO ₄]	Average phosphates concentration in the 0-20m layer
<u>Biological</u>	[Chl <i>a</i>]	Average Chlorophyll <i>a</i> concentration in the 0-20 m layer
	D _{Bytho}	Average <i>B. Longimanus</i> density in the 0-50m layer
	D _{Daphnia}	Average <i>Daphnia</i> spp. density in the 0-50m layer
	D _{Cop}	Average copepods (cyclopoids) density in the 0-50m layer
	D _{total}	Average microcrustacean total density in the 0-50m layer
	C/N _{Bytho}	Average C/N ratio of <i>B. longimanus</i>
	C/N _{Daphnia}	Average C/N ratio of <i>Daphnia</i> spp.
	C/N _{Cop}	Average C/N ratio of copepods (cyclopoids)

Table II. Linear models explaining baseline seasonal changes resulting from stepwise regression in the lake Geneva and Annecy. r^2 represents the cumulative explained variability.

Lake	Response	Factors	r^2	p-value
Geneva	<i>Daphnia</i> $\delta^{13}\text{C}$	T°	0.81	1.10^{-6}
	<i>Daphnia</i> $\delta^{15}\text{N}$	(1) D_{total}	0.46	3.10^{-3}
		(2) $[\text{NH}_4]$	0.61	1.10^{-3}
		(3) TP	0.78	1.10^{-4}
Annecy	<i>Daphnia</i> $\delta^{13}\text{C}$	T°	0.58	3.10^{-5}
	<i>Daphnia</i> $\delta^{15}\text{N}$	(1) T°	0.46	1.10^{-4}
		(2) $[\text{O}_2]$	0.68	2.10^{-5}

Table III. Parameters of the linear regression model between zooplankton taxa $\delta^{13}\text{C}$ and *Daphnia*, and probabilities associated to student tests for the lake Geneva. a is the slope coefficient and b the intercept. t_1 is the t -value of the Student test comparing a to 0, t_2 is the t -value of the student test comparing a to 1 and t_3 is the t -value of the student test comparing b to 0.

Response	r^2	$a(\pm\text{S.E.})$	$P(>t_1)$	$P(>t_2)$	$b(\pm\text{S.E.})$	$P(>t_3)$
$\delta^{13}\text{C}_{\text{Bythotrephes}}$	0.84	$0.86 (\pm 0.11.)$	0.00	0.13	$-3.44 (\pm 3.32)$	0.32
$\delta^{13}\text{C}_{\text{Copepods}}$	0.74	$0.80 (\pm 0.13)$	0.00	0.07	$-5.74 (\pm 3.71)$	0.14
$\delta^{13}\text{C}_{\text{Leptodora}}$	0.54	$1.24 (\pm 0.43)$	0.02	0.59	$-8.12 (\pm 11.78)$	0.51

Table IV. Parameters of the linear regression model between zooplankton taxa $\delta^{13}\text{C}$ and Daphnia, and probabilities associated to student tests for the lake Annecy. a is the slope coefficient and b the intercept. t_1 is the t -value of the Student test comparing a to 0, t_2 is the t -value of the student test comparing a to 1 and t_3 is the t -value of the student test comparing b to 0.

Response	r^2	a (\pm S.E.)	$P(>t_1)$	$P(>t_2)$	b (\pm S.E.)	$P(>t_3)$
$\delta^{13}\text{C}_{\text{Bythotrephes}}$	0.73	0.70 (\pm 0.18)	0.00	0.06	-10.20(\pm 6.47)	0.17
$\delta^{13}\text{C}_{\text{Copepods}}$	0.75	0.82 (\pm 0.11)	0.00	0.04	-6.74 (\pm 3.86)	0.10

Table V. Parameters of the linear regression model between zooplankton taxa $\delta^{15}\text{N}$ and Daphnia, and probabilities associated to student tests for the lake Geneva. a is the slope coefficient and b the intercept. t_1 is the t -value of the Student test comparing a to 0, t_2 is the t -value of the student test comparing a to 1 and t_3 is the t -value of the student test comparing b to 0.

Response	r^2	a (\pm S.E.)	$P(>t_1)$	$P(>t_2)$	b (\pm S.E.)	$P(>t_3)$
$\delta^{15}\text{N}_{\text{Bythotrephes}}$	0.85	0.80 (\pm 0.10.)	0.00	0.03	5.46(\pm 0.91)	0.00
$\delta^{15}\text{N}_{\text{Copepods}}$	0.85	0.90 (\pm 0.10)	0.00	0.17	3.26 (\pm 0.91)	0.00
$\delta^{15}\text{N}_{\text{Leptodora}}$	0.90	0.88 (\pm 0.11)	0.00	0.16	3.93 (\pm 0.88)	0.00

Table VI. Parameters of the linear regression model between zooplankton taxa $\delta^{15}\text{N}$ and *Daphnia*, and probabilities associated to student tests for the lake Annecy. **a** is the slope coefficient and **b** the intercept. t_1 is the *t*-value of the Student test comparing **a** to 0, t_2 is the *t*-value of the student test comparing **a** to 1 and t_3 is the *t*-value of the student test comparing **b** to 0.

Response	r^2	a (\pm S.E.)	$P(>t_1)$	$P(>t_2)$	b (\pm S.E.)	$P(>t_3)$
$\delta^{15}\text{N}_{\text{Bythotrephes}}$	0.49	0.51(\pm 0.23)	0.08		7.70(\pm 2.31)	0.02
$\delta^{15}\text{N}_{\text{Copepods}}$	0.45	0.37(\pm 0.09)	0.00	0.00	8.62(\pm 0.91)	0.00

FIGURES

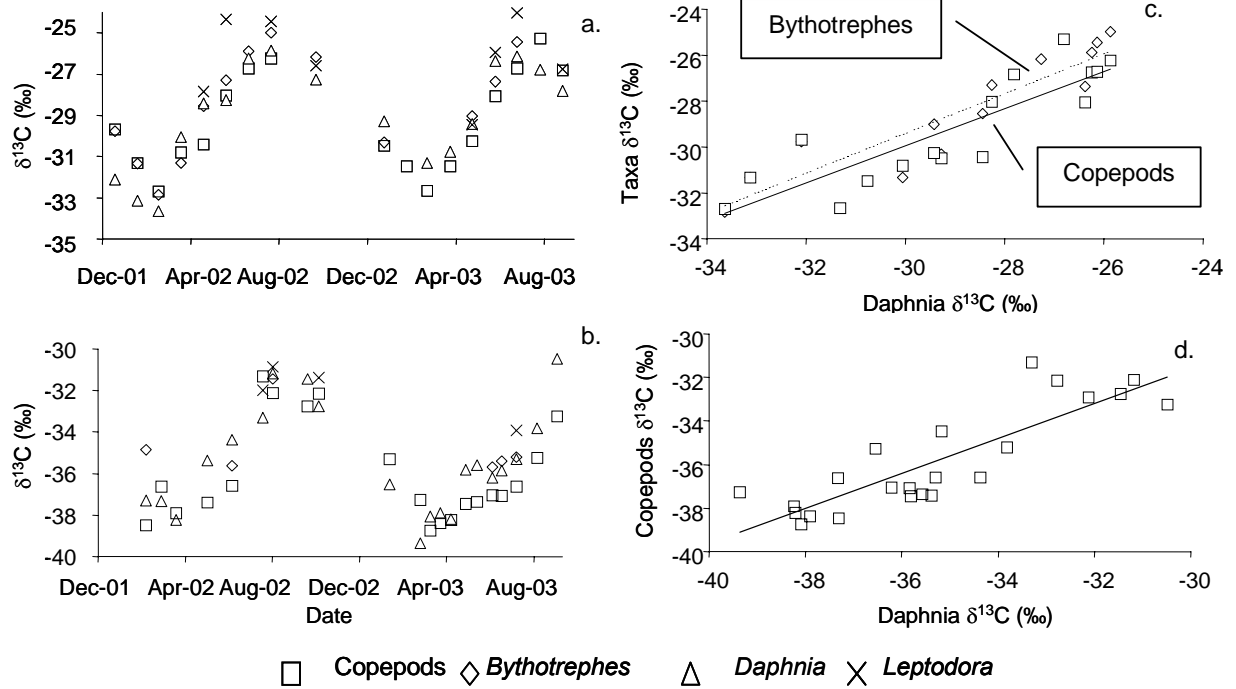


Figure 1. Crustacean $\delta^{13}\text{C}$ changes in the lake Geneva and Annecy during the two-year surveys

Values of the crustacean taxa $\delta^{13}\text{C}$ in the lake Geneva (a) and in the lake Annecy (b) at the sampling dates.

Relationships between Copepods and Bythotrephes $\delta^{13}\text{C}$ and that of Daphnia in the lake Geneva (c) and Annecy (d)

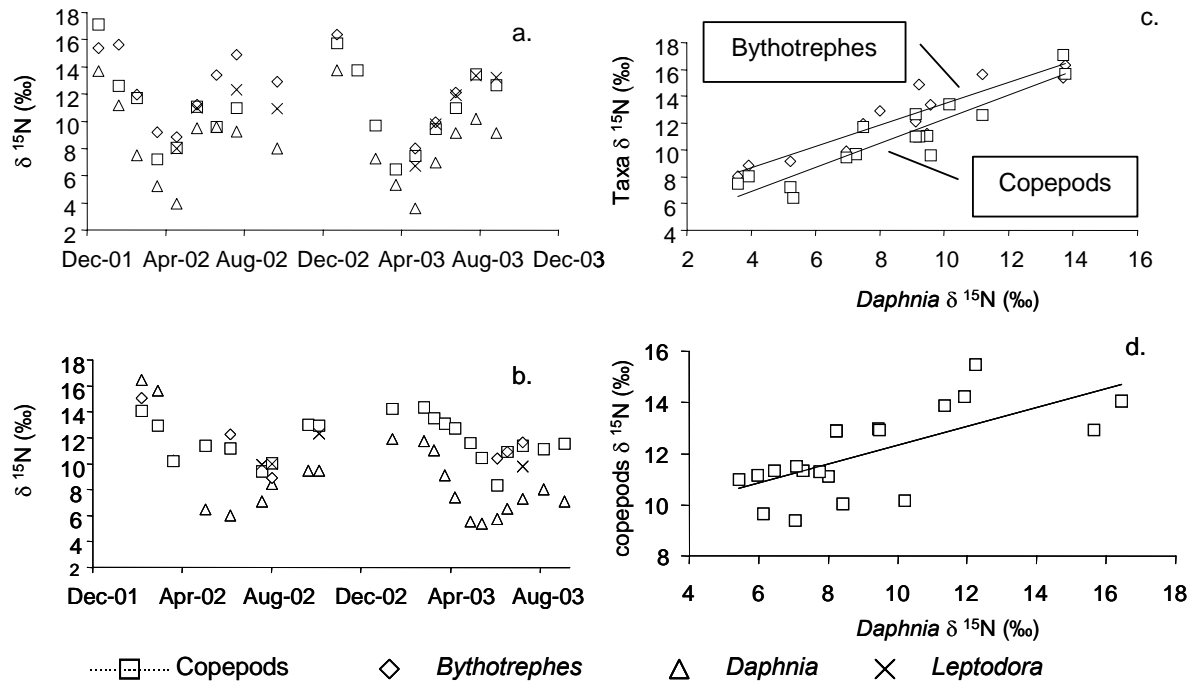
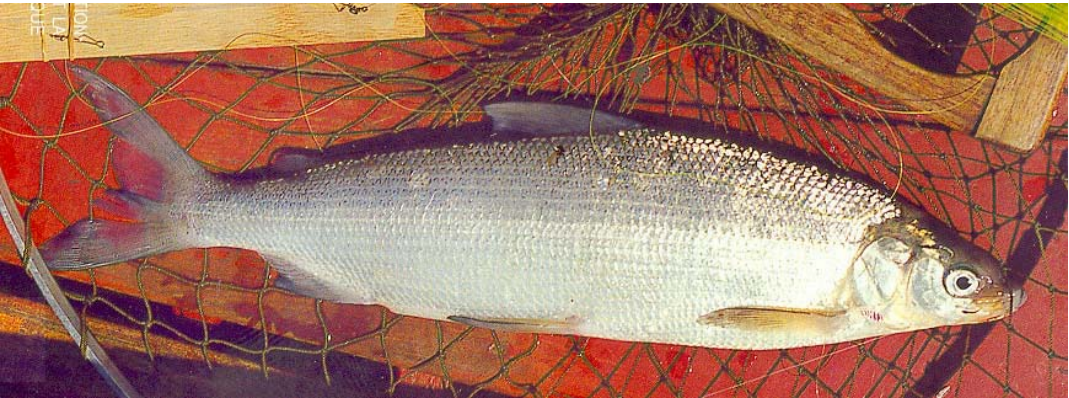


Figure 2. Crustacean $\delta^{15}\text{N}$ changes in the lake Geneva and Annecy during the two-year surveys

Values of crustacean taxa $\delta^{15}\text{N}$ in the lake Geneva (a) and in the lake Annecy (b) at the sampling dates. Relationships between Copepods and Bythotrephes $\delta^{15}\text{N}$ and that of *Daphnia* in the lake Geneva (c) and Annecy (d)



Article 4. Changes in whitefish $\delta^{13}\text{C}$ during eutrophication and re-oligotrophication in three subalpine lakes.

DANIEL GERDEAUX, MARIE-ELODIE PERGA AND CHRISTIAN RUHLE

LIMNOLOGY & OCEANOGRAPHY

RUNNING TITLE: WHITEFISH $\delta^{13}\text{C}$ DURING EUTROPHICATION AND RESTORATION

ABSTRACT

The isotopic composition of whitefish (*Coregonus lavaretus*) scales from 50-year collections was measured to determine the pattern of change of $\delta^{13}\text{C}$ during the eutrophication and re-oligotrophication of three subalpine lakes: Lakes Annecy, Constance and Geneva. Whitefish $\delta^{13}\text{C}$ is shown to be closely correlated with the mean annual phosphorus concentrations in Lakes Constance and Geneva, and to a lesser extent, also reflects the efficiency of winter mixing. In contrast, in Lake Annecy, where eutrophication has been very limited, minor changes in P_{tot} mirror the minor changes in $\delta^{13}\text{C}$. The change in whitefish $\delta^{13}\text{C}$ with the trophic status of the lake could not be linked to any shift in whitefish feeding behavior or to any change in the length of the pelagic trophic chain. In fact, whitefish $\delta^{13}\text{C}$ integrates the isotopic signature of the pelagic primary producers over time and space. Phytoplanktonic $\delta^{13}\text{C}$ depends mainly on the photosynthetic conditions and on the source of the dissolved inorganic carbon fixed (atmospheric or endogenous). This means that the change in whitefish $\delta^{13}\text{C}$ with P_{tot} provides reliable information about the modification of the autotrophy/heterotrophy ratio in the context of eutrophication and re-oligotrophication. The responses of the two ecosystems to changes in P_{tot} are strictly synchronic and parallel, with a hysteretic response during restoration. This hysteresis may have been the result of antagonism between the falling phosphorus concentration and global warming.

INTRODUCTION

Stable Isotopic Analysis (S. I. A.) has been extensively employed to study trophic relationships in lakes worldwide (Kling *et al.* 1992a; Cabana and Rasmussen 1994; Post 2002b). As the carbon isotopic composition ($\delta^{13}\text{C}$) of the consumer reflects the one of its prey with nearly no enrichment (+0.39‰ (Post 2002b)), $\delta^{13}\text{C}$ is used to track the primary producer at the base of the trophic chain. Then, any isotopic modification at the base of the lake food web may be transmitted up to top-predators, such as fish, that could then potentially be used as integrators (Vander Zanden et Vadeboncoeur 2002). For example, it has been shown experimentally that nutrient loading in lakes affects the carbon flux between lakes and the atmosphere (Schindler *et al.* 1997a). In Schindler's experiments, nutrient enrichment increased primary production, causing lakes to become net carbon sinks. The increased contribution of atmospheric carbon (C_{atm}) to food webs during eutrophication was reflected by a substantial increase in $\delta^{13}\text{C}$ throughout these food webs up to the top predator fish. It is very likely that eutrophication that affected many lakes worldwide may have lead to the same isotopic pattern. Inversely, during reoligotrophication of lakes, the contribution of atmospheric carbon may decrease, driving a decrease of the $\delta^{13}\text{C}$ along the food webs. However, so far this has not been well-studied in the field. As SIA is usually performed on dorsal muscle, observing isotopic changes with trophic status implies that dorsal muscle samples have been frozen and preserved for a long time,

which is not very common. On the contrary, many laboratories keep long-term fish scale collections but using fish scales to perform SIA raises some questions. Estep and Vigg (Estep and Vigg 1985) found that $\delta^{13}\text{C}$ of muscle and scale were not closely correlated. Wainright *et al.* (Wainright *et al.* 1993) relied on scale $\delta^{13}\text{C}$ values to investigate the relationship between the changes in trophic structure and a series of environmental and population variables associated with the Georges Bank food web, but did not address how scale and muscle $\delta^{13}\text{C}$ were related.

We demonstrated that decalcified whitefish scale $\delta^{13}\text{C}$ reflects muscle tissue or diet $\delta^{13}\text{C}$ values (Perga and Gerdeaux 2003). Once this link made, the potential exists through the use of stable isotope measures of whitefish $\delta^{13}\text{C}$ to provide a quantitative indicator of the potential carbon sources or pathways in the food web. Therefore, the objective of this study was to use stable isotope analyses of whitefish scales to quantify the impacts of the change on the trophics dynamics of three European subalpine lakes during eutrophication stage followed by reoligotrophication.

Lakes Geneva and Constance underwent a phase of eutrophication beginning in the 1950s, due to increasing anthropogenic pressure on the catchment areas. Phosphorus concentrations in Lakes Constance and Geneva have increased eightfold by the end of the 1970s. From the early 1980s, sewage diversion and wastewater treatment were undertaken, leading to a reduction of the phosphorus concentration. In contrast, Lake Annecy was relatively sheltered from eutrophication, and only switched from oligo to oligo-mesotrophic. Lakes Geneva and Constance are now engaged in a re-oligotrophication process, with phosphorus concentrations tending to return to their initial values. Changes in the trophic status of these lakes have influenced the algal community structure (Gaedke 1998; Kümmerlin 1998; Anneville *et al.* 2002), the zooplankton crustacean biomass (Straile et Geller 1998), and the production, growth and fecundity of fish (Hartmann and Quoss 1993; Eckmann and Rösch 1998). Eutrophication and re-oligotrophication affect different food web compartments, and so may have a great impact on both the food web structure and on carbon flows. Our objective is to investigate some of the changes in carbon flows triggered by changes in the trophic status by studying $\delta^{13}\text{C}$ in whitefish scales.

Whitefish, *Coregonus lavaretus*, is a preferentially zooplanktivorous fish, living in the pelagic area of many deep sub-alpine lakes. This fish is the main resource of lake fisheries and fisheries scientists used scales for ageing fish. Then, they stored scales since 1946 for Lake Constance (Germany/Switzerland /Austria), since 1958 for Lake Geneva (Switzerland/France) and since 1971 for Lake Annecy (France). The scale collections cover the phases of eutrophication and re-oligotrophication of Lakes Geneva and Constance, and the phase of relative stability in the phosphorus concentration of Lake Annecy. We intended to monitor the change in whitefish scale during the change in the trophic status in all three lakes. Our purpose is to search if the $\delta^{13}\text{C}$ of whitefish scale changes according to the hypothesis than $\delta^{13}\text{C}$ in the food webs may increase during eutrophication and then decrease during reoligotrophication.

METHODS

STUDY SITES

Located on the Swiss-French border, Lake Geneva is the biggest lake in Western Europe (area = 582 km², max depth = 309 m), and has a catchment area of 7400 km². Winter mixing in Lake Geneva, the depth of which is calculated from the winter O₂ profiles, rarely reaches the bottom of the lake. Increasing human pressure during the economic development initiated in the late 1950s and continued in the 1960s and 1970s, led to a dramatic increase in the phosphorous load. P_{tot} initial concentrations of 12.4 µgP.L⁻¹ in 1957 increased eightfold over 20 years, to reach 89.6 µgP.L⁻¹ in 1978. The lake, which was initially classified as oligotrophic, had become eutrophic by the end of the 1970s. Measures intended to reduce P inputs were taken in the early 80s. The mean phosphorus concentrations fell between 1980 and 2001, to reach 36.5 µg P.L⁻¹ (Fig. 1). No acidification of the lake waters could be observed. Nutrient concentrations and mixing depth data were obtained from the lake monitoring, by the International Commission for the Protection of the Water of Lake Geneva (www.cipel.org).

Lake Annecy is situated in the French Alps, 60 km south of Lake Geneva. It has a catchment area of 302 km², a surface area of 28 km² and a maximum depth of 81 m. It was ultra-oligotrophic before 1970, with phosphorus concentrations of less than 2 µgP.L⁻¹, but became oligo-mesotrophic, with 5-7 µgP.L⁻¹ by the end of the 1970s. Current phosphorus concentrations are 1 to 3 µgP.L⁻¹ (Fig. 1). Nutrient concentrations were obtained from the lake monitoring data provided by the Syndicat Intercommunal du Lac d'Annecy (Sila 1998).

Lake Constance is the second biggest lake in Western Europe, with an area of 534 km² and a maximum depth of 253 m. Winter mixing is always complete. Lake Constance underwent a pronounced eutrophication, mainly due to domestic phosphorus loading. Mean annual concentrations had risen from 5-8 µgP.L⁻¹ in the 1950s to 80 µgP.L⁻¹ in 1980. The lake became meso-eutrophic. A re-oligotrophication process was then begun as a result of sewage treatment. The mean annual phosphorus concentrations had decreased to 9 µgP.L⁻¹ in 2001 (Fig. 1). Nutrient data were obtained from the monitoring program of Lake Constance (www.igkb.de/blaue_berichte/48.html).

FISH SAMPLING

Female whitefish usually mature at the end of the third year of life, when the fish reaches a length of 35-40 cm. Special catches are made every year in December during the spawning season to collect eggs for restocking Lakes Geneva, Annecy and Constance. A survey has been conducted regularly of the spawning fish and this was the source of the scale collection. Scales were used to age the fish, and then dry-preserved and archived. Collections were started in 1946 for Lake Constance (Swiss collection from Amt für Jagd and Fischerei, St Gallen), in 1958 for Lake Geneva and in 1971 for Lake Annecy (French collections from Station d'hydrobiologie lacustre, INRA, Thonon les Bains).

SCALE DECALCIFICATION

Fish scale is a mixed-origin tissue, with an organic and an inorganic fraction. The organic constituents are essentially proteins, such as collagen and keratin (ichtylepidin), and the inorganic constituents are essentially carbonates and apatite (Wainright *et al.* 1993). The origin of the inorganic carbon is unknown and it can have a $\delta^{13}\text{C}$ value that differs from that of the organic constituents. In order to measure only the $\delta^{13}\text{C}$ of the proteins, the scales were decalcified for 2 min in 1.2 N HCl and rinsed in distilled water prior to isotopic composition analysis according to the protocol established by Perga and Gerdeaux (2003).

ISOTOPIC ANALYSES

1.5-mg samples of decalcified and dried scales were weighed into 6 x 4 mm tin cups for CF-IRMS analysis using a Europa Scientific ANCA-NT 20-20 Stable Isotope Analyser with a NCA-NT Solid/Liquid Preparation Module (PDZ Europa Ltd., Crewe, UK). The analytical precision (SD) was 0.2‰ estimated from 5 standards analyzed along with the samples. The working standards used were 1.5 mg leucine prepared by freeze drying 50 ml of a 20 mg/ml stock solution in the tin cups, and calibrated against 'Europa flour' and IAEA standards N1 and N2. Isotope ratios are expressed as parts per thousand (‰) differences from a standard reference, which is PeeDee Belemnite.

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\left[\frac{{}^{13}\text{C}_{\text{sample}}/{}^{12}\text{C}_{\text{sample}}}{{}^{13}\text{C}_{\text{standard}}/{}^{12}\text{C}_{\text{standard}}} \right] - 1 \right) \times 1,000$$

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis were performed on S-PLUS 6.0 (Insightful 2001). Relationships between isotopic signatures and factors (date, P-P_{tot}, mixing depth) were analyzed by least squares regression and one-way ANOVA. Homoscedasticity was ensured by Levene tests. The absence of autocorrelation between residuals was checked using the Durbin-Watson Test. As the fish were 3 years old, and winter mixing efficiency can vary considerably from one year to the other, we uses the mean of the previous three years to study the effects of winter mixing on $\delta^{13}\text{C}$ values. The eutrophication period lasted from 1956 to 1979 for Lake Geneva, and from 1946 to 1980 for Lake Constance. The re-oligotrophication period covered 1980-2001 for Lake Geneva and 1981-2001 for Lake Constance. To test whether adding supplementary factors would significantly improve the variability explained, regression models without and with the supplementary factor were compared by one-way ANOVA.

RESULTS

No significant linear trend of whitefish $\delta^{13}\text{C}$ over time ($r^2 = 0.09$, $p = 0.49$) or P_{tot} ($r^2 = 0.08$, $p = 0.26$) was found for Lake Annecy (Levene test, $F_{6, 52} = 1.967$, $p = 0.09$). In contrast, in Lakes Geneva and Constance, $\delta^{13}\text{C}$ was significantly correlated with the annual mean phosphorus concentrations (Fig. 2).

The sense of the change in P_{tot} was then taken into account (eutrophication or re-oligotrophication) in Lakes Geneva and Constance (Fig. 3). For each lake, the slope of the regression line corresponding to eutrophication was significantly higher than the one for re-oligotrophication (Table 1). However, the intercepts were not significantly different. Moreover, the slopes of the regression lines corresponding to eutrophication were not significantly different for Lakes Geneva and Constance, nor were the re-oligotrophication slopes (Table 1). The Durbin Watson test found no significant autocorrelation between residuals (results not provided).

In these regression models, the variability of $\delta^{13}\text{C}$ explained by P_{tot} was greater for Lake Constance than for Lake Geneva (Table 1). The years 1967 and 1968 contributed 65% of the residual variability of $\delta^{13}\text{C}$ during the eutrophication phase in Lake Geneva. The lakes differed with regard to the depth and duration of winter mixing. Lake Constance undergoes a complete turnover every winter, whereas winter mixing is rarely complete in Lake Geneva. The mean winter mixing depth was then introduced as a supplementary factor in the above regression models. Mixing depth was negatively correlated with $\delta^{13}\text{C}$ (Table 2). The variability explained by the multiple regression taking P_{tot} and mixing depth into account was significantly improved during eutrophication (ANOVA, $F_{11, 12} = 7.4$, $p = 0.029$).

DISCUSSION

The patterns of variations in whitefish scale $\delta^{13}\text{C}$ are the same in the two lakes Geneva and Constance, yet these lakes have not exactly the same planktonic and fish communities dynamics. During the same time, $\delta^{13}\text{C}$ in lake Annecy did not change significantly. Then changes in the P concentrations seem to be the only one cause of the changes in whitefish scale $\delta^{13}\text{C}$ even whether the innermost process of the changes could be discussed. As the regression slope of the restoration line was significantly lower than that of the eutrophication line, the response of lakes to decreasing P_{tot} seems to be slowed. The change in whitefish $\delta^{13}\text{C}$ may be related to a change in whitefish diet, to a change in the pelagic food web length, to a change in the signature at the base of the food web, or to both.

WHITEFISH DIET

As zooplankton biomass fluctuated during the modifications of the trophic status (Straile et Geller 1998), the whitefish diet may also have shifted. Results of feeding studies based on stomach contents revealed no major change in whitefish diet between the 1980s and 2001 (Ponton 1986; Gerdeaux and Hamelet 2001) in Lake Geneva. In Lake Constance, whitefish showed a preference for great cladocerans (*Daphnia* spp.) and predator species of zooplankton (*Bythotrephes longimanus*, *Leptodora kindtii*) (Becker and Eckmann 1992). So, in Lakes Geneva and Constance, whitefish can be assumed to have remained zooplanktivorous in spite of the trophic status modifications, and changes in the whitefish scale $\delta^{13}\text{C}$ reflect changes in the $\delta^{13}\text{C}$ at the base of the food web, changes in the pelagic food web length, or both.

PELAGIC TROPHIC CHAIN LENGTH

Modifications in trophic chain length are usually assessed from $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{15}\text{N}$ measurements on fish scales are well correlated with that on dorsal muscles (Perga and Gerdeaux 2003). As $\delta^{15}\text{N}$ increases from prey to predator with an isotopic fractionation at each trophic step of 3.4‰ (S.D = 1‰ (Post 2002b)), then the $\delta^{15}\text{N}$ difference between two organisms belonging to the same trophic chain gives an assessment of the number of trophic levels separating them. Then, an organism's $\delta^{15}\text{N}$ depends of its trophic level and of the $\delta^{15}\text{N}$ at the base of the food web. However, in lakes $\delta^{15}\text{N}_{\text{base}}$ depends on multiple factors such as Dissolved Inorganic Nitrogen source, DIN $\delta^{15}\text{N}$, algae metabolism, algae productivity... (Goericke *et al.* 1994; Lajtha and Marshall 1994) and may then vary a lot with time and season. To assess $\delta^{15}\text{N}_{\text{base}}$, usually long living primary consumer $\delta^{15}\text{N}$, such as bivalves, are employed. Such data were not available over the study time. We were then not able to assess whitefish trophic level in the pelagic food web from $\delta^{15}\text{N}$. No clear pattern could be brought out from whitefish $\delta^{15}\text{N}$ over the study period (results not communicated).

The range of $\delta^{13}\text{C}$ variation is about 3‰ for both lakes. According to the latest estimation by Post (2002b), the typical enrichment in ^{13}C from one trophic level to the next up is +0.39‰. A change in the lake trophic status can influence the zooplanktonic community structure (Straile and Geller 1998). We can reasonably assume that a maximum of one or two trophic levels can be added (or eliminated) as a result of a change in the zooplankton structure, especially by any change in the density of predators (*Bythotrephes longimanus*, *Leptodora kindtii*). This would correspond to a maximum shift of 0.78‰ in the whitefish $\delta^{13}\text{C}$, which would account for 26% of the change in $\delta^{13}\text{C}$ observed in the two lakes. Consequently, a change in the food web structure could only account for a fraction of the $\delta^{13}\text{C}$ range. This means that changes in whitefish $\delta^{13}\text{C}$ can be assumed to be mainly influenced by changes in the signature of the phytoplankton at the base of the food web.

RELATIONSHIPS BETWEEN $\delta^{13}\text{C}$ AT THE BASE OF THE FOOD WEB AND P_{TOT}

According to our data, *C. lavaretus* scales became increasingly enriched with ^{13}C as the lakes became eutrophic, and increasingly ^{13}C -depleted as the lakes recovered. The same pattern was observed in Lake Erie using archived walleye muscle $\delta^{13}\text{C}$ during the decrease in phosphorus loading (Kiriluk *et al.* 1999). As whitefish scales $\delta^{13}\text{C}$ provides an integrated image of the primary producers signatures, our findings would support the hypothesis that the mean annual phytoplanktonic $\delta^{13}\text{C}$ depends on the trophic status of the lake.

The $\delta^{13}\text{C}$ of phytoplankton depends on both the fractionation rate between dissolved inorganic carbon (DIC) and organic matter that occurs during photosynthesis, and on the $\delta^{13}\text{C}$ of the inorganic carbon source (Raven *et al.* 1994).

The fractionation rate, imposed by a carboxylation reaction and a kinetic mode of carbon fixation during photosynthesis, depends on the concentration of inorganic carbon available. For terrestrial C3 plants, the concentration of atmospheric CO_2 is quite constant, and the fractionation rate is around -20% . In contrast, in oceans and lakes, DIC diffusion is slowed by water viscosity, and consequently DIC concentration is always a limiting factor. In the context of high primary production, algal demand for DIC is high and this depletes the epilimnetic DIC. Since the fractionation rate decreases as DIC concentration decreases, phytoplankton tends to exhibit more positive $\delta^{13}\text{C}$ values when primary production increases (Takahashi *et al.* 1990; Goericke *et al.* 1994; Raven *et al.* 1994; Gu *et al.* 1996).

Secondly, DIC can originate from three different sources: the watershed substratum, the atmosphere and the mineralization of organic matter. DIC from watershed substratum can be assumed to have a constant $\delta^{13}\text{C}$ throughout the study period. Atmospheric and endogenous DIC have differing carbon isotopic signatures. The $\delta^{13}\text{C}$ of DIC is higher when it originates from the dissolution of atmospheric CO_2 (Schindler *et al.* 1997a), and is lower when the contribution of respired carbon is high (Post 2002b). Consequently, whitefish $\delta^{13}\text{C}$ depends on the autotrophy : heterotrophy ratio in the euphotic zone (France *et al.* 1997).

In a context of a high carbon demand, atmospheric CO_2 invasion increases, leading to a ^{13}C -enriched DIC pool (Emerson 1975; Schindler *et al.* 1997a). Once fixed, this enriched DIC leads to ^{13}C -enriched organic matter in the pelagic food web (Schindler *et al.* 1997a). Moreover, Lakes Geneva and Constance are located on an alkaline watershed and undergo considerable whitening due to calcium carbonate precipitation during the summer peaks of phytoplanktonic production. Carbonate precipitation contributes to enhancing the burial of atmospheric carbon in alkaline lake waters (Wanninkhof and Knox 1996; Einsele *et al.* 2001).

Then, as the lakes underwent eutrophication, the increase of the CO_2 demand led to a decrease in the photosynthetic fractionation rate and an invasion of atmospheric CO_2 , which was amplified by the alkaline nature of the waters. When the lakes eutrophicated, these phenomena contributed in the

same way to producing more positive values of the phytoplanktonic $\delta^{13}\text{C}$, which was transmitted up to whitefish $\delta^{13}\text{C}$, at the top of the pelagic food web.

As the lakes were restored, endogenous carbon became more and more able to meet the declining phytoplanktonic demand for DIC. The contribution of the atmospheric carbon decreased, and at the same time, the fractionation rate tended to rise again. Both these processes led to more negative values for the pelagic $\delta^{13}\text{C}$ during the lake restoration.

WINTER MIXING EFFECT.

The relationships between $\delta^{13}\text{C}$ and P_{tot} are very similar in Lakes Geneva and Constance, but the residual variability of the P_{tot} model is greater for Lake Geneva. A great part of the residual variability can be related to the efficiency of winter mixing during the eutrophication phase of Lake Geneva. In contrast, during the restoration phase, $\delta^{13}\text{C}$ was not influenced by winter mixing.

In Lake Geneva, mixing reaches depths of 50 to 309 m, depending on the mean winter temperature and wind force. During eutrophication, winter mixing depth and $\delta^{13}\text{C}$ were negatively correlated. The years 1967 and 1968, which contributed to the greater residual variability, corresponded to very warm winter periods with a mixing depth of around 50 to 75m (from 1965 to 1969). During this period of superficial mixing, P_{tot} concentrations decreased from 60 $\mu\text{gP.L}^{-1}$ in 1964 to 27 $\mu\text{gP.L}^{-1}$ in 1967, due to the repeated absence of re-homogenization of the water column and of the remobilization of deep P. When the next complete mixing occurred in 1970 the P_{tot} concentration rose to 80 $\mu\text{gP.L}^{-1}$. Whereas P_{tot} concentrations were very low in 1967 and 1968, whitefish $\delta^{13}\text{C}$ remained very high, illustrating a lower-than-expected contribution of endogenous inorganic carbon. A large proportion of mineralization takes place in the hypolimnion, leading to a very negative DIC $\delta^{13}\text{C}$ (Quay *et al.* 1986). When the lake is stratified, DIC from the hypolimnetic mineralization of organic matter cannot be returned to the epilimnion, where most of the primary production process takes place. Hypolimnetic DIC is made available to the primary production by the winter mixing. If the winter mixing is less efficient, the amount of hypolimnetic DIC remobilized may decrease. In Lake Constance, the entire quantity is available each Spring to the primary production. In contrast, in Lake Geneva, the proportion of the DIC stock remobilized depends on the depth of the mixed layer, which limits the potential contribution of endogenous DIC to the epilimnetic primary production.

PATTERNS OF $\delta^{13}\text{C}$ VARIATIONS IN EUTROPHICATION AND RESTORATION STAGES

Slopes of the regression were, for both lakes, lower during the restoration stage than the eutrophication stage. This could mean that the lake's reaction to restoration is slower than in eutrophication and that the state of the lake in restoration is likely not the same than in eutrophication. Besides P_{tot} , many other environmental factors have changed. These include fish community structure and fisheries management, nitrates, and also temperature regimes.

As for many other lakes worldwide, the period when restoration efforts occurred coincided with a period of positive NAO (Scheffer *et al.* 2001; Van Donk *et al.* 2003). Indeed, since 1988, the water temperature in both lakes has been higher in the first half of the year (Anneville, pers. com.). These two factors (a decreasing P_{tot} and global warming) have been shown to act in synergy to alter the phytoplanktonic community, in a synchronic way in the two lakes (Anneville, pers. com.). Spring temperatures are getting warmer, and phytoplankton are developing earlier in the season. The clear water phase is also occurring earlier. Consequently, the phosphorus in the euphotic layer is depleted by mid-summer, whereas this situation did not occur until the autumn before 1988 (Anneville *et al.* 2002). Phytoplanktonic species adapted to low phosphorus concentrations are typically autumnal, but now emerge earlier in the year. These modifications in algal phenology and succession are synchronic and similar in Lakes Geneva and Constance (Anneville, pers. com.). The decreasing P_{tot} concentration limits the potential productivity, whereas higher temperatures stimulate productivity and the emergence of a new assemblage. These antagonistic effects of temperature and P_{tot} may explain that the pattern of $\delta^{13}\text{C}$ variation in restoration is not parallel to the one in eutrophication.

CONCLUSIONS

In summary, the eutrophication and the restoration of the trophic status of Lakes Geneva and Constance have had profound repercussions on the processes of carbon acquisition at the base of the pelagic food web. The impact of eutrophication and re-oligotrophication on carbon flows has been transmitted along the pelagic food chain and has been recorded by whitefish scales. Patterns of $\delta^{13}\text{C}$ variations with nutrient concentrations were in accordance with the results of Schindler's experiments (Schindler *et al.* 1997a) and could be attributed, in part, to modifications in CO_2 exchanges between lake and atmosphere. However, both nutrient concentration and food web structure were shown to influence lake/atmosphere gas exchanges in Schindler's experiments. Lakes Constance and Geneva have undergone a similar trophic history, and although their phytoplanktonic and fish community structures are not strictly the same, their pelagic food webs may not be very contrasted. It is then very likely that similar studies performed upon a range of lakes of various size or nature, with different community structures, would lead to patterns of $\delta^{13}\text{C}$ variations different from the one observed in this work.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to all the French and Swiss scientists who have collected whitefish scales for such a long time. We thank also G. Cabana for his valuable advice. This work has been supported by Action Concertée Incitative "Ecologie Quantitative" of the French Ministry of Research.

TABLES

Table 1. Coefficients of regression between Whitefish $\delta^{13}C$, P_{tot} and the sense of the change. Coefficients of the different regressions were compared by a *t*-test.

N°	regression	r^2	p	slope	intercept	T-Test	p	p
							Slope comparison	Intercept comparison
1	Geneva Eutrophication	0.661	0.0043	0.0598	-24.23	1 vs 2	0.480	0.000
2	Constance Eutrophication	0.923	0.0004	0.0554	-27.33	2 vs 4	0.004	0.291
3	Geneva Re-oligotrophication	0.692	0.0080	0.0488	-24.33	1 vs 3	0.037	0.762
4	Constance Re-oligotrophication	0.861	0.0016	0.0430	-27.22	3 vs 4	0.216	

Table 2. Coefficients of regression between whitefish $\delta^{13}C$, P_{tot} and winter mixing depth in Lake Geneva, during the eutrophication and re-oligotrophication phases.

	P_{tot}	p	Mixing depth	p	r^2	F	df	p
Eutrophication	0.0486	0.050	-0.0128	0.0295	0.836	17.79	(2; 7)	0.002
Re-oligotrophication	0.0525	0.026	-0.0024	0.6087	0.701	10.55	(2; 9)	0.004

FIGURES

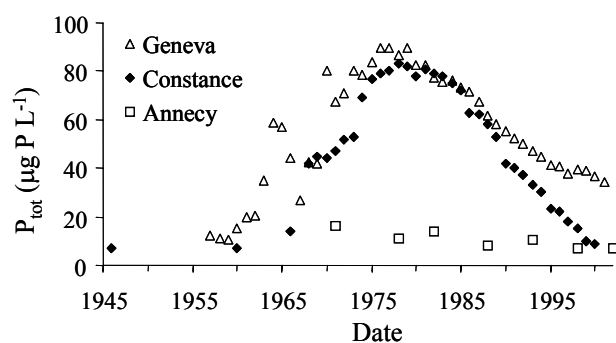


Fig. 1. Changes in mean annual phosphorus concentrations (P_{tot} , $\mu\text{g P L}^{-1}$) in Lakes Annecy (solid triangles), Geneva (open squares) and Constance (black crosses) over the study period.

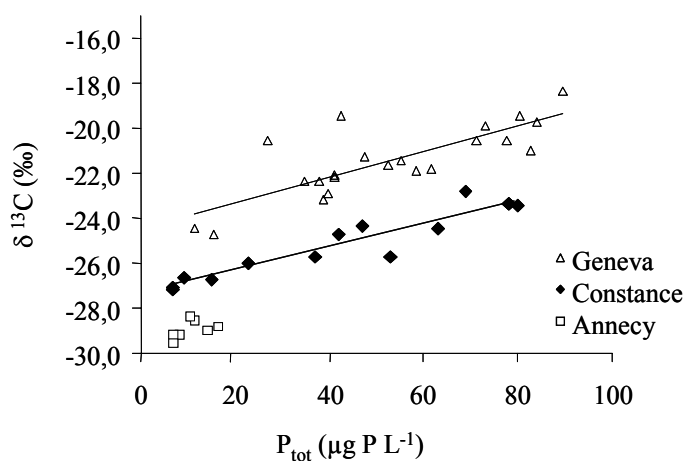


Fig. 2. Relationships between Whitefish $\delta^{13}C$ and P_{tot} for each lake. The relationship is not significant ($r^2 = 0.088$, $p = 0.264$) in the case of Lake Annecy. The equations of regression are $\delta^{13}C = 0.0514 * P_{tot} - 27.35$ ($r^2 = 0.884$, $p = 0$) for Lake Constance, $\delta^{13}C = 0.0560 * P_{tot} - 24.41$ ($r^2 = 0.604$, $p = 10^{-5}$) for Lake Geneva.

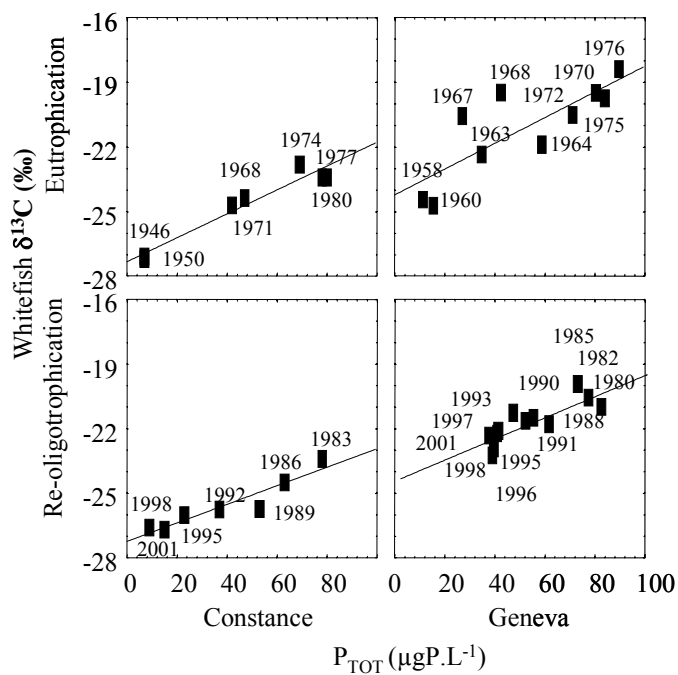
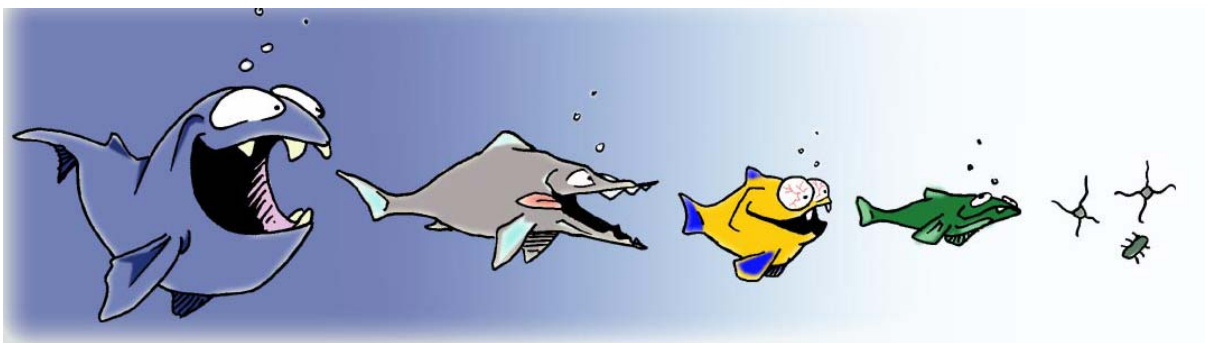


Fig. 3. Relationships between Whitefish $\delta^{13}\text{C}$, P_{tot} and the type of change (eutrophication or re-oligotrophication) for Lakes Constance and Geneva.



Article 5. Comparison of the monthly patterns of ^{13}C and ^{15}N natural compositions of Whitefish tissues and diet in lake Geneva: integration of isotopes from food into tissues in natural environments.

M.-E. PERGA AND D. GERDEAUX

Soumis à OECOLOGIA

PROCEEDINGS OF THE STABLE ISOTOPE ECOLOGY CONFERENCE,
WELLINGTON (NZ), APRIL 19-24TH 2004

RUNNING TITLE : WHITEFISH DIET AND TISSUES ISOTOPE COMPOSITION

ABSTRACT

Tissue isotope turnover has been well documented in endotherms, but little is known about it in ectotherms, and especially in fish. In mammals and birds, turnover has been shown to occur faster in the liver than in muscle. In ectotherms however, the few studies that have compared isotope turnover in liver and muscle report contradictory results. Moreover, isotope turnover in muscle has been shown to depend far more on growth than on metabolic replacement in ectotherms. However, ectotherms, such as fish, have a discontinuous pattern of growth over the year, which could be expected to affect the isotope turnover rate in muscle. In contrast, the liver is a regulatory tissue, with a continuous protein turnover. We therefore expected the isotope composition of fish muscle to reflect a long-term image of the isotope composition of the food consumed throughout the growth period, whereas that of the liver to reflect the isotope composition of the food consumed throughout the year. To check these expectations, we compared the isotope compositions of Whitefish muscle, liver and food in the field during a survey lasting two years. Isotope turnover was 2-3 times higher in the liver than that in muscle. The isotope composition of the food consumed during periods when no growth occurred, was not reflected in the isotope composition of the muscle, but was reflected in that of the liver. Consequently, Stable Isotope Analyses (SIA) performed on fish dorsal muscle, contrary to liver, reflects only some of the food consumed during the year.

KEYWORDS: Isotope turnover rate, ectotherms, Stable Isotope Analyses, Fish, Growth.

INTRODUCTION

During the 20 years that extensive use has been made of stable isotope analysis (SIA) to study food webs in various ecosystems, questions have emerged about the underlying assumptions on which this technique relies (Tieszen *et al.* 1983; Hobson and Clark 1992b; Gannes *et al.* 1997). Some of these questions concern isotope turnover. Isotope turnover is defined as the change, associated with a change of diet, in tissue isotopic composition attributable to growth and metabolic tissue replacement (Mac Avoy *et al.* 2001). The isotope turnover rate defines the delay necessary to the isotope composition of the tissue of the consumer to reach equilibrium with that of the food source. Isotope turnover has undergone numerous experimental studies, involving various species, mainly endotherms (Tieszen *et al.* 1983; Kelly 2000; Roth and Hobson 2000; Kurlle 2002; Kurlle and Worthy 2002; Hobson and Bairlein 2003), and to a lesser extent, ectotherms, such as krill (Frazer *et al.* 1997), insects (O'Brien *et al.* 2000) and fish (Hesslein *et al.* 1993; Pinnegar and Polunin 1999; Herzka and Holt 2000). Isotope turnover rates were then determined for different tissues of captive organisms, following an isotopic switch in their diet. In endotherms, the isotope composition of organs known to have a fast turnover (such as liver) changed their isotopic composition more rapidly than that slower growing tissues (such as muscle) (Tieszen *et al.* 1983; Hobson and Clark 1992b). Little is known about the isotope turnover process in ectotherms, such as fish, even though most recent SIA studies have been performed in aquatic ecosystems. Many questions concerning the isotope turnover rate in fish therefore need to be addressed.

SIA of aquatic food webs is usually performed on fish dorsal muscle, which is assumed to reflect the isotope signature of the food consumed. In contrast to endotherms, for which SIA can be performed on various tissues to get several time-scale results, there is no clear evidence that liver and muscle can be used in tandem to obtain different time-scale information for fish, as the few studies available involving fish have reached contradictory conclusions about turnover rates in muscle and liver (Johnson *et al.* 2002). Our first question concerned the isotope turnover rate in the liver. In the field, the isotope composition of a food source may vary continuously during the year, especially in aquatic ecosystems, where the isotope composition of plankton depends strongly on seasonal phenomena (Zohary *et al.* 1994). We therefore wondered whether the isotope composition of the liver could provide shorter-term information about the isotope composition of the food in the field than is provided by muscle.

Moreover, most of the studies of isotope turnover have so far relied on laboratory experiments under controlled conditions with a constant food supply, resulting in constant fish growth (Hesslein *et al.* 1993; Pinnegar and Polunin 1999). However, in the field, animals, and especially ectotherms, experience several different metabolic phases during the year, including phases of somatic growth and of gonadic growth, and a phase of basal metabolism, during which no growth occurs. In fish, while liver is a regulatory tissue with a constant protein turnover, muscle is the most representative tissue of growth when protein synthesis and deposition are considered (Mc Millan and Houlihan 1989; Peragon *et al.* 1994; De La Higuera *et al.* 1999). Furthermore, since muscle isotope

turnover depends mainly on growth (Hesslein *et al.* 1993), muscle isotope turnover is likely to be strongly affected by these physiological phases. The isotope signature of the food may consequently not be integrated into muscle at the same rate, all year round. This lead us to wonder to what extent the muscle isotope composition of the consumer reflects that of the food source: are fish what they eat, all year round? As far as we are aware, this question has never been addressed before.

To tackle these two questions, we compared the changes in the ^{13}C and ^{15}N compositions of the liver and muscle tissues of Whitefish (*Coregonus lavaretus*) to the isotope composition of their food in the field on a monthly basis. Whitefish was chosen because it is a zooplanktivorous fish (Mookerji *et al.* 1998), and so the isotope composition of its food varies all year long (Zohary *et al.*, 1994). Whitefish somatic growth in peri-alpine lakes has previously been described by retro-calculation from scales and shown to occur from March to September (Caranhac 1999). We therefore expected that at any given time Whitefish muscle would reflect the isotope composition of the food eaten during the previous growth period, whereas that of the liver would reflect the isotope composition of food consumed throughout the year, with a faster turnover.

MATERIAL AND METHODS

STUDY SITES

Located on the Swiss-French border, Lake Geneva is the largest lake in Western Europe (area = 582 km², max depth = 309 m), with a catchment area of 7400 km². The lake, was initially classified as being oligo-mesotrophic, but had shifted to a eutrophic status by the end of the 1970's. Initiatives to reduce P inputs were taken in the early 1980s and between 1980 and 2001, mean phosphorus concentrations in the lake fell to 36.5 $\mu\text{g P}\cdot\text{L}^{-1}$.

FISH SAMPLING

There is little inter-individual variability in *C. lavaretus* stomach contents in large and deep lakes (Ponton 1986, Mookerji *et al.*, 1998), and a sample of 10 individuals can be taken to be representative of the *C. lavaretus* population. From January 2002 to September 2003, 10 adult Whitefish were bought per month from professional fishermen in lake Geneva and kept in a cool box until being processed in the laboratory within an hour later. The stomachs were removed, and the stomach contents preserved in Ethanol 50%. The liver and part of the dorsal muscle were removed and frozen. We did not delipidize our samples prior to analysis. The correction described by Mc Connaughey and Mc Roy (1979)(Mc Connaughey and Mc Roy 1979) for the lipid formula has been shown to be applicable to Whitefish muscle (Dufour 1999). Moreover, as $\delta^{15}\text{N}$ tracks the origins of protein, and $\delta^{13}\text{C}$ tracks both proteins and lipids, liver $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ data provided different information. Consequently, we did not delipidize the liver samples, but the $\delta^{13}\text{C}$ data will be regarded along with the C/N ratio as a proxy for lipid content. Scales were also collected to age the fish.

STOMACH CONTENTS

An appropriate aliquot volume extracted from the 50-ml homogenized stomach content sample was placed in a Dolphuss cell and the prey species present were identified and counted under a binocular microscope. The main prey identified were Cladocerans (*Daphnia* sp., (Dufour 1999) and *Bythotrephes* sp.), Copepods (essentially Cyclopoids), and Chironomid larvae. The volume of each prey was assessed by multiplying the number of individuals by a prey-dependent volumetric coefficient (Hyslop 1980). The volumetric proportion of each prey was then calculated for each Whitefish.

ZOOPLANKTON AND BENTHOS SAMPLING

Each month, zooplankton was collected from several vertical hauls with a 200- μ m-mesh net from a depth of 50 m to the surface. Bulk zooplankton was kept in an isothermal bottle until processed in the lab. The main taxa in the bulk zooplankton were isolated manually under the binocular microscope and frozen. As Chironomids have a long life span, they were only sampled once, in December 2003. They were collected using an Eckman grab, along a depth gradient (5 m; 7 m; 16 m; 20 m). The gut was removed under the binocular microscope, and the body rinsed with demineralized water prior to freezing.

STABLE ISOTOPE ANALYSIS

Fish, benthos and zooplankton samples were freeze-dried. Fish and benthos samples were then ground to a fine powder in a ball mill. 1-mg fractions of the samples were weighed into 6 x 4 mm tin cups for CF-IRMS analysis using a Europa Scientific ANCA-NT 20-20 Stable Isotope Analyser with a NCA-NT Solid/Liquid Preparation Module (PDZ Europa Ltd., Crewe, UK). The analytical precision (S.D.) was 0.2‰, as estimated from 5 standards analyzed along with the samples. Working standards were 1 mg leucine prepared by freeze-drying 50 ml of a 20 mg/ml stock solution in the tin cups, and calibrated against 'Europa flour' and IAEA standards N1 and N2. The isotope ratios were expressed in δ as the parts per thousand differences (‰) from the standard references, which were PeeDee Belemnite for $\delta^{13}\text{C}$ and atmospheric nitrogen for $\delta^{15}\text{N}$.

DATA PROCESSING

Estimation of the isotope composition of the diet.

Whitefish in Lake Geneva is mainly zooplanktivorous. Since the proportion of chironomids to Whitefish diet varies annually and the isotope composition of chironomids depends on their depth, only the pelagic part of the diet (which makes up more than 85% of the diet) was simulated in order to compare the difference in the isotope compositions of the planktonic food and the Whitefish. Copepods and *Daphnia* could be sampled each month, and their isotope composition measured. In contrast, Leptodora and *Bythotrephes* were sometimes not sufficiently abundant in the monthly samples for their isotope composition to be measured. As linear regressions between the isotope compositions

of *Leptodora* or *Bythotrephes* versus *Daphnia* provided a good descriptor of these relationships, the regression equation was used to estimate the missing isotope composition values for *Bythotrephes* and *Leptodora* from those for *Daphnia*. The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values for the diet were assessed by a mixing model. As all zooplanktonic taxa had similar C/N values, we did not incorporate the C and N concentrations into the mixing models (Phillips and Koch 2002). The isotope composition of the zooplanktonic food was therefore equal to the sum of the volumetric contributions of each taxa present multiplied by their respective monthly isotope signatures.

Detecting significant changes in the monthly tissue $\delta^{13}\text{C}$, C/N ratios and $\delta^{15}\text{N}$ values

Levene tests were performed on the monthly muscle and liver C/N, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values, and rejected the assumption of variance equality. Significant differences between pairs of samples were tested by U-tests. Any significant changes in the isotope composition for Whitefish muscle and liver over the seasonal pattern were detected using the non-parametric Kruskal Wallis test. To perform post-hoc, non-parametric tests a modified of the Kruskal Wallis test was used. An S-Plus script of this modified test, which was created by F. Mueter (mueter@ims.alaska.edu), is available from the S-News forum <http://www.biostat.wustl.edu/archives/html/s-news/1999-03/msg00245.html>.

This test involves a Kruskal function modified to include multiple comparisons. The output includes a simple matrix of pairwise comparisons (only if the overall test rejects the null hypothesis), where T indicates whether the difference is significant at the given level of alpha. The test is based on a multiple comparison test given in (Conover 1980).

Significant monthly differences were then targeted, and adjoining groups of months with non-significant differences in Whitefish isotope compositions were created from the matrix of the post-hoc tests results. All the tests were performed on S-Plus (Insightful 2001).

RESULTS

GUT CONTENTS

Whitefish in lake Geneva relied on zooplanktonic prey for 75% to 100% of their diet. In each of the years studied, this percentage was lowest in February and highest in May-June and July (Fig. 1). Samples collected in August 2003 constituted an exception, as the Whitefish guts were full of chironomids nymphs. *Bythotrephes* and *Daphnia* are the most abundant prey species. *Bythotrephes* were predominant in the gut contents at the end of winter (January and February) and in the early summer months (June-July), whereas *Daphnia* were predominant in spring for each year of the survey. Benthic prey (chironomids) were consumed from February to April, when they accounted for 25% of the gut contents. The contribution of chironomids was also considerable in the late summers of 2002 and 2003 (Fig. 1). Benthic consumption accounted for 4.6% of the total consumption in 2002 and for 12.3% in 2003, and was significantly greater in 2003 than in 2002 ($p=0.03$). More precisely, the benthic contribution in February to April was twice as great in 2003 as in 2002, and in August 2003, the Whitefish fed exclusively upon benthos.

COMPARATIVE CHANGES IN $\delta^{13}\text{C}$ IN ZOOPLANKTON, AND IN WHITEFISH MUSCLE AND LIVER*Zooplankton and chironomid $\delta^{13}\text{C}$ values*

Every month, all the zooplanktonic taxa displayed very similar $\delta^{13}\text{C}$ values (Fig 2a.). Linear regression were therefore used to compare the $\delta^{13}\text{C}$ values of the zooplanktonic taxa (Table 1). In all taxa, $\delta^{13}\text{C}$ values were strongly correlated, with intercepts from the regression model not significantly different from 0 and slope coefficients from 1. We concluded that the $\delta^{13}\text{C}$ for the zooplanktonic taxa at a given time were not significantly different, and could therefore be assimilated to a single mean pelagic $\delta^{13}\text{C}$ (Fig 2a.). Consequently, the $\delta^{13}\text{C}$ of the diet was assessed as the mean of the $\delta^{13}\text{C}$ values of all the taxa present.

The $\delta^{13}\text{C}$ value for the zooplankton in the diet ranged between -25 and -33‰ (Fig 2a) between January 2002 and September 2003. The pelagic $\delta^{13}\text{C}$ reached its lowest value in early spring (March 2002 and February 2003), and its highest value in summer (August 2002 and July 2003). The seasonal pattern was fairly similar for 2002 and 2003.

Chironomids had $\delta^{13}\text{C}$ values ranging from -19 to -27‰ (Fig. 2a). The $\delta^{13}\text{C}$ values of the benthic prey overlapped the values for the late spring and summer pelagic diet, but were higher than the winter or early summer pelagic values. Benthic consumption was therefore discernable from pelagic preys on a $\delta^{13}\text{C}$ basis in February to April, when it made a major contribution to Whitefish diet. In contrast, the consumption of late summer nymphs was probably masked.

 $\delta^{13}\text{C}$ of Whitefish muscle and liver

The $\delta^{13}\text{C}$ of Whitefish muscle showed significant differences between different months (Fig 2b) (Kruskal Wallis $\chi^2 = 94.7088$; $df=18$; $p\text{-value}=0$). Homogeneous groups of mean $\delta^{13}\text{C}$ values are shown in Fig 2b. Minimum values were reached in April 2002 and April-May 2003. However, the lowest values reached in 2002 were significantly lower than in 2003. The higher value of the spring 2003 minimum, and the fact that it occurred later were very probably attributable to the higher proportion of chironomids in the diet. The highest $\delta^{13}\text{C}$ values for muscle were reached in July, and remained unchanged until the following February, even though the $\delta^{13}\text{C}$ of the zooplanktonic diet fell steadily from -24 to -32‰ . The $\delta^{13}\text{C}$ values of the zooplanktonic food and of the muscle exhibited parallel seasonal patterns from February to July each year, with the $\delta^{13}\text{C}$ pattern for muscle lagging one or two months behind that of the zooplanktonic diet. In contrast, during the autumn and winter of 2002-2003, muscle remained at the $\delta^{13}\text{C}$ value reached during summer, whereas the $\delta^{13}\text{C}$ of the zooplanktonic food continued to decrease. During this period (autumn and winter 2002-2003), the C/N ratios in Whitefish muscle did not show any significant change (KW test, $\chi^2 = 6.1435$, $df= 6$, $p=0.40$).

Liver $\delta^{13}\text{C}$ also varied significantly over the year (KW test $\chi^2=140.20$; $df=18$; $p\text{-value}=0$). Liver $\delta^{13}\text{C}$ fluctuations spanned a range of 3.5‰, and were twice as great as those for muscle (Fig. 2c). Minimum values were reached in April 2002 and March-May 2003, and maximum values in summer. The pattern in spring and summer 2003 included some fluctuations that reflected the high proportion of benthic prey species in the diet during this period. Like the $\delta^{13}\text{C}$ for muscle, that for liver remained unchanged from the summer until the next February, even though the $\delta^{13}\text{C}$ of the food source fell throughout the autumn and winter. However, unlike muscle, the fat content of the liver underwent major changes during this period (KW test, $\chi^2= 18.94$, $df=3$, $p= 0.003$). The liver C/N ratio was greatest during the growth period each year, and lowest at the end of winter (Fig. 2.d). Lipids stored during the growth period were therefore being consumed during the winter.

COMPARATIVE CHANGES OF THE $\delta^{15}\text{N}$ VALUES OF THE ZOOPLANKTONIC FOOD, WHITEFISH MUSCLE AND LIVER.

$\delta^{15}\text{N}$ of the zooplanktonic food

The zooplanktonic taxa exhibited differing $\delta^{15}\text{N}$ values, but they all followed the same pattern of seasonal variation (Fig 3a). Linear models were used to describe relationships between the $\delta^{15}\text{N}$ values for the different taxa (Table 2, Fig 3b). There were strong and significant correlations between the $\delta^{15}\text{N}$ values for all the taxa. Missing $\delta^{15}\text{N}$ values for *Bythotrephes* and *Leptodora* were estimated from linear models.

The modeled zooplanktonic food $\delta^{15}\text{N}$ is shown in Fig 4a. General trends in the $\delta^{15}\text{N}$ of the zooplanktonic food were very similar in the two years surveyed. The $\delta^{15}\text{N}$ of the pelagic food was highest in winter (17‰) in both years, and lower in spring and summer (12‰), with a transient minimum in early spring (as low as 5‰). The extremes values, reached in winter or late spring, were the same for both years surveyed. The main difference was the steeper and earlier decrease in $\delta^{15}\text{N}$ values in 2003.

Whitefish tissue $\delta^{15}\text{N}$

The monthly means of the Whitefish muscle $\delta^{15}\text{N}$ were included in a 2‰ interval, whereas levels in the diet spanned a range of 12‰. However $\delta^{15}\text{N}$ values in the muscle varied significantly during the year (KW $\chi^2=117$, $df=18$, $p=0$) (Fig 4b). Whitefish muscle $\delta^{15}\text{N}$ was greatest at the end of winter in both years, and decreased in spring. Minimum values, reached as early as May, remained constant until September. However, in January 2003, the muscle $\delta^{15}\text{N}$ was higher than that in November 2002 one, indicating an increase (of about 1‰) in muscle during the winter. Like the $\delta^{15}\text{N}$ of the zooplanktonic diet, the spring decrease occurred earlier in 2003 than in 2002. The annual pattern of $\delta^{15}\text{N}$ for Whitefish muscle was similar in these two years, although benthic consumption in 2003

was double that in 2002. However $\delta^{15}\text{N}$ values for benthic prey overlapped those for zooplankton, which made it impossible to identify benthic consumption from the whitefish muscle $\delta^{15}\text{N}$.

To conclude, Whitefish muscle $\delta^{15}\text{N}$ displayed a seasonal pattern that mirrored that of the pelagic food, with higher values in winter and lower ones in spring and summer. Whitefish muscle $\delta^{15}\text{N}$ increased from October 2002 to February 2003, as did that of the diet.

Liver $\delta^{15}\text{N}$ also displayed significant changes over the year (KW $\chi^2= 175$, $df=18$, $p=0$) but, unlike that of the muscle, the liver $\delta^{15}\text{N}$ varied all year long (Fig 4c). The maximum $\delta^{15}\text{N}$, was reached at the end of winter. There was a sharp decrease in $\delta^{15}\text{N}$ (-5‰), and the minimum value of $\delta^{15}\text{N}$ was reached in May. The $\delta^{15}\text{N}$ of the liver generally lagged one month behind that of the zooplankton, and the amplitude of liver $\delta^{15}\text{N}$ variations was 3 times higher than that of muscle. As in zooplankton, this transient minimum was followed by a rise of $\delta^{15}\text{N}$ up to 13‰ in summer. As in muscle, $\delta^{15}\text{N}$ values also increased in winter (by about 2‰). Changes in liver isotope composition reflected the same seasonal pattern as the zooplanktonic food .

DISCUSSION

We found that the isotope composition of the Whitefish food sources varied continuously over the two years of our survey. The reasons of these variations, and especially for seasonal variations in the isotope compositions of the zooplanktonic taxa, will not be addressed here, but will constitute the topic of another paper. As $\delta^{15}\text{N}$ only tracks proteins, and as the samples were not delipidized, $\delta^{15}\text{N}$ is a more adequate tool for comparing tissue isotope turnover, than $\delta^{13}\text{C}$, which tracks both proteins and lipids, which are known to have different isotope compositions and turnovers. The seasonal nature of the zooplankton $\delta^{15}\text{N}$ was reflected by the consumer's tissues after an interval of one month in the case of the liver and of 4-5 months in that of the muscle. Moreover, if liver and muscle have similar turnovers, as suggested by Hesslein, then the amplitudes of $\delta^{15}\text{N}$ variations in these two organs would have been expected to be the same. In fact, we found that the amplitudes of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ variations in the liver were three times greater than those in muscle. It would also have been expected that there would be a difference in fish liver and muscle isotope turnover rates, as previously shown both in birds (Hobson and Clark 1992b) and in mammals (Tieszen *et al.* 1983). Contradictions with the data previously reported by Hesslein (1993), who admitted that the conclusions drawn should be tempered because of limited sample size, prompt us to confirm these results by further experiments. However, the findings reported here support the idea that fish liver could provide shorter term information about the isotope composition of fish diet than muscle.

Monthly changes in tissue $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ were investigated, and we confirmed that spring and summer $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ patterns were integrated into the tissues: liver and muscle $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ patterns matched those of the zooplankton. Liver and muscle $\delta^{13}\text{C}$ matched the early spring decrease

in zooplankton in 2002 and 2003 and the increase that followed in the late spring and summer, to reach a balance with the maximal summer values. In 2003, spring and summer muscle and liver $\delta^{13}\text{C}$ values were all higher than in 2002, reflecting the higher benthic contribution to the diet in early spring. Liver $\delta^{15}\text{N}$ matched the spring diet $\delta^{15}\text{N}$ decrease and the following summer increase to reach equilibrium with the diet $\delta^{15}\text{N}$ summer values. Because of its slower turnover, muscle $\delta^{15}\text{N}$ matched only the spring decrease in diet $\delta^{15}\text{N}$. However, at the first sight, the data concerning food isotope composition recording during autumn and winter for the two isotopes seem to contradict each other. Whitefish muscle and liver $\delta^{13}\text{C}$ remained constant from July to February, while the Whitefish were still feeding, and zooplanktonic $\delta^{13}\text{C}$ was still decreasing. Neither muscle nor liver then seemed to record the $\delta^{13}\text{C}$ of the zooplankton during autumn and winter. On the contrary, muscle and liver $\delta^{15}\text{N}$ actually increased even in winter, as did the zooplankton $\delta^{15}\text{N}$, which would support the assumption of a continuous isotope turnover in both tissues.

Under the assumption of a continuous recording of diet isotope composition in muscle, as suggested by $\delta^{15}\text{N}$ data, whitefish muscle and liver $\delta^{13}\text{C}$ would remain constant throughout autumn and winter if the $\delta^{13}\text{C}$ of their diet also remained constant during this time, and equal to the summer value of -26‰ . This could occur if the Whitefish consumed enough ^{13}C -enriched chironomids to compensate for the $\delta^{13}\text{C}$ decrease in zooplankton during this period. We then assessed the proportion of chironomids that would be needed for the diet $\delta^{13}\text{C}$ to settle around -26‰ during autumn and winter (Table 3). As the $\delta^{13}\text{C}$ of the chironomids depended on depth, we determined minimum and maximum percentages depending on the depth of the chironomids potentially consumed (Table 3). The observed proportion of chironomids in the gut during October 2002 was within the range of that estimated. However, for all the following months, the hypothetically required proportion of chironomids was far higher than the range actually observed in this study or in previous surveys (Ponton 1986; Gerdeaux and Hamelet 2001). It is very likely then that benthic consumption could not compensate for the decreased in zooplankton $\delta^{13}\text{C}$ from November 2002 to February 2003, which implies that the $\delta^{13}\text{C}$ of the diet was not being recorded in muscle during autumn and winter. If this is the case, the increase in $\delta^{15}\text{N}$ observed in muscle during winter would not reflect the $\delta^{15}\text{N}$ of the diet. In winter, diet resources are limited and nutrients in the muscle could be remobilized to support gonadic growth or basal metabolism when all the lipids reserves have been consumed, as has been reported in birds (Hobson *et al.* 2000) and scallops (Lorrain *et al.* 2002). Nutrient remobilization is known to increase tissue $\delta^{15}\text{N}$, suggesting that in the context of starvation or of limited resources, animals catabolize their own tissue proteins (Frazer *et al.* 1997; Adams and Sterner 2000; Olive *et al.* 2003). In this situation, changes in $\delta^{15}\text{N}$ during the winter could result from changes in physiology rather than in diet. The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ data are consistent, and suggest that a discontinuous isotope

turnover occurs in muscle. This means that the isotope composition of muscle cannot provide reliable information about the food consumed during seasons when there is no somatic growth.

In the case of the liver, the apparent $\delta^{13}\text{C}$ patterns also support the hypothesis that diet $\delta^{13}\text{C}$ is not reflected by this organ during the winter, whereas the $\delta^{15}\text{N}$ of the liver matched that of the zooplanktonic all year round. For the liver, fat should also be taken into consideration. While muscle fat content remained low and constant throughout the autumn and winter, the liver stored fat during summer and consumed it during autumn and winter. Lipids have lower levels of ^{13}C than proteins (De Niro and Epstein 1978). During autumn and winter, the consumption of ^{13}C -depleted lipids should have led to an increase in liver $\delta^{13}\text{C}$, unless this increasing $\delta^{13}\text{C}$ was offset by the integration of proteins with lower $\delta^{13}\text{C}$ values coming from the zooplankton. In the liver then, the integration of the zooplanktonic $\delta^{13}\text{C}$ signal could be masked by the consumption of the fat stored in the liver during summer. Our findings for liver could therefore support the hypothesis that there is a continuous turnover all year round.

CONCLUSION

The data support our initial expectations. Muscle does indeed exhibit a slow and discontinuous turnover. Whitefish dorsal muscle provides a long-term integrated image (4-5 months) of the isotope composition of the food consumed from March to September, 7 months out of 12, during which nutrients are allocated to growth. The Whitefish stomachs were not empty for the other 5 months, but as nutrients from the food consumed over the other 5 months were allocated to basal metabolism and to gonadic growth, their isotope composition was not reflected in the muscle. Food consumed during nearly half of the year cannot be detected by SIA of dorsal muscle. The Whitefish growth period is even shorter in boreal lakes (Bruslé and Quignard 2001) and consequently the period during which SIA of muscle provides reliable information about diet is probably even shorter. This study makes it clear that SIA performed on ectotherms gave reliable information about the isotopic composition of the diet only over a restricted time period.

On the other hand, our findings do support the assumption that isotope turnover is quicker and more continuous in the Whitefish liver. Should our first assumption be verified by further experiments, then food consumed outside the somatic growth period could be studied from SIA performed on delipidized liver samples.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank all the participants at the “Stable Isotope Ecology Conference” whose questions and comments helped in improving this manuscript. This work was supported by the “ACI écologie quantitative” program from the French Ministry of Research.

TABLES

Regression model	r ²	a (± S.E.)	P(>t ₀)	P(>t ₁)	b (± S.E.)	P(>t ₂)
$\delta^{13}\text{C}_{\text{Bythotrephes}} = a \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{Daphnia}} + b$	0.84	0.86 (± 0.11.)	0.00	0.13	-3.44 (± 3.32)	0.32
$\delta^{13}\text{C}_{\text{Copepods}} = a \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{Daphnia}} + b$	0.74	0.80 (± 0.13)	0.00	0.07	-5.74 (± 3.71)	0.14
$\delta^{13}\text{C}_{\text{Leptodora}} = a \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{Daphnia}} + b$	0.54	1.24 (± 0.43)	0.02	0.59	8.12 (± 11.78)	0.51

Table 1. Parameters of the linear regression model between $\delta^{13}\text{C}$ values for zooplankton taxa and probabilities associated with Student's tests for Lake Geneva. t_1 is the t -value of the Student's test comparing a to 0, t_2 is the t -value of the Student's test comparing a to 1 and t_3 is the t -value of the Student's test comparing b to 0.

Regression model	r ²	a (± S.E.)	P(>t ₀)	P(>t ₁)	b (± S.E.)	P(>t ₂)
$\delta^{15}\text{N}_{\text{Bythotrephes}} = a \cdot \delta^{15}\text{N}_{\text{Daphnia}} + b$	0.85	0.80 (± 0.10.)	0.00	0.03	5.46 (± 0.91)	0.00
$\delta^{15}\text{N}_{\text{Copepods}} = a \cdot \delta^{15}\text{N}_{\text{Daphnia}} + b$	0.85	0.90 (± 0.10)	0.00	0.17	3.26 (± 0.91)	0.00
$\delta^{15}\text{N}_{\text{Leptodora}} = a \cdot \delta^{15}\text{N}_{\text{Daphnia}} + b$	0.90	0.88 (± 0.11)	0.00	0.16	3.93 (± 0.88)	0.00

Table 2. Parameters of the linear regression model between the $\delta^{15}\text{N}$ of zooplankton taxa and probabilities associated with Student's tests for Lake Geneva. t_1 is the t -value of the Student's test comparing a to 0, t_2 is the t -value of the Student's test comparing a to 1 and t_3 is the t -value of the Student's test comparing b to 0.

Date	$\delta^{13}\text{C}$ of the pelagic diet	Minimum proportion of chironomids	Maximum proportion of chironomids	Proportion of chironomids recorded
October 2002	-26.7‰	10%	64%	25%
November 2002	-27.7‰	23%	82%	
December 2002	-28.9‰	32%	88%	0-5% (Ponton 1986, Gerdeaux 2001)
January 2003	-30.0‰	40%	91%	0-3%
February 2003	-31.5‰	47%	93%	20-40%
March 2003	-32.0‰	50%	94%	10-20%

Table 3. Theoretical minimum and maximum percentages of benthic prey species in the gut contents required for the diet $\delta^{13}\text{C}$ to remain equal to its summer 2002 value of -26.0‰ and the percentages actually recorded.

FIGURES

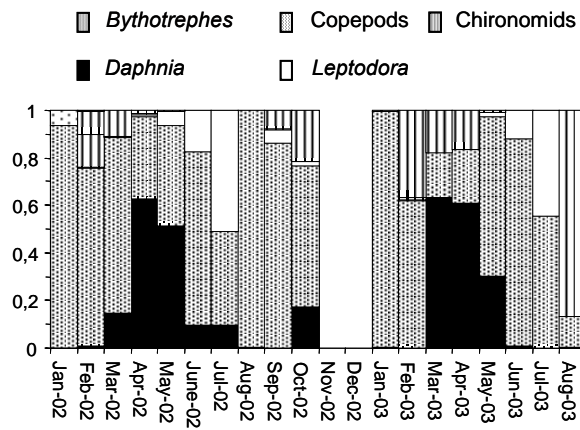


Fig. 1. Whitefish gut contents during the 2002-2003 survey.

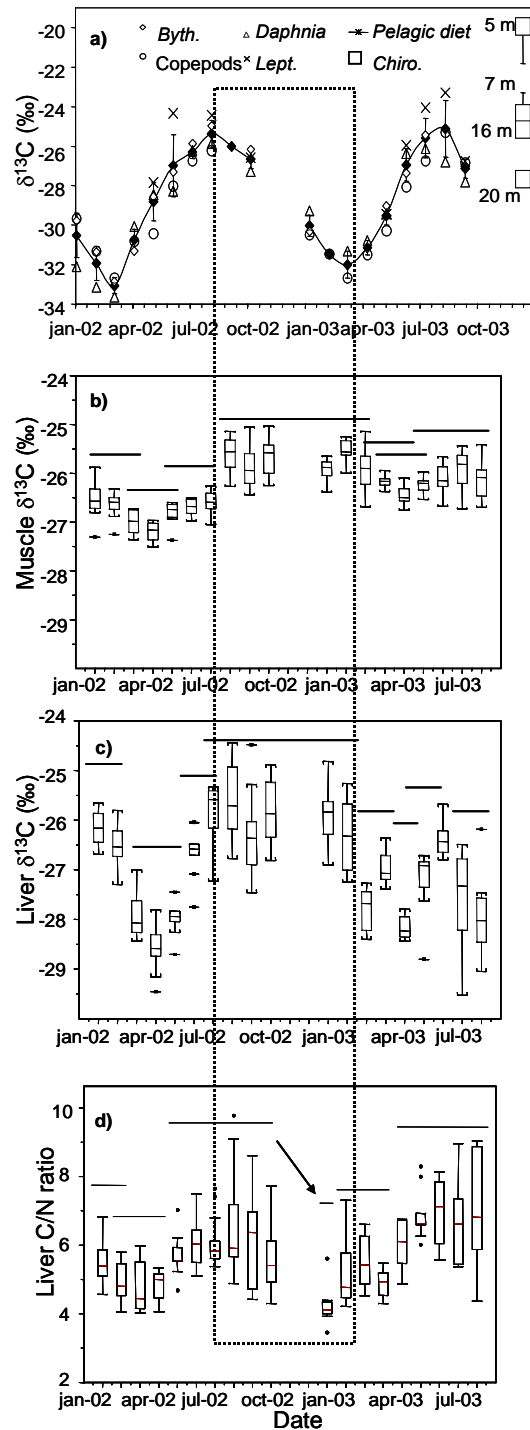


Fig. 2. Monthly diet, muscle and liver $\delta^{13}C$ values.

a. Comparison of monthly variations of pelagic diet, muscle and liver $\delta^{13}C$. Byth.: *Bythotrephes longimanus*, Lept.: *Leptodora kindtii*, Chiro.: *Chironomids*. b. Monthly variations of muscle $\delta^{13}C$. c. Monthly variations of liver $\delta^{13}C$. d. Monthly variations in the liver C/N ratio, used as a fat content proxy. Black lines indicate homogeneous groups of monthly means (Post-hoc test adapted from Conover (1980)).

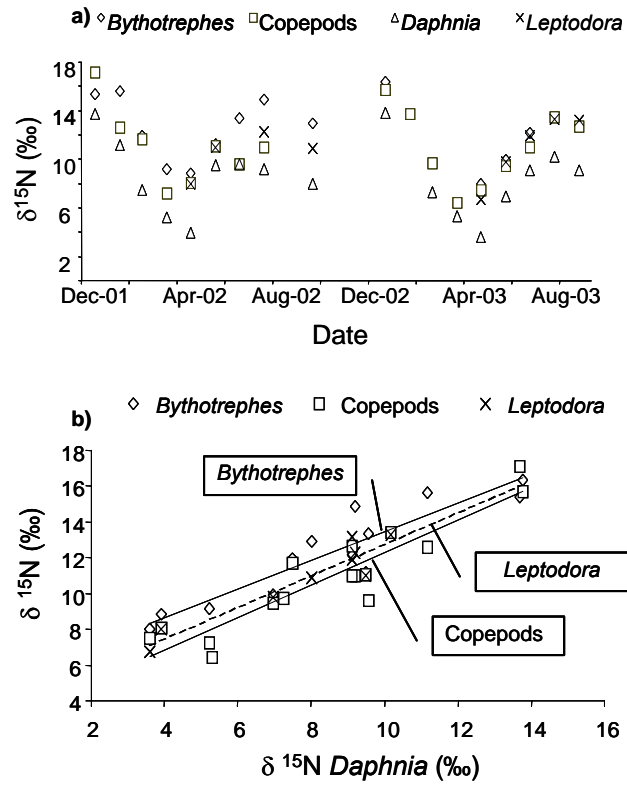


Fig 3. a. Zooplankton taxa $\delta^{15}\text{N}$ during the 2002-2003 survey. b. Linear relationships between the $\delta^{15}\text{N}$ values for Bythotrephes, Leptodora and copepods and that of Daphnia.

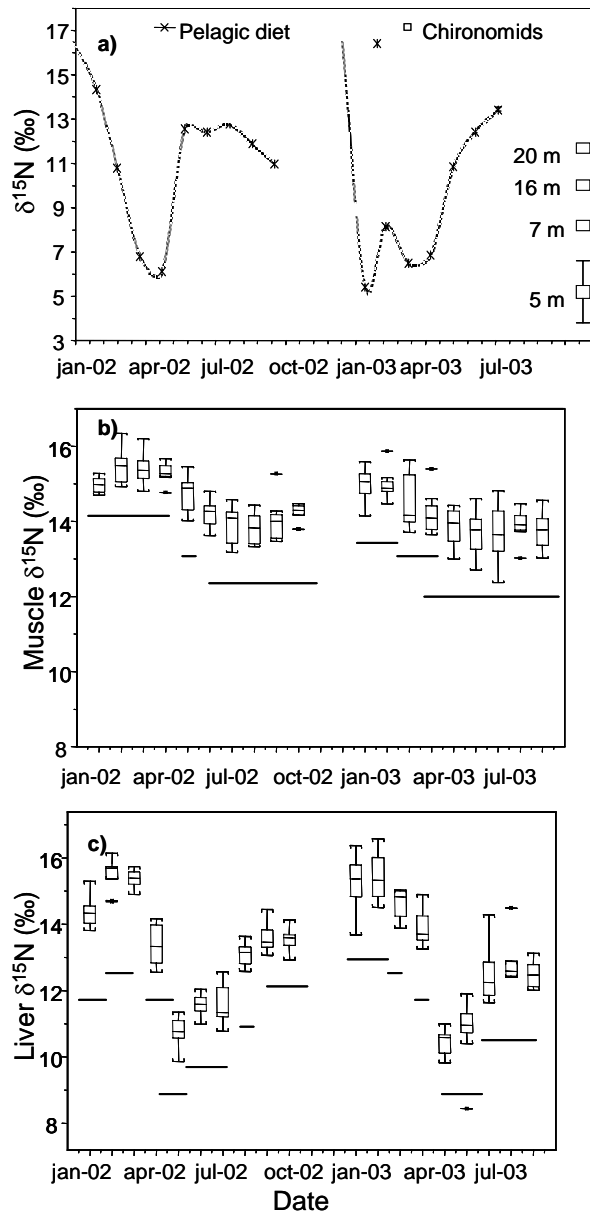


Fig. 4. Monthly $\delta^{15}\text{N}$ values for diet, muscle and liver. a. Comparison of monthly variations in pelagic diet $\delta^{15}\text{N}$. b. Monthly variations in muscle $\delta^{15}\text{N}$. c. Monthly variations in liver $\delta^{15}\text{N}$. Black lines indicate homogeneous groups of monthly means. (Post-hoc test adapted from Conover (1980))



Article 6. Seasonal and spatial variations in the stable carbon and nitrogen isotope ratios of fish in a tropical reservoir, Sélingué (Mali)

MARIE-ELODIE PERGA, ROBERT ARFI, DANIEL GERDEAUX,

EN REVISION

CANADIAN JOURNAL OF ZOOLOGY

RUNNING TITLE: VARIATIONS OF FISH ISOTOPIC COMPOSITIONS IN AN AFRICAN RESERVOIR

ABSTRACT.

Organic matter transfers were studied in a West African reservoir, Sélingué, Mali, from analysis of stable isotopes in fish, taking spatial and seasonal variability into account. Shifts in the mean isotopic positions and variations in the isotopic dispersion of fish species were identified between two sites at low and high water periods. Trophic relationships between the sampled fish species were shown to be quite similar between the two studied sites while they underwent marked changes with the hydrological season. Both carbon sources and food web structure were altered with hydrological seasonality. Although the taxa were shown to exploit mainly pelagic carbon at low water period, carbon derived from C₄-plants and deep methanogenetic carbon were alternative carbon sources for some species. Flooding of the grassy fringes during high water season provided a large support for littoral periphytic colonization. At high water period, three of the sampled fish species shifted towards the newly formed periphytic carbon, to the detriment of pelagic or allochthonous sources. Piscivorous fishes, however, may not benefit from the diversification of the available food sources.

RESUME:

Nous avons étudié des flux de matière organique dans un réservoir d'Afrique de l'Ouest, le réservoir de Sélingué au Mali, à partir de l'analyse des compositions en isotopes stables de poissons, en prenant en compte la variabilité spatiale et saisonnière. Les changements dans les positions isotopiques moyennes et dans la dispersion isotopique des taxons échantillonnés ont été mis en évidence entre deux sites, en hautes et en basses eaux. Nous avons montré que les relations trophiques entre les taxons échantillonnés variaient plus selon la saison que selon la station. Tant les sources de carbone que la structure du réseau trophique ont été affectées par la saisonnalité. Bien que les taxons exploitaient principalement le carbone d'origine pélagique en basses eaux, le carbone issu de plantes en C₄ et celui issu du recyclage profond par méthanogénèse constituaient des sources de carbone alternatives pour certaines espèces. L'immersion des pelouses de marnage en hautes eaux fournit une surface importante pour la colonisation du périphyton. En hautes eaux, trois des espèces échantillonnées se sont tournées vers l'exploitation du carbone de ces zones inondées, au détriment du carbone pélagique ou allochtone. Les espèces de poissons piscivores, cependant, ne sembleraient pas bénéficier de la diversification des ressources disponibles en hautes eaux.

KEY WORDS: Reservoir, Africa, Stable isotopes analysis, Fish, Hydrological season, Food web, Organic carbon flow.

MOTS-CLES: Réservoir, Afrique, analyse des isotope stables, poissons, saison hydrologique, réseau trophique, flux de matière organique.

INTRODUCTION

High biodiversity and the flexible dietary intake of fish are responsible for intricate trophic relationships in tropical freshwater ecosystems (Winemiller and Jepsen 1998). Moreover, those ecosystems are notable for high hydrologic variations that may shape trophic relationships (Winemiller and Jepsen 1998). Consequently, tropical freshwater food webs are thought to be complex and strongly variable with seasonality. In that context, food web studies from gut contents are prohibitive because they require large fish samples and a lot of time in order to assess individual and seasonal trophic variability. Stable isotope studies of trophic relationships offer a new field of investigation for complex food webs. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values are passed on from the food source to consumers with characteristic enrichments. $\delta^{13}\text{C}$ changes little from prey to predator (De Niro and Epstein 1978; France and Peters 1997), with a mean trophic fractionation of +0.39‰ in lake food webs (Post 2002b). By contrast, in the case of $\delta^{15}\text{N}$, consumer tissues are enriched compared to the food, with a typical fractionation of +3.4‰ in lake food webs (De Niro and Epstein 1981; Minagawa and Wada 1984; Post 2002b). Consequently, $\delta^{15}\text{N}$ is useful for determining the food web structure (Post *et al.* 2000), and $\delta^{13}\text{C}$ can be used to track the carbon source from its origin at the base of the food web (France 1995a; Schindler *et al.* 1997a; Post *et al.* 2000). This approach circumvents many of the problems in gut analysis as it is less time-consuming and gives a temporal-integrated image of the composition of the assimilated food (Post 2002b). Due to an easier access to stable isotope analysis equipment, stable isotope analysis spread and some complex tropical freshwater food webs were described recently in Australian billabongs (Bunn and Boon 1993), Florida lakes (Gu and Schelske 1996) and South American floodplains (Lewis *et al.* 2001; Wantzen *et al.* 2002). Stable isotope studies are still rare in Africa and focus mainly on Eastern deep rift lakes (Bootsma *et al.* 1996; Branstrator *et al.* 2003; Genner *et al.* 2003). As far as we know, no study concerns West African lakes and reservoirs although knowledge about food webs and carbon sources for fish are required for sustainable management strategies of those ecosystems.

Our study took place in the Sélingué Reservoir, Mali. This reservoir was created in 1980 with the construction of a dam on the Sankarani River, an affluent of the Niger River. This reservoir is dedicated to hydroelectricity and to control of the consequences of the Niger flood. Sélingué is also a very active fishing place that provides Bamako, the capital of Mali, with fresh fish (Laë and Weigel 1994). In that part of the country where farming is poor, fish is an important animal protein source for local populations (Alhousseini 1999). Few studies have focused on the Sélingué Reservoir (Anne *et al.* 1994; Laë and Weigel 1994; Arfi 2003) and no one has concerned fish relationships and the carbon sources upon which fish rely. Consequently, this study was performed to describe spatial and seasonal variations in the circulation of organic matter in the Sélingué food webs, using the natural abundance of carbon and nitrogen isotopes.

MATERIALS AND METHODS

STUDY SITE

Sélingué Reservoir is located on the Sankarani river, a few kilometres downstream of the Balé-Sankarani confluence (11°38 N, 8°14W) (Fig. 1). Its catchment area covers 34200 km², primarily made up of gently sloping, strongly weathered hills of metamorphic rocks and quartzite. The reservoir covers an area of 409 km² with a volume estimated to be 2.17 10⁹ m³ at the highest water level. In this season, its maximum depth is 22 m, with a mean depth of 5.3 m. The range between the highest and the lowest water levels is 9 m. At the end of the low water period, the water volume is ten times less than at the peak of the high water period (0.24 10⁹ m³). Its shore features gentle slopes, covered by high grass in low water season. Samples from the tidal grass were collected and identified at the Botanical Conservatory of Geneva by the Dr Lebrun. A bathymetric transect near the sampling station shows successively a shallow bank which runs into a large plain at the edge of which there is a levee which Sudanian climate zone, defined by a dry season from October to April and a wet season from May to September. Both Balé and Sankarani have a hydrological regime characteristic of Sahelian rivers. The flood reaches the reservoir at the end of July. After the flood, the water level remains high until January and then decreases slowly under the combined effects of evaporation and water output until July.

The reservoir is monomictic, with a stratified period in March and April. Chlorophyll *a* concentration is typical of an oligotrophic lake in high water and flood periods while it is characteristic of a mesotrophic one in low water period. Transient high *Chl a* concentrations would class the Sélingué reservoir as transiently eutrophic at the end of the low water period (Arfi 2003).

To check whether trophic links vary with location, two stations in the reservoir were sampled (Fig. 1). The first one was close to the dam, in the Northern part of the reservoir. This station was named “Carrière” as the near-by village on shore. In this part of the reservoir, most of the trees had been cleared before filling. This station had a maximum depth of 18 m during the high water survey (HW) and 12 m at the low water survey (LW). The major bed in the Carrière station was 2 km in width and remained flooded throughout the year. The second station was in the Balé river, upstream of the confluence with the Sankarani. This station had a maximum depth of 12 m during the HW survey and 6 m during the LW survey. In the high water season, the major bed of about 500 m in width was flooded while in the low water season, the station was almost totally reduced to the Balé minor bed. This station was not cleared of trees before filling and numerous trunks, residuals from the ancient gallery-forest of the Balé River, remained at this station. Plants and submerged trunks have been shown to be important as substrate for fish food organisms in African reservoirs (Douglas, 1966; McLachlan 1969; 1970 reviewed in (Lévêque *et al.* 1988)). Seasonal variations were taken into account by two surveys, one in LW period in June 2002 and the second one in HW period, in November 2002. The LW survey represented a period of progressive lowering of the water level while the HW survey occurred in a period of two months of stable water level after a quick and transient flood.

SAMPLE COLLECTION AND PROCESSING.

To compare organic matter flows between stations and seasons, samples of potential carbon sources and the most abundant fish species were collected.

Sampling of carbon sources

Particular Organic Matter (POM), epixylon on submerged trunks in the major bed, sediment and periphyton on flooded terrestrial plants of the banks in HW period, were potential carbon sources to sample. POM was collected in subsurface and 3 m above the bottom with a modified 7-litre Van Dorn bottle at two sites for each station. Water was then pre-filtered on 85 μm -mesh to remove the largest particles. POM size-fractions were separated on 50 μm -mesh filters to isolate large and filamentous algae (GPOM) from smaller ones (FPOM). Some of the larger size-fractions of POM were preserved for optical analysis. Filtrate from the 50- μm filter was then filtered through glass microfibre filters (Whatman GF/F) until saturation of the filter (FPOM).

Epixylon and periphyton were sampled by hand. A part of the support (bark or plant) was placed in mineral water. Shaking for 2-min allowed the biofilm to separate from its support. The water was at first pre-filtered on 85 μm mesh to exclude larger particles and then filtered on GF/F filters.

As primary producers are known to exhibit very variable isotopic composition, large zooplankton and macrobenthos were collected to assess a time integrated isotopic signature of pelagic (POM) and deep (sediment) carbon sources (Post 2002b, Matthews et Mazumder 2003). Zooplankton was sampled using a 200 μm -mesh net and kept in mineral water for one night to clear the guts. Lake flies (*Chaoborus*) and Cladocerans were hand-picked from the bulk zooplankton. Macrobenthos (*Chironomid* larvae) were collected by an Eckman grab in the minor and major beds and kept in mineral water for one night.

FISH SAMPLING

52 fish species were listed in the Sélingué reservoir in 2002 (Tito de Morais, unpublished results). It was not practical to sample all of them. The most abundant species of local fisheries according to fisheries investigations by Laë and Weigel (1994) were chosen for the study. 3 to 20 individuals from each taxa were bought from local fishermen at each station, in the Carrière village for the Carrière station and in the Kandare Koro village for the Balé station (Fig. 1). A small fraction of the dorsal muscle was then removed.

All samples dedicated to stable isotope analysis were dried at 60°C for 24 hours. Samples of 1 mg of finely ground muscle, zooplankton, benthos or POM or 10 mg of GF/F were weighed in 6 x 4 mm tin cups for CF-IRMS analysis using a Europa Scientific ANCA-NT 20-20 Stable Isotope Analyser with a NCA-NT Solid/Liquid Preparation Module (PDZ Europa Ltd., Crewe, U. K.). The analytical precision, estimated from 5 standards analysed along with the samples, was 0.2 ‰. Working standards for analytical precision consisted of 1 mg of leucine prepared by freeze drying 50 ml of a 20 mg ml⁻¹ stock solution in tin cups, and calibrated against 'Europa flour' and IAEA standards N1 and N2. All stable isotope values were reported in the δ notation:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left[\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{sample}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{standard}}} - 1 \right] \times 10^3 \text{ and}$$

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = \left[\frac{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{sample}}}{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{standard}}} - 1 \right] \times 10^3.$$

Standard for C is Pee Dee belemnite and standard for N is atmospheric nitrogen.

DATA PROCESSING

We aimed at first to point out the possible changes in the food web structure, using fish $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ distributions. Afterwards, changes in the food web structure were explained up by describing the trophic relationships between the sampled taxa. Twelve fish species were collected but only seven of them were present in all stations and seasons. Those species ranged from primary consumers to piscivorous fishes. In order to point possible changes in the food web structure between those seven common species, their $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ distributions were compared between all stations and seasons. However, species' sample sizes were sometimes different and the shape of the distributions may depend on sample size. To avoid this bias, individual $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values were weighted prior to the distribution analysis. The weight attributed to each individual was equal to $10/n_i$ (with n_i being the average sample size of the species i) for each of the seven common fish species to contribute as a ten individual sample. Mean, median and standard error values were calculated from the distributions to reach the symmetry coefficient (SC) defined as : $SC = 3 * (\text{Mean} - \text{Median}) / \text{Standard Error}$. A SC value closed to 0 is typical of a symmetric distribution while a more positive SC value indicates a dissymmetric distribution tailed along more positive values.

To describe the trophic relationships between all the sampled taxa (fish, zooplankton, macrobenthos and primary producers), we used the isotopic image $\delta^{13}\text{C} * \delta^{15}\text{N}$ of the whole sample obtained for the station near from the dam (Carrière), at low water period. From this isotopic image, a model of trophic relationships between the sampled taxa was constructed. Species isotopic positions in the LW Balé isotopic image and HW Carrière isotopic image were compared to the positions occupied by the same species in the LW Carrière in order to identify the trophic links that changed with station and season. Species' positions in the HW Balé isotopic image were compared to the species' positions in the HW Carrière isotopic image. Between stations or seasons, isotopic positions of fish species may actually shift. These shifts may result from carbon source isotopic shifts and/or from a modification of the fish's trophic behaviour (changes in diet or migration). To discriminate the two effects, isotopic shifts of carbon sources and fish species were compared to point differences in the trophic structure of the LW Carrière food web. Isotopic positions between taxa, seasons or stations were compared using a non-parametric test of pairwise mean comparison (Mann-Whitney U-test).

Intraspecies variability was also studied. High variability for consumers $\delta^{13}\text{C}$ arises out of alternative use of several carbon sources while high $\delta^{15}\text{N}$ variability results from feeding at different trophic levels (omnivory). $\delta^{15}\text{N}$ high variability may depend on the age of individuals if it is an ontogenic shift. This was tested by analysis of the relationships between isotopic ratios and fish length using Spearman correlations. Otherwise, high variability of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ within species may be the result of the alternative consumption

of different food sources, even the cohabiting of trophic sub-populations. Dispersions of the individual positions for a single taxa were then compared between stations or seasons by the Fisher-Snedecor variance homogeneity test. Analysis of dispersions aims at stressing more specialization or, on the contrary, more flexibility in the feeding behaviour of taxa. All the tests were performed on S-Plus 6 (Insightful 2001).

RESULTS

ISOTOPIC COMPOSITION OF CARBON SOURCES

Depending of the station or season, the available carbon sources were different. FPOM and GPOM could be sampled at all seasons and stations (Table 1). Epixylon on submerged trunks could not be sampled at Balé station at LW. Moreover, as chironomids larva are time integrating organisms of the benthic carbon isotopic composition, they were only sampled once at low water period in the Carrière station. No macrobenthos could be found at the Balé station. During low water season, the littoral zone of the reservoir is bare and presents very few potential supports for periphyton development. No littoral periphyton sample was collected in low water season. The grassy fringes were mainly composed by Leguminous (*Indigofera* sp.), Rubiaceae (*Spermacoce* sp.) and numerous Gramineae, typical of savannah C₄-vegetation. Isotopic signature of surrounding vegetation was not measured but is classically assessed at around -14 to -12‰ for C₄ plants (Lajtha and Marshall 1994). This range of variation of C₄ plants' δ¹³C was considered as the isotopic signature of an allochthonous carbon source (Fig. 2).

In the pelagic zone of the reservoir, available carbon sources are FPOM, GPOM and epixylon on submerged trunks (Fig. 2). Although FPOM and GPOM underwent significant variations in their isotopic compositions between stations and seasons, GPOM was always enriched with ¹³C compared to FPOM, but the differences were not significant in each case. (U-test p-value=0.05 for Carrière LW, 0.4 for Carrière HW and 0.2 for Balé HW). In LW, epixylon and FPOM had similar ¹³C compositions (-24.1 ‰ ± 0.6‰). while in HW, epixylon was significantly enriched with ¹³C (U-test p-value =4.10⁻³ for Carrière HW and 1.10⁻³ for Balé HW) (Fig. 2).

Between Balé and Carrière stations, in LW, only GPOM underwent a modification in its isotopic composition with an impoverishment in ¹³C and ¹⁵N but we did not have not enough replicates to test the significance of this (Table 1).

At the Carrière station, FPOM, GPOM and epixylon showed significant isotopic shifts between LW and HW although the directions of the shifts depended on the carbon sources (Table 2). In HW, FPOM was enriched in ¹⁵N (U-test p-value=5.10⁻²) and impoverished in ¹³C (U-test p-value=5.10⁻²) while larger POM was only impoverished in ¹³C (U test p-value=3.10⁻²). Epixylon showed also a shift toward higher δ¹⁵N (+4.3‰) but not enough samples were available to test the significance of this. By the flooding of the margins, periphyton developed on the submerged grass of the littoral zone. This littoral periphyton was enriched in ¹⁵N and ¹³C compared to the epixylon, but we did not have enough samples to test the significance of this (Table 1).

In HW, when comparing the two stations, GPOM and littoral biofilm showed similar isotopic ratios between the two stations while FPOM and epixylon had different signatures. At the Balé station, FPOM was impoverished in ^{15}N (U-test p-values= 5.10^{-2}) and the epixylon was impoverished in ^{15}N (U-test p value= 3.10^{-2}) and enriched in ^{13}C (U-test p-value = 3.10^{-3}).

The most impoverished potential carbon source was the benthic one (Table 1). The Chironomids' mean isotopic value was $-34.7 (\pm 13.7)\text{‰}$. Intra species variability indicated that more than one carbon source was exploited by the macrobenthos. Two samples, collected in the deepest part of the lake, exhibited very low isotopic values, both in $\delta^{13}\text{C}$ and in $\delta^{15}\text{N}$ (-51.9‰ ; -5.6‰) and (-43.0 ; -3.1‰) while the sample collected on the major bed had $\delta^{13}\text{C}$ values compatible with pelagic or littoral carbon exploitation (respectively (-27.5‰ ; 2.1‰) and (-16.4‰ ; 6.2‰) in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$). Benthic production may be supported by different carbon sources and presented high variability. To conclude, most of the potential carbon sources did not overlap and were distinguishable along a $\delta^{13}\text{C}$ gradient (Fig. 2). The benthic sources had the lowest and most variable $\delta^{13}\text{C}$ values. Depending on the station and seasons, FPOM and epixylon ranged between -28.1 and -23.8‰ . While epixylon and FPOM were not distinguishable by their $\delta^{13}\text{C}$ values in any sample, GPOM had, in all cases, a higher $\delta^{13}\text{C}$. Littoral periphyton, when present, had a higher $\delta^{13}\text{C}$ value than the pelagic sources. The most ^{13}C -enriched potential carbon source was the surrounding terrestrial C_4 plants (Fig. 2).

FOOD WEB STRUCTURE

$\delta^{13}\text{C}$ distributions and exploitation of carbon sources

At the Carrière station at LW, the distribution of the $\delta^{13}\text{C}$ of the seven fish species was centred around -23‰ and dissymmetric toward more positive values (SC = 1.40) (Fig. 3a). 55% of the fish species matched the FPOM or epixylic $\delta^{13}\text{C}$ (Fig. 3a). 10% ranged between the pelagic and benthic $\delta^{13}\text{C}$. 10% of the species, exclusively represented by *T. zillii*, matched the C_4 plants $\delta^{13}\text{C}$. The rest of the species, ranging between pelagic and terrestrial $\delta^{13}\text{C}$, may exploit GPOM or a mix of pelagic and terrestrial carbon. In that case, $\delta^{13}\text{C}$ did not allow to choose between these two potentialities. Some of the species exploited exclusively one carbon source, such as *A. occidentalis* and *H. forskalii* which relied exclusively upon pelagic carbon. Other species had $\delta^{13}\text{C}$ that suggested the use of a mix of two carbon sources: *H. membranaceus* and *C. nigrodigitalus* showed $\delta^{13}\text{C}$ ranging between the benthic and the pelagic $\delta^{13}\text{C}$, and *T. zillii* between pelagic and terrestrial $\delta^{13}\text{C}$. *L. senegalensis* individuals were distributed into three non contiguous classes, that could suggest a trophic specialization of some individuals in this species.

At the Balé station, at LW, the $\delta^{13}\text{C}$ distribution was symmetric (SC=0.56) and centred around -22‰ (Fig. 3b). 70% of the species matched a pelagic $\delta^{13}\text{C}$. Less than 3% may rely upon allochthonous resources. Compared to the Carrière station, allochthonous resources were under consumed to the detriment

of benthic ones. *S. mystus* and *L. senegalensis* relied exclusively upon pelagic carbon, while *T. zillii* consumed a mix of pelagic and terrestrial carbon. Others species ranged between benthic and pelagic values.

In Carrière at HW, the $\delta^{13}\text{C}$ distribution was unimodal and centred around -24‰ , while FPOM had a $\delta^{13}\text{C}$ value closed to -28‰ (Fig. 3c). Apparently, 40% of the species matched the GPOM $\delta^{13}\text{C}$ and nearly no species matched the FPOM $\delta^{13}\text{C}$. The distribution is dissymmetric toward higher $\delta^{13}\text{C}$ (SC=1.33) illustrating the exploitation of littoral and terrestrial carbon instead of pelagic carbon. 40% of the species ranged between the pelagic and littoral $\delta^{13}\text{C}$. No species matched strictly the $\delta^{13}\text{C}$ of C_4 plants (Fig. 3. c). As in LW, *H. membranaceus* and *C. nigrodigitalus* relied upon benthic carbon sources. *A. occidentalis*, *H. forskalii* and *S. mystus* relied upon the same carbon source, apparently GPOM. *L. senegalensis* would exploit exclusively the littoral biofilm and *T. zillii* would consume a mix of terrestrial plants and littoral biofilm. *C. nigrodigitalus* had a noncontiguous distribution and some individuals would exploit benthic carbon while others relied upon littoral and terrestrial carbon sources.

At HW at the Balé station, the distribution was bimodal (Fig. 3d), suggesting that only pelagic and terrestrial carbon were consumed. All of the species were therefore pelagic consumers, except for *T. zillii* which relied exclusively upon allochthonous carbon. Benthic and periphytic carbon were not consumed by the studied species.

Trophic levels

At Carrière at LW, the $\delta^{15}\text{N}$ distribution was clearly trimodal and ranged over a 7‰ span (Fig. 4a). The first group (25% of fish species), composed of *L. senegalensis* and *T. zillii*, was centred around 7‰ , the second one (55%), composed of *C. nigrodigitalus*, *A. occidentalis*, *S. mystus* and *H. membranaceus*, was centred around 9.5‰ , and the last one (20%) exclusively composed of *H. forskalii*, was centred around 11.5‰ . The species were mostly distributed in three or four adjoining classes. This distribution clearly signified three trophic levels in the trophic chain exploiting pelagic production.

In Balé at LW, the $\delta^{15}\text{N}$ distribution was also trimodal (Fig. 4b) but covered a shorter range (6‰). Several species (*A. occidentalis*, *C. nigrodigitalus*, *H. membranaceus*, *H. forskalii* and *T. zillii*) were distributed in unconnected classes and trophic levels were not as clear as at the Carrière station.

In HW at the Carrière station, no structure could be noticed in the $\delta^{15}\text{N}$ distribution (Fig. 4c). Compared to LW, $\delta^{15}\text{N}$ values covered a shorter span (5.5‰). Most of the species' individuals were distributed in one or two contiguous classes (except *C. nigrodigitalus* and *T. zillii*). At the Balé station at HW, the distribution was quite similar (Fig. 4d). $\delta^{15}\text{N}$ values covered a still shorter span (5‰) and the distribution of any single species was restricted to two classes.

TROPIC RELATIONSHIPS OF THE SAMPLED TAXA.

Taxa sampled, sample sizes and isotopic ratios obtained at all stations and seasons were summarized in Table 1.

Trophic relationships in Carrière at LW.

For the complete $\delta^{13}\text{C}^*\delta^{15}\text{N}$ image of the station (Fig. 5. a), numerous taxa matched the $\delta^{13}\text{C}$ of FPOM, with a gradual enrichment in ^{15}N . The most impoverished in ^{15}N were cladocerans and *S. galileus*, then *Pellonula* and *S. schall*, and the most enriched in ^{15}N are *H. fasciatus* and *H. forskalii*. On the contrary, no species matched the largest POM $\delta^{13}\text{C}$.

$\delta^{13}\text{C}$ of *C. citharus* was significantly less than in pelagic primary producers (U-test, $p=0.04$, unilateral). Some fish species showed a wide range of $\delta^{13}\text{C}$, flanked by potential carbon sources $\delta^{13}\text{C}$ (*H. membranaceus*, *C. nigrodigitalus*, *L. senegalensis* and *T. zili*). Dispersions of *H. membranaceus* and *C. nigrodigitalus* $\delta^{13}\text{C}$ were flanked by fine POM and epixylic $\delta^{13}\text{C}$ and deep carbon $\delta^{13}\text{C}$. They were enriched with ^{15}N compared to those potential carbon sources. The dispersion of $\delta^{13}\text{C}$ in *L. senegalensis* is flanked by deep carbon and allochthonous $\delta^{13}\text{C}$, and enriched with ^{15}N compared to those potential carbon sources. *T. zili* showed large dispersion both in $\delta^{13}\text{C}$ and in $\delta^{15}\text{N}$. *T. zili* $\delta^{13}\text{C}$ ranges between fine POM and epixylon $\delta^{13}\text{C}$ and allochthonous $\delta^{13}\text{C}$. $\delta^{15}\text{N}$ in *T. zili* are higher than that in potential carbon sources.

Comparison of isotopic positions of taxa between low and high water situations at the Carrière sampling station.

As said before, FPOM was enriched with ^{15}N and impoverished in ^{13}C compared to LW. GPOM was only ^{13}C impoverished and epixylon enriched in ^{15}N . Numerous taxa showed significant isotopic shifts (Table 2). *Pellonula* was the only taxa in which isotopic shift matched that of the fine POM (Fig. 5. b). *H. fasciatus*, *H. forskalii*, *S. galileus*, *S. mystus* and *T. zili* were impoverished in ^{13}C in HW situation, as were FPOM and GPOM and *Pellonula*, but they did not show the same ^{15}N enrichment as FPOM and *Pellonula* (Fig. 5. b). On the contrary, some of these taxa had significantly lower $\delta^{15}\text{N}$ at high water (*H. forskalii*, *S. mystus* and *S. schall*). For *H. forskalii*, the HW sample was composed of significantly smaller individuals (U-test, $p=6.10^{-4}$, unilateral) than those from the LW sample. For *S. mystus* and *S. schall*, the mean length of individuals in the LW and HW samples were similar (U-tests, $p=0.07$ and $p=0.92$, bilateral).

$\delta^{15}\text{N}$ in *C. nigrodigitalus* and *H. membranaceus* was also lower in HW situation (Table 2). While their mean $\delta^{13}\text{C}$ was similar between the two seasons, their $\delta^{13}\text{C}$ dispersion changed significantly. It was narrower for *H. membranaceus* and wider for *C. nigrodigitalus*. The wider dispersion of *C. nigrodigitalus* was not related to a difference in individual lengths dispersion between the LW and HW samples (F-test, $p=0.19$). *C. citharus*, *L. senegalensis* and *A. occidentalis* had similar isotopic positions between the two seasons but showed narrower dispersions in high water period (Fig. 5.b, Table 2).

Comparison of isotopic positions of taxa between Carrière and Balé stations, LW period.

In LW situation, only GPOM had significant isotopic shift with an impoverishment in ^{13}C and ^{15}N . At the global $\delta^{13}\text{C}*\delta^{15}\text{N}$ image scale (Fig. 5.c), *T. ziliu* and *L. senegalensis* were the only taxa to show significant $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ shifts (Table 3). *T. ziliu* was significantly impoverished in ^{13}C and enriched in ^{15}N at the Balé station, while *L. senegalensis* was enriched both in ^{13}C and ^{15}N . *T. ziliu* $\delta^{13}\text{C}$ dispersion was wide in the two stations while the *L. senegalensis* dispersion was narrower at the Balé station (Table 3).

H. forskalii and *S. mystus* showed small but significant enrichment in ^{15}N at the Balé site. *H. forskalii* mean length was similar between the two samples (U-test $p=0.47$) while *S. mystus* individuals were significantly larger in the Balé samples (U-test, $p=3.10^{-5}$).

H. membranaceus individuals $\delta^{13}\text{C}$ were more dispersed in the Carrière station, while their mean $\delta^{13}\text{C}$ position was similar between the two stations (Fig. 5. c).

All the other taxa had similar positions and dispersions between the two sites at low water level (Table 3, Fig 5.c).

Comparison of isotopic positions of taxa between Carrière and Balé stations, HW period

In spite of the isotopic differences of carbon sources, most fish taxa in the global $\delta^{13}\text{C}*\delta^{15}\text{N}$ image held similar isotopic positions at both sites (Fig. 5d, Table 4). *H. membranaceus* and *S. mystus* showed a slight ^{13}C enrichment, with significant differences in ^{13}C dispersion. *H. membranaceus* $\delta^{13}\text{C}$ dispersion was narrower at the Balé site while *S. mystus*' one was larger at this site. *C. nigrodigitatus* had also significant $\delta^{15}\text{N}$ shift toward higher values, with a lower dispersion of $\delta^{13}\text{C}$ (Fig. 5. a, Table 4).

DISCUSSION

FOOD WEB MODEL AT THE CARRIÈRE SITE OF THE SÉLINGUÉ RESERVOIR, LW PERIOD

The food web at the Carrière sampling station was fuelled by several carbon sources. FPOM and epixylon showed similar signatures and their consumption could not be distinguished on a stable isotope basis. Nevertheless, the larger POM was distinctly enriched with ^{13}C . Large POM was mainly constituted of large and filamentous algae (*Mougeotia* spp. and cyanobacteria, Dufour. P. unpublished data, 2000). No observation was performed on FPOM but its $\delta^{13}\text{C}$ was typical of tropical phytoplanktonic material (-30 to -10‰, (Gu and Schelske 1996)). A large contribution of terrestrial carbon (mainly C_4 plants) to the POM would have been noticeable by higher $\delta^{13}\text{C}$ and would have buffered the seasonal $\delta^{13}\text{C}$ variations. It seems therefore reasonable to conclude that FPOM was essentially composed of small phytoplankton species. In this reservoir, two diatoms, *Aulacosira* spp. and *Melosira varianse* represent about 80% of the algal biomass of the < 50 μm size class (Dufour unpublished data 2000). The observed significant differences in size class POM $\delta^{13}\text{C}$ may be the result of different fractionation rates during photosynthesis. Large algae were shown to have in some cases a lower fractionation rate than smaller ones, due to lower DIC turnover at the boundary layer (Goericke *et al.* 1994). Consequently, a preferential consumption by fish species of a POM

size-class can be discriminated. As the surrounding vegetation is composed mainly of C₄ plants, consumption of allochthonous carbon was also detectable in the tropical lake, contrary to most temperate lakes where phytoplankton and allochthonous carbon (mainly C₃ plants) show overlapping $\delta^{13}\text{C}$ (France 1996a). Although some chironomid samples had isotopic ratios characteristic of an FPOM based diet, others showed the very low $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ typical of a diet based on methanotrophic bacteria in anoxic sediment (Kiyashko *et al.* 2001; Bastviken *et al.* 2003; Grey *et al.* 2004). This recycling in the anoxic sediment may be considered as a potential source of secondary carbon.

In LW situation, FPOM and/or epixylon supported most of the food web (Fig. 6. a).

Cladocerans were less than 3‰ enriched compared to FPOM or epixylon $\delta^{15}\text{N}$. The lake fly *Chaoborus*, which is a predatory species of zooplankton, had the same isotopic composition as *S. galilaeus* and *L. senegalensis*. However, *S. galilaeus* and *S. senegalensis* are usually described as primary consumers (Lévêque *et al.*, 1988). Consequently, some taxa at the base of the pelagic food chain, while belonging to different trophic levels, had confounded $\delta^{15}\text{N}$. Time delays in integration for the different taxa may be evoked. FPOM and epixylon may show rapid variations in their $\delta^{15}\text{N}$ that are quickly integrated in zooplankton. Fish isotopic ratios have a high inertia that slows the isotopic signal integration.

FPOM and epixylon were the carbon sources fuelling the food chain composed of *L. senegalensis*, *S. galilaeus*, *A. occidentalis*, *Pellonula*, *S. mystus* and *S. schall* until *H. fasciatus* and *H. forskalii* (Fig. 6. a). *H. forskalii* and *H. fasciatus* have the highest $\delta^{15}\text{N}$, which is consistent with their ichthyophagous feeding habits (Lévêque *et al.*, 1988). However, their isotopic position is consistent with predation on small zooplanktivore species, such as *Pellonulla* and all fish juveniles, but excluded consumption of mature fish. *C. citbarinus* showed a $\delta^{13}\text{C}$ that apparently excluded the consumption of any of the sampled sources. *C. citbarinus* is usually described as a grazer of superficial biofilm (Lévêque *et al.* 1988). Epixylon was sampled only a few centimetres under the surface, but, as the DIC $\delta^{13}\text{C}$ usually decreases with depth (Quay *et al.* 1986), deeper epixylon may be impoverished in ^{13}C . The apparent impoverishment of *C. citbarinus* and the dispersion may therefore be the consequence of epixylon grazing at greater depths.

If FPOM and epixylon supported most of the fish production, carbon from C₄ plants contributed to the carbon consumption in the lake. Between the pelagic and C₄-plant point sources were *S. mystus*, *T. zillii* and *L. senegalensis* that relied for different proportion upon the two sources. *T. zillii* is the taxa that relies the most upon C₄-plant carbon. We had no estimates for C₄ plants $\delta^{15}\text{N}$ and *T. zillii* $\delta^{15}\text{N}$ dispersion was broad. Consequently, it is difficult to conclude about the form of C₄ carbon *T. zillii* consumed. It may be plants, or animal and human detritus. In any case, $\delta^{13}\text{C}$ dispersion was not linked to fish length, so, no ontogenic shift could be pointed out. Alternative use of carbon sources was the result of opportunistic feeding behaviour. Benthic consumption was also noticeable. *H. membranaceus* and *C. nigrodigitatus* showed an impoverished ^{13}C ratio and a wide dispersion that may be due to the consumption of benthic organisms, with a part of their carbon supply arising out of methanogenetic recycling (Fig. 6. a).

Fish $\delta^{15}\text{N}$ distribution showed three distinct groups. As most of the fish relied upon pelagic production, the food web linking the seven common fish species was a fairly linear three level food chain. Fish species' $\delta^{15}\text{N}$ did not split between two categories which means that omnivory was rare.

CARBON FLOWS MODIFICATIONS AT HIGH WATER PERIOD.

Isotopic shifts of carbon sources

POM of all fraction size showed a significant ^{13}C impoverishment between low and high water periods. As this ^{13}C shift was integrated into the pelagic consumers, it may have been progressive and regular over the flood period. As it was also observed at the Balé station, it may result from a large-scale effect. The $\delta^{13}\text{C}$ of phytoplankton depends on the specific composition of the community, the $\delta^{13}\text{C}$ of the dissolved inorganic carbon (DIC) and the primary production (Takahashi *et al.* 1990; Goericke *et al.* 1994; Raven *et al.* 1994).

There are no major changes in the algal community of the Sélingué reservoir over a year (Dufour unpublished data, 2000). If the shift resulted from a DIC $\delta^{13}\text{C}$ shift, it should have affected also the epixylic $\delta^{13}\text{C}$, which is not what was observed. On the other hand, Arfi (2003) categorized the Sélingué reservoir, from criteria based on chlorophyll *a* measures over the year 2000, as mesotrophic at LW period and oligotrophic at high water period. There are consequently changes in primary production with the hydrological seasons that may result in the pelagic $\delta^{13}\text{C}$ modification.

FPOM and epixylon showed a ^{15}N enrichment while large POM retained a similar $\delta^{15}\text{N}$ between the two seasons in the Carrière station. Primary producers' $\delta^{15}\text{N}$ arises from N inorganic source and productivity. If productivity was the main cause of $\delta^{15}\text{N}$ changes, it would have acted in the opposite way. The two size fractions POM may use different sources of Inorganic Nitrogen. A part of the larger POM was composed of cyanobacteria (Dufour, unpublished data, 2000) that may rely more upon atmospheric N_2 , which could explain the $\delta^{15}\text{N}$ differences. DIN consumed by FPOM and epixylon may undergo strong $\delta^{15}\text{N}$ modifications. In the pelagic food chain, *Pellonula* was the only fish species to match the isotopic shift. *Pellonula* was also the fish species with the highest muscle turnover as it is an annual species. The integration of isotopic modification required a delay, depending on the trophic level, that has already been mentioned (O'reilly and Hecky 2002) in a stable isotopic study for an African lake food web. The more plausible explanation would be that the DIN isotopic shift occurred a short time before the sampling period and may have been too recent for integration in slow-growing fish species. Moreover, FPOM did not show the same $\delta^{15}\text{N}$ isotopic shift at the Balé station at high water level as at the Carrière station, which implies that the ^{15}N variation resulted from a local-scale cause. In the reservoir, high concentrations are observed during shallow conditions, from April to June, when the hypolimnion is anoxic. The consumption of this recycled DIN by primary producers may result in the pelagic taxa $\delta^{15}\text{N}$ observed in the LW period. Both tributaries carry water characterized by a low mineral load. However, the tributaries DIN $\delta^{15}\text{N}$ may differ from the reservoir DIN $\delta^{15}\text{N}$. During the flood, the reservoir's nutrients are diluted by the tributaries inputs by up to

3 to 4 times (Arfi 2003). The large contribution of the Sankarani waters in the flood may be reflected in the $\delta^{15}\text{N}$ isotopic shift.

Only the fine POM $\delta^{13}\text{C}$ shift may be integrated for a part in the food web while $\delta^{15}\text{N}$ shift was too recent to be recorded in slow growing fish muscle.

Food web modifications

According to the $\delta^{13}\text{C}$ distribution, fish relied less upon pelagic production and allochthonous carbon but exploited the newly formed periphytic carbon in HW. According to the $\delta^{15}\text{N}$ distribution, the food chain length was shorter and the trophic levels were not distinguishable. Consequently, the HW Carrière food web was most intricate while piscivory was less common than in LW.

The study of the $\delta^{13}\text{C}*\delta^{15}\text{N}$ image confirmed this. Under the hypothesis of a recent $\delta^{15}\text{N}$ modification, *C. citbarinus* and *A. occidentalis*, both of which kept similar mean ^{13}C positions between the two seasons, still relied on epixylon, the only autochthonous carbon that showed similar $\delta^{13}\text{C}$ between the two seasons. Moreover, POM ^{13}C impoverishment was followed by *T. zili*, *S. galilaens* and *H. fasciatus* that consequently have kept the same carbon source, POM, in low and high water period. As *T. zili* $\delta^{15}\text{N}$ dispersion was lower at high water level, it may suggest that *T. zili* was less omnivorous and more of a primary consumer in that period. *H. forskalii*, *S. mystus* and *S. schall* showed ^{15}N impoverishment incompatible with POM exploitation. In the case of *H. forskalii*, the HW sample constituted smaller individuals than the LW one. As smaller individuals may feed upon smaller and lower prey in the food web, difference in the mean length between the two samples may be responsible for the observed ^{15}N drop. *H. forskalii* may keep its carbon source between the two seasons. For *S. mystus* and *S. schall*, mean lengths of individuals in the samples are similar. In LW situation, those species were described as consumers of pelagic and benthic invertebrates. The ^{15}N drop suggested that they relied more upon deep carbon. *H. membranaceus*, *C. nigrodigitatus* and *L. senegalensis* showed differences in their isotopic dispersion between low and high waters. *C. nigrodigitatus* $\delta^{13}\text{C}$ was more dispersed in HW period. Its $\delta^{13}\text{C}$ distribution, in three unconnected classes implied that some individuals had a benthic diet while others relied upon littoral carbon. Those populations were distinct and the consumers of littoral carbon could come from the part of the reservoir upstream. On the contrary, *L. senegalensis* and *H. membranaceus* $\delta^{13}\text{C}$ were less dispersed in HW situations. For *H. membranaceus*, this may be explained by a higher consumption of zooplankton. For *L. senegalensis*, as its mean isotopic position was also similar between the two seasons, it may be compatible with a heavy consumption of periphyton from tidal grass. This was confirmed by its distribution (fig 3 c).

To conclude, in HW period at Carrière, both carbon sources and food web structure were modified. The carbon supply to the sampled taxa was less provided by pelagic primary production (Fine POM) and more by alternative resources such as deep carbon, or littoral periphyton (Fig. 6. b). Moreover, littoral carbon became a significant contributor to *L. senegalensis* and *T. zili* and some individuals of *C. nigrodigitatus* in HW situation, that shifted respectively from pelagic or allochthonous carbon towards the littoral biofilm. Omnivory is frequent and prey-predator relationships are weaker. However, piscivorous

fishes did not benefit from those supplementary carbon sources. *H. forskalii* and *H. fasciatus* still relied on pelagic production in HW situations (Fig. 6. b).

INTER-STATION VARIATIONS IN THE TROPHIC RELATIONSHIPS

Variations of the trophic relationships were observed between the two sites, Carrière and Balé. In LW situations, most of the fish species (70 to 85%) relied upon pelagic production (epixylon and fine POM). However, alternative carbon was provided mainly by benthic consumption in low water situation, while it is provided by allochthonous carbon in high water situations. When the isotopic positions are studied individually, the differences of the carbon exploitation may be attributed to three of the fish species sampled, *C. nigrodigitalus*, *H. membranaceus* and *T. zillii*. In LW situations, *C. nigrodigitalus* and *H. membranaceus* had $\delta^{13}\text{C}$ positions dispersed between the benthic and the pelagic $\delta^{13}\text{C}$, showing the exploitation of benthic carbon. *T. zillii* was essentially pelagic and the allochthonous consumption was very much reduced. In HW situations, their $\delta^{13}\text{C}$ showed an exclusive consumption of pelagic carbon, probably through epixylic invertebrates or zooplankton while *T. zillii* relied exclusively upon allochthonous carbon (Fig. 6. c and d).

CARBON SOURCES AND TROPHIC STRUCTURE.

Between stations and between seasons, noticeable differences in carbon source exploitation and trophic structure were pointed out. Between stations, food webs are quite similar both in low and high water periods (Fig. 6.). Food web differences are essentially due to the availability of carbon sources. At Balé, the shores are steeper and the area flooded is restricted. Macrophytes and periphyton are consequently less abundant at that station, which may explain that omnivorous and opportunistic feeders (*T. zillii*) rely less upon allochthonous resources. Foodweb changes are more distinguishable between seasons than between stations (Fig. 6.). Diversity in available carbon sources was higher in HW period than in LW period. In several floodplain studies, spectrum of carbon sources exploited by fishes are larger in high water (Winemiller et Jepsen 1998, Wantzen *et al.*, 2002). In our study, the variety of carbon sources exploited was different but not more extensive between the two hydrological seasons. In LW situations, fish production relies essentially upon phytoplankton and epixylon biomass with substantial consumption of benthic and C_4 plants' carbon. In HW situations, littoral and allochthonous carbon are selected by some species at the cost of benthic or pelagic carbon (*L. senegalensis*, *T. zillii*, *C. nigrodigitalus*, *S. mystus*). However, others species, especially piscivorous ones like *H. forskalii* or *H. fasciatus*, did not benefit from those more diverse carbon sources as they relied essentially upon *Pellonula*, a forage-fish very abundant in the Sélingué reservoir. Food web structure was also altered by the hydrological phase. While the three trophic levels were distinct in LW situations in the pelagic food chain of the two stations, trophic levels were confounded in HW situations. In the LW study, the food web could be reduced to a 3-level food chain relying nearly exclusively upon pelagic production (Fig. 6 a and c). Because the reservoir volume was ten times smaller in LW, refuges were poor and fish densities high. According to the $\delta^{15}\text{N}$ distribution, prey-predator interactions were strong and carnivory and specialization were high (Winemiller et Jepsen 1998, Wantzen *et al.*, 2002). In high water

situation in Sélingué, the food chain was shorter and omnivory higher (Fig. 6. b and d). The food web was more complex for primary and secondary consumers. Fish densities and competition were less important; refuges are more numerous and some fish move to the areas of flooded grass. Prey-predator interactions were weaker (Winemiller and Jepsen 1998; Wantzen *et al.* 2002).

To conclude, the organic matter flow in the Sélingué reservoir underwent marked seasonal modifications due to changes in the diversity and availability of carbon sources. The allochthonous contribution to fish carbon acquisition was significant in low and high water periods, especially at the Carrière station. Carrière village is the largest village directly on the Sélingué reservoir shore. Consequently, this C₄-derived carbon integrated in the Carrière food web via *T. zillii* consumption may have been introduced as plants or animal detritus, or even human waste.

Flooding of the lake margins at high water period contributed to change food webs, more by providing a larger surface for development of biofilm than by increasing terrestrial carbon input. Among the fish species collected, three had a very flexible feeding behaviour and exploited carbon from the flooded margins. If the other species, especially piscivorous such as *H. forskalii* or *H. fasciatus*, do not benefit from this littoral carbon, they may use those margins for reproduction or as a nursery (Winemiller and Jepsen 1998) as illustrated in African or South-American floodplains.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the UR RAP IRD for the field work and logistics, and especially J. Raffray, L. Tito de Morais, J. Panfili and J.J. Albaret. We thanks one more time J. J. Albaret, L. Tito de Morais and D. Paugy for their advisory reading and Dr Lebrun (Botanical Conservatory of Geneva) for its patience and help in plant identifications. This work was supported by the program FLAG “Algal efflorescence studies in tropical inland aquatic systems” of the UR 098 (IRD).

Table 1. Isotopic signatures and sample sizes of taxa at the Carrière and Balé stations at low and high water periods.

Taxa	Abrev.	Mean size (mm)	Carrière Low Water			Balé Low Water			Carrière High Water			Balé High Water		
			$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	n	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	n	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	n	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	n
<i>Auchenoglanis occidentalis</i>	Ao	280	-22.8 (±1.2)	8.6 (±0.4)	7	-22.4 (±1.1)	8.5 (±0.5)	10	-23.6 (±0.6)	8.4 (±0.2)	4	-23.1 (±0.2)	8.4 (±0.1)	3
<i>Citharinus citharus</i>	Cc	332	-27.0 (±1.1)	5.7 (±0.2)	5	-25.7 (±1.6)	8.3 (±0.5)	5	-25.1 (±0.6)	6.5 (±0.1)	2			
<i>Chrysichthys nigrodigitatus</i>	Cn	233	-24.5 (±1.6)	9.3 (±0.7)	9	-25.8 (±2.3)	9.0 (±1.3)	7	-23.3 (±5.9)	7.5 (±1.0)	4	-23.2 (±1.3)	9.1 (±0.4)	4
<i>Hemicromis fasciatus</i>	Hmf	136	-21.8 (±1.7)	10.9 (±0.9)	10				-24.0 (±0.1)	11.0 (±0.1)	2	-23.5 (±1.0)	11.2 (±0.2)	4
<i>Hemisynodontis membranaceus</i>	Hm	235	-25.3 (±1.9)	8.9 (±0.8)	11	-24.5 (±1.0)	9.0 (±0.9)	10	-25.6 (±0.4)	9.8 (±0.3)	9	-24.2 (±0.2)	10.0 (±0.3)	7
<i>Hydrocynus forskalæii</i>	Hf	280	-22.7 (±0.93)	11.8 (±0.4)	11	-22.6 (±1.1)	12.1 (±1.1)	10	-24.5 (±0.6)	10.7 (±0.2)	7			
<i>Labeo senegalensis</i>	Ls	206	-22.6 (±2.2)	7.0 (±1.7)	8	-21.2 (±0.7)	7.9 (±0.5)	10	-21.3 (±1.1)	6.7 (±0.2)	9	-21.8 (±0.3)	6.8 (±0.2)	2
<i>Sarotherodon galilæus</i>	Sg	218	-21.7 (±0.7)	7.2 (±0.4)	13				-23.0 (±1.0)	7.2 (±0.2)	5			
<i>Schilbe mystus</i>	Sm	171	-21.5 (±1.1)	10.0 (±0.3)	18	-21.0 (±1.1)	10.3 (±0.4)	10	-23.5 (±0.8)	9.3 (±0.3)	10	-22.3 (±1.3)	9.5 (±0.5)	9
<i>Synodontis schall</i>	Ss	175	-21.6 (±1.3)	9.9 (±0.2)	3				-24.4 (±1.9)	8.7 (±0.8)	5			
<i>Tilapia zillii</i>		172	-15.1 (±2.0)	6.7 (±0.9)	9	-20.9 (±2.9)	9.0 (±2.2)	13	-17.2 (±0.8)	6.8 (±1.3)	4	-14.8 (±0.3)	7.3 (±0.3)	3
<i>Pelonulla spp</i>	P	53	-23.7 (±0.3)	8.2 (±0.5)	10				-25.9 (±0.9)	10.4 (0.31)	13			
POM < 50µm	FPOM		-23.8 (±0.4)	2.7 (±0.7)	3	-24.1	4.5	1	-28.1 (±0.8)	5.9 (±0.6)	4	-26.8 (±2.6)	3.9 (±0.5)	3
POM 85-50 µm	GPOM		-18.1 (±1.0)	6.0 (±0.6)	5	-20.9	5.9	1	-23.6	5.0	1	-21.9 (±1.7)	6.0 (±0.5)	2
Zooplankton	Zoo		-2.8 (±0.1)	4.8 (±0.1)	2									
Chaoborus	Chao		-23.0	7.0	1									
Epixylon	E		-25.0	1.5	1				-25.8	5.9	3	-23.8	2.81	3

Periphyton	Pph				(±0.0)	(±0.6)		(±0.3)	(±0.8)	
Chironomids	Chiro	-34.7	-0.1	5	-20.2	5.0	1	-19.9	4.6	1
		(±13.7)	(±4.6)							

Table 2. Differences in mean isotopic ratios and $\delta^{13}\text{C}$ SD between the low and high water periods at the Carrière station. $\Delta\delta^{13}\text{C}$ (‰) = $\delta^{13}\text{C}_{\text{HighWater}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{LowWater}}$; $\Delta\delta^{15}\text{N}$ (‰) = $\delta^{15}\text{N}_{\text{HighWater}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{LowWater}}$.

Taxa	$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (‰)	p (U-test)	$\Delta\delta^{15}\text{N}$ (‰)	p (U-test)	$\delta^{13}\text{C}$ SD LW	$\delta^{13}\text{C}$ SD HW	p (F-test)
<i>Ao</i>	-0.8	0.315	-0.2	0.527	1.34	0.36	0.155
<i>Cc</i>	1.9	0.095	0.7	0.095	1.23	0.36	0.387
<i>Cn</i>	1.2	0.939	-1.8	0.011	2.55	34.9	0.001
<i>Hmf</i>	-2.2	0.030	0.1	0.601	2.70	0.00	0.036
<i>Hm</i>	-0.3	0.095	0.9	0.002	3.59	0.17	0.000
<i>Hf</i>	-1.7	1.10 ⁻⁴	-1.0	6.10 ⁻⁴	0.87	0.38	0.167
<i>Ls</i>	1.3	0.962	-0.3	0.962	4.89	1.16	0.030
<i>Sg</i>	-1.3	0.009	-0.0	0.586	0.54	0.97	0.193
<i>Sm</i>	-2.0	2.10 ⁻⁴	-0.6	1.10 ⁻⁴	1.27	0.67	0.165
<i>Ss</i>	-2.7	0.071	-1.2	0.035	1.64	3.52	0.342
<i>T_z</i>	-2.0	0.033	0.1	1.000	3.94	0.67	0.087
<i>P</i>	-2.2	0.038	2.2	0.019			
GPOM	-6.1	0.028	0.6	0.400			
FPOM	-4.4	0.057	3.1	0.057			

Table 3. Differences in mean isotopic ratios and $\delta^{13}\text{C}$ SD between the Carrière and the Balé stations at the low water period. $\Delta\delta^{13}\text{C}$ (‰) = $\delta^{13}\text{C}_{\text{Balé}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{Carrière}}$; $\Delta\delta^{15}\text{N}$ (‰) = $\delta^{15}\text{N}_{\text{Balé}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Carrière}}$.

Taxa	$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (‰)	p(U-test)	$\Delta\delta^{15}\text{N}$ (‰)	p(U-test)	$\delta^{13}\text{C}$ SD Balé	$\delta^{13}\text{C}$ SD Carrière	p (F-test)
<i>Ao</i>	0.4	0.525	-0.2	0.536	1.28	1.58	0.368
<i>Cc</i>	1.3	0.150	0.5	0.116	2.43	1.23	0.262
<i>Cn</i>	-1.3	0.368	-0.3	0.680	7.68	2.55	0.076
<i>Hm</i>	0.7	0.809	0.1	0.888	1.10	3.59	0.044
<i>Hf</i>	0.1	0.621	0.3	0.048	1.32	0.87	0.261
<i>Ls</i>	1.3	6.10 ⁻³	0.9	6.10 ⁻³	0.47	4.86	0.001
<i>Sm</i>	0.5	0.312	0.3	0.018	1.28	1.27	0.471
<i>T_z</i>	-5.7	2.10 ⁻⁴	2.3	2.10 ⁻³	8.51	3.94	0.140
GPOM	-2.3		-1.3				
FPOM	-0.3	1	1.7	0.5			

Table 4. Differences in mean isotopic ratios and $\delta^{13}\text{C}$ SD between the Carrière and the Balé stations at the high water period. $\Delta\delta^{13}\text{C}$ (‰) = $\delta^{13}\text{C}_{\text{Balé}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{Carrière}}$; $\Delta\delta^{15}\text{N}$ (‰) = $\delta^{15}\text{N}_{\text{Balé}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Carrière}}$.

Taxa	$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (‰)	p(U-test)	$\Delta\delta^{15}\text{N}$ (‰)	p(U-test)	$\delta^{13}\text{C}$ SD Balé	$\delta^{13}\text{C}$ SD Carrière	p (F-test)
<i>Ao</i>	0.5	0.400	-0.1	0.400	0.03	0.36	0.080
<i>Cn</i>	0.1	1.000	1.6	0.028	1.41	34.91	0.010
<i>Hmf</i>	0.6	0.800	0.2	0.533	1.07	0.01	0.005
<i>Hm</i>	1.4	2.10 ⁻⁴	0.2	0.184	0.03	0.17	0.030
<i>Ls</i>	-0.6	0.581	0.18	0.436	0.08	0.47	0.323
<i>Sm</i>	1.1	0.043	0.1	0.402	1.62	0.67	0.100
<i>Ss</i>	2.5	0.222		0.055	2.10	1.87	0.791
<i>T_z</i>	2.4	0.057	0.5	0.400	0.09	0.67	0.124
FPOM	1.3	0.626	-2.0	0.057			
E	1.98	0.003	-3.1	0.031			
Pph	0.29		-0.4				

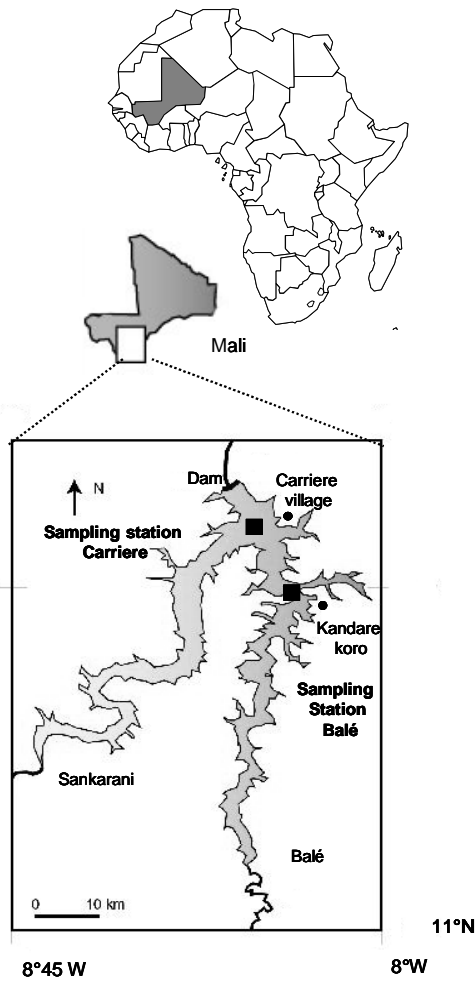


Figure 1. Map of Sélingué Reservoir. Black squares represent the sampling stations.

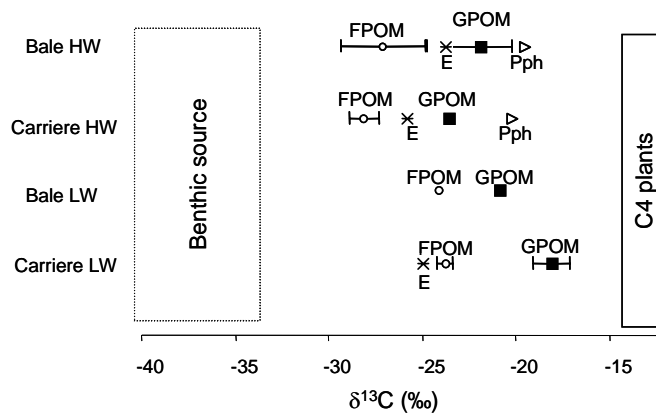


Figure 2. Diagram of the potential carbon sources $\delta^{13}C$ values of Carrière and Balé stations, at low and high water level. E: *Epiexylon*; FPOM: POM $<50 \mu m$; GPOM : POM $85-50 \mu m$; Pph: Periphyton

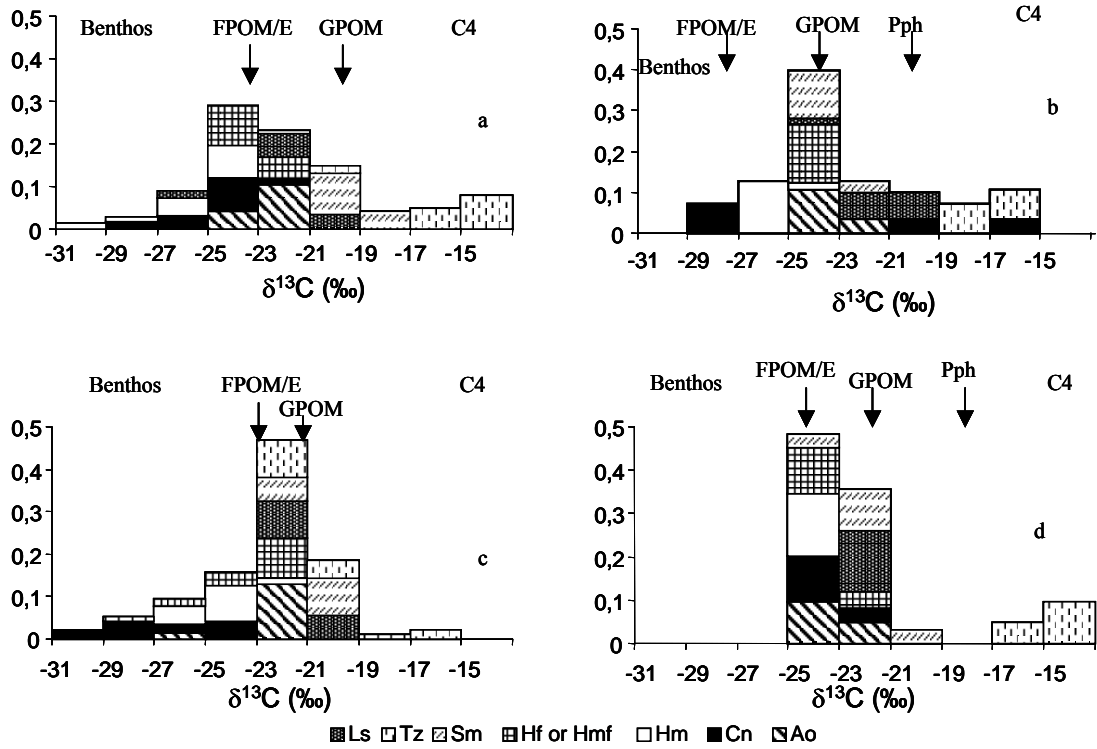


Figure 3. $\delta^{13}\text{C}$ distribution of the seven commonest fish species. a. Carrière station at low water level. b. Carrière station at high water level. c. Balé station at low water level. d. Balé station at high water level.

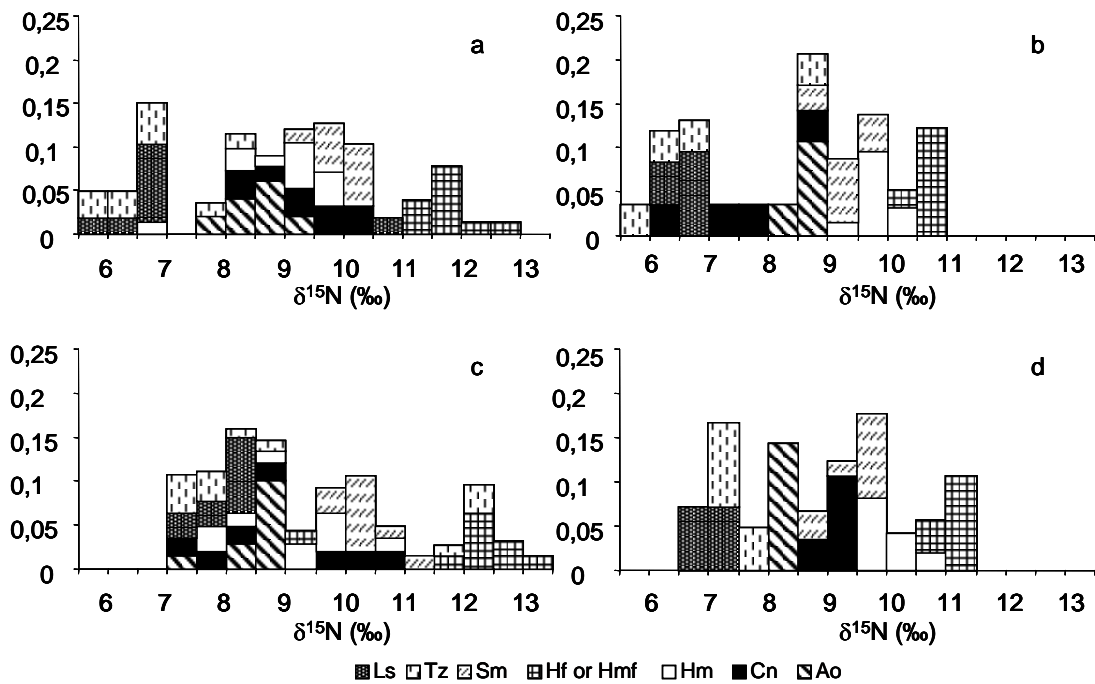


Figure 4. $\delta^{15}\text{N}$ distribution of the seven commonest fish species. a. Carrière station at low water level. b. Carrière station at high water level. c. Balé station at low water level. d. Balé station at high water level.

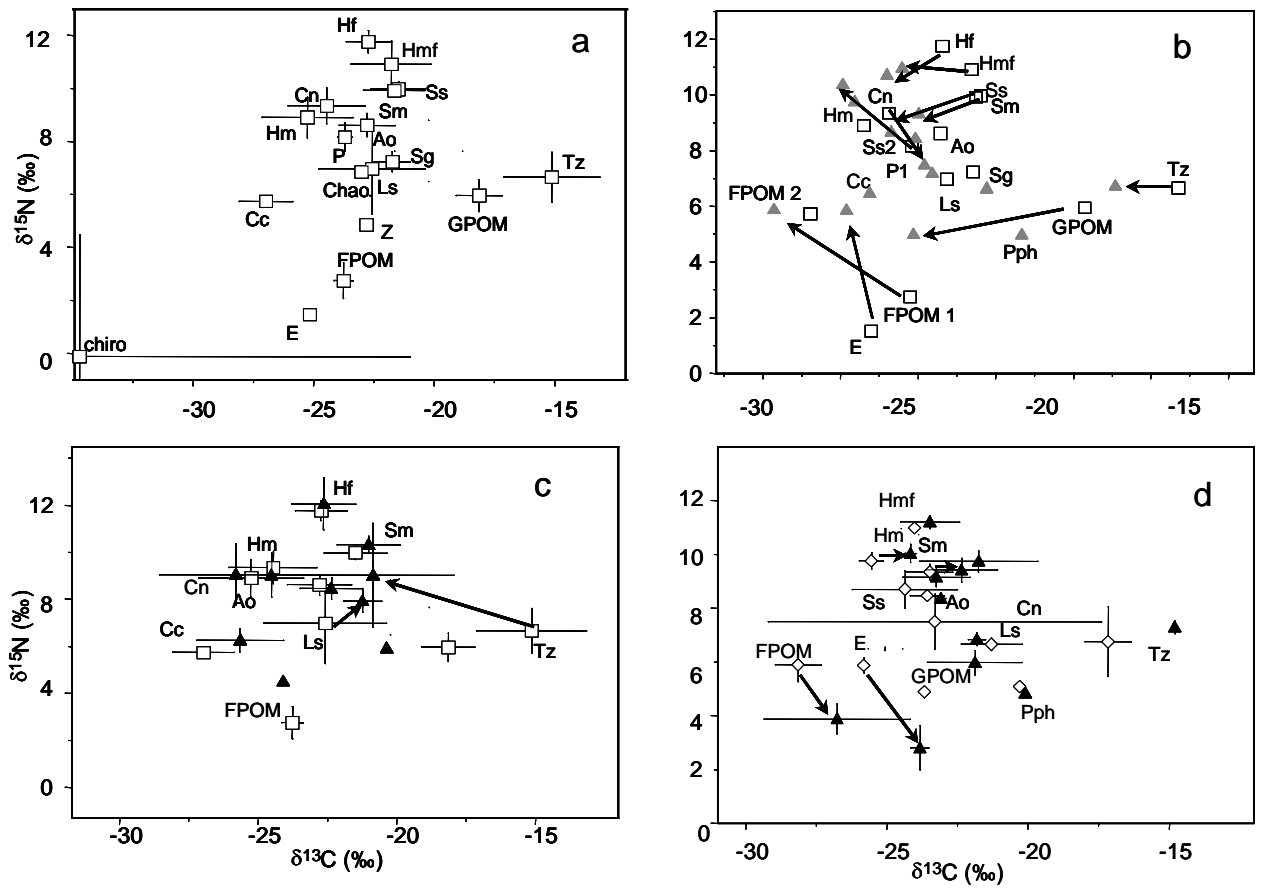


Figure 5. Isotopic positions and shifts of the sampled taxa in the $\delta^{13}\text{C} \cdot \delta^{15}\text{N}$ representation. a. Positions of taxa in the Carrière station at low water level. b. comparative diagram of the sampled taxa of the Carrière station at low (open squares) and high (closed triangles) water level. c. Comparative diagram of all the sampled taxa at Carrière (open squares) and Balé (closed triangles) stations at low water level. d. Comparative diagram of all the sampled taxa at Carrière (open lozenges) and Balé (closed triangles) stations at high water level.

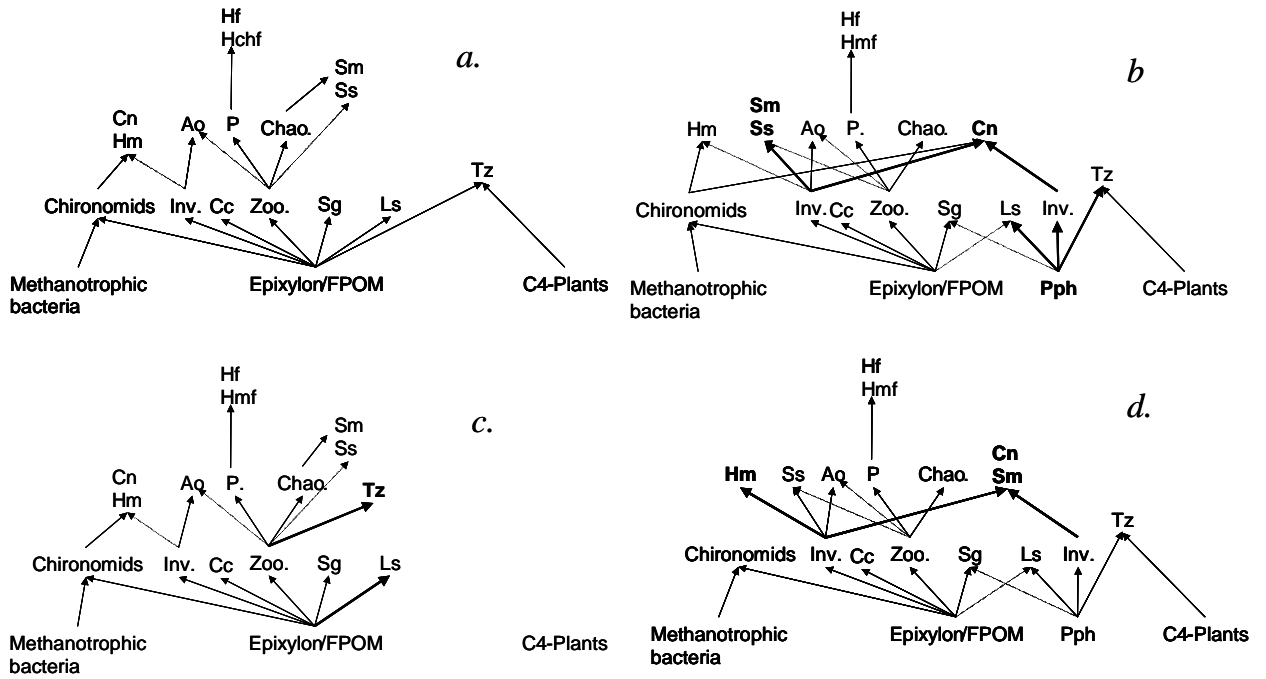


Figure 6. Hypothetical trophic relationships between the sampled taxa. a. Carrière station at low water period. b. Carrière station at high water period. c. Balé station at low water period. d. Balé station at high water period.



Article 7. Seasonal variations in fish $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in two West African reservoirs, Sélingué and Manantali (Mali): modifications of trophic links in relation to water level.

M.-E. PERGA, R. ARFI AND D. GERDEAUX

Soumis à STABLE ISOTOPES IN HEALTH AND ENVIRONMENTAL STUDIES

RUNNING TITLE : SEASONAL VARIATIONS IN FISH ISOTOPE COMPOSITION

ABSTRACT

Most regions in the tropics undergo high seasonal precipitation that produces cyclic patterns of riverine discharge. Tropical rivers and reservoirs are thus subject to a marked hydrologic seasonality, resulting in periods of low and high water levels. Many chemical and biological factors are altered by this hydrologic seasonality and it therefore appeared very likely that food webs also change in low and high water levels. While available carbon sources for fish are scarce in low water periods, flooding of the minor bed in high water periods brings fish into contact with a greater abundance and diversity of food resources, such as terrestrial plants or biofilms that grow on submerged terrestrial plants. We at first assumed that fish would rely mainly on phytoplankton production in low water, while they may consume more diverse carbon sources in high water level. Moreover, fish densities are higher in low water level than in high water level and so we expected piscivory to be more significant in low water level than in high water level. These assumptions were tested by stable isotope analysis of the most common species in Sélingué and Manantali, two large reservoirs in Mali (West Africa). Stable isotope analysis was shown to be an adequate method to study trophic relationships in tropical reservoirs, where trophic plasticity and fish biodiversity are high. Contrary to our first assumption, carbon sources consumed by fish were not more diverse in high water but differed between low and high water levels, especially in the Sélingué reservoir. At high water period, some fish species shifted towards the newly formed periphytic carbon instead of the pelagic or allochthonous sources. As we expected, piscivory was higher in low water level than in high water level.

KEYWORDS: fish; trophic relationships, diet shift, tropical rivers, tropical reservoirs, high water, low water, stable isotope analysis, carbon sources, periphyton, trophic chain length.

INTRODUCTION

Most regions in the tropics undergo high seasonal precipitation that produces cyclic patterns of riverine discharge. Tropical rivers and reservoirs are thus subject to a marked hydrologic seasonality, associated with periods of low and high water levels. In tropical freshwater ecosystems, water level seasonality, more than temperature or day length, is the key factor that influences the functioning of the hydrosystem (Lowe-Mc Connell 1985). Lots of environmental factors vary with water level, including temperature, dissolved oxygen concentration, water velocity and nutrient concentration (Winemiller and Jepsen 1998; Jepsen and Winemiller 2002; Arfi 2003). Biological factors such as primary production, organic carbon contents and fish densities are also altered. While available carbon sources for fish are scarce in low water period, flooding of the minor bed in high water period brings fish into contact with a greater abundance and diversity of food resources, such as terrestrial plants or biofilms that grow on submerged terrestrial plants. The gradual drying of the minor bed causes fish densities (per unit surface area) to increase and species interactions to intensify as habitat is reduced and availability of resource declines (Winemiller and Jepsen 1998). Fish trophic relationships may then change with hydrological cycles (Winemiller and Jepsen 1998). As fish densities are high and carbon sources restricted to pelagic and benthic production in low water, we first assumed that food webs would principally rely upon phytoplankton carbon and therefore that piscivory would be high. In high water level, allochthonous and autochthonous carbon sources are more diversified and fish densities lower, so we assumed that many other carbon sources should be exploited and omnivory would be high. To test these assumptions, we performed Stable Isotope Analysis on the fish assemblages of two Malian reservoirs, Sélingué and Manantali (West Africa). Trophic diversification and plasticity are known to be higher in tropical fish assemblages than in temperate ones (Winemiller and Jepsen 1998). Significant changes in the carbon sources or food web structure of the fish assemblages would be reflected in modifications in fish stable isotope compositions. However, biodiversity is high in tropical systems. Sélingué and Manantali reservoirs shelter more than 40 fish species each. As an exhaustive study of the fish community was therefore not feasible, we selected, in each reservoir and for each survey, seven fish species among the most heavily fished. We assumed that if trophic relationships within the fish assemblages changed strongly between high and low water periods, then this should be reflected within the relative stable isotopic compositions of these seven species.

MATERIALS AND METHODS

STUDY SITES

Sélingué and Manantali reservoirs are located in the South-West part of Mali (Fig. 1). Sélingué reservoir was created in 1980 with the construction of a dam on the Sankarani River, a tributary of the Niger River. Manantali reservoir was built in 1987 on the Bafing river, a tributary of the Senegal. Both are used to provide to hydroelectricity and to control the consequences of the annual river flood. They are also very active fishing sites that provides Bamako, the capital of Mali, with fresh fish (Laë et

Weigel 1994). Sélingué reservoir is located a few kilometers downstream of the Balé-Sankarani confluence (11°38' N, 8°14' W) (Fig. 1). Its catchment area covers 34200 km², primarily made up of gently sloping, strongly weathered hills of metamorphic rocks and quartzite. The reservoir covers an area of 409 km² with a volume estimated to be $2.17 \cdot 10^9$ m³ at the highest water level. In this season, its maximum depth is 22 m, with a mean depth of 5.3 m. The range between the highest and the lowest water levels is 9 m. At the end of the low water period, the water volume ($0.24 \cdot 10^9$ m³) is ten times less than at the peak of the high water period. The flood reaches the reservoir at the end of July. After the flood, the water level remains high until January and then decreases slowly due to the combined effects of evaporation and water output until July (Anne *et al.* 1994; Arfi 2003). The shores of the reservoir consist of gentle slopes and are covered with typical savannah vegetation in low water season. Ancient gallery forest was not clear cut before the filling of the reservoir. Manantali reservoir (12°40' N, 10°08' W) covers an area of 475 km² and has a volume of $11 \cdot 10^9$ m³ at the highest water level. In high water season, its maximum depth is 53 m, with a mean depth of 23 m. The flood reaches the reservoir in September and the water level remains high until February-March. The range between the highest and the lowest water levels is 15 m. The catchment area of 27800 km² is located on the Manding plateau and made up of quartz and feldspath sandstone. The reservoir shoreline consist mainly of cliffs and in only few places are gentle slopes which are used by the local fishermen as landing points. Surrounding vegetation is typical savannah (Anne *et al.* 1994; Alhousseini 1999). In the area close to the dam, forest was clear-cut before the reservoir was filled. For each reservoir, a survey was conducted in low water season (LW, June 2002) and in high water season (HW, November 2002 for Sélingué and March 2003 for Manantali). Sites studied in both reservoirs were located in the deforested area close to the dam (Fig 1)

FISH SPECIES.

36 and 52 fish species were indexed respectively in Manantali and Sélingué. We then selected the seven most commonly caught fish species by local fishermen, as determined by the (Laë and Weigel 1994) surveys. The list of selected species appears in Tables I and II. For each fish species, an optimum sample consisted of 10 adult individuals bought from fishermen for each survey, in the Carrière village for Sélingué, in the Ouoncoglou village for Manantali. Fish length was measured and a fragment of dorsal muscle collected for isotope measurements.

CARBON SOURCES.

All the potential carbon sources available for fish were sampled. Particular Organic Matter (POM), epixylon on submerged trunks in the major bed (Sélingué), epilithon on the rocks (Manantali), sediment and periphyton on flooded terrestrial plants of the banks in HW period were potential carbon sources to sample. POM was collected in subsurface and 3 m above the bottom with a modified 7-litre Van Dorn bottle and samples were pooled. Water was then pre-filtered through 85

μm -mesh to remove the largest particles. POM size-fractions were separated on 50 μm -mesh filters to isolate large and filamentous algae (GPOM) from smaller ones (FPOM). Fractions of GPOM were preserved for optical analysis. Filtrate from the 50- μm filter was then filtered on glass microfibre filters (Whatman GF/F) until saturation of the filter (FPOM). Epixylon, epilithon and periphyton were sampled by hand. A part of the support (bark or plant) was placed in mineral water. Shaking for 2-min caused the biofilm to separate from its support. Rocks were scraped in mineral water. The water was then pre-filtered on 85 μm to remove larger particles and filtered on GF/F filters. Macrobenthos was collected to assess a time integrated isotopic signature of deep (sediment) carbon sources. Macrobenthos (*Chironomid* larvae) was sampled by an Eckman grab in the minor and major beds and maintained in mineral water for one night. Surrounding vegetation was collected and species were identified by Dr G. Lebrun, Botanical Conservatory of Geneva, Switzerland.

MEASUREMENTS OF STABLE ISOTOPIC COMPOSITIONS.

All samples intended for stable isotope analysis were dried at 60°C for 24 hours. Samples of 1 mg of finely ground muscle, zooplankton, benthos or POM or 10 mg of GF/F were weighed in 6 x 4 mm tin cups for CF-IRMS analysis using a Europa Scientific ANCA-NT 20-20 Stable Isotope Analyzer with a NCA-NT Solid/Liquid Preparation Module (PDZ Europa Ltd., Crewe, U. K). The analytical precision, estimated from 5 standards analyzed along with the samples, was 0.2 ‰. Working standards for analytical precision consisted of 1 mg leucine prepared by freeze-drying 50 ml of a 20 mg ml⁻¹ stock solution in tin cups, and calibrated against 'Europa flour' and IAEA standards N1 and N2. Standard for C is Pee Dee belemnite and standard for N is atmospheric nitrogen. Measurements were conducted by C. Scrimgeour at the Mylnefield Research Services, Dundee, Scotland.

C/N ratios were used to compare fish muscle fat contents between LW and HW.

DATA PROCESSING.

Differences of stable isotopic compositions were tested by non parametric mean comparisons (U-test, Mann-Whitney). In order to identify potential modifications in the food web structure between those seven common species, their $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ distributions were compared between seasons. However, species sample sizes were sometimes different and the shape of the distributions might depend on sample size. To avoid this bias, individual $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values were weighted prior to the distribution analysis. The weight attributed to each individual was equal to $10/n_i$ (with n_i being the sample size of the species i) for each of the seven fish species of which a ten individual were analyzed.

RESULTS

$\delta^{13}\text{C}$ FROM CARBON SOURCES

Carbon sources isotopic compositions are shown in Fig. 2. The surrounding vegetation is mainly *Gramineae* and savannah plants, i.e. C₄ metabolism plants. Isotopic signature of surrounding

vegetation was not measured but is classically assessed around -14 to -12‰ for C_4 plants (Lajtha et Michener 1994). This range of variation of C_4 plants $\delta^{13}\text{C}$ was considered as the isotopic signature of allochthonous carbon sources (Fig. 2). In each reservoir, some chironomids were collected in deep sediments. Their $\delta^{13}\text{C}$ was very negative, typical of the methanogenetic process of organic matter mineralization (Grey *et al.* 2004). Between LW and HW, FPOM and GPOM $\delta^{13}\text{C}$ decreased significantly in Sélingué (U-test, $p=0.05$ and $p=0.02$) while FPOM $\delta^{13}\text{C}$ did not change significantly in Manantali (U-test, $p=0.229$). At HW, periphyton was sampled in submerged terrestrial plants at the grassy fringe of both reservoirs. Periphyton $\delta^{13}\text{C}$ was higher than pelagic autochthonous carbon in both lakes (U-test, $p=0$ for Sélingué, $p=0.07$ for Manantali). Most of the potential carbon sources did not overlap and were distinguishable along a $\delta^{13}\text{C}$ gradient (Fig. 2). In both reservoirs and regardless of the season, POM $\delta^{15}\text{N}$ featured, a high variability and consequently carbon sources could not be distinguished by their $\delta^{15}\text{N}$.

FISH SPECIES $\delta^{13}\text{C}$ DISTRIBUTION IN BOTH RESERVOIRS.

Sélingué: In LW, fish $\delta^{13}\text{C}$ ranged between -29 and -13‰ , with a distribution centered around -23‰ corresponding to POM and epixylon $\delta^{13}\text{C}$ (Fig. 3A). The modal class corresponds to 65% of the individuals. Apparently, none of the sampled species relied on GPOM. *T. zili* exhibited high $\delta^{13}\text{C}$ corresponding to a strong contribution of C_4 -derived carbon to their diet. In HW, fish $\delta^{13}\text{C}$ spanned over a shorter range, between -29 and -15‰ , with a distribution centered around -25‰ , corresponding to POM $\delta^{13}\text{C}$ (Fig. 3B). *L. senegalensis*, which had a $\delta^{13}\text{C}$ corresponding to POM in LW, exhibited in HW a $\delta^{13}\text{C}$ similar to the periphytic one. *T. zili* $\delta^{13}\text{C}$ is significantly lower in HW than in LW (U-test, $p=0.02$) and closer to the periphytic one. These changes were not related to changes in fish fat content (U Mann-Whitney $p=0.42$ for *L. senegalensis* and $p=0.06$ for *T. zili*). $\delta^{13}\text{C}$ distribution showed that species relied mainly on pelagic autochthonous carbon in LW, except for *T. zili* which consumed C_4 -derived carbon. In HW, two species shifted from pelagic (*L. senegalensis*) and C_4 derived carbon (*T. zili*) to periphytic carbon.

Manantali: In LW, fish $\delta^{13}\text{C}$ spanned from -29 to -13‰ (Fig. 3C). The distribution is nearly uniform and fish species may use all the sampled carbon sources. In HW, only *T. zili* showed significant changes in its isotopic composition (U-test, $p=0.005$) but it was associated with a significantly higher fat content in HW (U Mann Whitney, $p=0.04$). Its $\delta^{13}\text{C}$, which corresponded to C_4 derived carbon $\delta^{13}\text{C}$ in LW, was closer to the periphytic carbon one in HW (Fig. 3D) but this could result partly from a change in fat content. In this reservoir, various carbon sources are exploited by the sampled fish species, in LW as well as in HW. Only *T. zili* exhibited a shift between the two seasons. As in Sélingué reservoir, *T. zili* had a $\delta^{13}\text{C}$ compatible in a certain measure with the consumption of periphytic carbon in HW to the detriment of C_4 derived carbon.

DISTRIBUTION OF FISH SPECIES $\delta^{15}\text{N}$ IN BOTH RESERVOIRS.

Sélingué : $\delta^{15}\text{N}$ distribution spanned from 4 to 13‰ in LW (Fig. 4A). Considering the mean trophic fractionation as show by Post (2002b), this would correspond to 3 trophic fractionations and then 4 trophic levels. Fish species $\delta^{15}\text{N}$ was distributed across three groups. A first group, composed of *T. ziliü* and *L. senegalensis* constitute the first trophic level. In the second one, *A. occidentalis*, *C. nigrodigitalus*, *H. membranaceus*, *S. mystus* were ranged in tiers. The last one was only made up *H. forskalii*. In HW, the $\delta^{15}\text{N}$ distribution spanned a shorter range, from 4 to 11‰, which may reflect a shorter food chain (Fig. 4B). *H. forskalii*, *S. mystus*, *H. membranaceus*, *C. nigrodigitalus* which had the highest $\delta^{15}\text{N}$ in LW, all exhibited a significant decrease in their $\delta^{15}\text{N}$ in HW (U-test, $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.011$, $p=0.002$ respectively).

Manantali : In LW, fish species $\delta^{15}\text{N}$ spanned over 8 to 15‰, which corresponds to three trophic levels (Fig. 4C). Fish species $\delta^{15}\text{N}$ is divided into three groups. The first one is composed of *T. ziliü*, *S. galilaens*, *C. auratus*, *H. bebe* and *S. ocellifere*. The second one consists of *S. schall*, while the last one contains *H. forskalii*. In HW, fish species' $\delta^{15}\text{N}$ was distributed over a shorter range (from 8 to 13.5‰) and in two groups (Fig. 4D). This shorter range is the result of a lower $\delta^{15}\text{N}$ for *H. forskalii* ($p=0.000$). Other fish species exhibited similar $\delta^{15}\text{N}$ between LW and HW.

DISCUSSION AND CONCLUSION

CARBON SOURCES. Carbon sources which were relied upon by the selected fish species did not exhibit marked modifications between reservoirs and water levels. Stable isotope data strongly suggest that the fish species (except *T. ziliü*) were supported by algal C in LW and HW. Allochthonous carbon contribution remained low, even if C_4 inputs in HW may be consequent. *T. ziliü* was likely to be able to consume C_4 carbon. C_4 inputs to the reservoir may pass into a microbial dead end but the stable isotope data for C indicated no significant microbial loop or detrital food-chain bringing C from microbes relying on vascular plants to invertebrates through the intermediary consumers such as protozoan. The contribution of vascular plant carbon to fish diet in flood plain is often quite minor although litter and terrestrial inputs often represent major C stocks in these environments (Forsberg *et al.* 1993; Lewis *et al.* 2001; Wantzen *et al.* 2002). This may be the result of the preference of aquatic invertebrates for C_3 plants' litter and their limited ability to assimilate C_4 plants (Clapcott and Bunn 2003). The only pathways from which C_4 inputs could enter the reservoirs' food webs would be by being metabolized in sediments. Some chironomids with very low $\delta^{13}\text{C}$ (around -50‰) were found in both lakes and this is typical of methanotroph invertebrates (Kiyashko *et al.* 2001). Deep methanogenesis processes occurred in sediments (Kiyashko *et al.* 2001). As methanogenesis fractionates a lot, we cannot know the original $\delta^{13}\text{C}$ of the carbon metabolized. However, amounts of organic matter from allochthonous origin are important as vegetation was not clear-cut before filling

and as changes in water level bring a lot of allochthonous carbon to the water. Methanogenesis could occur from this terrestrial organic matter and support benthic consumption.

In both reservoirs, carbon sources exploited by the selected fish species did not change markedly between LW and HW. The main difference was the appearance of littoral biofilm consumption in both reservoirs in HW, essentially in the Sélingué reservoir. Our hypothesis concerning carbon sources was not validated, as carbon sources were not more diverse in HW. However, littoral carbon contribution to the food web could be underestimated in this study. First, fish are more dispersed in HW and catches are less successful as fish densities are lower (Lowe-Mc Connell 1985). Fish that migrate to the floodplain and rely mainly on littoral or allochthonous carbon are difficult to catch. Fish bought from the fishermen were caught close to the dam. The fish sampled were then likely to rely more on pelagic than on littoral production. Moreover, most fish species reproduce just before the flood. Juveniles then disperse to the flooded areas to find food and refuge (Lowe-Mc Connell 1985). Littoral food may then have a high functional importance on fish recruitment, but as juveniles were not caught, this could not be supported by our data.

TROPHIC STRUCTURE.

In both reservoirs, $\delta^{15}\text{N}$ fish range was shorter in HW than in LW, demonstrating that trophic structure changed between the two seasons. In Sélingué, all the fish species, except *T. zillii*, consumed all or almost all of their carbon from pelagic sources (POM, epixylon). All the selected fish species (except *T. zillii*) therefore belonged to the same food chain, with POM at its base. $\delta^{15}\text{N}$ distribution in Sélingué at LW supports strongly this hypothesis, characterized by a four-level trophic chain. The primary consumer among the selected fish species of this food chain is *L. senegalensis*. The second group of the $\delta^{15}\text{N}$ distribution consisted of consumers, with increasing trophic level. *A. occidentalis* and *C. nigrodigitatus* are insectivorous, *H. membranaceus* is zooplanktivorous while *S. mystus* can feed occasionally on fish juveniles. The last level consists of the piscivorous species *H. forskalii*, that may consume fishes of the second and third trophic levels. In Manantali, carbon sources consumed were more widely distributed between the selected fish species. As these carbon sources could have different $\delta^{15}\text{N}$, not all the fish species had the same baseline for $\delta^{15}\text{N}$. Then, the first group of the $\delta^{15}\text{N}$ distribution mixed primary and secondary consumers. However, as in Sélingué, *H. forskalii* featured a top-predator position, consuming fish from the second or the third trophic levels of the chain.

In HW, in both reservoirs, fish species' $\delta^{15}\text{N}$ spanned a shorter range, thus revealing a shorter food chain. In both lakes, *H. forskalii* was placed about half a trophic level under its position in LW, and this could be the result of a greater number of invertebrates in its diet. Actually in Sélingué, not only *H. forskalii* but also the two other predators placed just below it in the food chain (*S. mystus* and *H. membranaceus*) showed a decrease in their trophic level. Predatory species often have an ontogenic diet shift with age, and then size. The size of the consumed prey depends upon predator size (Lauzanne

1975). However, fish sizes were similar between LW and HW samples, and the $\delta^{15}\text{N}$ decrease didn't result from fish size. *H. forskalii* stayed in the major bed in HW (Régier *et al.* 1989) and still relied on pelagic C. But fish densities were low in the major bed as lots of fish migrated towards the flooded fringes. When this happens, fish interactions are not as frequent and so *H. forskalii* may be less selective and feed on insects, invertebrates or fish. *H. forskalii*, in Sélingué, *S. mystus* and *H. membranaceus* may also be less selective and feed on lower trophic levels in HW (Lauzanne 1976; Paugy and Bénech 1989).

To conclude, consumed carbon sources shifted between HW and LW but our hypothesis about carbon sources was not actually validated. Our isotopic data gave some evidence that the flood brings fish into contact with new carbon sources, like periphyton that developed on submerged plants. However, periphytic consumption was restricted to two out of the seven selected species and more obvious in the Sélingué reservoir. These mixed results could be related to the fish sampling which is not easy to perform in the flooded areas. However, previous studies have given evidence that floodplains have a great functional role in providing fish with high quality food and refuge (Welcomme 1979; Wantzen *et al.* 2002). Carbon sources consumed by the sampled fish were not more diverse in HW, but they were different, as littoral contribution appeared only in HW. However, our results agree with our assumptions that piscivory is higher in LW. As fish densities are lower in HW, predators are less selective and feed at lower trophic levels. Manantali and Sélingué reservoirs, while featuring the same hydrological cycle, have different morphology, trophic status and fish assemblages. However, similar patterns of trophic modifications with hydrological seasonality could be pointed out by stable isotope analyses. In tropical ecosystems, where high biodiversity could hinder trophic studies, stable isotope studies give an integrated image of potential modifications of trophic links, as this study has done.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the UR 070, IRD, for the field work and logistic, and especially J. Raffray, L. Tito de Morais, J. Panfili and J.J. Albaret. We thank one more time J. J. Albaret and L. Tito de Morais for their advisory reading, as well as D. Paugy, and the Dr G. Lebrun for his help in plant identification. This project was supported by the program "Algal bloom in tropical aquatic systems" (UR 098, IRD)

TABLES AND FIGURES

Table I. Isotopic composition of fish species collected in Sélingué.

Fish species	Abbrev.	LW			HW		
		$\delta^{13}C$	$\delta^{15}N$	<i>n</i>	$\delta^{13}C$	$\delta^{15}N$	<i>n</i>
		($\pm S. D$)	($\pm S. D$)		($\pm S. D$)	($\pm S. D$)	
<i>Auchenoglanis occidentalis</i>	Ao	-22.8 (± 1.1)	8.6 (± 0.4)	7	-23.6 (± 0.5)	8.5 (± 0.1)	4
<i>Chrysichtys nigrodigitatus</i>	Cn	-24.5 (± 1.5)	9.4 (± 0.6)	9	-23.3 (± 5.1)	7.5 (± 0.9)	4
<i>Hemisynodontis membranaceus</i>	Hm	-25.3 (± 1.8)	8.9 (± 0.7)	11	-25.6 (± 0.4)	9.8 (± 0.3)	9
<i>Hydrocynus forskalii</i>	Hf	-22.7 (± 0.9)	11.8 (± 0.4)	11	-24.5 (± 0.6)	10.7 (± 0.2)	7
<i>Labeo senegalensis</i>	Ls	-22.6 (± 2.1)	7.0 (± 1.6)	8	-21.3 (± 1.0)	6.7 (± 0.2)	9
<i>Schilbe mystus</i>	Sm	-21.5 (± 1.1)	10.0 (± 0.3)	18	-23.5 (± 0.8)	9.4 (± 0.3)	10
<i>Tilapia zillii</i>	Tz	-15.1 (± 1.9)	6.7 (± 0.9)	9	-17.2 (± 0.7)	6.8 (± 1.1)	4

Table II. Isotopic composition of fish species collected in Manantali.

Fish species	Abbrev.	LW			HW		
		$\delta^{13}C$	$\delta^{15}N$	<i>n</i>	$\delta^{13}C$	$\delta^{15}N$	<i>n</i>
		($\pm S. D$)	($\pm S. D$)		($\pm S. D$)	($\pm S. D$)	
<i>Chrysichtys auratus</i>	Ca	-19.6 (± 3.2)	9.8 (± 0.6)	12	-22.5 (± 3.5)	10.0 (± 0.8)	6
<i>Hydrocynus forskalii</i>	Hf	-24.7 (± 0.5)	14.2 (± 0.3)	11	-24.0 (± 0.6)	12.7 (± 0.4)	9
<i>Hyperopisus bebe</i>	Hb	-21.4 (± 0.1)	9.6 (± 0.2)	2	-19.9 (± 1.9)	9.3 (± 0.2)	10
<i>Sarotherodon galilaeus</i>	Sg	-18.3 (± 2.1)	9.3 (± 0.6)	5	-19.8 (± 1.6)	9.3 (± 0.4)	15
<i>Synodontis ocellifera</i>	So	-21.8 (± 0.4)	9.0 (± 0.4)	2	-23.6 (± 1.0)	10.1 (± 0.2)	5
<i>Synodontis schall</i>	Ss	-26.8 (± 0.8)	11.9 (± 0.6)	12	-26.3 (± 1.0)	11.6 (± 0.5)	8
<i>Tilapia zillii</i>	Tz	-15.9 (± 1.2)	8.7 (± 0.5)	10	-18.8 (± 3.0)	9.3 (± 0.6)	10

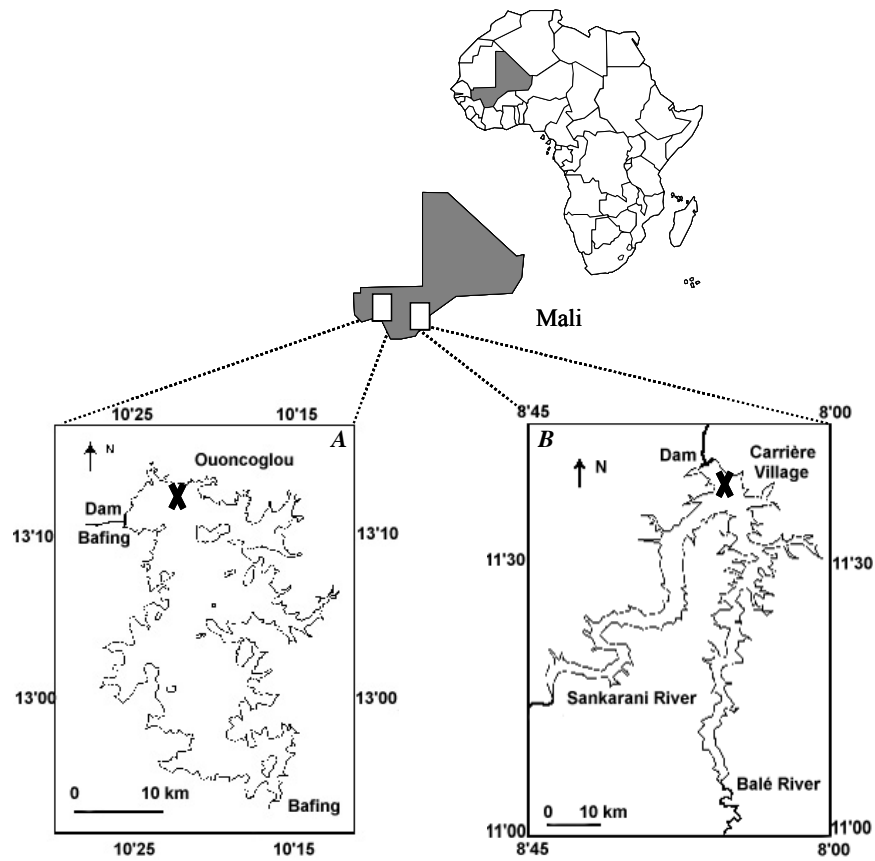


Figure 1. Location of the Manantali (A) and the Sélingué (B) reservoirs.

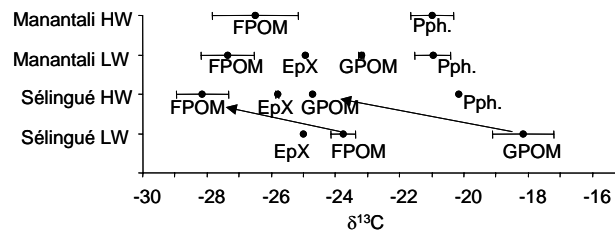


Figure 2. Carbon sources $\delta^{13}\text{C}$ in the two reservoirs in LW and HW. EpX: Epixylon on submerged trunks; Epilith: epilithion; FPOM: Fine Particular Organic Matter; GPOM: Gross Particular Organic Matter; Pph: Periphyton.

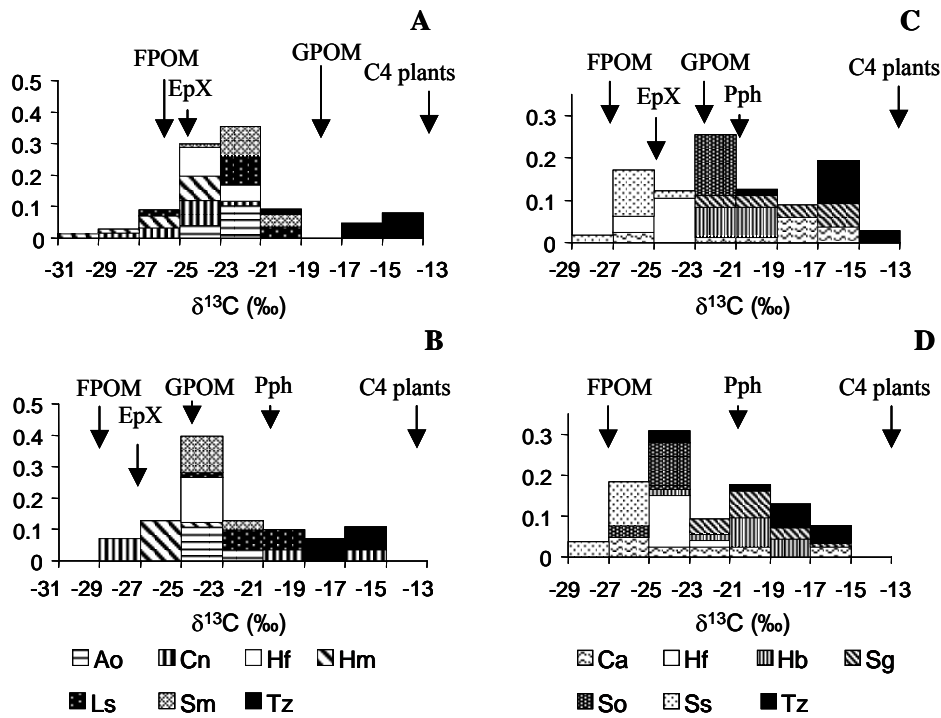


Figure 3. $\delta^{13}\text{C}$ distribution and carbon sources in LW and HW EpX: Epixylon on submerged trunks; FPOM: Fine Particular Organic Matter; GPOM: Gross Particular Organic Matter; Pph: Periphyton. Sélingué in LW (A) and HW (B). Manantali reservoir in LW (C) and HW (D).

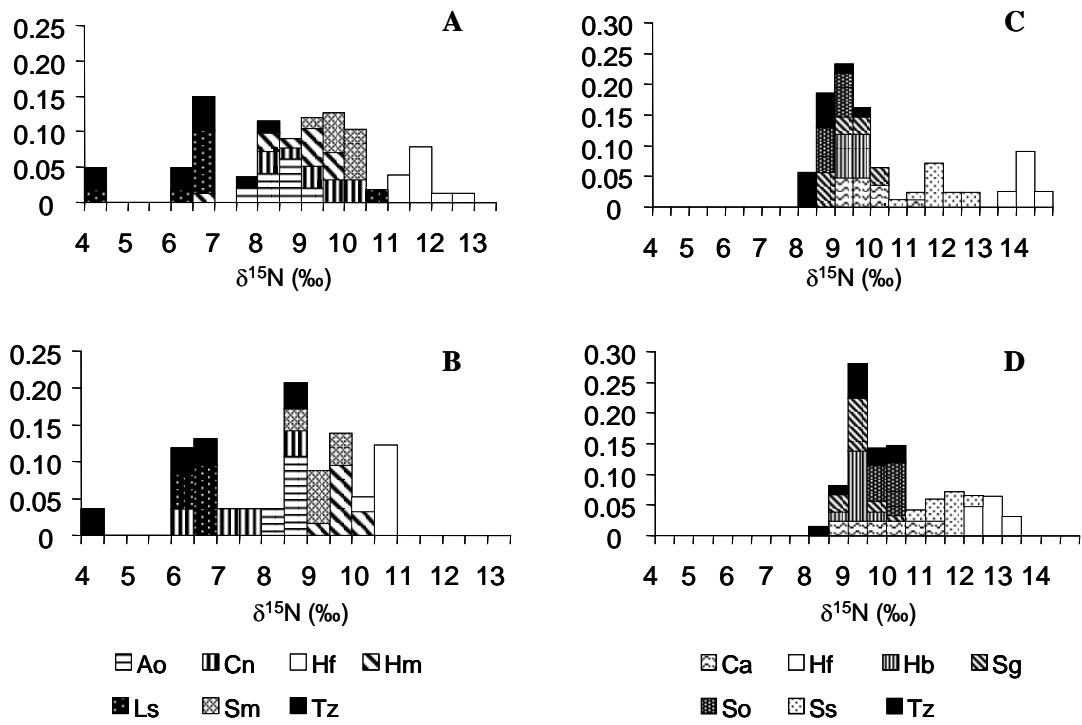


FIGURE 4. $\delta^{15}\text{N}$ distribution. *Sélingué* in LW (A) and HW (B) and *Manantali* in LW (C) and HW (D).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMS, C., D. FRASER, I. MCCARTHY, S. SHIELDS, S. WALDRON, and G. ALEXANDER. 2003. Stable isotope analysis reveals ecological segregation in a bimodal size polymorphism in Arctic charr from Loch Tay, Scotland. *Journal of Fish Biology* **62**: 474-481.
- ADAMS, T. S., and R. W. STERNER. 2000. The effects of dietary nitrogen content on the trophic level $\delta^{15}\text{N}$ enrichment. *Limnology and Oceanography* **45**: 601-607.
- ALHOUSSEINI, S. 1999. Peuplement ichtyologique et exploitation des espèces d'intérêt halieutique de la retenue d'eau de Manantali (Mali), 227 pp. Thèse de doctorat. Université de Provence.
- ALTABET, M. A., and W. G. DEUSER. 1985. Seasonal variations in natural abundance of ^{15}N in particles sinking to the deep Sargasso Sea. *Nature* **315**: 218-219.
- ANNE, J., A. LELEK, and W. TOBIAS. 1994. Postimpoundment changes in water quality and fish stocks in two large west african reservoirs (Manantali and Sélingué, Mali). *Internationale revue der gesamten hydrobiologie* **79**: 61-75.
- ANNEVILLE, O. 2001. Diagnostic sur l'évolution de l'état de santé écologique du Léman par l'analyse des séries chronologiques du phytoplancton, 307 pp. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard Lyon I.
- ANNEVILLE, O., S. SOUISSI, F. IBANEZ, V. GINOT, J. C. DRUART, and N. ANGELI. 2002. Temporal mapping of phytoplankton assemblages in Lake Geneva: Annual and interannual changes in their patterns of succession. *Limnology and Oceanography* **47**: 1355-1366.
- ARFI, R. 2003. Effects of climate and hydrology on the trophic status of Sélingué Reservoir (Mali, West Africa). *Lakes and Reservoirs: Research and Management* **8**: 247-257.
- BADE, D. L., S. R. CARPENTER, J. J. COLE, P. C. HANSON, and R. H. HESSLEIN. 2004. Controls of $\delta^{13}\text{C}$ -DIC in lakes : Geochemistry, lake metabolism, and morphometry. *Limnology and Oceanography* **49**: 1160-1172.
- BAGENAL, T. B. 1973. *In* T. B. Bagenal [ed.], *Proceedings of an International Symposium on the ageing of fish*, 234 pp. Unwin Brother's Ltd.
- BASTVIKEN, D., J. EJLERTSSON, I. SUNDH, and L. TRANVIK. 2003. Methane as a source of carbon and energy for lake pelagic food webs. *Ecology* **84**: 969-981.
- BEAUDOIN, C. P., W. M. TONN, E. E. PREPAS, and L. I. WASSENAR. 1999. Individual specialization and trophic adaptability of northern pike (*Esox lucius*): an isotope and dietary analysis. *Oecologia* **120**: 386-396.
- BEC, A. 2003. Flux de matière dans le réseau trophique planctonique du lac d'Annecy: Approche expérimentale et *in situ* par les acides gras marqueurs et leurs rapports isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$), 216 pp. Thèse de doctorat. Université de Savoie.
- BECKER, M., and R. ECKMANN. 1992. Plankton selection by european whitefish in Lake Constance: dependency on season and time of day. *Polskie Archivum Hydrobiologii* **39**: 343-402.

- BERTOLA, C. 1998. Introduction. *In* F. A. Forel [ed.], Le Léman, Monographie Limnologique 2nd ed, 543 pp. Slatkine, Genève, 1-8.
- BIDIGARE, R. R., FLUEGGE, A., FREEMAN, K. H., HANSON, K. L., HAYES, J. M., HOLLANDER, D., JASPER, J. P., KING, L. L., LAWS, E. A., MILDNER, J., MILLERO, F. J., PANCOST, R., POPP, B. N., STEINBERG, P. A., and S. G. WAKEHAM. 1997. Consistent fractionation of C-13 in nature and in the laboratory: Growth-rate effects in some haptophyte algae. *Global Biogeochemical Cycles* **11**: 279-292.
- BOOTSMA, H. A., R. E. HECKY, R. H. HESSLEIN, and G. F. TURNER. 1996. Food partitioning among lake Malawi nearshore fishes as revealed by stable isotope analyses. *Ecology* **77**: 1286-1290.
- BOSCHKER, H. T. S., J. F. C. DE BROUWER, and T. E. CAPPENBERG. 1999. The contribution of macrophyte-derived organic matter to microbial biomass in salt-marshes sediments: Stable carbon isotope analysis of microbial biomarkers. *Limnology and Oceanography* **44**: 309-319.
- BOSCHLER, H. T. S., and J. J. MIDDELBURG. 2002. Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **40**: 85-95.
- BOSLEY, K. L., and S. C. WAINRIGHT. 1999. Effects of preservatives and acidification on the stable isotope ratios (¹⁵N/¹⁴N, ¹³C/¹²C) of two species of marine mammals. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **56**: 2181-2185.
- BRANSTRATOR, D. K., L. MWEBAZA-NDAWULA, and J. P. MONTROYA. 2003. Resource-consumer relationships in Lake Victoria, East Africa. *Hydrobiologia* **493**: 27-34.
- BRUSLÉ, J., and J.-P. QUIGNARD. 2001. *Biologie des poissons d'eaux douces européens*. Technique et Documentation, Londres Paris New York, 625 pp.
- BUNN, S. E., and P. I. BOON. 1993. What sources of organic carbon drive food webs in billabongs? A study based on stable isotope analysis. *Oecologia* **96**: 85-94.
- BUNN, S. E., N. R. LONERAGAN, and M. A. KEMPSTER. 1995. Effects of acid washing on stable isotopes 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.
- BURKHARDT, S., U. RIEBESELL, and I. ZONDERVAN. 1999. Effects of growth rate, CO₂ concentration, and cell size on the stable carbon isotope fractionation in marine phytoplankton. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**: 3729-3741.
- CABANA, G., and J. B. RASMUSSEN. 1994. Modelling food chain structure and contaminant bioaccumulation using stable nitrogen isotopes. *Nature* **372**: 255-257.
- . 1996. Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 10844-10847.
- CARANHAC, F. 1999. Modélisation de la dynamique de populations piscicoles exploitées intégrant la variabilité annuelle de croissance : applications aux corégones (*Coregonus lavaretus*) du lac d'Annecy, 276 pp. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard Lyon I.
- CARIGNAN, R., D. PLANAS, and C. VIS. 2000. Planktonic production and respiration in oligotrophic Shield lakes. *Limnology and Oceanography* **45**: 189-199.

- CARMICHAEL, R. H., B. ANNETT, and I. VALIELA. 2004. Nitrogen loading to Pleasant Bay, Cape Cod: application of models and stable isotopes to detect incipient nutrient enrichment of estuaries. *Marine Pollution Bulletin* **48**: 137-143.
- CARPENTER, S. R., J. J. COLE, J. R. HODGSON, J. F. KITCHELL, J. F. PACE, M. L. BADE, D. COTTINGHAM, K. L. ESSINGTON, T. E. HOUSER, J. N., and D. E. SCHINDLER. 2001. Trophic cascades, nutrients, and lake productivity: whole-lake experiments. *Ecological Monographs* **71**: 163-186.
- CARPENTER, S. R., and J. F. KITCHELL. 1993. The trophic cascade in lakes. *Cambridge Studies in Ecology*, Cambridge, 385 pp.
- CARPENTER, S. R., J. F. KITCHELL, and J. R. HODGSON. 1985. Cascading trophic interactions and lake productivity. *Bioscience* **35**: 634-639.
- CLAPCOTT, J. E., and S. E. BUNN. 2003. Can C₄ plants contribute to aquatic food webs of subtropical streams? *Freshwater Biology* **48**: 1105-1116.
- COFFIN, R. B., L. A. CIFUENTES, and P. M. ELDERIDGE. 1994. The use of stable isotopes to study microbial processes in estuaries. *In* K. Lajtha and R. H. Michener [eds.], *Stable isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 222-240.
- COLE, J. J., S. R. CARPENTER, J. F. KITCHELL, and M. L. PACE. 2002. Pathways of organic carbon utilization in small lakes: Results from a whole-lake ¹³C addition and coupled model. *Limnology and Oceanography* **47**: 1664-1675.
- COLE, M. L., I. VALIELA, K. D. KROEGER, G. L. TOMASKY, J. CEBRIAN, C. WIGAND, R. A. MCKINNEY, S. P. GRADY, and M. H. C. DA SILVA. 2004. Assessment of a delta N-15 isotopic method to indicate anthropogenic eutrophication in aquatic ecosystems. *Journal of Environmental Quality* **33**: 124-132.
- CONOVER, W. J. 1980. *Practical nonparametric statistics*, 2nd edition John Wiley & Sons, New York Chichester Brisbane Toronto Singapore, 493 pp.
- CRAIG, H. 1953. The geochemistry of the stable carbon isotopes. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **3**: 53-92.
- DABROWSKI, K., and A. CHAMPIGNEULLE. 1985. Chemical composition of Whitefish (*Coregonidae*) from Lake Léman during spawning. *In* K. S. O. and B. Fernholm [eds.], *Proceedings of the Vth Congress of European Ichthyology*. Swedish museum of Natural history, Stockholm, 335-338.
- DAVENPORT, S. R., and N. J. BAX. 2002. A trophic study of a marine ecosystem of southeastern Australia using stable isotopes of carbon and nitrogen. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **59**: 514-530.
- DE LA HIGUERA, M., H. AKHARBACH, M. C. HIDALGO, J. PERAGON, J. A. LUPIANEZ, and M. GARCIA-GALLEGO. 1999. Liver and white muscle protein turnover rates in the European eel (*Anguilla anguilla*): effects of dietary protein quality. *Aquaculture* **179**: 203-216.
- DE NIRO, M. J., and S. EPSTEIN. 1977. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science* **197**: 261-263.

- . 1978. Influence of the diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **42**: 495-506.
- . 1981. Influence of the diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **45**: 341-351.
- DEANGELIS, D. L., R. A. GOLDSTEIN, and R. V. O'NEILL. 1975. A model for trophic interaction. *Ecology* **56**: 881-892.
- DEL GIORGIO, P. A., and R. L. FRANCE. 1996. Ecosystem-specific patterns in the relationship between zooplankton and POM or microplankton delta-13-C. *Limnology and Oceanography* **41**: 359-365.
- DEL GIORGIO, P. A., and R. H. PETERS. 1993. Balance between phytoplankton production and plankton respiration in lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **50**: 282-289.
- DENICOLA, D. M., E. DE EYTO, A. WEMAERE, and K. IRVINE. 2003. Production and respiration of epilithic algal communities in Irish lakes of different trophic status. *Archiv Fur Hydrobiologie* **157**: 67-87.
- DUFOUR, E. 1999. Implications paléoenvironnementales et paléalimentaires des abondances isotopiques en Carbone et Azote des poissons téléostéens., 197 pp. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie Paris VI.
- ECKMANN, R., and R. RÖSCH. 1998. Lake Constance fisheries and fish ecology. *Archiv Für Hydrobiologie. Special Issues: Advances in Limnology* . **53**: 285-301.
- EHLERINGER, J. R., D. R. BOWLING, L. B. FLANAGAN, J. FESSENDEN, B. HELLIKER, L. A. MARTINELLI, and J. P. OMETTO. 2002. Stable isotopes and carbon cycle processes in forests and grasslands. *Plant Biology* **4**: 181-189.
- EINSELE, G., J. P. YAN, and M. HINDERER. 2001. Atmospheric carbon burial in modern lake basins and its significance for the global carbon budget. *Global and Planetary Change* **30**: 167-195.
- EMERSON, S. E. 1975. Chemically enhanced CO₂ gas exchange in a eutrophic lake:A general model. *Limnology and Oceanography* **20**: 743-753.
- ENZ, C. A., H. R. BURGI, F. STOSSEL, and R. MULLER. 2001. Food preference of adult whitefish in eutrophic Lake Hallwil (Switzerland), and the question of cannibalism. *Archiv Für Hydrobiologie* **152**: 81-98.
- ESTEP, M. L., and S. VIGG. 1985. Stable carbon and Nitrogen isotope tracers of trophic dynamics in natural populations and fisheries of the Lahontan Lake System, Nevada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **42**: 1712-1719.
- FANTLE, M. S., A. I. DITTEL, S. M. SCHWALM, C. E. EPIFANIO, and M. L. FOGEL. 1999. A food web analysis of the juvenile blue crab, *Callinectes sapidus*, using stable isotopes in whole animals and individual amino acids. *Oecologia* **120**: 416-426.
- FECHHELM, R. G., R. E. DILLINGER, B. J. GALLAWAY, and W. B. GRIFFITHS. 1992. Modeling of in situ temperature and growth relationships for yearling broad Whitefish in Prudhoe Bay, Alaska. *Transactions of American Fisheries Society* **121**: 1-12.

- FOCKEN, U., and K. BECKER. 1998. Metabolic fractionation of stable carbon isotopes : implications of different proximate compositions for studies of the aquatic food webs using delta C-13 data. *Oecologia* **115**: 337--343.
- FORBES, S. A. 1887. The lake as a microcosm. *Bulletin of the Illinois Natural History Survey* **15**: 537-550.
- FORSBERG, B. R., C. A. R. M. ARAUJO-LIMA, L. A. MARTINELLI, R. L. VICTORIA, and J. A. BONASSI. 1993. Autotrophic carbon sources for fish of the Central Amazon. *Ecology* **74**: 643-652.
- FOSTER, A. M. 1999. Nonindigenous aquatic species. http://nas.er.usgs.gov/crustaceans/docs/my_relic.html
- FRANCE, R. L. 1995a. Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: Foodweb implications. *Marine Ecology Progress Series* **124**: 307-312.
- . 1995b. Differentiation between littoral and pelagic food web in lakes using stable carbon isotopes. *Limnology and Oceanography* **40**: 1310-1313.
- . 1995c. Source of variability in d¹⁵N of autotrophs as a potential aid in measuring allochthony in freshwaters. *Ecography* **18**: 318-320.
- . 1996a. Benthic-pelagic coupling of carbon flow. *TREE* **11**: 471-472.
- . 1996b. Scope for use of stable carbon isotopes in discerning the incorporation of forest detritus into aquatic foodwebs. *Hydrobiologia* **325**: 219-222.
- . 1999. Relationships between DOC concentration and epilithon stable isotopes in boreal lakes. *Freshwater Biology* **41**: 101-105.
- . 2000. Comparing δ¹³C among littoral food webs using lake DOC. *Aquatic Ecology* **34**: 445-448.
- FRANCE, R. L., P. A. DEL GIORGIO, and K. A. WESTCOTT. 1997. Productivity and heterotrophy influences on zooplankton d¹³C in Northern Temperate lakes. *Aquatic Microbial Ecology* **12**: 85-93.
- FRANCE, R. L., and R. H. PETERS. 1997. Ecosystem differences in the trophic enrichment in ¹³C in aquatic food webs. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**: 1255-1258.
- FRANCOIS, R., M. A. ALTABET, R. GOERICKE, D. C. MCCORKLE, C. BRUNET, and A. POISSON. 1993. Changes in the delta-C-13 of surface-water particulate organic-matter across the Subtropical Convergence in the Sw Indian-Ocean. *Global Biogeochemical Cycles* **7**: 627-644.
- FRAZER, T. K., R. M. ROSS, L. B. QUETIN, and J. P. MONTOYA. 1997. Turnover of carbon and nitrogen during growth of larval krill, *Euphausia superba* Dana: A stable isotope approach. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **212**: 259-275.
- FRY, B. *in press*. Isotopes for isopodes.
- FRY, B., and E. B. SHERR. 1984. δ¹³C measurements as indicators of carbon flow in marine and freshwater ecosystems. *Marine Science* **27**: 13-47.

- GAEDKE, U. 1998. The response of the pelagic food web to re-oligotrophication of a large and deep lake (L. Constance) : Evidence for scale-dependent hierarchical patterns? *Archiv Für Hydrobiologie. Special Issues: Advances in Limnology*. **53**: 317-333.
- GANNES, L. Z., D. M. O'BRIEN, and C. MARTINEZ DEL RIO. 1997. Stables isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology* **78**: 1271-1276.
- GAYE-SIESSEGGER, J., U. FOCKEN, S. MUETZEL, H. ABEL, and K. BECKER. 2004. Feeding level and individual metabolic rate affect delta C-13 and delta N-15 values in carp: implications for food web studies. *Oecologia* **138**: 175-183.
- GENNER, M. J., S. J. HAWKINS, and G. F. TURNER. 2003. Isotopic change throughout the life history of a Lake Malawi cichlid fish. *Journal of Fish Biology* **62**: 907-917.
- GERDEAUX, D., S. BERGERET, J. FORTIN, and T. BARONNET. 2002. Diet and seasonal patterns of food intake by *Coregonus lavaretus* in Lake Annecy, comparison with the diet of the other species of the fish community. *Archiv Für Hydrobiologie* **57**: 199-207.
- GERDEAUX, D., and V. HAMELET. 2001. Regime alimentaire des corégones et des gardons du Léman, en milieu pélagique, campagne 2000. In CIPEL [ed.], *Rapports sur les études et recherches entreprises dans le bassin lémanique*, Lausanne, 137-143.
- GHASHGHAIE, J., G. TCHERKEZ, G. CORNIC, and E. DELEENS. 2001. Utilisation de la spectrométrie de masse isotopique en physiologie végétale. www.isv.cnrs-gif.fr/ebv/ghashghaie.pdf
- GIUSSANI, G., and R. DE BERNARDI. 1977. Food selectivity in *Coregonus* sp. of Lago Maggiore : an energetical approach. *Memorie dell'Instituto Italiano di Idrobiologia* **34**: 121-130.
- GOERICKE, R., J. P. MONTOYA, and B. FRY. 1994. Physiology of isotopic fractionation in algae and cyanobacteria. In K. Lajtha and R. H. Michener [eds.], *Stable isotopes in ecology and environmental sciences*. Blackwell Scientific publications, Oxford, 187-22
- 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.
- GREY, J., and J. I. JONES. 1999. Carbon stable isotopes reveal complex trophic interaction in lake plankton. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **13**: 1311-1314.
- GREY, J., R. I. JONES, and D. SLEEP. 2000. Stable isotope analysis of the origins of zooplankton carbon in lakes of differing trophic state. *Oecologia* **123**: 232-240.
- . 2001. Seasonal changes in the importance of the source of organic matter to the diet of zooplankton in Loch Ness, as indicate by stable isotope analysis. *Limnology and Oceanography* **46**: 505-513.
- GREY, J., A. KELLY, and R. I. JONES. 2004. High intraspecific variability in carbon and nitrogen stable isotope ratios of chironomid larvae. *Limnology and Oceanography* **49**: 239-244.

- GREY, J., J. THACKERAY, R. I. JONES, and A. SHINE. 2002. Ferox Trout (*Salmo trutta*) as 'Russian dolls' : complementary gut content and stable isotope analyses of the Loch Ness foodweb. *Freshwater Biology* **47**: 1235-1243.
- GU, B., V. ALEXANDER, and D. M. SCHELL. 1999. Seasonal and interannual variability of plankton carbon isotope ratios in a subarctic lake. *Freshwater Biology* **42**: 417-426.
- GU, B., and C. SCHELSKE. 1996. Temporal and spatial variations in phytoplankton carbon isotopes in a polymictic subtropical lake. *Journal of Plankton Research* **18**: 2081-2092.
- GU, B., C. L. SCHELSKE, and M. BRENNER. 1996. Relationship between sediment and plankton isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) and primary productivity in Florida lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**: 875-883.
- HARTMANN, J., and H. QUOSS. 1993. Fecundity of whitefish (*Coregonus lavaretus*) during the eutrophication and oligotrophication of Lake Constance. *Journal of Fish Biology* **43**: 81-87.
- HECKY, R. E., and R. H. HESSLEIN. 1995. Contributions of benthic algae to lake food webs as revealed by stable isotope analysis. *Journal of the North American Benthological Society* **14**: 631-653.
- HEIKINHEIMO, O., M. MIINALAINEN, and H. PELTONEN. 2000. Diet, growth and competitive abilities of sympatric whitefish forms in a dense introduced population: results of a stocking experiment. *Journal of Fish Biology* **57**: 808-827.
- HERZKA, S. Z., and G. J. HOLT. 2000. Changes in isotopic composition of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae in response to dietary shifts: potential applications to settlement studies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **57**: 137-147.
- HESSLEIN, R. H., M. J. CAPEL, D. E. FOX, and K. A. HALLARD. 1991. Stable isotopes of sulfur, carbon, and nitrogen as indicators of trophic level and fish migration in the lower Mackenzie river basin, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **48**: 1991.
- HESSLEIN, R. H., K. A. HALLARD, and P. RAMLAL. 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 34 S, delta 13 C and delta 15N. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **50**: 2071-2076.
- HILDERBRAND, G. V., C. T. ROBBINS, and S. D. FARLEY. 1998. Response: Use of stable isotopes to determine diets of living and extinct bears. *Canadian Journal of Zoology* **76**: 2301-2303.
- HOBSON, K. A., and F. BAIRLEIN. 2003. Isotopic fractionation and turnover in captive Garden Warblers (*Sylvia borin*): implications for delineating dietary and migratory associations in wild passerines. *Canadian Journal of Zoology* **81**: 1630-1635.
- HOBSON, K. A., and R. G. CLARK. 1992a. Assessing avian diets using stable isotopes II: Factors influencing diet-tissue fractionation. *The Condor* **94**: 189-197.
- HOBSON, K. A., and R. W. CLARK. 1992b. Assessing avian diets using stable carbon and nitrogen isotopes . I. Turnover of carbon-13. *Condor* **94**: 181-188.

- HOBSON, K. A., J. SIROIS, and M. L. GLOUTNEY. 2000. Tracing nutrient allocation to reproduction with stable isotopes: A preliminary investigation using colonial waterbirds of Great Slave Lake. *Auk* **117**: 760-774.
- HOBSON, K. A., and H. E. WELCH. 1995. Cannibalism and trophic structure in a high arctic lake: Insights from stable-isotope analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **52**: 1195-1201.
- HODELL, D. A., C. SCHELSKE, G. L. FAHNENSTIEL, and L. R. ROBBINS. 1998. Biologically induced calcite and its isotopic composition in Lake Ontario. *Limnology and Oceanography* **43**: 187-199.
- HOIE, H., A. FOLKVORD, and E. OTTERLEIE. 2003. Effect of somatic and otolith growth rate on stable isotopic composition of early juvenile cod (*Gadus morhua* L) otoliths. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **289**: 41-58.
- HULOT, F. D., G. LACROIX, F. LESCHER-MOUTOUE, and M. LOREAU. 2000. Functional diversity governs ecosystem response to nutrient enrichment. *Nature* **405**: 340-344.
- HYSLOP, E. J. 1980. Stomach content analysis - a review of methods and their application. *Journal of Fish Biology* **17**: 411-429.
- INSIGHTFUL. 2001. S-Plus 6. Insightful Corporation.
- JEPSEN, D. B., and K. O. WINEMILLER. 2002. Structure of tropical river food webs revealed by stable isotope ratios. *OIKOS* **96**: 46-55.
- JOHNSON, B. M., P. J. MARTINEZ, and J. D. STOCKWELL. 2002. Tracking trophic interactions in coldwater reservoirs using naturally occurring stable isotopes. *Transactions of American Fisheries Society* **131**: 1-13.
- JOHNSTON, A. M., J. A. RAVEN, J. BEARDALL, and R. C. LEEGOOD. 2001. Carbon fixation - Photosynthesis in a marine diatom. *Nature* **412**: 40-41.
- JONES, R. I., J. GREY, D. SLEEP, and L. ARVOLA. 1999. Stable isotope analysis of zooplankton carbon nutrition in humic lakes. *OIKOS* **86**: 97-104.
- JONSSON, A., J. KARLSSON, and M. JANSSON. 2003. Sources of carbon dioxide supersaturation in clearwater and humic lakes in northern Sweden. *Ecosystems* **6**: 224-235.
- KARLSSON, J., A. JONSSON, M. MEILI, and M. JANSSON. 2003. Control of zooplankton dependence on allochthonous organic carbon in humic and clear-water lakes in northern Sweden. *Limnology and Oceanography* **48**: 269-276.
- KELLY, C. A. and others 2001. Natural variability of carbon dioxide and net epilimnetic production in the surface of boreal lakes of different sizes. *Limnology and Oceanography* **46**: 1054-1064.
- KELLY, J. F. 2000. Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Canadian Journal of Zoology* **78**: 1-27.

- KEOUGH, J. R., C. A. HAGLEY, E. RUZYCKI, and M. SIERSZEN. 1998. $\delta^{13}\text{C}$ composition of primary producers and role of detritus in a freshwater coastal ecosystem. *Limnology and Oceanography* **43**: 734-740.
- KEOUGH, J. R., M. E. SIERSZEN, and C. A. HAGLEY. 1995. Analysis of a Lake Superior coastal food web with stable isotope techniques. *Limnology and Oceanography* **41**: 136-146.
- KIRILUK, R. M., D. M. WHITTLE, R. W. RUSSELL, G. CABANA, and J. B. RASMUSSEN. 1999. Stable isotopic compositions of archived walleye (*Stizostedion vitreum*) tissues as a measure of historical changes in the food web dynamics of the western basin of Lake Erie. In M. Munawar, T. Edsall and I. F. Munawar [eds.], *State of Lake Erie: Past, Present and Future*. ECOVISION WORLD MONOGRAPH SERIES. Backhuys Publishers, Leiden, 469-479.
- KIYASHKO, S. I., T. NARITA, and E. WADA. 2001. Contribution of methanotrophs to freshwater macroinvertebrates: evidence from stable isotope ratios. *Aquatic Microbial Ecology* **24**: 203-207.
- KLING, G., B. FRY, and O'BRIEN. 1992a. Stable isotopes and planktonic trophic structure in arctic lakes. *Ecology* **73**: 561-566.
- KLING, G. W., G. W. KIPPHUT, and M. C. MILLER. 1992b. The flux of CO_2 and CH_4 from lakes and rivers in arctic Alaska. *Hydrobiologia* **240**: 23-36.
- KOCH, P. L., and D. L. PHILLIPS. 2002. Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models: a reply to Robbins, Hilderbrand and Farley (2002). *Oecologia* **133**: 14-18.
- KRITZBERG, E. S., J. J. COLE, M. L. PACE, W. GRANÉLI, and D. L. BADE. 2004. Autochthonous versus allochthonous carbon sources of bacteria: Results from whole-lake ^{13}C addition experiments. *Limnology and Oceanography* **49**: 586-596.
- KÜMMERLIN, R. E. 1998. Taxonomical response of the phytoplankton community of Upper Lake Constance (Bodensee-Obersee) to eutrophication and re-oligotrophication (1979-1997). *Archiv Für Hydrobiologie. Special Issues: Advances in Limnology* **53**: 109-117.
- KURLE, C. M. 2002. Stable-isotope ratios of blood components from captive northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) and their diet: applications for studying the foraging ecology of wild otarids. *Canadian Journal of Zoology* **80**: 902-908.
- KURLE, C. M., and G. A. J. WORTHY. 2002. Stable nitrogen and carbon isotope ratios in multiple tissues of the northern fur seal *Callorhinus ursinus*: implications for dietary and migratory reconstructions. *Marine Ecology-Progress Series* **236**: 289-300.
- LAË, R., and J. Y. WEIGEL. 1994. Diagnostic halieutique et propositions d'aménagement : l'exemple de la retenue de Sélingué (Mali), rapport PAMOS, Volet filière Pêche, 73pp.
- LAJTHA, K., and J. D. MARSHALL. 1994. Sources of variations in the stable isotopic composition of plants. In K. Lajtha and R. H. Michener [eds.], *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Sciences*. Methods in Ecology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1-21.

- LAJTHA, K., and R. H. MICHENER. 1994. Stable isotopes in ecology and environmental sciences. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 315 pp.
- LAKE, J. L. and others 2001. Stable nitrogen isotopes as indicators of anthropogenic activities in small freshwater systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **58**: 870-878.
- LAKE, P. S. and others 2000. Global change and the biodiversity of freshwater ecosystems: Impacts on linkages between above-sediment and sediment biota. *Bioscience* **50**: 1099-1107.
- LAMPERT, W., and J. GREY. 2003. Exploitation of a deep-water algal maximum by *Daphnia*: a stable-isotope tracer study. *Hydrobiologia* **500**: 95-101.
- LAUZANNE, L. 1976. Régimes alimentaires et relations trophiques des poissons du lac Tchad. Cahiers de l'Orstom, série Hydrobiologie **10**: 267-310.
- LAWS, E. A., B. N. POPP, R. R. BIDIGARE, M. C. KENNICUTT, and S. A. MACKO. 1995. Dependence of phytoplankton carbon isotopic composition on growth-rate and CO₂ (Aq) - Theoretical considerations and experimental results. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **59**: 1131-1138.
- LAZERTE, B. D. 1981. The relationship between total dissolved carbon dioxide and its stable carbon isotopic ratio in aquatic sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **45**: 647-656.
- LEE, C., M. J. A., and M. STURM. 1987. Carbon isotope fractionation and changes in the flux and composition of particulate matter resulting from biological activity during a sediment trap experiment in Lake Griefen, Switzerland. *Limnology and Oceanography* **32**: 83-96.
- LEE, R. M. 1920. A review of the methods of age and growth determination by means of scales. Fishery investigation, Serie II **4**: 32 p.
- LEGGETT, M. F., O. JOHANNSSON, R. HESSLEIN, D. G. DIXON, W. D. TAYLOR, and M. R. SERVOS. 2000. Influence of inorganic nitrogen cycling on the delta-15 N of Lake Ontario biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **57**: 1489-1496.
- LEGGETT, M. F., M. R. SERVOS, R. HESSLEIN, O. JOHANNSSON, E. S. MILLARD, and D. G. DIXON. 1999. Biogeochemical influences on the carbon isotope signatures of Lake Ontario biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **56**: 2211-2218.
- LEHMANN, M. F., P. REICHERT, S. M. BERNASCONI, A. BARBIERI, and J. A. MCKENZIE. 2003. Modelling nitrogen and oxygen isotope fractionation during denitrification in a lacustrine redox-transition zone. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67**: 2529-2542.
- LEHMANN, M. F., S. BERNASCONI, J. MCKENZIE, A. BARBIERI, M. SIMONA, and M. VERONESI. 2004. Seasonal variation of the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of particulate and dissolved carbon and nitrogen in Lake Lugano : Constraints on biogeochemical cycling in a eutrophic lake. *Limnology and Oceanography* **49**: 415-429.
- LÉVÊQUE, C., M. N. BRUTON, and G. W. SSENTONGO. 1988. Biologie et écologie des poissons d'eau douce africains. Editions de l'ORSTOM, Paris, 508 pp.

- LEWIS, W. M. J., S. K. HAMILTON, M. A. RODRIGUEZ, J. F. I. SAUNDERS, and M. A. LASI. 2001. Food web analysis of the Orinoco floodplain based on production estimates and stable isotope data. *Journal of North American Benthological Society* **20**: 241-254.
- LORRAIN, A., Y.-M. PAULET, L. CHAUVAUD, N. SAVOYE, A. DONVAL, and C. SAOUT. 2002. Differential $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures among scallop tissues: implications for ecology and physiology. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **275**: 47-61.
- LOWE-MC CONNELL, R. H. 1985. The biology of the river systems with particular references to the fishes. *In* A. T. Grove [ed.], *The Niger and its neighbours*. Balkema A. A., Rotterdam, Boston, 101-140.
- MAC AVOY, S. E., S. A. MACKO, and G. C. GARMAN. 2001. Isotopic turnover in aquatic predators: quantifying the exploitation of a migratory prey. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **58**: 923-932.
- MARIOTTI, A. 1995. Les isotopes stables du carbone, traceurs de l'évolution des écosystèmes continentaux et de dynamique des matières organiques des sols. *In* J. M. Legay and R. Barbault [eds.], *La révolution technologique en écologie*. Collection d'écologie, Masson, Paris, 37-61.
- MATTHEWS, B., and A. MAZUMDER. 2003. Compositional and interlake variability of zooplankton affect baseline stable isotope signatures. *Limnology and Oceanography* **48**: 1977-1987.
- MC CONNAUGHEY, T., and C. P. MC ROY. 1979. Food-web structure and the fractionation of carbon isotopes in the Bering Sea. *Marine Biology* **53**: 257-262.
- MC MILLAN, D. N., and D. F. HOULIHAN. 1989. Short-term responses of protein synthesis to re-feeding in rainbow trout. *Aquaculture* **79**: 37-46.
- MCCLELLAND, J. W., and J. P. MONTOYA. 2002. Trophic relationships and the nitrogen isotopic composition of amino acids in plankton. *Ecology* **83**: 2173-2180.
- MCCUTCHAN J. H., LEWIS W. M., KENDALL C., and C. C MCGRATH. 2003. Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos* 102, 378-390.
- MEHNER, T., and J. BENNDORF. 1995. Eutrophication - a summary of observed effects and possible solutions. *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua* **44**: 35-44.
- MEHNER, T., P. KASPRZAK, K. WYSUJACK, U. LAUDE, and R. KOSCHEL. 2001. Restoration of a stratified lake (Feldberger Haussee, Germany) by a combination of nutrient load reduction and long-term biomanipulation. *International Review of Hydrobiology* **86**: 253-265.
- MEILI, M., G. W. KLING, B. FRY, R. T. BELL, and I. AHLGREN. 1996. Sources and partitioning of organic matter in a pelagic microbial food web inferred from the isotopic composition ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of zooplankton species. *Archiv Für Hydrobiologie. Special Issues: Advances in Limnology* **48**: 53-61.
- MILLER, L. M., and A. R. KAPUSCINSKI. 1996. Microsatellite DNA markers reveal new levels of genetic variation in Northern pike. *Transactions of American Fisheries Society* **125**: 971-977.

- . 1997. Historical analysis of genetic variation reveals low effective population size in a northern pike (*Esox lucius*) population. *Genetics* **147**: 1249-1258.
- MINAGAWA, M., and E. WADA. 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **48**: 1135-1140.
- MOOKERJI, N., C. HELLER, H. J. MENG, H. R. BURGI, and R. MULLER. 1998. Diel and seasonal patterns of food intake and prey selection by *Coregonus* sp. in re-oligotrophicated Lake Lucerne, Switzerland. *Journal of Fish Biology* **52**: 443-457.
- NEEDOBA, J. A., N. A. WASER, P. J. HARRISON, and S. E. CALVERT. 2003. Nitrogen isotope fractionation in 12 species of marine phytoplankton during growth on nitrate. *Marine Ecology-Progress Series* **255**: 81-91.
- NICHOLS, S. J., and D. GARLING. 2000. Food-web dynamics and trophic-level interactions in a multispecies community of freshwater unionids. *Canadian Journal of Zoology* **78**: 871-882.
- O'BRIEN, D. M., D. P. SCHRAG, and C. M. DEL RIO. 2000. Allocation to reproduction in a hawkmoth: A quantitative analysis using stable carbon isotopes. *Ecology* **81**: 2822-2831.
- OFEFP. 1994. L'état des lacs en Suisse., 159 pp., Cahier de l'environnement. Rapport de l'Office fédéral de l'environnement des forêts et du paysage. Berne.
- OLIVE, P. J. W., J. K. PINNEGAR, N. V. C. POLUNIN, G. RICHARDS, and R. WELCH. 2003. Isotope trophic-step fractionation: a dynamic equilibrium model. *Journal of Animal Ecology* **72**: 608-617.
- O'REILLY, C. M., and R. E. HECKY. 2002. Interpreting stable isotopes in food webs: Recognizing the role of time averaging at different trophic levels. *Limnology and Oceanography* **47**: 306-309.
- PACE, M. L., J. J. COLE, S. R. CARPENTER, J. F. KITCHELL, J. R. HODGSON, M. C. VAN DE BOGART, D. L. BADE, E. S. KRITZBERG, and D. BASTVIKEN. 2004. Whole-lake carbon-13 additions reveal terrestrial support of aquatic food webs. *Nature* **427**: 240-243.
- PALMER, M. A., A. P. COVICH, S. LAKE, P. BIRO, J. J. BROOKS, J. COLE, C. DAHM, J. GIBERT, W. GOEDKOOOP, K. MARTENS, and J. VERHOEVEN. 2000. Linkages between aquatic sediment biota and life above sediments as potential drivers of biodiversity and ecological processes. *Bioscience* **50**: 1062-1075.
- PAUGY, D., and V. BÉNECH. 1989. Poissons d'eau douce des bassins côtiers du Togo (Afrique de l'Ouest). *Revue d'Hydrobiologie Tropicale* **22**: 295-316.
- PERAGON, J., J. B. BARROSO, L. GARCIA-SALGUERO, M. DE LA HIGUERA, and J. A. LUPIANEZ. 1994. Dietary protein effects on growth and fractional protein synthesis and degradation rates in liver and white fish muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **124**: 35-46.
- PERECK, S. 2004. Les éléments chimiques.
<http://elements.chimiques.free.fr/fr/ficFiche.php?p=16&z=7>

- PERGA, M. E., and D. GERDEAUX. 2003. Using fish scales $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ for retrospective ecological studies : the example of the evolution of Whitefish isotopic signature during re-oligotrophication of lake Geneva, 1980-2001. *Journal of Fish Biology* **63**: 1197-1207.
- PERSOON, A., and L. A. HANSSON. 1999. Diet shift in fish following competitive release. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **56**: 70-78.
- PETERSON, B. J. 1999. Stable isotopes as tracers of organic matter input and transfer in benthic food webs: A review. *Acta Oecologica International Journal of Ecology* **20**: 479-487.
- PETERSON, B. J., and B. FRY. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 293-320.
- PHILLIPS, D. L. 2001. Mixing models in analyses of diet using multiple stable isotopes: a critique. *Oecologia* **127**: 166-170.
- PHILLIPS, D. L., and J. W. GREGG. 2001. Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia* **127**: 171-179.
- . 2003. Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources. *Oecologia* **136**: 261-269.
- PHILLIPS, D. L., and P. L. KOCH. 2002. Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models. *Oecologia* **130**: 114-125.
- PINNEGAR, J. K., and N. V. C. POLUNIN. 1999. Differential fractionation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ among fish tissues: Implications for the study of trophic interactions. *Functional Ecology* **13**: 225-231.
- PONSARD, S., and R. ARDITI. 2000. What can stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) tell about the food web of soil macro-invertebrates? *Ecology* **81**: 852-864.
- PONTON, D. 1986. Croissance et alimentation de deux poissons planctonophages du lac Léman : le Corégone (*Coregonus* sp.) et le gardon (*Rutilus rutilus*). 156 pp. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard Lyon I.
- PONTON, D., and D. GERDEAUX. 1988. Quelques aspects de l'alimentation de deux poissons planctonophages du lac Léman : le corégone (*Coregonus schinzii palea* Cuv. et Val.) et le gardon (*Rutilus rutilus*). *Bulletin français de la pêche et de la pisciculture*. **308**: 11-23.
- POPP, B. N., E. A. LAWS, R. R. BIDIGARE, J. E. DORE, K. L. HANSON, and S. G. WAKEHAM. 1998. Effect of Phytoplankton Cell Geometry on Carbon Isotopic Fractionation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **62**: 69-77.
- POST, D. M. 2002a. The long and short of food-chain length. *TREE* **17**: 269-277.
- . 2002b. Using stable isotopes to estimate trophic position : models, methods, and assumptions. *Ecology* **83**: 703-718.
- POST, D. M., M. L. PACE, and N. G. HAIRSTON. 2000. Ecosystem size determines food-chain length in lakes. *Nature* **405**: 1047-1049.

- POWER, M., K. GUIGUER, and D. R. BARTON. 2003. Effects of temperature on isotopic enrichment in *Daphnia magna*: implications for aquatic food-web studies. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17**: 1619-1625.
- QUAY, P. D., S. R. EMERSON, B. M. QUAY, and A. H. DEVOL. 1986. The carbon cycle for Lake Washington. A stable isotope study. *Limnology and Oceanography* **31**: 596-611.
- RAU, G. H. 1978. Carbon-13 depletion in a subalpine lake: Carbon flow implications. *Science* **201**: 901-902.
- RAVEN, J. A., A. M. JOHNSTON, J. R. NEWMAN, and C. M. SCRIMGEOUR. 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.
- RAVEN, J. A., J. J. MACFARLANE, and H. GRIFFITHS. 1987. The application of carbon discrimination techniques. *Special publications of the British Ecological Society* **5**: 129-152.
- RÉGIER, H. A., R. L. WELCOMME, R. J. STEEDMAN, and H. F. HENDERSON. 1989. Rehabilitation of degraded river ecosystems. *Canadian Special Publication in Fisheries and Aquatic Sciences* **106**: 86-97.
- RIEBESSELL, U. 2000. Photosynthesis - Carbon fix for a diatom. *Nature* **407**: 959-960.
- ROTH, J. D., and K. A. HOBSON. 2000. Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissue of captive red fox: implications for dietary reconstruction. *Canadian Journal of Zoology* **78**: 848-852.
- RUDSTAM, L. G., F. P. BINKOWSKI, and M. A. MILLER. 1994. A bioenergetics model for analysis of food consumption patterns of bloater in Lake Michigan. *Transactions of American Fisheries Society*. **123**: 344-357.
- SARAKINOS, H. C., M. L. JOHNSON, and M. J. VANDER ZANDEN. 2002. A synthesis of tissue-preservation effects on carbon and nitrogen stable isotope signatures. *Canadian Journal of Zoology* **80**: 381-387.
- SAVIDGE, W. B., and N. E. BLAIR. 2004. Patterns of intramolecular carbon isotopic heterogeneity within amino acids of autotrophs and heterotrophs. *Oecologia* **139**: 178-189.
- SCHAUS, M. H., M. J. VANNI, T. E. WISSING, M. T. BREMIGAN, J. E. GARVEY, and R. A. STEIN. 1997. Nitrogen and phosphorus excretion by detritivorous gizzard shad in a reservoir ecosystem. *Limnology and Oceanography* **42**: 1386-1397.
- SCHEFFER, M., D. STRAILE, E. H. VAN NES, and H. HOSPER. 2001. Climatic warming causes regime shifts in lake food webs. *Limnology and Oceanography* **46**: 1780-1783.
- SCHELSKE, C. 1991. Historical nutrient enrichment of Lake Ontario: Paleolimnological Evidence. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **48**: 1529-1538.
- SCHELSKE, C., and D. A. HODELL. 1991. Recent changes in productivity and climate of Lake Ontario detected by isotopic analysis of sediments. *Limnology and Oceanography* **36**: 961-975.
- . 1995. Using carbon isotopes of bulk sedimentary organic matter to reconstruct the history of nutrient loading and eutrophication in Lake Erie. *Limnology and Oceanography* **40**: 918-929.

- SCHINDLER, D. E., S. R. CARPENTER, J. J. COLE, J. F. KITCHELL, and M. L. PACE. 1997a. Influence of food web structure on carbon exchange between lakes and the atmosphere. *Science* **277**: 248-250.
- SCHINDLER, D. E., J. R. HODGSON, and J. F. KITCHELL. 1997b. Density-dependent changes in individual foraging specialization of largemouth bass. *Oecologia* **110**: 592-600.
- SCHINDLER, D. E., and M. D. SCHEUERELL. 2002. Habitat coupling in lake ecosystems. *OIKOS* **98**: 177-189.
- SCHINDLER, D. W., G. J. BRUNSKILL, S. EMERSON, W. S. BROEKER, and T.-H. PENG. 1973. Atmospheric carbon dioxide: Its role in maintaining phytoplankton standing crops. *Science* **177**: 1192-1194.
- SHOLTO-DOUGLAS, A. D., J. G. FIELD, A. G. JAMES, and N. J. VAN DER MERWE. 1991. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ isotope ratios in the Southern Benguela Ecosystem: indicators of food web relationships among different size-classes of plankton and pelagic fish; differences between fish muscle and bone collagen tissues. *Marine Ecology Progress Series* **78**: 23-31.
- SILA, I. 1998. Evolution de la qualité des eaux du lac d'Annecy de 1966 à 1997. RAP SILA, Annecy, 44 pp.
- SOLOW, A. R., C. COSTELLO, and A. BEET. 1999. On an early result on stability and complexity. *American Naturalist* **154**: 587-588.
- STRAILE, D., and W. GELLER. 1998. Crustacean zooplankton in Lake Constance from 1920 to 1995 : Response to eutrophication and re-oligotrophication. *Archiv Für Hydrobiologie. Special Issues: Advances in Limnology*. **53**: 255-274.
- TAKAHASHI, K., E. WADA, and M. SAKAMOTO. 1991. Relationships between carbon isotope discrimination and the specific growth rate of green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Japan Journal of Limnology*. **52**: 105-112.
- TAKAHASHI, K., T. YOSHIOKA, E. WADA, and M. SAKA MOTO. 1990. Temporal variations in carbon isotope ratio of phytoplankton in a eutrophic lake. *Journal of Plankton Research* **12**: 799-808.
- TIESZEN, L. L., T. W. BOUTTON, K. G. TESDAHL, and N. A. SLADE. 1983. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for delta-13 C analysis of diet. *Oecologia* **57**: 32-37.
- TION. 1978. Rhythmic growth activity in fish scales. *Journal of Fish Biology* **12**: 615-623.
- VADEBONCOEUR, Y., E. JEPPESEN, M. J. VANDER ZANDEN, H. H. SCHIERUP, K. CHRISTOFFERSEN, and D. M. LODGE. 2003. From Greenland to green lakes: Cultural eutrophication and the loss of benthic pathways in lakes. *Limnology and Oceanography* **48**: 1408-1418.
- VADEBONCOEUR, Y., D. M. LODGE, and S. R. CARPENTER. 2001. Whole-lake fertilization effects on distribution of primary production between benthic and pelagic habitats. *Ecology* **82**: 1065-1077.
- VADEBONCOEUR, Y., M. J. VANDER ZANDEN, and D. M. LODGE. 2002. Putting the lake back together: reintegrating benthic pathways into lake food web models. *Bioscience* **52**: 44-54.

- VAN DONK, E., L. SANTAMARIA, and W. M. MOOIJ. 2003. Climate warming causes regime shifts in lake food webs: a reassessment. *Limnology and Oceanography* **48**: 1350-1353.
- VANDER ZANDEN, M. J., G. CABANA, and J. B. RASMUSSEN. 1997. Comparing trophic position of freshwater fish calculated using stable isotope nitrogen ratios and literature dietary data. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**: 1142-1158.
- VANDER ZANDEN, M. J., J. M. CASSELMAN, and J. B. RASMUSSEN. 1999a. Stable isotope evidence for the food web consequences of species invasion in lakes. *Nature* **401**: 464-467.
- VANDER ZANDEN, M. J., S. CHANDRA, B. C. ALLEN, J. E. REUTER, and C. R. GOLDMAN. 2003. Historical food web structure and restoration of native aquatic communities in the Lake Tahoe (California-Nevada) basin. *Ecosystems* **6**: 274-288.
- VANDER ZANDEN, M. J., J. D. OLDEN, J. H. THORNE, and N. E. MANDRAK. 2004a. Predicting occurrences and impacts of smallmouth bass introductions in north temperate lakes. *Ecological Applications* **14**: 132-148.
- VANDER ZANDEN, M. J., and J. B. RASMUSSEN. 2001. Variation in delta N-15 and delta C-13 trophic fractionation: Implications for aquatic food web studies. *Limnology and Oceanography* **46**: 2061-2066.
- VANDER ZANDEN, M. J., B. J. SHUTER, N. LESTER, and J. B. RASMUSSEN. 1999b. Patterns of Food Chain Length in Lakes: A Stable Isotope Study. *The American Naturalist* **154**: 406-416.
- VANDER ZANDEN, M. J., and Y. VADEBONCOEUR. 2002. Fishes as integrators of benthic and pelagic food webs in lakes. *Ecology* **83**: 2152-2161.
- VANDER ZANDEN, M. J., K. A. WILSON, J. M. CASSELMAN, and N. D. TAN. 2004b. Species introductions and their impacts in North American Shield lakes. *In* J. M. Gunn, J.M. Ryder and R. A. Steedman [eds], *Boreal Shield Watersheds : Lake Trout Ecosystems in a Changing Environment*. CRC Press, Boca Raton, 239-263.
- VANDERKLIFT, M. A., and S. PONSARD. 2003. Sources of variation in consumer-diet delta N-15 enrichment: a meta-analysis. *Oecologia* **136**: 169-182.
- WAINRIGHT, S. C., M. J. FOGARTY, R. C. GREENFIELD, and B. FRY. 1993. Long-term changes in the Georges Bank food web: trends in stable isotopic compositions of fish scales. *Marine Biology* **115**: 481-493.
- WANNINKHOF, R. 1992. Relationship between wind-speed and gas-exchange over the Ocean. *Journal of Geophysical Research-Oceans* **97**: 7373-7382.
- WANNINKOF, R., and M. KNOX. 1996. Chemical enhancement of CO₂ exchange in natural waters. *Limnology and Oceanography* **41**: 689-697.
- WANTZEN, K. M., F. DE ARRUDA MACHADO, M. VOSS, H. BORISS, and W. J. JUNK. 2002. Seasonal isotopic shifts in fish of the Pantanal wetland, Brazil. *Aquatic Sciences* **64**: 239-251.
- WELCOMME, R. L. 1979. *Fisheries ecology of floodplain rivers*. Longman. London. 317 pp.
- WETZEL, R. G. 2001. *Limnology. Lake and river ecosystems*, 3rd ed. Academic Press, San Diego, 1006 pp.

- WHITCAR, M. J. 1999. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chemical Geology* **161**: 291-314.
- WILSON, J. P. F., and T. J. PITCHER. 1984. Age determination and growth of the pollan, *Coregonus autumnalis* pollan Thompson, of Lough Neagh, Northern Ireland. *Journal of Fish Biology* **24**: 151-163.
- WINEMILLER, K. O., and D. B. JEPSEN. 1998. Effects of seasonality and fish movement on tropical river food webs. *Journal of Fish Biology* **53**: 267-296.
- WONG, W. W., and W. M. SACKETT. 1978. Fractionation of stable isotopes by marine phytoplankton. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **42**: 1809-1815.
- YOSHIOKA, T., E. WADA, and H. HAYASHI. 1994. A stable isotope study on seasonal food web dynamics in a eutrophic lake. *Ecology* **75**: 835-846.
- ZOHARY, T., J. EREZ, M. GOPHEN, I. BERMAN-FRANK, and M. STILLER. 1994. Seasonality of stable carbon isotopes within the pelagic food web of Lake Kinneret. *Limnology and Oceanography* **39**: 1030-1043.