



HAL
open science

Structure et fonctionnement des réseaux trophiques par l'utilisation de traceurs écologiques (isotopes stables, métaux) en environnement marin ouvert : le cas du Golfe de Gascogne

Tiphaine Chauvelon

► **To cite this version:**

Tiphaine Chauvelon. Structure et fonctionnement des réseaux trophiques par l'utilisation de traceurs écologiques (isotopes stables, métaux) en environnement marin ouvert : le cas du Golfe de Gascogne. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2011. Français. NNT : 2011LAROS344 . tel-00718595

HAL Id: tel-00718595

<https://theses.hal.science/tel-00718595>

Submitted on 17 Jul 2012

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.

**Structure et fonctionnement des réseaux trophiques par
l'utilisation de traceurs écologiques (isotopes stables, métaux) en
environnement marin ouvert : le cas du Golfe de Gascogne**



Thèse présentée par Tiphaine CHOUVELON

Soutenue le 6 décembre 2011

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Spécialité : Écologie Marine

JURY :

Véronique LESAGE
Frédéric MÉNARD
Pierre RICHARD
Florence CAURANT
Jacques MASSÉ
Paco BUSTAMANTE

Chercheur, Pêche et Océans Canada, Rapporteur
Directeur de recherche, IRD, Rapporteur
Directeur de recherche, CNRS, Président du jury
Maître de Conférences-HDR, Université de La Rochelle, Examinatrice
Chercheur, IFREMER, Invité
Professeur, Université de La Rochelle, Directeur de thèse



UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

École Doctorale Sciences pour l'Environnement Gay Lussac

Structure et fonctionnement des réseaux trophiques par l'utilisation de traceurs écologiques (isotopes stables, métaux) en environnement marin ouvert : le cas du Golfe de Gascogne

Thèse présentée par Tiphaine CHOUVELON

Soutenue le 6 décembre 2011

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Spécialité : Écologie Marine

JURY :

Véronique LESAGE

Frédéric MÉNARD

Pierre RICHARD

Florence CAURANT

Jacques MASSÉ

Paco BUSTAMANTE

Chercheur, Pêche et Océans Canada, Rapporteur

Directeur de recherche, IRD, Rapporteur

Directeur de recherche, CNRS, Président du jury

Maître de Conférences-HDR, Université de La Rochelle, Examinatrice

Chercheur, IFREMER, Invité

Professeur, Université de La Rochelle, Directeur de thèse



REMERCIEMENTS

Après ces quelques années de thèse, voici (enfin !) venu le moment de remercier les personnes qui m'ont accompagnées pendant ce projet. Et il est bien difficile de savoir par où commencer, ou de ne pas oublier quelqu'un. On dit souvent que la thèse est "une formation à et par la recherche", et c'est tout à fait ça. Mais c'est surtout bien plus que ça ! Et les conditions dans lesquelles se déroule une thèse ainsi que les personnes côtoyées y sont pour beaucoup. Il y a trois ans, j'ai hésité à me lancer dans l'aventure. Si j'avais su... je me mordrais bien les doigts aujourd'hui d'y avoir renoncé !

Je tiens tout d'abord à remercier Sylvain Lamare et Pierre Richard, directeurs successifs du LIENSs, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire, et de m'avoir ainsi permis d'effectuer cette thèse dans de très bonnes conditions. Je remercie également la Région Poitou-Charentes d'avoir financé ce projet.

Je tiens ensuite à remercier très sincèrement les membres du jury, qui me font l'honneur d'évaluer ce travail : Paco Bustamante et Florence Caurant, qui m'ont encadrée ; Véronique Lesage et Frédéric Ménard, qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail ; Éric Feunteun, qui présidera ce jury ; Pierre Richard, qui sera examinateur ; enfin Jacques Massé, qui s'est montré enthousiaste pour participer à ce jury en tant qu'invité. Vos horizons divers de recherche me font attendre vos impressions et vos remarques.

Dans cette foulée, j'en profite pour remercier Yves Cherel, qui a participé à mon comité de thèse et ainsi à mon encadrement. Yves, tu ne pourras pas être présent à la soutenance (et la raison de ton absence me fait bien envier !), mais je te remercie très chaleureusement pour ton implication dans cette thèse. Tu es un scientifique que j'estime beaucoup, tes remarques et tes conseils ont toujours été très constructifs lors de nos rencontres. Si nous avons de nouveau l'occasion de travailler ensemble un jour, ce sera avec grand plaisir.

De même, je souhaite remercier Vincent Ridoux, qui a participé à l'un de mes comités de thèse. Tu acceptes toujours de t'impliquer dans les réflexions ou les corrections en prétextant un "regard naïf" sur les traceurs écologiques. J'ai bien du mal à y croire ;-)... D'autre part, si j'ai eu la chance d'effectuer cette thèse, c'est aussi un peu grâce à toi, à Paco et à Florence aussi, évidemment ! Vous avez en effet ouvert un sujet de M2 "isotopes" sur les dauphins de Pleubian. Même si à l'époque, je "mangeais à tous les râteliers" en termes de recherche de stage (n'est-ce pas, Pierrick), quelle belle opportunité cela a été pour moi ! Le début de cette aventure, finalement...

Alors comment te remercier, Paco ? El boss. Mais quel boss. Je vais tout simplement commencer par te remercier pour avoir permis que ce sujet prenne vie et qu'il soit financé ; puis, de m'avoir permis de rester dans les parages du labo, en attendant que cette thèse puisse débiter ; enfin, de m'avoir fait confiance et d'avoir cru que j'étais capable de mener ce projet. Je te remercie également pour la confiance que tu m'as accordée en me déléguant quelques-uns de tes enseignements. J'y ai tellement appris. Même si je crois que je n'ai jamais eu autant la trouille que d'assurer ces premiers TD seule face aux étudiants, cela a été formateur à bien des égards. Je te remercie de m'avoir soutenue et d'avoir toujours trouvé les moyens financiers notamment pour que je puisse participer aux missions et aux formations que j'ai souhaité

réaliser au cours de cette thèse (même si tu m'as "interdit" d'embarquer en 3^{ème} année ;-)). À ce propos d'ailleurs, merci pour la parenthèse calmars géants à Luarca avec A. Guerra (je crois que mon père a toujours rêvé que j'étudie les calmars géants). Je te remercie encore pour m'avoir encadrée, à tes côtés on apprend à être pragmatique ; même si ce n'est toujours pas mon fort ! En sciences et en recherche, et même souvent dans la vie, il faut pourtant avouer que c'est bien utile... Tu es un scientifique que j'estime beaucoup. Et, malgré tes nombreuses responsabilités au cours de cette thèse, j'ai toujours su que tu trouverais un peu de temps à me consacrer lorsque le besoin s'en ferait ressentir. Pour tout ça, encore merci. Car sans toi Paco, pas de thèse (je ne me serais sûrement pas lancée) et donc pas d'aventure aussi enrichissante, professionnellement et personnellement, que ce projet a été pour moi. Je considère que j'ai vraiment eu beaucoup de chance de t'avoir comme directeur de thèse. Mais désormais que ce doctorat est fini, je ne veux plus entendre parler de tes talents de pêcheur, de chasseur et de cuisinier. Car je ne crois que c'que j'vois, moi, si tu vois ce que j'veux dire ;-).

Florence, je te remercie pour ton implication dans cette thèse, et plus particulièrement ces derniers mois. Scientifiquement, tu aspiras toujours à voir un côté très appliqué aux résultats obtenus avec les traceurs et c'est très motivant ; cela s'est encore vu lors des dernières corrections. Tes remarques sont toujours très pertinentes et constructives. Humainement, cela m'a fait particulièrement plaisir de te voir me considérer comme l'une de tes thésardes depuis quelques temps. Et puis, je garde un très bon souvenir de ces quelques soirées "entre filles" avec les deux autres super poulettes que je ne risque pas d'oublier un peu plus loin dans ces remerciements. Pour ton soutien en ces derniers moments, encore merci Florence !

Je souhaite également remercier chaleureusement Pierre Richard, de nouveau, qui depuis mes premiers pas dans les isotopes stables est toujours prêt à répondre à mes questions. Ceci avec une patience, et je dirais même une passion, qui n'ont d'égales que sa compétence dans ce domaine. Pierre, c'est toujours un plaisir de discuter sur les isotopes avec toi. Même si, avec tes nouvelles responsabilités notamment, je regrette que ces discussions n'aient pas été plus nombreuses au cours de cette thèse.

Pendant que je suis dans les mentors, je ne peux pas ne pas te consacrer un petit paragraphe, Docteur Jérôme Spitz. Ton soutien et ta contribution dans ce travail sont inestimables. Modèle de patience, de créativité, maître poissonnier et maître en l'art de la relativisation, il n'en fallait pas moins pour que je vienne te réquisitionner plus d'une fois au cours de cette thèse ! En fait, pour ton bien, t'aurais peut-être pas dû être dans le bureau d'en face ;-). Tu dis avoir un côté antisocial, mais à mes côtés, pendant cette thèse, tu l'as vite oublié ! Tu es vraiment un super collègue ; que ce soit sur le terrain ou derrière l'ordi, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci infiniment Jérôme, pour tout.

Je souhaite maintenant remercier chaleureusement toutes celles et ceux qui ont largement contribué à ce que les analyses et les résultats qui figurent dans ce travail existent, dans un premier temps ; celles et ceux qui ont permis que ces résultats prennent un peu vie, ensuite :

- Les chefs de mission des campagnes EVHOE, Jean-Pierre Léauté, Robert Bellail, Jean-Claude Mahé, Michèle Salaun, et les chefs de mission des campagnes PELGAS, Jacques Massé et Pierre Petitgas, qui m'ont permis de participer à ces campagnes ; Pascal Lorange également, pour l'échantillonnage de la faune profonde sur EVHOE 2009. Quel bon moment à chaque fois ! J'y ai rencontré de chouettes personnes, et je salue en particulier quelques Ifremériens qui m'ont filé un sacré coup de main lors de la récolte de mes échantillons : Françoise Mornet (qui a fait bien plus que lors de ces campagnes, une sacrée technicienne, en mer comme sur terre, chapeau ! Promis, je désencombre les congélateurs de l'Houmeau dès que possible...), Nicolas Caroff (un merci tout particulier pour la mission Mer Celtique et Manche/Mer du Nord ; les échantillons encombrant encore mon congélateur... et le

congélateur des autres...), Erwan Duhamel (le Bonobo reconverti... en coq de poulailler), Olivier Mouchel (Mouche Mouche et son regard avisé), Ludovic Bouché, Aurélie Nadeau, Florence Cornette, Armelle Latrouite, Laurence Pennors, qui débordent chacun et chacune d'énergie, Yann Coupeau (un cas particulier celui-là, je serais bien obligé d'y revenir), Martin Huret et Paul Bourriau pour les nuits folles en hydro (ben oui, l'hydro, ça se fait la nuit). Et bien sûr je suis obligée d'en oublier un paquet car la liste est longue (Momo, Patrick, Damien, Matthieu, Sophie, Emilie...), mais sachez que c'est avec beaucoup de plaisir que je réembarquerai avec vous ! Je ne peux tout de même pas oublier de remercier l'équipage également, qui fait aussi vivre ces campagnes scientifiques (et notamment les cap'tains, euh, commandant et second, Michel et Robert). Tout de même, un clin d'œil spécial à Régis dit Brutus : ma "synthèse" touche enfin à sa fin ("quoi ?! 3 ans pour faire une "synthèse" ?! Mais sur quoi ?!" ;-)). Les campagnes, ça vous gagne !

- Gaël Guillou, qui a réalisé la très grande majorité des analyses isotopiques. Merci Gaël pour ton efficacité, et puis pour les discussions annexes pendant ces longues journées de boulettes... Par contre, je ne te remercie pas pour m'avoir renversé une boîte de boulettes, chose que j'avais pourtant réussie à ne pas faire jusque-là ! ;-). Tu vois, en cette fin de rédaction, je rêve parfois de faire des journées de boulettes. Ça ne saurait tarder...

- Carine Churlaud, qui a réalisé quelques-unes des analyses métalliques. Mais Carine, je vais plutôt te remercier pour ta gentillesse et ta patience lors de mes nombreux passages de visite à ce vieillard d'AMA, qui néanmoins, aura rempli son contrat ! C'était toujours un plaisir. Merci aussi à Michel Robert et Mulumba Kalombo, qui ont participé à certains dosages de métaux.

- Un grand merci également à celles et ceux qui ont eu la chance ou la malchance de faire un stage avec moi (à vous de choisir !). À vos côtés, j'ai beaucoup appris aussi, et cela a été un réel plaisir. Ce travail ne serait évidemment pas ce qu'il est sans votre contribution. Presque dans l'ordre : Aurélie Lassus-Débat, Richard Sirmel, Flora Laugier, Julien Autier, Edvin Le Goff, et bien sûr, Alexis Chappuis. Un merci tout spécial, effectivement, au roi des ces stagiaires, Alexis, qui est revenu par trois fois ! Merci Alexis pour ton investissement remarquable dans cette thèse. Je te souhaite à toi et aux autres aussi, bien sûr, de réussir dans la voie que vous avez choisie. Vous le méritez, et je n'en doute pas !

- Christine Dupuy, pour son implication dans Reproduce et pour avoir ainsi permis que le plancton (une petite partie seulement de ce tout petit monde !) ne reste pas une boîte noire de cette thèse. Christine je te remercie donc pour cette collaboration fructueuse avec Alexis et Paco ; ce n'était sûrement qu'un début... puisque bien sûr, je te remercie également de me permettre, avec Paco, de vivre cette fin de thèse plus sereinement... encore merci !

- Sébastien Lefebvre, qui nous a enseigné les mixing models à Alexis et à moi-même lors d'un cours passage à Wimereux dans le ch'nord. Sébastien je te remercie très sincèrement pour ton accueil plus que sympathique, et de nous avoir consacré de ton temps, malgré un planning que j'imagine plus que chargé. Encore merci, cela nous a beaucoup servi ! En parlant mixing models, je ne peux pas m'empêcher de remercier de même Mathieu Autier, doctorant à Chizé, expert bayésien et sûrement en dernière ligne droite de rédaction également, d'avoir pris de son temps pour nous initier à SIAR l'été dernier, Paula, Aurore et moi.

- Benoît Simon-Bouhet, Beubeu je te remercie de toujours trouver infiniment de patience pour nous éclairer sur une question stat, ou sur les mystères de Rrrrrr !!! Puis pour ta bonne humeur, tout simplement, et pour les quelques heures à Montmorillon, l'expérience avec les lycéens était très sympa même si elle ne s'est pas renouvelée souvent (après la thèse, j'aurais plus de temps ;-)...).

- Merci enfin aux cartographes Cécilia Pignon-Mussaud, Dorothee James, Pascal Brunello, d'une efficacité remarquable pour les quelques cartes toujours demandées au dernier moment, évidemment ! (même si je prétextais une non urgence...).

Je souhaite également remercier l'ensemble du personnel administratif, en particulier Sylvie Jaouen en début de thèse, Nicolas Alligner, Lucia Picard, Johan Guiard et Marie Chivaille, dont j'ai davantage sollicité les services. Toujours arrangeants et super efficaces, merci à vous. Et bien sûr merci à Thierry, Martine et Nicolas, toujours prêt à filer un coup de main ! Merci aussi à Armelle Combaud qui m'a embarquée dans quelques actions de vulgarisation, car ces opportunités sont également très enrichissantes. Enfin, un grand merci à Brigitte Hudelaine (j'espère que tu profites bien de cette retraite bien méritée), et Jennifer de la Corté de l'école doctorale, pour leur accueil toujours sympathique.

Dans cette foulée, je souhaite remercier très chaleureusement toutes celles et ceux qui s'impliquent dans les formations doctorales, et en particulier Frédérique Deloffre-Vye (pour un exemple "bien senti", comme elle dirait...). Merci Frédérique pour ton engagement et ton soutien auprès des jeunes docteurs, cela a été un vrai plaisir que de se former à tes côtés. Merci encore pour tous ces précieux conseils !

Merci à ceux qui, au détour d'un couloir de l'ILE, remontent le moral et soutiennent en ces derniers moments : Thierry, Gilles, Denis, Cécile, Benoît SB, Vanessa, Johann, Hélène M, Hélène A, Valérie, Pierrick, Pascale, Nathalie I, Nathalie N, Jérôme J... C'est un plaisir que de travailler à vos côtés au sein du LIENSs ; quand ce n'est pas pour aller faire un peu de grimpe (merci Thierry !), ou un peu de gym (merci Valérie et Vanessa ! Promis, je m'y remets bientôt...).

Un grand merci à la petite troupe du CRMM du côté CCA... c'est toujours un plaisir que de côtoyer ces mammifères au détour d'une réunion ou d'une visite au mercure, pour le moral !! : Olivier, Willy, Ghislain, Fabien, et les filles (nombreuses maintenant !) Laurence, Sophie, Ludivine, Flore, Émeline et Hélène F, merci pour votre bonne humeur communicative !

Un grand merci également à Sidonie Marty, qui a réalisé un superbe triptyque de mon sujet de thèse. Une vraie surprise, mais quelle belle surprise !

J'en viens à remercier les "anciens", ceux qui ont été un jour à ma place, les nouveaux docs (plus tous jeunes ! pour certains...;-)), et qui par leur enthousiasme à l'époque m'ont donné plus qu'envie de suivre leurs traces : Thomas Lakwee et Marc tout d'abord (les ex thésards du Pac comme ils disent, votre soutien en qualité "d'ex" compte beaucoup !), mais aussi bien sûr ceux que j'ai davantage côtoyés dans les couloirs de l'ILE. Dans le désordre : Elodie, Benoît L, Aurore, Vanessa, Jérôme S, Julien, Margot, Pascaline, Marcella, Andrea, Camille L, Camille P, Aline, Thomas Mili, Marion R, Mathieu L, Gwen, Fred, Jérôme... Certains d'entre vous sont encore dans les parages, et votre soutien dans cette dernière ligne droite, en tant "qu'anciens", compte énormément ! J'espère que ceux-là se reconnaîtront sinon ces remerciements vont faire dix pages ! Je salue également le soutien de docs d'ailleurs, nouveaux arrivés au LIENSs mais qui m'encouragent et me rassurent dans ces derniers moments : Magali, Géraldine, Benoît, et Marie plus récemment.

J'ai bien sûr une pensée toute particulière pour ceux vivent ce dernier sprint du marathon de thèse en même temps moi : Hélène P, Sébastien, Paula, Luc, Thomas G, Lara, Samuel, Marie-Élise... Courage, on en voit la fin !! Merci également aux futurs docs qui ont encore un peu de temps devant eux, et qui m'ont encouragée pendant ces derniers mois : Richard, Blanche, Joana, Julie, Alex, Laura, Céline... Enfin, je remercie celles qui sont parties vers d'autres horizons et qui soutiennent à la moindre occasion de visite : Marion D, Stéphanie, Camille F... Encore merci !

La liste est déjà longue.... mais je ne peux pas vous remercier si vite, les deux meilleures "remonteuses" de moral que l'on puisse espérer côtoyer en thèse.... et surtout en dehors de la thèse !! J'ai nommé : Paula et Aurore. Quelle complémentarité ! Aurore, modèle de patience, qui a toujours les mots pour rassurer. Paula, débordante de dynamisme et qui trouve toujours les mots pour booster, et surtout, qui me supporte depuis les débuts (la pauvre !). J'ai du mal à trouver les mots justes, sachez que je n'en pense pas moins.... Pour les moments mémorables je retiendrais notamment ce week-end d'ULM en Normandie avec Gérard (merci Gérard !... un pensée toute particulière...), ce séjour dans les Highlands écossaises accompagnées de 2 Yann tout droit sortis de la préhistoire, enfin, les "bon les filles, on ne parle pas aujourd'hui" lorsqu'en fin d'année dernière, nous partagions toutes les 3 le même bureau... Infiniment merci les amies !

Un grand merci également à celles et ceux qui soutiennent de loin (et qui se demandent toujours c'que j'peux bien faire sur La Rochelle depuis toutes ces années !) : Mag, Lydia, Jawad, Emilie, Cécile... promis je viendrais vous voir plus souvent désormais.

Un merci tout spécial à la famille Papin-Coupeau-Fromentin pour leur accueil chaleureux tous ces nombreux week-ends, pour mon ravitaillement hebdomadaire en fraises et autres courgettes cet été. À Caro et Manu en particulier, les "bénévoles restaurant" sur qui j'ai pu compter de nombreuses fois ! Cécé, toujours aux petits soins également ; merci !!

Bon, ben je n'aurais pas réussi à être concise... Pas de ma faute si je ne côtoie que des gens détestables ;-)...

Mes derniers remerciements seront pour ma famille, et pour mes parents en particulier qui m'ont toujours soutenue et encouragée à poursuivre dans la voie que j'ai choisie. Un grand merci. Les fameux abonnements à Cousteau Junior Magasine et autres Sciences et Vie Junior sont peut-être bien les fautifs dans cette histoire ! Merci pour ces coups de téléphone (maman) et ces petits mails (papa) (chacun son truc !), pour me soutenir et me redonner confiance en cette dernière ligne droite. Je vous dois tellement. À la sœurette, un grand merci également pour ces midis de décompression... Au bout de 3 ans c'est toujours drôle de t'entendre parler de mon sujet de thèse ("poisson demersalo-trofitruc qui structure la colonne d'eau..."), mais heureusement, il y a eu le tableau de Sidonie pour te réconcilier avec ce sujet ! ;-)... Je vais être plus dispo pour la nénette désormais ;-). Esthelle, pour ton soutien indéfectible ! Et le frérot, bien loin de ce demersalo-trofitruc quelque part en terre australienne, mais qui m'a bien motivée pour en finir au plus vite, et peut-être bien aller le rejoindre pour un bol d'air en Océanie !...

Je n'oublie pas la p'tite Louloune qui en a supporté bien des choses parfois.

Enfin, merci à toi Yann, pour ton soutien au quotidien, et pour savoir me remonter le moral quand je n'y crois plus beaucoup. La vie est faite de belles surprises, cette thèse en a été la preuve. Il s'en est passé des choses depuis 3 ans... *Alors maintenant mon D*****, c'est quand qu'on va où ?!.....*

SOMMAIRE

Avant-propos	1
Organisation du manuscrit	5
Chapitre I - Introduction et contexte général	9
I.1 Un bilan un peu pessimiste de l'usage par l'Homme des écosystèmes marins, mais une volonté certaine de reprendre les choses en main.....	9
I.2 Les réseaux trophiques au cœur de la structure et du fonctionnement des écosystèmes.....	12
I.3 Les méthodes d'étude de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques et du régime alimentaire des organismes en environnement marin	15
I.4 Le concept de traceurs écologiques dans ce contexte.....	17
I.5 Hypothèse et objectifs de la thèse.....	20
Chapitre II - Quels traceurs, dans quels tissus, pour quelle(s) information(s) en écologie trophique marine ?	25
II.1 Les profils d'acides gras.....	25
II.2 Les isotopes stables du carbone et de l'azote.....	27
II.3 Les contaminants chimiques : polluants organiques persistants et éléments traces.....	32
Chapitre III - Un peu de protocole, de stratégie et de mise au point méthodologique....	39
III.1 La nécessité d'un échantillonnage adapté aux traceurs choisis	39
III.1.1 Tissus prélevés	39
III.1.2 Espèces et individus échantillonnés.....	42
III.1.3 Campagnes océanographiques (saisons/années échantillonnées).....	43
III.2 La nécessité d'une approche technique adaptée aux analyses effectuées.....	45
III.2.1 Conservation des échantillons.....	45
III.2.2 Préparation des échantillons pour analyses.....	48
Chapitre IV - Facteurs de variations biologiques des traceurs : variabilité intra et interspécifique, échelles des individus et de l'espèce	53
IV.1 Un petit état des lieux des facteurs de variations biologiques possibles	53
IV.2 Quelles informations sont apportées par la variabilité intraspécifique et les changements ontogéniques ?	55
IV.2.1 Cas des isotopes stables du carbone et de l'azote dans le muscle (céphalopodes et poissons) .	57
IV.2.2 Cas des concentrations en Hg dans le muscle (céphalopodes et poissons).....	59
IV.2.3 Cas des concentrations en Cd dans la glande digestive (céphalopodes)	61
IV.3 Quelles informations sont apportées par la variabilité interspécifique ?.....	62

IV.3.1	Exemple des céphalopodes : hétérothermes marins de niveau trophique intermédiaire	63
IV.3.2	Exemple des cétacés: homéothermes marins de niveau trophique supérieur.....	65
IV.4	Isotopes ou métaux, faut-il choisir ?	68

Chapitre V - Facteurs de variations environnementaux des traceurs : variabilité spatio-temporelle, échelles des réseaux trophiques et de l'écosystème..... 71

V.1	Un petit rappel des spécificités du Golfe de Gascogne	71
V.2	Une variabilité spatiale des signatures isotopiques incontestable	75
V.2.1	Mise en évidence d'un gradient côte-large, et de différences entre les systèmes nord-sud et benthique-pélagique.....	75
V.2.2	Processus à l'origine de ces variations spatiales, et des variations en $\delta^{15}\text{N}$ en particulier.....	77
V.3	Une variabilité temporelle moins constante : exemple de quelques espèces fourrages	83
V.3.1	Mise en évidence de variations interannuelles et saisonnières des signatures isotopiques	83
V.3.2	Processus à l'origine de ces variations temporelles	86
V.4	Quelle implication des variations spatio-temporelles pour l'utilisation des traceurs isotopiques en environnement marin ouvert ?.....	88

Chapitre VI - Utilisation des traceurs pour l'étude de l'écologie trophique d'une espèce et des relations interspécifiques..... 93

VI.1	Que peut apporter le traçage isotopique naturel dans l'étude des relations interspécifiques ?	93
VI.1.1	Relations interspécifiques et niche trophique d'une espèce au sein d'un écosystème	93
VI.1.2	Niche isotopique et approche quantitative de la niche trophique et des relations interspécifiques par les modèles de mélange.....	96
VI.2	Une exploration du potentiel des modèles de mélange au niveau des échelons trophiques intermédiaires dans le Golfe de Gascogne	100
VI.2.1	Variabilité spatiale des signatures isotopiques, encore et toujours	101
VI.2.2	Modèles de mélange et étude des relations trophiques mésozooplancton-petits poissons pélagiques dans le Golfe de Gascogne.....	105
VI.3	Suite de l'investigation au niveau des échelons trophiques supérieurs et à plus large échelle.....	108
VI.3.1	Cas du bar <i>Dicentrarchus labrax</i> dans le Golfe de Gascogne	108
VI.3.2	Cas du dauphin commun <i>Delphinus delphis</i> dans le nord-ouest de la péninsule ibérique.....	112
VI.4	Traçage isotopique naturel et contenus stomacaux pour l'étude d'une ou quelques espèces et des relations interspécifiques : un duo gagnant	115

Chapitre VII - Utilisation des traceurs pour l'étude de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques en environnement marin ouvert : le cas du Golfe de Gascogne..... 119

VII.1	Les traceurs isotopiques face à quelques concepts clés dans l'étude de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques.....	119
VII.1.1	Une donnée centrale en écologie : la position trophique (TP) des organismes	119
VII.1.2	Quels indicateurs de structure et de fonctionnement des réseaux trophiques sont donc envisageables avec les traceurs isotopiques ? Un petit tour d'horizon	122
VII.2	Application et apport de l'indicateur TP développé dans le Golfe de Gascogne à partir des traceurs isotopiques	126
VII.2.1	Mise en place dans un environnement contrasté et spatialement très variable d'un point de vue isotopique.....	126
VII.2.2	Quelles informations sont apportées par l'évaluation initiale des TP ainsi calculées à large échelle dans le Golfe de Gascogne ?.....	130
VII.3	Apport de l'indicateur TP pour l'étude du comportement des contaminants dans les réseaux trophiques du Golfe de Gascogne : exemple du Hg.....	136
VII.3.1	Un effet de la TP finalement assez limité et l'importance d'autres facteurs tels que l'habitat	137
VII.3.2	Discussion de ces résultats dans le contexte des traceurs écologiques	141
VII.4	Quelles perspectives pour les indicateurs de structure et de fonctionnement des réseaux trophiques issus des traceurs écologiques ?.....	144
Chapitre VIII - Discussion générale, conclusions et perspectives		149
VIII.1	Traceurs écologiques et réseaux trophiques complexes en environnement marin ouvert : un bilan général de cette étude dans le Golfe de Gascogne.....	149
VIII.2	Les limites de l'approche aux échelles d'intégration envisagées	152
VIII.2.1	Des limites inhérentes à la volonté d'échantillonner un écosystème complexe.....	152
VIII.2.2	Des limites inhérentes à la considération d'une grande diversité biologique associée à ces écosystèmes complexes	154
VIII.3	Vers un « bon usage » des traceurs écologiques.....	155
VIII.3.1	La petite sépiole ne mange pas le cachalot.....	155
VIII.3.2	Un schéma conceptuel pour une utilisation « raisonnée » des traceurs isotopiques et métalliques en environnement marin ouvert.....	156
VIII.4	Les traceurs écologiques dans le contexte d'un besoin d'indicateurs et d'outils de suivi de la structure, du fonctionnement, et de l'état des écosystèmes marins.....	159
VIII.5	Perspectives	161
VIII.5.1	Perspectives à l'échelle d'une ou quelques espèces	161
VIII.5.2	Perspectives à l'échelle des réseaux trophiques et de l'écosystème	164
Références.....		167

Annexe 1.....	185
Effects of ethanol preservation on stable isotopes ratios and mercury concentrations in fish muscle and liver	185
Annexe 2.....	193
An efficient delipidation method previous to stable isotope analysis that does not affect $\delta^{15}\text{N}$ values of marine organisms	193
Annexe 3.....	199
Inter-specific and ontogenic differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and Hg and Cd concentrations in cephalopods.....	199
Annexe 4.....	215
Stable isotope ratios in fish reveal different feeding strategies and muscle Hg bioaccumulation patterns during ontogenesis.....	215
Annexe 5.....	233
Spatio-temporal variations in stable isotopic signatures revisit the use of $\delta^{15}\text{N}$ in mesoscale studies of marine food webs. The case of an open ecosystem: the Bay of Biscay (North-East Atlantic)	233
Annexe 6.....	265
Trophic ecology of European sardine <i>Sardina pilchardus</i> and anchovy <i>Engraulis encrasicolus</i> in the Bay of Biscay (North-East Atlantic) inferred from $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotopic signatures	265
Annexe 7.....	289
Feeding ecology and prey choice by adult sea bass, <i>Dicentrarchus labrax</i>, in the north-eastern Atlantic	289
Annexe 8.....	311
Foraging ecology of five toothed whale species in the North West Iberian Peninsula, inferred using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotopic signatures	311
Annexe 9.....	337
Enhanced bioaccumulation of mercury in deep-sea fauna from the Bay of Biscay (North-East Atlantic) revealed by stable isotope analysis.....	337
Annexe 10.....	367
Isotopic investigation of mercury accumulation in the oceanic and deep-sea food webs from the Bay of Biscay.....	367
Annexe 11.....	371
Use of stable carbon and nitrogen isotopes for trophic levels evaluation and food webs reconstruction: the Bay of Biscay case study	371

AVANT-PROPOS

Lors de la création du laboratoire LIENSs (Littoral, Environnement et Sociétés, UMR 6250) au 1^{er} janvier 2008, le regroupement d'équipes de recherche compétentes pour l'utilisation de différents outils analytiques en écologie trophique (e.g., isotopes stables, acides gras, éléments traces) a encouragé la création d'un atelier « Traceurs en Ecologie » au sein du laboratoire. L'atelier devait ainsi constituer un support au développement d'approches couplant ces différents outils pour appréhender et comprendre, d'une façon générale, les processus impliqués dans la structuration et le fonctionnement des écosystèmes marins ; ceci à l'échelle de quelques modèles biologiques d'intérêt ou de celle des réseaux trophiques.

A cette époque, au sein des équipes ainsi réunies, l'utilisation du traçage isotopique naturel seul et/ou couplé à l'analyse des profils d'acides gras pour l'étude des réseaux trophiques en environnement côtier était déjà bien rôdée. Concernant les métaux traces mercure (Hg) et cadmium (Cd), les travaux de thèse de Virginie Lahaye en particulier (thèse soutenue à l'Université de La Rochelle en 2006) ont permis de les identifier comme traceurs potentiels des préférences alimentaires chez les petits cétacés (surtout le Cd). L'opportunité d'un échouage en masse de dauphins communs a ensuite permis d'appliquer une approche « multitraceurs » à ce modèle biologique en Atlantique Nord-Est. Le couplage des différents outils analytiques, susceptibles d'apporter chacun une information sur le régime alimentaire des individus à différentes échelles de temps d'intégration, devait ainsi permettre d'estimer le temps probable de vie commune de cette unité sociale putative. L'analyse des isotopes stables en particulier, sur ce groupe d'individus, a fait l'objet d'un stage de Master 2 dont je fus la candidate au cours de l'année 2007. Cependant, des données de métaux (provenant de la thèse de V. Lahaye notamment) étaient disponibles concernant les niveaux trophiques inférieurs et permettaient de ce fait de bien interpréter les différentes concentrations de Hg et Cd mesurées chez les individus du groupe. En revanche, des données isotopiques sur les proies potentielles des cétacés en question manquaient clairement pour expliquer les différences de valeurs isotopiques retrouvées au sein du troupeau, par comparaison avec d'autres individus issus d'échouages aléatoires le long des côtes françaises.

Dans ce contexte, et dans l'objectif plus général de développer des approches « multitraceurs » à l'échelle de réseaux trophiques tels que ceux encore très peu étudiés du Golfe de Gascogne en Atlantique Nord-Est (i.e., réseaux trophiques autres que ceux des écosystèmes côtiers déjà étudiés au sein du laboratoire), l'opportunité de développer un sujet de thèse était toute trouvée. Cette thèse a ainsi débuté en octobre 2008. En parallèle, la thèse de Paula Mèndez Fernandez commençait, avec pour objectif principal le développement d'une approche « multitraceurs » au sein de la communauté de mammifères marins de la péninsule ibérique, et de l'Atlantique Nord-Est en général, pour l'identification potentielle de flux d'individus entre les différentes zones. Les deux sujets de thèse trouvaient ainsi une bonne complémentarité : approfondissement de l'utilisation des traceurs écologiques à l'échelle d'un écosystème (i.e., le Golfe de Gascogne) dans le cadre de ma thèse ; comparaison possible des informations obtenues par les différents traceurs dans deux zones adjacentes de l'Atlantique Nord-Est, à l'échelle de la communauté de petits cétacés, dans le cadre de la thèse de Paula Mèndez Fernandez.

Le présent travail de thèse a donc été réalisé au sein de l'équipe AMARE (réponse des Animaux MARins à la vaRiabilité Environnementale) du laboratoire LIENSs. Il a été financé en grande partie par la Région Poitou-Charentes, par le biais d'une allocation de recherche. La grande majorité du matériel biologique analysé au cours de cette thèse a été récupéré lors de deux campagnes EVHOE et deux campagnes PELGAS auxquelles j'ai pu participer (de deux semaines à un mois à chaque fois). Ces campagnes sont organisées chaque année respectivement à l'automne et au printemps par l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer).

Ce travail de thèse a notamment reçu le soutien technique de :

- Françoise Mornet (IFREMER), pour les prélèvements de plancton et de petits poissons pélagiques lors des campagnes PELGAS 2008, 2009, et 2010 traités au cours de cette thèse ;
- Gaël et Guillou et Pierre Richard (LIENSs), pour les (nombreuses !) analyses isotopiques par spectrométrie de masse ;

- Carine Churlaud, Michel Robert, et Mulumba Kalumbo (Plateforme Analytique de la Fédération de Recherche en Environnement pour le Développement Durable à La Rochelle), pour les dosages de Cd en particulier figurant dans ce travail.

Au cours de la thèse, j'ai également eu le plaisir d'encadrer ou co-encadrer plusieurs stagiaires, qui ont ainsi contribué de façon importante au travail, pour couvrir l'ensemble des analyses effectuées et mener à bien le projet :

- Richard Sirmel (6 semaines, Licence 3^{ème} année, Université de La Rochelle), pour une étude sur la contamination en Hg de plusieurs espèces de céphalopodes ;

- Aurélie Lassus-Débat (6 semaines, Licence 3^{ème} année, Université de La Rochelle), pour une étude sur la contamination en Hg de plusieurs espèces de requins ;

- Alexis Chappuis (5 semaines, Licence 3^{ème} année, Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand), pour une étude sur la contamination en Hg de plusieurs espèces de la faune benthique ;

- Julien Autier (8 semaines, Master 1^{ère} année, Université de Bretagne Occidentale à Brest), pour une étude sur la contamination en Hg de la faune océanique et profonde ;

- Flora Laugier (8 semaines, Master 1^{ère} année, Université de Bretagne Occidentale à Brest), pour une étude préliminaire sur la variabilité spatio-temporelle des signatures isotopique au sein du réseau trophique pélagique ;

- Alexis Chappuis (pour la 2^{nde} fois, 10 semaines, Master 1^{ère} année, Université de La Rochelle), pour une étude sur l'écologie trophique des céphalopodes par approches isotopique et métallique (Hg) ;

- Edvin Le Goff (8 semaines, Master 1^{ère} année, Université de Bretagne Occidentale à Brest), pour une étude sur la variabilité temporelle des signatures isotopiques chez plusieurs espèces "fourrages" (petits poissons pélagiques et céphalopodes) ;

- Alexis Chappuis (pour la 3^{ème} fois, 6 mois, Master 2^{ème} année, Université de La Rochelle), pour une étude sur la relation trophique plancton-petits poissons pélagiques par l'approche isotopique.

Enfin, au cours de ces trois années de thèse, j'ai eu l'occasion de dispenser des enseignements au sein de l'Université de La Rochelle en tant que vacataire : 54h de Travaux Dirigés en Biologie Cellulaire (niveau Licence 1^{ère} année) ; 24h de Travaux Pratiques en Biologie des Vertébrés (niveau Licence 2^{ème} année) ; et 28h de Travaux Pratiques en Informatique d'usage (niveau Licence 1^{ère} année).

ORGANISATION DU MANUSCRIT

Pour éviter la redondance d'informations liée à la juxtaposition d'articles scientifiques dans un seul volume, telle qu'aurait pu l'engendrer une thèse dite « sur publications », j'ai choisi de présenter ce travail sous la forme d'une synthèse en français reprenant les résultats principaux de la thèse. Ceux-ci sont donc davantage détaillés en annexes, ainsi que les analyses statistiques effectuées, sous la forme d'articles scientifiques (publiés, soumis ou en préparation). Ces annexes sont disposées dans l'ordre où elles sont évoquées dans les chapitres de la synthèse (Tableau 1). Ce format de thèse et les chapitres constituant ce manuscrit permettent ainsi, du moins je l'espère, de présenter un ensemble cohérent. L'idée était également qu'ils permettent de suivre le cheminement et la démarche scientifique suivis au cours de la thèse. D'autre part, les chapitres VI et VII en particulier, concernant l'utilisation des outils analytiques que sont les traceurs écologiques pour répondre à des questions écologiques précises, seront plus importants que les chapitres qui les précèdent. Ces derniers concernent en effet davantage la mise au point méthodologique, et l'étude du potentiel et/ou des limites des traceurs écologiques dans le contexte du Golfe de Gascogne, et en environnement marin ouvert en général.

Tableau 1 : Annexes du manuscrit, constituées des articles scientifiques issus (tout ou partie) de ce travail de thèse. Le chapitre de la synthèse dans lequel chaque annexe est respectivement citée, et les résultats principaux repris pour la synthèse, est indiqué.

Chapitre de la synthèse	Annexe	Titre	Statut en octobre 2011
III	1	Chouvelon T , Caurant F, Mèndez Fernandez P, Churlaud C, Bustamante P. Effects of ethanol preservation on stable isotopes ratios and mercury concentrations in fish muscle and liver.	En préparation pour Aquatic Biology
	2	Chouvelon T , Richard P, Caurant F, Mèndez Fernandez P, Bustamante P. An efficient delipidation method previous to stable isotope analysis that does not affect $\delta^{15}\text{N}$ values of marine organisms.	En préparation pour Journal of Marine Experimental Biology and Ecology
IV	3	Chouvelon T , Spitz J, Cherel Y, Caurant F, Sirmel R, Mèndez Fernandez P, Bustamante P. Intra-specific and ontogenic differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and Hg and Cd concentrations in cephalopods.	Publiée dans Marine Ecology Progress Series
	4	Chouvelon T , Cherel Y, Caurant F, Simon-Bouhet B, Mèndez-Frenandez P, Bustamante P. Stable isotope ratios in fish reveal different feeding strategies and muscle Hg bioaccumulation patterns during ontogenesis.	En préparation pour Journal of Sea Research
V	5	Chouvelon T , Spitz J, Caurant F, Mèndez-Fernandez P, Chappuis A, Laugier F, Le Goff E, Bustamante P. Spatio-temporal variations in stable isotopic signatures revisit the use of $\delta^{15}\text{N}$ in mesoscale studies of marine food webs. The case of an open ecosystem: the Bay of Biscay (North-East Atlantic).	Acceptée dans Progress in Oceanography avec révisions mineures
VI	6	Chappuis A, Chouvelon T , Bustamante P, Lefebvre S, Mornet F, Guillou G, Dupuy C. Trophic ecology of European sardine <i>Sardina pilchardus</i> and anchovy <i>Engraulis encrasicolus</i> in the Bay of Biscay (North-East Atlantic) inferred from $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotopic signatures.	En préparation pour Marine Ecology Progress Series
	7	Spitz J, Chouvelon T , Cardinaud M, Kostecki C, Lorance P. Prey choice by adult sea bass, <i>Dicentrarchus labrax</i> , on the continental shelf of the Bay of Biscay, north-eastern Atlantic.	Soumise à Marine Ecology Progress Series
	8	Mèndez-Fernandez P, Bustamante P, Bode A, Chouvelon T , Ferreira M, López A, Pierce GJ, Santos MB, Spitz J, Vingada JV, Caurant F. Foraging ecology of five toothed whale species in the Northwest Iberian Peninsula, inferred using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotopic signatures.	Soumise à Journal of Marine Experimental Biology and Ecology
VII	9	Chouvelon T , Spitz J, Caurant F, Mèndez Fernandez P, Autier J, Lassus-Débat A, Bustamante P. Enhanced bioaccumulation of mercury in deep-sea fauna from the Bay of Biscay (North-East Atlantic) revealed by stable isotope analysis.	Soumise à Deep-Sea Research Part I

Enfin, une partie de ce travail de thèse a également été présenté au cours de conférences internationales, sous la forme de communications orales ou affichées :

- *Communications orales* :

Chouvelon T, Spitz J, Cherel Y, Caurant F, Méndez Fernandez P, Churlaud C, Bustamante P (2009) Ontogenetic changes on metal accumulation in cephalopods: comparison of squid and cuttlefish. Cephalopod International Advisory Council conference, 7-11 septembre 2009, Vigo (Espagne).

Bustamante P, **Chouvelon T**, Lacoue-Labarthe T, Spitz J, Caurant F (2010). A synthesis on Hg bioaccumulation in cephalopods. 8th International Symposium Cephalopods - Present and Past, 30 août-3 septembre 2010, Dijon (France).

- *Posters* :

Chouvelon T, Spitz J, Autier J, Caurant F, Méndez Fernandez P, Bustamante P (2010). Isotopic investigation of mercury accumulation in the oceanic and deep-sea food webs from the Bay of Biscay. 12th International Deep-Sea Biology Symposium, 7-11 juin, 2010, Reykjavík (Islande). (**Annexe 10**)

Chouvelon T, Spitz J, Caurant F, Méndez Fernandez P, Bustamante P (2011). Use of stable carbon and nitrogen isotopes for trophic levels evaluation and food webs reconstruction: the Bay of Biscay case study. International Symposium on Isotopes in Hydrology, Marine Ecosystems, and Climate Change Studies, 27 mars-01 avril 2011, Monaco (Monaco). (**Annexe 11**)

Chapitre I

INTRODUCTION ET CONTEXTE GENERAL

I.1 Un bilan un peu pessimiste de l'usage par l'Homme des écosystèmes marins, mais une volonté certaine de reprendre les choses en main

Dans le monde, 540 millions de personnes ont leurs moyens d'existence qui dépendent plus ou moins directement des secteurs de la pêche et de l'aquaculture. Depuis plusieurs années, malgré une capacité de pêche et des engins de plus en plus performants, la production mondiale est pourtant stagnante, voire décline dans certaines grandes régions (e.g., Atlantique Nord-Est ; Fig. I-1 ; FAO 2010). 90% du volume des captures de la pêche proviennent des eaux marines, cependant 31% des stocks de poissons de mer suivis sont jugés surexploités ou épuisés (FAO 2010). Enfin, la population humaine mondiale devrait dépasser les 9 milliards d'habitants d'ici à 2050 (pour 7 milliards environ actuellement), et on estime qu'une augmentation de 27 millions de tonnes de la production serait nécessaire pour maintenir en 2030 le niveau actuel de consommation de poisson par habitant (FAO 2010). De ce fait, la pression sur les biens et services rendus par les écosystèmes marins tels que les ressources alimentaires qu'ils procurent devrait encore s'accroître davantage dans l'avenir. Or, l'espèce humaine apparaît fortement dépendante des écosystèmes naturels qu'elle exploite, et un des enjeux majeurs de son avenir est ainsi le maintien de l'intégrité de ces écosystèmes à long terme.

L'Evaluation des Ecosystèmes pour le Millénaire a en effet classé les services rendus par les écosystèmes en quatre grandes catégories : 1) les services d'approvisionnement (e.g., ressources alimentaires, eau, combustibles fossiles) ; 2) les services de régulation (e.g., régulation du climat, cycle de l'eau) ; 3) les services d'auto-entretien (e.g., production primaire, cycle des éléments) ; 4) les services culturels (e.g., bénéfices esthétiques, loisirs récréatifs) (Millennium Ecosystem Assessment 2005).

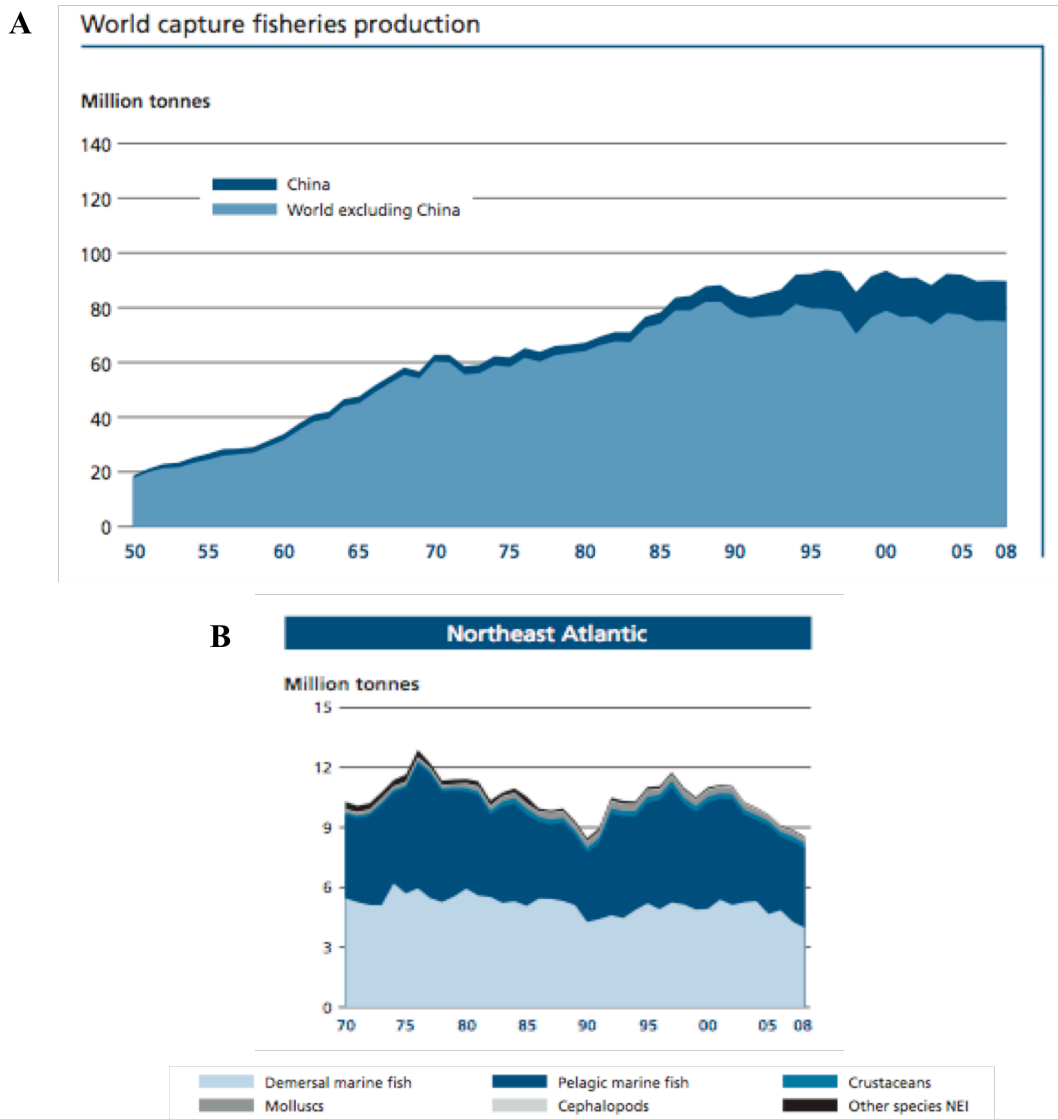


Figure I-1 : Evolution des captures par pêche en milieu marin **A**) dans le monde depuis 1950, et **B**) en Atlantique Nord-Est depuis 1970, à nos jours (tiré de FAO 2010).

En environnement marin, la pêche n'est donc pas la seule activité à partir de laquelle l'Homme peut tirer profit de ces écosystèmes, mais il est vrai que c'est l'une des plus importantes, sûrement l'une des plus médiatisées et l'une des plus controversées, notamment pour les dégâts qu'elle peut engendrer sur le milieu (Larkin 1996, Curtin et Prellezo 2010). Les activités humaines qui impactent les écosystèmes marins sont en fait nombreuses, incluant également les transports, l'extraction pétrolière et gazière offshore, ou encore toutes les activités terrestres ou littorales qui ont un lien avec la mer (e.g., installations nucléaires, rejets industriels et agricoles charriés par les fleuves, etc.). Entraînant une pollution, un réchauffement, une acidification des eaux marines en général, une eutrophisation des eaux

côtières dans certaines régions, ou encore une perte de biodiversité, une dégradation des habitats, et ainsi une modification générale de la structure et du fonctionnement des écosystèmes marins, ces activités mettent en sursis les nombreux biens et services qu'ils procurent (OSPAR 2010).

Le concept d'une gestion à l'échelle écosystémique des habitats et des ressources naturels a donc émergé depuis plusieurs décennies. Ce concept a été formalisé par les Conférences des Nations Unies sur l'Environnement et le Développement (i.e., initialisation du processus lors du premier Sommet de la Terre à Stockholm en 1972, meilleure conceptualisation à celui de Rio en 1992). L'approche écosystémique de gestion des pêches, par exemple, est ainsi née du constat général que les modes traditionnels de gestion (i.e., stocks considérés de manière indépendante) ne permettaient pas une exploitation durable des ressources halieutiques. Une vision intégrée des différents composants des écosystèmes s'imposait alors pour une meilleure gestion générale (Grumbine 1994, Larkin 1996, Pikitch et al. 2004, Arkema et al. 2006). La prise en compte de l'interconnectivité et de la nature interdépendante des différents composants (e.g., compartiments biologiques, habitats, activités humaines, etc.) est ainsi au cœur de la démarche écosystémique, dans laquelle l'Homme est considéré comme faisant intégralement partie des écosystèmes en question (Curtin et Prellezo 2010).

Concernant les écosystèmes marins européens en particulier, la convention OSPAR¹ représentait jusqu'à présent le principal mécanisme ancré dans les obligations et les engagements universels en matière de protection et de gestion de la mer, pour l'Atlantique Nord-Est (Fig. I-4). Le travail de la commission OSPAR est aujourd'hui largement guidé par l'approche écosystémique évoquée précédemment, cette approche devant donc *"essentielle- ment permettre une exploitation durable des ressources naturelles tout en maintenant la qualité, la structure et le fonctionnement des écosystèmes marins"* (OSPAR 2010). En parallèle, et venant ainsi compléter les travaux de la commission OSPAR, l'Union Européenne a mis en œuvre en 2008 la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM). Permettant d'établir *"un cadre d'action communautaire dans le domaine de la politique pour le milieu marin"* (Commission européenne 2008), la DCSMM a pour principal

¹ unification de la Convention d'OSlo et de celle de PARis en 1992.

objectif que toutes les mesures nécessaires soient prises pour réaliser ou maintenir un « bon état écologique » (BEE) du milieu marin d'ici 2020. La définition du BEE, l'évaluation initiale de ce BEE dans les différentes régions concernées (i.e., Atlantique Nord-Est, mer Baltique, mer Méditerranée et mer Noire), et la fixation d'objectifs environnementaux pour réaliser et/ou maintenir ce BEE doivent ainsi s'appuyer sur des indicateurs appartenant à onze descripteurs qualitatifs des écosystèmes marins concernés (e.g., « biodiversité », « conditions hydrographiques », « réseau trophique », ou encore « eutrophisation induite par les activités humaines »).

Un indicateur écologique peut être défini comme une caractéristique mesurable de la structure, de la composition, ou de la fonction des systèmes écologiques (Niemi et McDonald 2004). La DCSMM s'inscrit donc bien dans une démarche écosystémique de compréhension de la structure et du fonctionnement des écosystèmes marins, plaçant les activités humaines au centre des processus et de la gestion de ces écosystèmes, et ayant donc pour but final de pérenniser la qualité des biens et services fournis par les écosystèmes notamment d'un point de vue socio-économique. Pour soutenir un développement durable des activités humaines, la bonne connaissance de l'environnement et des processus naturels dont dépendent ces activités est en effet primordiale.

I.2 Les réseaux trophiques au cœur de la structure et du fonctionnement des écosystèmes

L'assimilation de matière énergétique est un besoin vital pour tous les organismes vivants, autotrophes et hétérotrophes, puisqu'elle détermine et conditionne la survie et les capacités reproductives de ces organismes (Stearns 1992). Dans tout environnement, la quête de nourriture est ainsi l'un des principaux objectifs des organismes supérieurs. En 1927, Elton stipulait déjà que les relations entre les organismes d'une communauté sont essentiellement d'ordre trophique. Puis, en 1942, Lindeman précise que les flux d'énergie entre les niveaux trophiques d'une chaîne alimentaire constituent la principale caractéristique de l'organisation des écosystèmes. En 1935, Tansley est l'un des premiers à employer et décrire le terme « écosystème », et en 1969, Odum définit ainsi un écosystème comme étant "*une unité d'organisation biologique composée de tous les organismes dans une zone donnée (c'est-à-dire, la « communauté »), interagissant avec l'environnement physique, de sorte qu'un flux*

*d'énergie conduit à une structure trophique caractéristique et aux cycles de matières dans le système*².

Dans un premier temps, pour décrypter la structure et le fonctionnement général des écosystèmes marins, les écologistes se sont donc particulièrement intéressés aux liens trophiques et à l'importance relative des différents transferts d'énergie pouvant exister entre les compartiments biologiques de ces écosystèmes (Paine 1980). De nombreux concepts ont ainsi émergé et ont été largement débattus ou illustrés dans la littérature. Ces concepts sont par ailleurs souvent liés entre eux, tels que :

- la prédominance de contrôles « bottom-up » ou « top-down » des communautés biologiques dans les réseaux trophiques (i.e., contrôle bottom-up : lorsque la régulation du réseau trophique dépend des variables environnementales et des premiers niveaux trophiques, eux-mêmes directement affectés par ces variables environnementales ; contrôle top-down : lorsque des modifications ayant lieu au niveau des prédateurs supérieurs ont des répercussions sur les niveaux inférieurs ; e.g., Hunter et Price 1992, Power 1992) ;

- la notion d'espèces clés au sein des réseaux trophiques (i.e., espèce dont l'impact est très fort sur la communauté ou l'écosystème, et disproportionné par rapport à son abondance ; e.g., Power et al. 1996) ;

- les phénomènes de cascades trophiques (i.e., lorsque la modification d'un compartiment biologique engendre une modification de l'abondance, de la biomasse et de la productivité d'une population ou d'un niveau trophique à travers plus d'un lien dans un réseau trophique, par le biais des relations prédateur-proies ; e.g., Pace et al. 1999, Polis et al. 2000) ;

- l'importance et/ou les conséquences de l'omnivorie dans un réseau trophique (i.e., capacité d'un consommateur à se nourrir sur plusieurs niveaux trophiques ; e.g., Pimm et Lawton 1978, Polis et Strong 1996, Vandermeer 2006) ;

- etc.

² Texte original (Odum 1969) : *"The ecosystem, or ecological system, is considered to be a unit of biological organization made up of all organisms in a given area (that is, "community") interacting with the physical environment so that a flow of energy leads to characteristic trophic structure and material cycles within the system"*.

La compréhension des interactions trophiques entre les différents compartiments et/ou espèces d'un réseau trophique dans un écosystème marin, et la mise en évidence des différents processus pouvant avoir lieu dans les réseaux trophiques tels que ceux évoqués ci-dessus, sont effectivement une étape clé. Dans un second temps, cette étape permet ainsi d'évaluer l'impact des activités anthropiques tel que la surpêche d'un compartiment biologique (e.g., Myers et al. 2007), ou encore d'étudier le transfert et/ou l'impact de certains contaminants dans les écosystèmes marins (ceux qui se transmettent par la voie trophique principalement) (e.g., Fleeger et al. 2003). Dans ce sens, Pauly et al. (1998) ont ainsi mis en évidence l'impact de la pêche sur la structure trophique des écosystèmes, et de ce fait la non durabilité de l'exploitation actuelle des ressources marines. Dans cette étude, les auteurs ont mis en relation l'abaissement du niveau trophique moyen des espèces marines capturées depuis les années 1950 avec la pêche intensive des plus gros spécimens au sein des espèces prédatrices et/ou des grands prédateurs marins en général. Depuis, ce phénomène appelé « *fishing down marine food webs* » est devenu un concept majeur concernant les environnements marins exploités, figurant d'ailleurs au rang des principaux impacts sur le milieu naturel concernant ces écosystèmes, lors de l'Evaluation des Ecosystèmes pour le Millénaire (Fig. I-2).

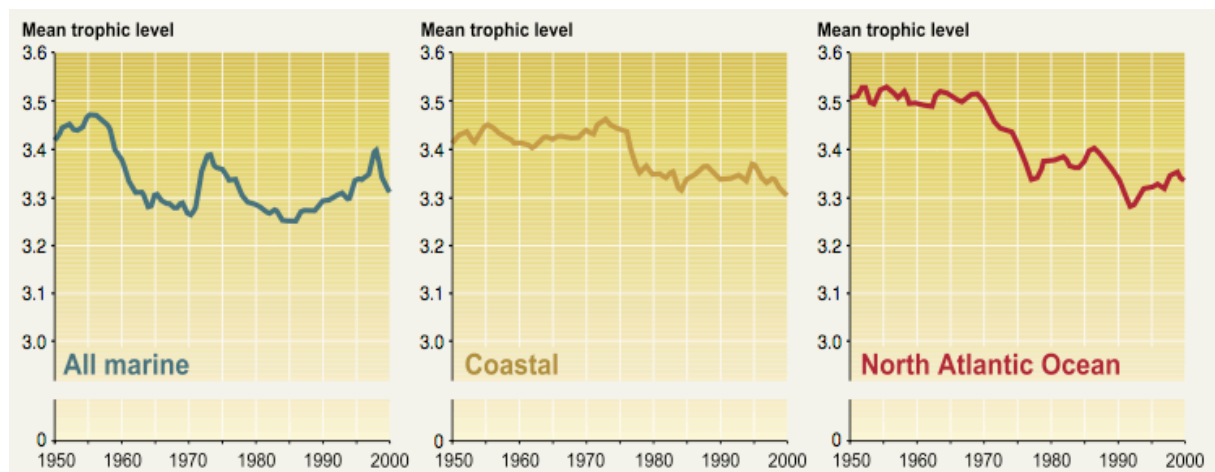


Figure I-2 : Evolution du niveau trophique moyen des captures par pêche en milieu marin, pour l'ensemble des écosystèmes marins, puis pour les écosystèmes côtiers, enfin pour l'océan Atlantique Nord, depuis 1950 à nos jours (tiré de Millenium Ecosystem Assessment 2005). Ce phénomène engendré par la pêche intensive et non durable des plus grands prédateurs marins est appelé « *fishing down marine food webs* » (Pauly et al. 1998).

Puisque les interactions trophiques sont à la base de la structure des communautés dans les écosystèmes, mieux connaître l'organisation trophique au sein d'un écosystème, les liens en place et leur dynamique (i.e., fonctionnement des réseaux trophiques), c'est donc aussi, en définitive, disposer et/ou favoriser le développement d'outils efficaces pour la gestion de ces écosystèmes. Les réseaux trophiques, *via* leur structure et leur fonctionnement, constituent ainsi en eux-mêmes l'un des onze descripteurs de la DCSMM. Dans cette Directive, il est effectivement clairement énoncé qu' "*il est nécessaire de consolider les connaissances scientifiques et techniques à ce stade afin de mettre au point des indicateurs potentiellement utiles, ainsi que des critères permettant de traiter les relations au sein du réseau trophique*" ; ceci, dans le but final d'atteindre donc et/ou de maintenir le BEE des écosystèmes marins européens, comme évoqué précédemment, à travers l'ensemble des descripteurs suggérés dans la DCSMM (Commission européenne 2010).

I.3 Les méthodes d'étude de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques et du régime alimentaire des organismes en environnement marin

Pour appréhender les interactions trophiques et évaluer les flux de matière et d'énergie au sein des écosystèmes, les modèles écosystémiques constituent des outils indispensables. Ils permettent d'avoir la vision intégrée souhaitée, et ont été considérablement améliorés ces dernières décennies notamment du fait des progrès technologiques (Larkin 1996). Selon les modèles, de nombreuses données peuvent désormais être prises en considération, telles que les données de biomasse et de productivité des différents compartiments biologiques, les différents régimes alimentaires, l'impact des activités humaines sur ces compartiments (e.g., capture par pêche), ou encore les fluctuations de variables environnementales (e.g., forçages climatiques), etc. Dans les écosystèmes marins exploités, le modèle écosystémique qui s'est ainsi imposé et apparaît désormais comme un standard est le modèle Ecopath (Polovina 1984, Larkin 1996, Christensen et Pauly 1992). Ecopath permet d'avoir une représentation des compartiments biologiques au sein d'un écosystème et des flux trophiques entre ces compartiments lorsque le système (i.e., réseau trophique à un endroit donné dans ce cas) est à l'équilibre (Christensen et Pauly 1992). Un complément au logiciel Ecopath, Ecosim, a ensuite été développé (i.e., Ecopath with Ecosim ; Christensen et Walters 2004), pour avoir une vision plus dynamique des transferts. Dans tous les cas, la force de ce

modèle Ecopath tient notamment dans le fait qu'il a été rendu relativement accessible aux écologistes et est applicable à de nombreux écosystèmes. Il autorise ainsi la comparaison entre ces différents écosystèmes pour faire émerger de nouvelles hypothèses quant à leur structure, leur fonctionnement et la réponse possible aux perturbations des différents réseaux trophiques ; ceci, toujours dans l'optique d'une meilleure gestion et de la conservation de l'intégrité des écosystèmes marins (e.g., Vasconcellos et al. 1997, Libralato et al. 2006).

Cependant, comme tout modèle, les modèles écosystémiques nécessitent l'acquisition en amont d'un certain nombre de données, plus ou moins important. Ainsi pour alimenter un modèle Ecopath spécifique aux transferts d'énergie dans les réseaux trophiques, il est nécessaire de fournir des données sur le régime alimentaire de chaque compartiment biologique considéré (i.e., données exprimées en % de prédation de ce compartiment sur les autres compartiments). Pour acquérir des données sur le régime alimentaire des organismes en environnement marin, qui est par définition un milieu difficilement accessible à l'Homme, l'observation directe *in situ* de la prédation n'est pas aisée. De façon empirique, l'analyse directe par identification des restes de proies dans les tractus digestifs tels que les contenus stomacaux ou dans les fèces s'est ainsi généralisée depuis très longtemps en écologie alimentaire marine (e.g., Hyslop 1980, Pierce et al. 1991, Barrett et al. 2007). Cette méthode traditionnelle permet d'avoir une précision taxinomique des proies consommées et de leur gamme de taille. Cependant, elle requiert un temps de formation très important de l'opérateur, peut être biaisée par une digestion différentielle des différentes proies réellement consommées, ne représente que la nourriture ingérée à un temps donné et non l'alimentation réellement assimilée à des échelles de temps plus importantes, et apparaît ainsi difficilement envisageable lorsque les relations trophiques sont étudiées à l'échelle d'un écosystème. De plus, chez les petits consommateurs (e.g., petits poissons pélagiques planctonophages), la reconnaissance des proies dans les contenus stomacaux par exemple, de plus petite taille encore et/ou ne possédant pas de pièces dures résistant un minimum à la digestion, devient très vite limitée. Un autre exemple est celui des espèces profondes. Lorsqu'elles sont capturées et remontées à la surface, la baisse de pression engendre souvent une perte des restes alimentaires contenus dans les estomacs (par régurgitation ou éversion de l'estomac ; e.g., Clarke et Merrett 1972, Mauchline et Gordon 1980), ce qui limite également l'utilisation de la méthode traditionnelle pour ces espèces (i.e., analyse des contenus stomacaux).

Pour pallier à certaines de ces limites et notamment du fait des progrès technologiques, des méthodes indirectes d'analyse du régime alimentaire des organismes marins se sont donc développées plus récemment. Ainsi certains écologistes ont plutôt misé sur des techniques basées sur l'analyse de paramètres et/ou sur des propriétés biologiques des proies consommées. Il s'agit par exemple de l'analyse ADN des restes de proies plus ou moins digérés retrouvés dans les tractus digestifs ou les fèces (e.g., Jarman et al. 2002, Deagle et al. 2005) ; ou encore, d'analyses dérivées de l'immunologie, consistant alors à comparer les protéines spécifiques de certaines proies à celles provenant des restes de proies récupérés (e.g., Boyle et al. 1986, Pierce et al. 1990). D'autres méthodes indirectes d'étude du régime alimentaire reposent cette fois sur l'analyse de paramètres (bio)chimiques dans les tissus biologiques des proies, mais aussi et surtout des tissus des consommateurs eux-mêmes. L'intérêt est ensuite de mettre ces résultats en relation pour répondre à la question écologique (i.e., régime alimentaire d'un consommateur d'intérêt). Ces paramètres incluent par exemple l'analyse des isotopes stables du carbone et de l'azote, l'analyse de lipides (e.g, profils d'acides gras), ou encore l'analyse de contaminants (e.g., métaux, polluants organiques) accumulés dans les tissus biologiques. Ces paramètres (bio)chimiques analysés chez les consommateurs et/ou leurs proies potentielles seront appelés ici les « traceurs écologiques ».

I.4 Le concept de traceurs écologiques dans ce contexte

Outre la valeur intrinsèque du paramètre (bio)chimique, les traceurs écologiques représentent des indicateurs en eux-mêmes, puisque ces paramètres (bio)chimiques mesurés dans les tissus biologiques permettent d'apporter des informations sur le régime alimentaire des consommateurs, et sur leurs interactions avec d'autres compartiments biologiques de l'écosystème. En fait, les « signatures isotopiques », les profils d'acides gras, ou encore les concentrations en contaminants sont utilisés comme traceurs écologiques des organismes sur la base du postulat : « je suis ce que je mange » (e.g., Kohn 1999). Ils reflètent en effet, *a priori*, les habitudes et les préférences alimentaires, et/ou la zone d'alimentation, et/ou encore la position trophique des consommateurs étudiés.

Dans le contexte décrit précédemment, nous retiendrons ici que les différents traceurs écologiques généralement utilisés peuvent donc permettre d'une part, de tester des hypothèses fondamentales quant au régime alimentaire de consommateurs d'intérêt, et/ou sur la structure

et le fonctionnement d'un écosystème en particulier (e.g., origine de la matière organique soutenant les réseaux trophiques dans un écosystème grâce à l'analyse des isotopes stables ; Peterson 1999) ; d'autre part, ils peuvent avoir une application directe dans le cadre de la gestion des écosystèmes, comme le suggèrent ces deux grands exemples :

1) Ils peuvent fournir des informations sur les impacts anthropiques : par exemple a) sur la modification de la structure et du fonctionnement d'un réseau trophique (e.g., cas de l'impact de l'introduction d'une espèce prédatrice dans un lac, démontré à partir des isotopes stables ; Vander Zanden et al. 1999) ; b) sur la pollution d'un écosystème et/ou sur la qualité des produits de la mer destinés à la consommation humaine (e.g., à partir de l'analyse de contaminants chimiques) ; ou encore c) sur l'état d'eutrophisation d'un écosystème (e.g., à partir des isotopes stables de l'azote ; McClelland et al. 1997) ; etc.

2) Ils peuvent servir à définir des unités de gestion, notamment lorsque la combinaison des informations provenant de différents traceurs permet de distinguer une utilisation différente des ressources et/ou des habitats par les différents stocks d'une même espèce, à des échelles de temps qui sont *a priori* plus pertinentes pour la gestion que la génétique notamment. Une application récente au cas du dauphin commun en Atlantique Nord-Est en est un exemple (Caurant et al. 2009). Dans cette zone, le dauphin commun *Delphinus delphis* est une espèce protégée et particulièrement sujette aux captures accidentelles du fait d'interactions avec les pêcheries (Morizur et al. 1999, Ridoux et Dabin 2005, Northridge et al. 2006). En confrontant à une échelle interrégionale, les résultats issus de l'analyse des contenus stomacaux, de l'analyse de différents traceurs écologiques (métaux, isotopes, lipides) et les résultats issus de l'analyse génétique, trois unités de gestion possibles pour cette espèce de petit cétacé en Atlantique Nord-Est ont ainsi été identifiées (Fig. I-3 ; Caurant et al. 2009).

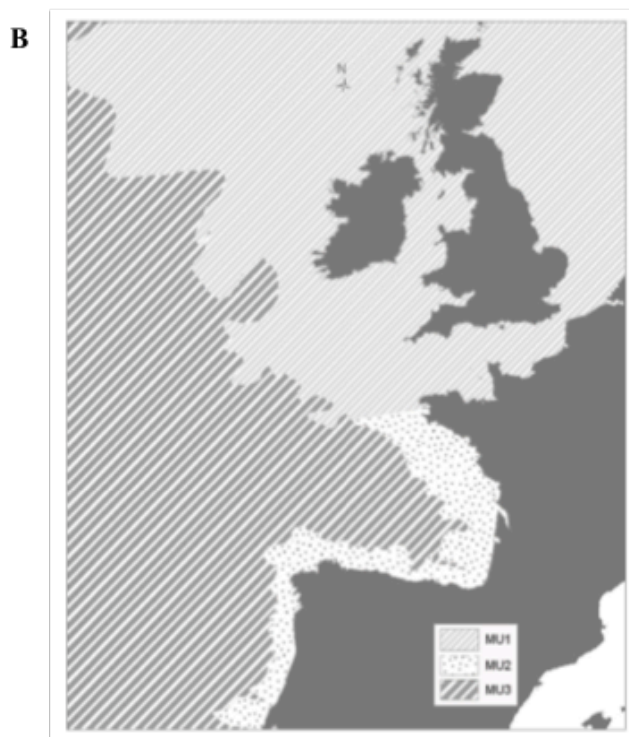
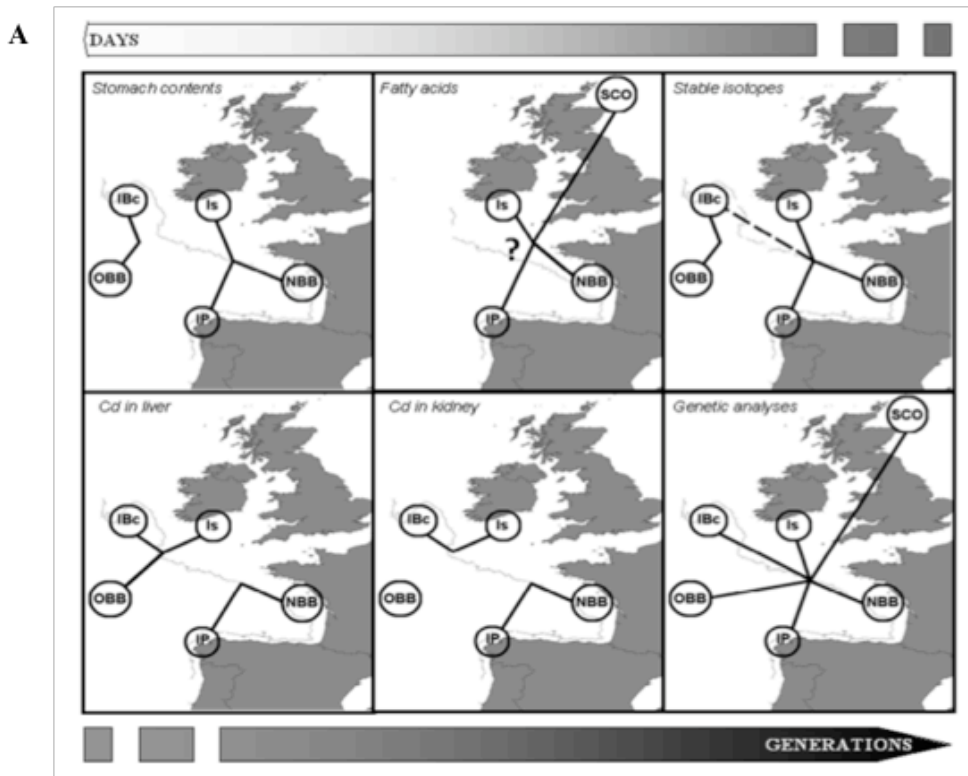


Figure I-3 : **A)** Représentation des liens établis à partir de différents traceurs écologiques entre les individus de dauphins communs issus des différentes zones géographiques des eaux européennes (IBc = zone océanique d’Irlande ; IP = péninsule ibérique ; Is = zone néritique de l’Irlande ; NBB = zone néritique du Golfe de Gascogne ; OBB = zone océanique du Golfe de Gascogne ; SCO = Ecosse). **B)** Représentation des trois unités de gestion (MU = Management Unit) ainsi proposées pour le dauphin commun en Atlantique Nord-Est à partir du croisement des informations apportées par les différents traceurs écologiques, l’analyse des contenus stomacaux et la génétique (tiré de Caurant et al. 2009).

I.5 Hypothèse et objectifs de la thèse

Le développement et l'utilisation d'indicateurs d'état des populations et des écosystèmes sont ainsi devenus un centre d'intérêt considérable en écologie marine. Cela a en effet été grandement encouragé par le besoin urgent d'outils de diagnostic de l'état écologique global des écosystèmes marins pour leur gestion et/ou leur monitoring (e.g., actuelle DCSMM en Europe), comme évoqué précédemment, mais aussi considérablement facilité par les progrès technologiques en général.

Depuis quelques années, l'utilisation des traceurs écologiques et du traçage isotopique naturel en particulier a donc considérablement explosé pour l'étude des relations trophiques et de la structure et du fonctionnement des écosystèmes. Par analogie avec le modèle écosystémique Ecopath évoqué précédemment, l'utilisation de ces outils, et notamment de l'outil isotopique, a en effet été rendue relativement accessible aux écologistes (Martínez del Rio et al. 2009). Cela permet de mettre en œuvre cet outil relativement facilement pour l'étude de nombreux modèles biologiques d'intérêt et/ou écosystèmes. Cela permet également d'envisager, par exemple, une comparaison des résultats obtenus pour différents écosystèmes, pour faire émerger de nouvelles théories et/ou révéler des changements liés aux activités anthropiques (e.g., Vander Zanden et al. 1999).

Cependant, pour l'utilisation pertinente de tels indicateurs en écologie fondamentale ou appliquée, il est bien sûr important d'en connaître leur potentiel dans un système d'intérêt, mais aussi et surtout les limites (e.g., les sources de variabilité qui affectent les valeurs mesurées ou calculées). Ainsi, ce travail de thèse propose d'explorer ces problématiques pour les traceurs écologiques, à l'échelle du Golfe de Gascogne.

Le Golfe de Gascogne est en effet une des zones cibles des conventions et directives européennes de type OSPAR ou DCSMM (Commission européenne 2008, OSPAR 2010), car il abrite une grande diversité d'habitats, ce qui lui permet de soutenir une grande diversité biologique. Il présente également un fort intérêt commercial, constituant une zone de pêche particulièrement importante ; enfin, son positionnement est stratégique en Atlantique Nord-Est (Fig. I-4).

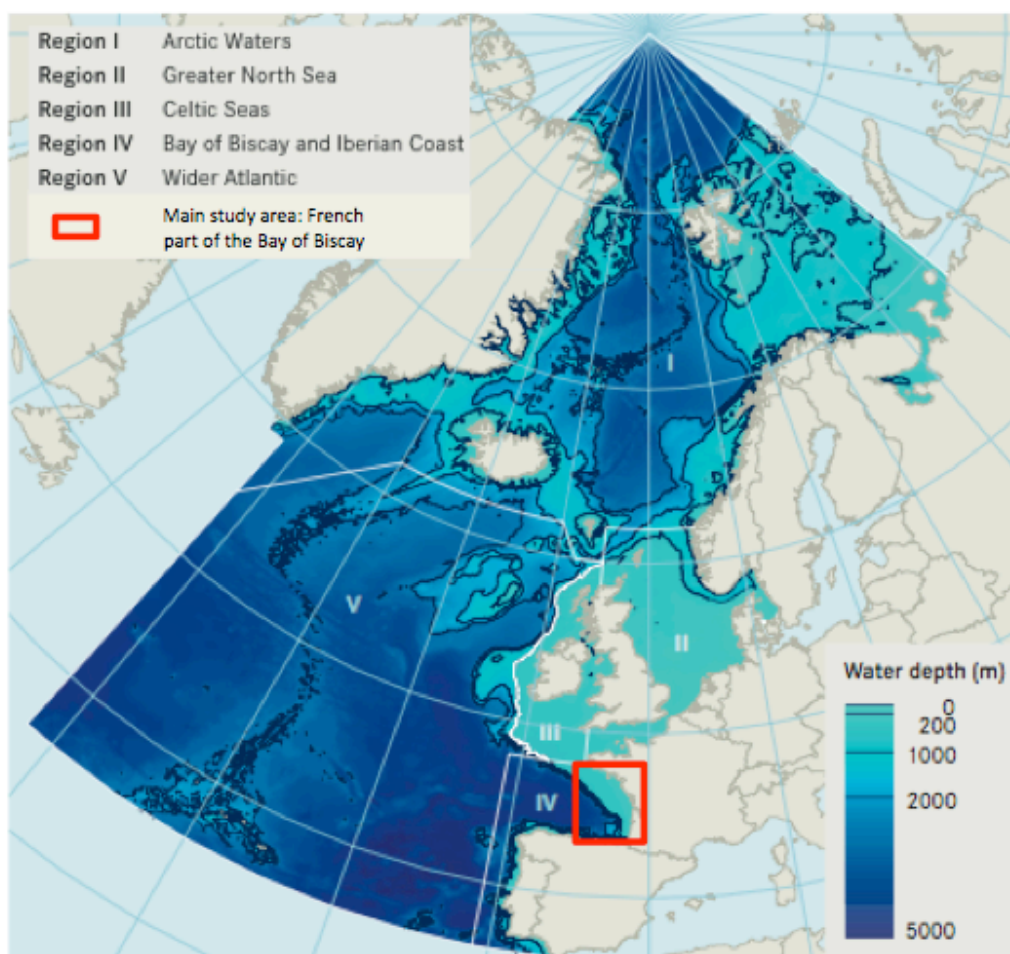


Figure I-4 : Représentation des cinq grandes régions marines concernées par la convention OSPAR (voir texte), et localisation de la principale zone d'étude de la thèse (partie française du Golfe de Gascogne, des zones côtières aux zones océaniques). Le gradient de profondeur des différentes régions est également indiqué (tiré et modifié à partir de OSPAR 2010).

En effet, environnement marin ouvert sur l'océan Atlantique, situé entre 1 et 10° W et 43 et 48° N, le Golfe de Gascogne dispose d'une partie française et d'une partie espagnole qui diffèrent complètement en termes de caractéristiques océanographiques. Dans la partie française du Golfe, celle que nous allons principalement étudier ici (Fig. I-4), le plateau continental est très vaste (plus de 220 000 km²), très large au nord de la zone et très étroit au sud. L'hydrologie sur le plateau est principalement influencée par les panaches fluviaux de la Loire et de la Gironde (Lazure et Jégou 1998). Néanmoins, des courants de pentes et/ou des remontées d'eaux profondes (upwellings) peuvent avoir lieu au niveau du talus, influençant alors l'hydrologie de ces zones aux abords du plateau, et celle de certaines zones côtières lorsque le plateau continental est particulièrement étroit, par exemple, au niveau de la côte des Landes dans le sud du Golfe (Koutsikopoulos et Le Cann 1996, Puillat et al. 2004, 2006). Du

côté espagnol, les upwellings saisonniers influencent principalement l'hydrologie de cette zone du fait de l'étroitesse du plateau continental (Fraga 1981).

À notre connaissance, aucune étude par traceurs écologiques n'a été jusqu'à présent menée concernant l'ensemble des réseaux trophiques de cette zone maritime, c'est-à-dire, comprenant à la fois les réseaux néritiques mais aussi les réseaux trophiques plus océaniques et/ou profonds. Pourtant, dans de tels environnements marins ouverts, la définition de frontières nettes entre réseaux trophiques et/ou habitats reste souvent difficile à établir (Vander Zanden et Fetzer 2007). Dans le Golfe de Gascogne, les quelques études publiées sur les différents réseaux trophiques qu'il abrite, par modélisation de type Ecopath ou par traceurs écologiques (i.e., uniquement par traçage isotopique naturel), ne concernent effectivement que des secteurs particuliers de la zone (i.e., étude du réseau trophique sur le plateau continental par modélisation Ecopath, entre les isobathes 30 et 150 m par Lassalle et al. sous presse). Parfois même, certains compartiments importants de l'écosystème tels que les mammifères marins sont négligés (i.e., étude du réseau trophique de la Grande Vasière en partie Nord du plateau continental du Golfe de Gascogne par traçage isotopique et modélisation Ecopath par Le Loc'h (2004), qui reste néanmoins un secteur d'importance pour les communautés benthiques et pour l'activité de pêche qui s'y exerce). Enfin, en 2010, le dernier rapport de la commission OSPAR soulignait bien un manque évident de surveillance générale des zones d'eaux profondes dans le Golfe de Gascogne (i.e., au-delà du talus soit en deçà de 200 m de profondeur). Etant donné le contexte évoqué précédemment, il existe ainsi un vrai potentiel à développer l'approche par traceurs écologiques sur l'ensemble des habitats, et donc des réseaux trophiques et des espèces en présence, dans le Golfe de Gascogne.

Lorsqu'il doit être considéré dans son ensemble (i.e., volonté et principe d'une approche écosystémique), le Golfe de Gascogne apparaît effectivement comme un écosystème fortement contrasté d'un point de vue océanographique, dans sa partie française essentiellement, et complexe d'un point de vue de la diversité biologique qui compose les différents réseaux trophiques en présence. Pour développer la méthode des traceurs écologiques à l'échelle d'un tel écosystème marin ouvert (Fig. I-4) qui subit diverses influences (i.e., panaches fluviaux, courants océaniques, upwellings du talus, etc.), et supporte une variété importante d'organismes et notamment des organismes très mobiles

(e.g., mammifères marins), nous devons faire l'hypothèse que les sources de variabilité possibles des valeurs de traceurs écologiques mesurées dans les tissus biologiques sont très importantes (Fig. I-5). Par ailleurs, l'identification des facteurs de variation des traceurs écologiques est primordiale pour l'utilisation de ces outils à des fins fondamentales (e.g., l'étude de l'écologie trophique de consommateurs d'intérêt, ou encore l'étude de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques) ou appliquées (e.g., mise en évidence d'impacts anthropiques, ou identification d'unités de gestion).

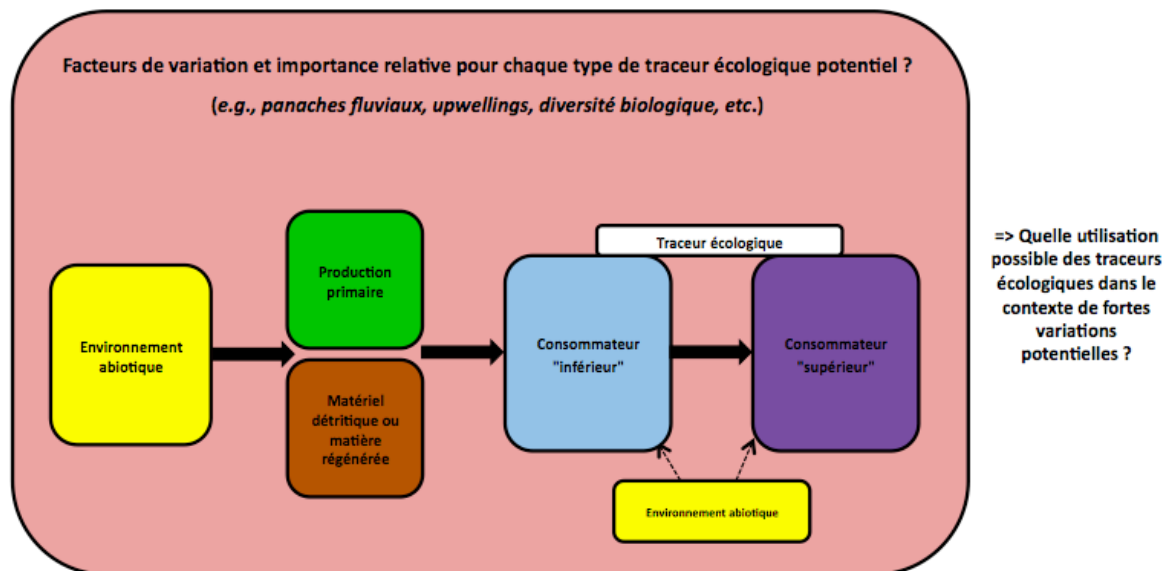


Figure I-5 : Schéma illustrant les questions qui se posent au départ de ce travail de thèse : 1) Quels sont les facteurs de variations possibles, et leur importance relative, pour chaque type de traceurs écologiques utilisé en environnement marin ouvert et contrasté d'un point de vue hydrologique et biologique ? 2) Quelles sont alors les possibilités d'utilisation de ces traceurs écologiques dans un contexte où de nombreuses sources de variations sont attendues ? Ce schéma sera ainsi complété en fonction des résultats obtenus au cours de la thèse.

En utilisant essentiellement la partie française du Golfe de Gascogne comme cas d'étude, nous nous sommes attachés à répondre progressivement aux questions suivantes :

- ⇒ Quels traceurs écologiques semblent les plus pertinents à mettre en place dans un environnement marin ouvert, qui supporte *a priori* de nombreux niveaux trophiques, et dont les réseaux trophiques sont généralement composés d'une grande variété d'organismes ?
- ⇒ Quelle est l'importance des facteurs de variations biologiques (i.e., variabilité intra et interspécifique) à l'échelle des individus et de celle de l'espèce, pour l'utilisation des traceurs écologiques dans ce type d'écosystème ?
- ⇒ Quelle est l'importance des facteurs de variations environnementaux (i.e., variabilité spatio-temporelle) à l'échelle des réseaux trophiques et de celle de l'écosystème, pour l'utilisation des traceurs écologiques et notamment des traceurs isotopiques dans ce type d'écosystème ?
- ⇒ Quelles sont alors les possibilités d'utilisation des traceurs écologiques et notamment des traceurs isotopiques pour l'étude de l'écologie trophique d'une espèce et des relations interspécifiques dans ce type d'écosystème ?
- ⇒ Quelles sont enfin les possibilités d'utilisation des traceurs écologiques et notamment des traceurs isotopiques pour l'étude de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques dans de tels environnements marins ouverts ?

Les différents chapitres de ce manuscrit, synthèse des résultats principaux, sont donc organisés de façon à répondre à ces différentes questions-objectifs qui ont motivé ce travail de recherche.

Chapitre II

QUELS TRACEURS, DANS QUELS TISSUS, POUR QUELLE(S) INFORMATION(S) EN ECOLOGIE TROPHIQUE MARINE ?

En écologie trophique, et notamment en environnement marin, trois grandes techniques basées sur l'analyse de paramètres (bio)chimiques dans les tissus biologiques sont principalement utilisées comme "alternatives" pour l'étude des régimes alimentaires et des relations trophiques. Le terme "alternatives" est employé ici car ces méthodes ne permettront jamais, par exemple, d'obtenir la précision taxinomique en termes de proies consommées, comme cela est possible avec les méthodes plus traditionnelles que sont l'analyse des restes alimentaires dans les contenus stomacaux ou les fèces. Cependant, ces méthodes alternatives peuvent apporter un complément d'information indéniable, notamment par le fait qu'elles intègrent une information sur une échelle de temps variant de quelques jours à plusieurs années selon le tissu considéré. Les paramètres (bio)chimiques les plus souvent analysés sont ainsi 1) les profils d'acides gras, 2) les isotopes stables du carbone et de l'azote, 3) les contaminants chimiques de type Polluants Organiques Persistants (POPs) et quelques éléments traces, particulièrement les métaux non essentiels, mercure (Hg) et cadmium (Cd). Ces traceurs sont alors utilisés seuls ou couplés.

II.1 Les profils d'acides gras

Les profils de lipides et en particulier des acides gras contenus dans les tissus des organismes marins sont un premier outil pouvant être utilisé comme traceur du régime alimentaire en environnement marin (Sargent et Whittle 1981). De nombreux acides gras

essentiels ne sont pas synthétisés par les organismes supérieurs et doivent être directement apportés par l'alimentation pour satisfaire les besoins physiologiques de ces organismes. Les acides gras caractéristiques des proies consommées par un prédateur sont alors incorporés dans les tissus adipeux de celui-ci sans qu'il y ait de modification majeure de leur structure, ou bien selon un schéma prévisible, fournissant de ce fait une information qualitative et/ou quantitative quant au régime alimentaire du prédateur analysé (Budge et al. 2006, Iverson et al. 2004).

L'information intégrée est représentative d'une fenêtre temporelle qui dépend du métabolisme du tissu ou de la partie de tissu analysée (Budge et al. 2006). Chez les cétacés par exemple, la couche de lard est particulièrement stratifiée. La couche interne de lard adjacente aux muscles est la plus active métaboliquement en termes de stockage des lipides provenant de la nourriture (Koopman et al. 1996). Elle est ainsi la mieux appropriée chez ce groupe de mammifères marins pour l'étude du régime alimentaire à court terme, c'est-à-dire à l'échelle de quelques semaines (Thiemann et al. 2004). Chez les poissons ou les céphalopodes, les profils d'acides gras dans le foie et la glande digestive fournissent également une information sur le régime alimentaire à plus court terme que les acides gras analysés dans le muscle (Stowasser et al. 2006, 2009).

Par ailleurs, les différents producteurs primaires d'un milieu peuvent synthétiser des acides gras très spécifiques (Graeve et al. 2002). Ceci permet de préciser les sources constituant la matière organique à la base des réseaux trophiques dont dépendent les organismes, et peuvent ainsi grandement faciliter l'étude des relations trophiques à la base des réseaux trophiques (Graeve et al. 1994, 2002, Nelson et al. 2001). Cela suggère également une utilisation possible des profils d'acides gras comme traceurs de la zone d'alimentation des organismes (Smith et al. 1996).

Néanmoins, une des principales limitations de l'utilisation des acides gras comme traceurs du régime alimentaire est leur métabolisation potentiellement plus importante chez les plus hauts niveaux trophiques et/ou dans certains tissus (Phillips et al. 2002). Ceci augmente alors la difficulté de mise en œuvre de ces traceurs à l'échelle d'un écosystème, et la difficulté d'interprétation des données obtenues. Enfin, cet outil peut permettre d'obtenir des informations sur le régime alimentaire de nombreux types de consommateurs, depuis le zooplancton jusqu'aux mammifères marins, en passant par les poissons et les céphalopodes (Graeve et al. 1994, Phillips et al. 2002, Dalsgaard et al. 2003, Iverson et al. 2004, Elsdon

2010). Cependant, il requiert une formation de l'utilisateur très importante et coûteuse en temps (pour l'analyse des spectres d'acides gras), en plus de procédures techniques relativement longues et très rigoureuses en termes de prélèvement des échantillons, de conservation, et de préparation avant analyse (Budge et al. 2006).

II.2 Les isotopes stables du carbone et de l'azote

Les ratios des isotopes stables du carbone et de l'azote ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ et $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) sont un second outil très communément utilisé comme traceurs du régime alimentaire, en écologie trophique marine en particulier (Michener et Kaufman 2007). Dans les écosystèmes, les éléments naturels se présentent effectivement sous plusieurs formes isotopiques. Ces isotopes stables d'un élément donné diffèrent par leur masse atomique et se comportent ainsi différemment lors des processus physiques, chimiques et biologiques. Les isotopes les plus légers de l'élément chimique ont tendance à former des liens plus faibles et à réagir plus vite que les isotopes lourds, ce qui modifie leurs proportions dans les tissus biologiques : ce processus correspond au **fractionnement isotopique** (Peterson et Fry 1987, Fry 2006). Les tissus biologiques acquièrent ainsi une composition isotopique qui leur est propre.

Les premières études ayant montré l'existence d'un lien direct entre la composition isotopique d'un aliment et celle de son consommateur datent principalement de la fin des années 1970-début 1980 (Haines 1976, De Niro et Epstein 1976, 1978, 1981, Minagawa et Wada 1984). Si l'utilisation de cet outil comme traceur de l'alimentation et/ou des migrations s'est ensuite fortement développée dans les années 1980 (Fry 1983, 1988, Schell et al. 1989), elle a considérablement explosé au début des années 1990 et a connu un développement exponentiel jusqu'à aujourd'hui, notamment du fait des progrès technologiques (Fig. II-1).

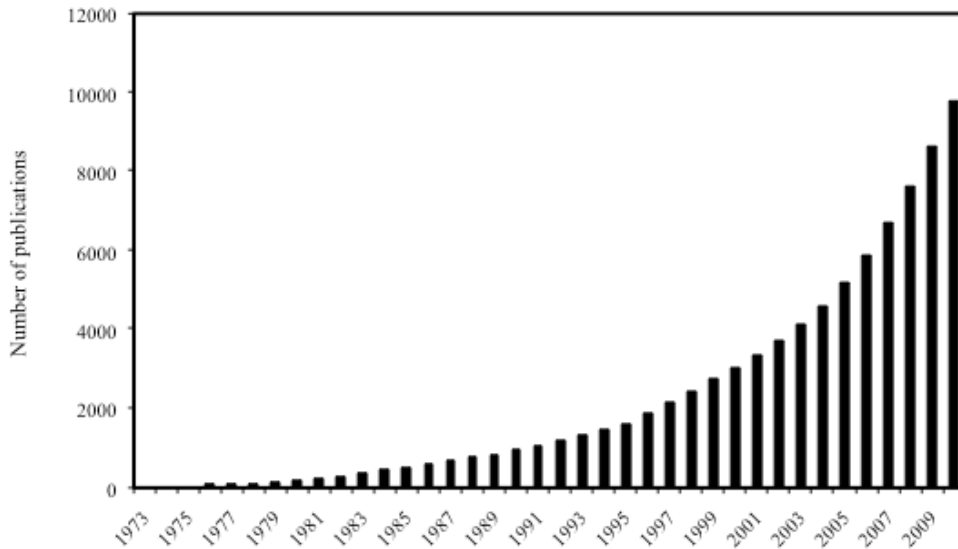


Figure II-1 : Evolution du nombre de publications utilisant les isotopes stables en sciences biologiques et environnementales depuis 1973 à nos jours (nombre cumulé). Résultat obtenu pour une recherche avec le mot clé "stable isotope", catégorie "Biological and Environmental Science", dans la base de données Scopus.

L'utilisation des ratios isotopiques du carbone et de l'azote mesurés dans les tissus des consommateurs comme traceurs écologiques est principalement basée sur le fait que : 1) les différents producteurs primaires d'un écosystème présentent des compositions isotopiques différentes. Celles-ci sont dues aux différents nutriments fixés dont la composition isotopique est également différente, aux différentes sources de carbone et d'azote utilisées, et/ou au cycle biochimique que ces producteurs primaires utilisent pour réaliser la photosynthèse (Peterson et Fry 1987, Gannes et al. 1998) ; 2) l'enrichissement en ^{13}C et ^{15}N entre une source (une proie) et son consommateur est relativement prévisible pour les consommateurs omnivores et/ou carnivores (également appelé facteur d'enrichissement trophique, ou TEF pour « *Trophic Enrichment Factor* » en anglais). Il est moins important en ^{13}C ($\leq 1\text{‰}$) qu'en ^{15}N (3,4‰ en moyenne) (Post 2002a). Ce TEF peut être plus faible mais surtout plus variable chez les consommateurs herbivores. Enfin, la composition isotopique (ratio des isotopes d'un élément) des consommateurs analysés est comparée à celle de standards de référence, et calculée selon la formule :

$$\delta X (\text{‰}) = [(R_{\text{échantillon}} / R_{\text{standard}}) - 1] * 1000$$

où $X = ^{13}\text{C}$ ou ^{15}N , $R_{\text{échantillon}} = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dans l'échantillon, et $R_{\text{standard}} = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dans les standards de référence. Ces standards de référence sont le Pee Dee Belemnite

pour le carbone (formation calcaire fossile marine de Caroline du Sud aux USA), et l'air atmosphérique pour l'azote (Peterson et Fry 1987). Par convention, δX pour ces standards est égal à 0‰.

Les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ des consommateurs sont ainsi généralement utilisées comme traceurs de leur zone d'alimentation et/ou habitat, puisque leur composition isotopique se rapproche de celle des producteurs primaires du réseau trophique auquel ils appartiennent (France 1995, Hobson 1999). Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ sont davantage utilisées comme indicateurs de la position trophique des organismes dans leur réseau trophique et ont largement servi au calcul du niveau trophique absolu des espèces dans de nombreux écosystèmes (Hobson et Welch 1992, Lesage et al. 2001, Le Loc'h et al. 2008) (Fig. II-2).

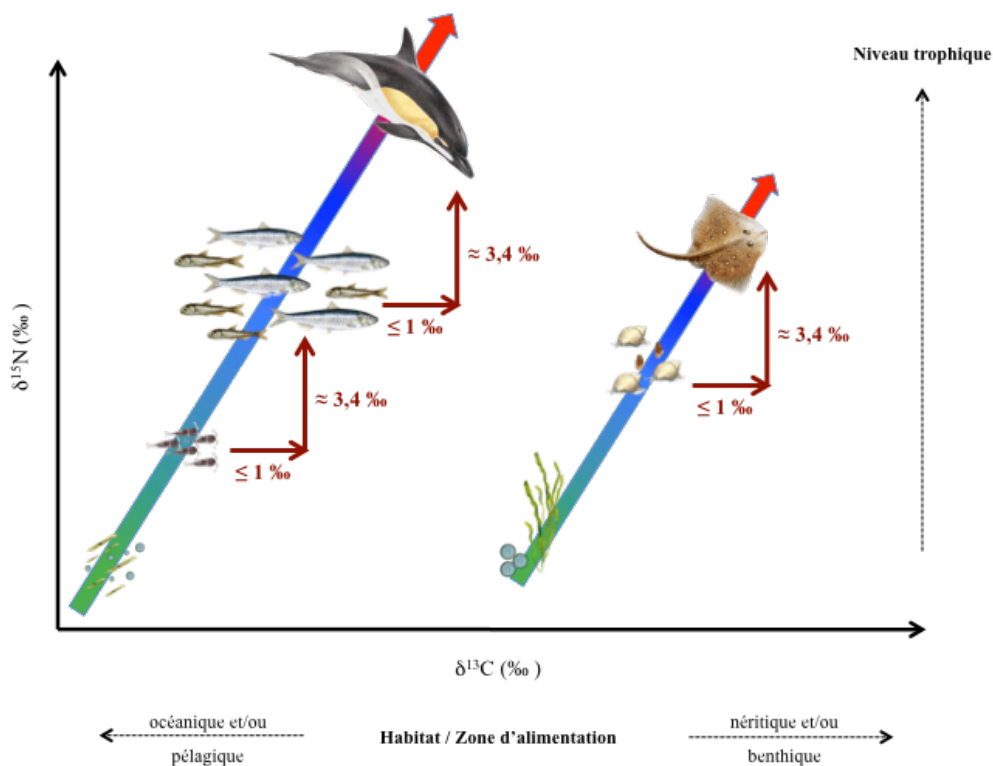


Figure II-2 : Schéma de principe de l'utilisation des isotopes stables du carbone et de l'azote en environnement marin. Sont illustrées ici deux chaînes alimentaires volontairement simplifiées supportées par différents producteurs primaires (phytoplancton océanique vs. microphytobenthos et/ou macroalgues côtières). Le facteur d'enrichissement (TEF) généralement estimé entre une source et son consommateur, pour un consommateur omnivore et/ou carnivore, est indiqué pour chaque élément. L'axe des abscisses correspond aux signatures isotopiques en carbone des organismes, l'axe des ordonnées aux signatures isotopiques en azote, ces signatures étant calculées par rapport à des standards de référence ; voir texte.

Comme pour les profils d'acides gras, les signatures isotopiques fournissent une information à une échelle de temps qui dépend du taux de renouvellement du tissu analysé, allant du court terme pour le foie au moyen terme pour le muscle (Tieszen et al. 1983, Hobson et Clark 1992, Sponheimer et al. 2006), à la vie entière de l'animal en ce qui concerne les tissus non renouvelés tels que les dents lorsqu'elles sont analysées entièrement (Niño-Torres et al. 2006). Les dents résultent en fait de l'accumulation de couches de dentine au cours de temps, et ces couches peuvent également être analysées séparément pour reconstituer le régime alimentaire d'individus au cours du temps (Walker et Macko 1999). C'est aussi le cas des tissus kératinisés (e.g., poils de mammifères, fanons de baleines, plumes d'oiseaux) ou chitinisés (e.g., plumes et becs des céphalopodes). Ces tissus croissent continuellement au cours de la vie d'un animal (ou entre deux périodes de mue selon les espèces), deviennent métaboliquement inertes après leur synthèse, et constituent ainsi d'excellents tissus « archives » pour l'étude des migrations notamment (e.g., baleines, Schell et al. 1989 ; calmars, Lorrain et al. 2011).

Pour les tissus mous qui se renouvellent, la fenêtre temporelle d'intégration de l'information sera évidemment différente en fonction des espèces considérées, variant par exemple de quelques semaines à quelques mois pour un même tissu analysé (e.g., le muscle) entre une caille, une gerbille ou un lama (Tieszen et al. 1983, Hobson et Clark 1992, Sponheimer et al. 2006). De même, la différence de métabolisme et de fractionnement isotopique entre les différents tissus d'un animal rend difficile la comparaison des informations apportées par le foie et le muscle par exemple. Ainsi, on ne peut pas prétendre aussi facilement un changement de régime alimentaire entre le court et le moyen terme parce que les deux tissus présentent des compositions isotopiques différentes : il s'agit avant tout d'une différence physiologique des tissus qu'il faut absolument prendre en considération (Dalerum et Angerbjörn 2005). En effet, les différences de signatures en $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ entre les différents tissus d'un consommateur, ainsi que les différences de fractionnement isotopique entre ces différents tissus (i.e., $\delta X_{\text{tissu consommateur}} - \delta X_{\text{nourriture}}$ différents), dépendent directement :

- pour le carbone : de la composition en acides aminés et en lipides des différents tissus, et de la signature isotopique même en $\delta^{13}\text{C}$ de ces différents acides aminés et lipides en présence (e.g., Hare et al. 1991). Par exemple, les lipides sont particulièrement appauvris en ^{13}C par rapport aux autres constituants cellulaires, à cause des processus de fractionnement qui ont lieu pendant leur formation (De Niro et Epstein 1977) ;

- pour l'azote : cela dépend de la composition en acides aminés des différents tissus, et de la signature isotopique même en $\delta^{15}\text{N}$ de ces différents acides aminés en présence (voir à ce sujet des différences entre tissus la synthèse de Martínez del Rio et al. 2009).

Par ailleurs, la différence théorique de composition isotopique existant entre une source et son consommateur (i.e., TEF, moins de 1‰ en $\delta^{13}\text{C}$, en moyenne 3,4 ‰ en $\delta^{15}\text{N}$) est depuis quelques années maintenant largement discutée, alors qu'elle est à la base de l'utilisation des isotopes stables du carbone et de l'azote en écologie trophique. Ce TEF peut en effet largement varier, par exemple, en fonction du taxon du consommateur, du type de nourriture qu'il consomme (composition), ou encore de la qualité de la nourriture (McCutchan et al. 2003, Vanderklift et Ponsard 2003, Robbins et al. 2005, Caut et al. 2009) ; et, bien sûr, en fonction du tissu analysé. De plus, au sein d'une même espèce et d'un même tissu, le taux d'incorporation du signal isotopique d'une proie peut également varier en fonction de la taille et de l'âge du consommateur (Martínez del Rio et al. 2009). Enfin, l'interprétation de la composition isotopique d'un consommateur est encore compliquée par ce que l'on appelle le « routing isotopique » (Gannes et al. 1997, Martínez del Rio et al. 2009). Le routing isotopique correspond au fait que les différents composants issus de la nourriture (ceux qui sont assimilés), de composition isotopique distincte, sont alloués différemment aux différents tissus du consommateur pour leur constitution et leur renouvellement. Souvent, les tissus d'un consommateur ne reflètent donc pas tout à fait la composition isotopique de la nourriture prise dans son ensemble, mais la composition isotopique des composants de cette nourriture (e.g., protéines) à partir desquels le tissu a été synthétisé (Gannes et al. 1997). Ainsi, les valeurs isotopiques mesurées chez un consommateur sont finalement le résultat de nombreux processus géochimiques, biochimiques, physiologiques et écologiques. Ces traceurs potentiels sont donc soumis à de nombreuses sources de variations biologiques et environnementales (e.g., variations ontogéniques, spatio-temporelles, etc.).

Cependant, malgré ces sources de variations, et au-delà de son intérêt fondamental, cet outil a trouvé de nombreux adeptes en écologie trophique ces dernières décennies notamment grâce aux progrès technologiques qui ont considérablement facilité sa mise en œuvre et nettement diminué les coûts d'analyses. Il est ainsi possible aujourd'hui de réaliser des analyses isotopiques sur de grands jeux d'échantillons. De plus, le développement de modèles spécifiques aux données isotopiques (e.g., les modèles de mélange ou « *mixing models* ») a grandement facilité l'interprétation des mesures *in situ*, malgré un manque évident, encore aujourd'hui, de données expérimentales sur lesquelles s'appuyer (Martínez del Rio et al.

2009). D'autre part, certains de ces modèles permettent depuis peu d'intégrer une partie de la variabilité associée à l'analyse des ratios isotopiques du carbone et de l'azote chez les organismes (Parnell et al. 2010).

Enfin, les isotopes stables du carbone et de l'azote permettent d'avoir une image des réseaux trophiques étudiés à un temps donné (celui de l'échantillonnage), dont une image de la position des différentes espèces en leur sein. Toutefois, cette vision des réseaux trophiques peut paraître quelque peu statique. Les modèles de mélange permettent notamment de s'affranchir partiellement d'une telle vision, et d'avoir ainsi une idée de la dynamique des relations trophiques sous-jacentes, même si leur utilisation se limite souvent à une relation unidirectionnelle de type proies-prédateur.

II.3 Les contaminants chimiques : polluants organiques persistants et éléments traces

L'analyse de contaminants chimiques comme les Polluants Organiques Persistants (POPs), ou d'éléments traces tels que le mercure (Hg) et le cadmium (Cd), représente la troisième technique ayant plus récemment fait ses preuves en tant que traceurs des préférences alimentaires chez les organismes marins. Ils ont été regroupés dans cette partie pour la raison principale qu'à la différence des acides gras et des isotopes stables du carbone et de l'azote, bien que pouvant avoir une origine naturelle pour certains d'entre eux comme le Hg et le Cd, ces paramètres chimiques (i.e., POPs, Hg et Cd) n'ont aucune fonction biologique avérée chez les organismes supérieurs et sont même reconnus comme étant hautement toxiques au-delà de concentrations seuils.

Les POPs, dont les représentants les plus connus sont sans doute les Polychlorobiphényles (PCBs) et le Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), ont une origine exclusivement anthropique pour la grande majorité d'entre eux, fabriqués pour et répandus par l'industrie et l'agriculture dans l'environnement. Ils ont notamment la particularité de se volatiliser très facilement, et, à cause de leur grande stabilité physico-chimique dans l'atmosphère, d'être transportés sur des distances immenses et de pouvoir se déposer dans des zones très éloignées de leur endroit d'utilisation ou de leur point d'émission d'origine (e.g., en environnement arctique) (Jones et de Voogt 1999). D'autre part, les POPs sont des composés

fortement hydrophobes et lipophiles. Dans les organismes des environnements aquatiques, ils s'accumulent donc dans les tissus adipeux, principalement *via* la voie trophique, et les apports étant plus importants que l'élimination, ils finissent par se bioamplifier dans les réseaux trophiques. De plus, l'inertie biologique relative de ces composés chimiques ou de leurs métabolites leur confère une forte persistance dans les écosystèmes en général (Braune et al. 2005). Ainsi, alors que nombre de ces composés ont été interdits d'utilisation depuis plusieurs années voire quelques décennies dans de nombreux pays, ils contaminent encore fortement les écosystèmes (Jones et de Voogt 1999).

Le stockage et la dynamique d'élimination des POPs par les organismes sont en fait intimement liés au stockage des graisses par ces organismes, et à leur métabolisme. Les organismes qui sont amenés à remobiliser leurs graisses au cours de leur cycle de vie (e.g., au cours d'une migration, de la reproduction, d'une hibernation) sont ainsi susceptibles d'éliminer une partie de leur charge en POPs (Jones et de Voogt 1999), ou encore d'en subir les effets toxiques (e.g., Verreault et al. 2008).

Leur transport loin de leur source d'émission, et cette élimination possible par certains organismes (néanmoins la bioaccumulation des POPs reste avérée), pourraient notamment contraindre l'utilisation de ces contaminants chimiques comme traceurs écologiques des préférences alimentaires chez les organismes marins. Cependant, ils ont prouvé leur intérêt pour l'étude de l'écologie trophique de nombreux prédateurs supérieurs, tels que les requins ou les mammifères marins en environnement arctique notamment (Fisk et al. 2002, Herman et al. 2005, Krahn et al. 2007). Du fait de leur haut niveau trophique, et leurs besoins énergétiques très importants pour maintenir leur métabolisme élevé, les homéothermes marins tels que les mammifères marins sont en effet d'excellents accumulateurs de POPs dans leur couche de lard (Braune et al. 2005). Dans les études citées ci-dessus, l'analyse des POPs est néanmoins souvent couplée à l'analyse des isotopes stables du carbone et de l'azote et/ou aux profils d'acides gras (approche multitraceurs) pour répondre à une question écologique.

Le Hg et le Cd sont émis dans l'environnement à partir de sources naturelles ou anthropiques (e.g., volcanisme ou incinération des déchets pour le Hg, exploitation des minerais de zinc pour le Cd). Ils atteignent les eaux marines par voie fluviale ou par déposition atmosphérique, l'atmosphère restant le vecteur le plus important pour ces métaux (Cossa et al. 1990, Cossa et Lassus 1989, Neff 2002). Le transfert par voie trophique est

ensuite, encore une fois, la principale voie pour l'incorporation de ces deux métaux par les organismes supérieurs, dans lesquels ils s'accumulent fortement chez les plus hauts niveaux trophiques en particulier (Eisler 1987, Cossa et al. 1990, Koyama et al. 2000, Lahaye et al. 2005). Néanmoins, la bioamplification des métaux en général est plus une exception qu'une règle, et seule la bioamplification d'une des formes organiques du Hg, le méthyl-Hg, n'est plus discutée (Gray 2002). L'évaluation de la bioamplification des métaux dans les réseaux trophiques marins est effectivement souvent ambiguë, car les concentrations en métaux dans des proies entières sont généralement comparées aux concentrations dans des tissus spécifiques d'un prédateur, sans que l'on connaisse vraiment les processus de bioaccumulation et d'élimination en jeu, les relations trophiques ou le statut trophique réel des espèces (LeBlanc 1995, Reinfelder et al. 1998, Gray 2002, Wang 2002).

Les concentrations en métaux mesurées chez les organismes sont en fait le résultat net de ce qui est entré dans l'organisme et/ou dans le tissu analysé, moins ce qui a été éliminé *via* les processus de régulation mis en place chez ces organismes au cours de l'évolution, pour contrecarrer par exemple la toxicité de certains métaux. L'accumulation d'un métal par un organisme et son transfert dans les réseaux trophiques dépend enfin de sa spéciation ou forme physico-chimique (et donc de sa biodisponibilité) dans les environnements biotique et abiotique de l'organisme (Gray 2002, Neff 2002, Rainbow 2002).

Le caractère bioamplifiable du Hg tient dans le fait qu'il peut être méthylé par des microorganismes, notamment dans les sédiments marins sur le plateau continental (Fitzgerald et al. 2007). La méthylation du Hg par les microorganismes serait également accrue dans les eaux océaniques profondes peu oxygénées situées sous la thermocline, eaux dans lesquelles la forme organique diméthyl-Hg devient alors la forme dominante parmi toutes les formes organiques possibles du Hg (Mason et al. 1995, 1998). Or, le diméthyl-Hg est une forme très peu stable et représente la principale source de formation du monométhyl-Hg, forme du mercure finalement la plus stable, la plus biodisponible et donc la plus accumulée par les organismes marins (Fitzgerald et al. 2007). C'est également la forme du Hg la plus toxique (Boening 2000).

Certains auteurs ont exploré le potentiel du Hg en tant que traceur de l'habitat et/ou de la zone d'alimentation de certains consommateurs, en démontrant par exemple une bioaccumulation préférentielle du Hg chez les espèces mésopélagiques par rapport aux espèces épipélagiques

(Monteiro et al. 1996, Thompson et al. 1998, Choy et al. 2009). Ainsi, les oiseaux de mer se nourrissant sur des poissons mésopélagiques remontant en surface la nuit présentent des concentrations en Hg dans leurs plumes plus importantes que les oiseaux se nourrissant d'espèces épipélagiques (Thompson et al. 1998, Ochoa-Acuña et al. 2002). De plus, on peut penser que le mercure est potentiellement un bon indicateur du niveau trophique des organismes, étant donnée sa bioamplification avérée dans les réseaux trophiques (Eisler 1987, Cossa et al. 1990, Gray 2002), comme cela a déjà été montré avec l'analyse de POPs - qui se bioamplifient également - chez le requin du Groenland (Fisk et al. 2002).

Si le foie ou la glande digestive et les reins sont, *a priori*, les organes accumulateurs du Hg chez les organismes marins (Eisler 2010), en particulier chez les oiseaux et les mammifères marins, il n'en reste pas moins que souvent, le muscle présente également des concentrations très élevées, voire plus élevées que le rein et le foie, chez les poissons ou les céphalopodes par exemple (Neff 2002, Bustamante et al. 2006). Ceci est notamment le cas de nombreuses espèces de requins (Pethybridge et al. 2010), qui présentent souvent un foie particulièrement imposant très riche en graisse, leur servant de réserve mais aussi à diminuer la densité de l'animal en l'absence de vessie natatoire. Chez les requins, la quantité de mercure dans le foie peut ainsi se trouver fortement diluée (Fig. II-2). D'autre part, c'est en se liant à des protéines que le Hg s'accumulerait, d'où une rétention importante du méthyl-Hg en particulier dans le tissu musculaire des organismes marins (Bloom 1992, Neff 2002, Bustamante et al. 2006).

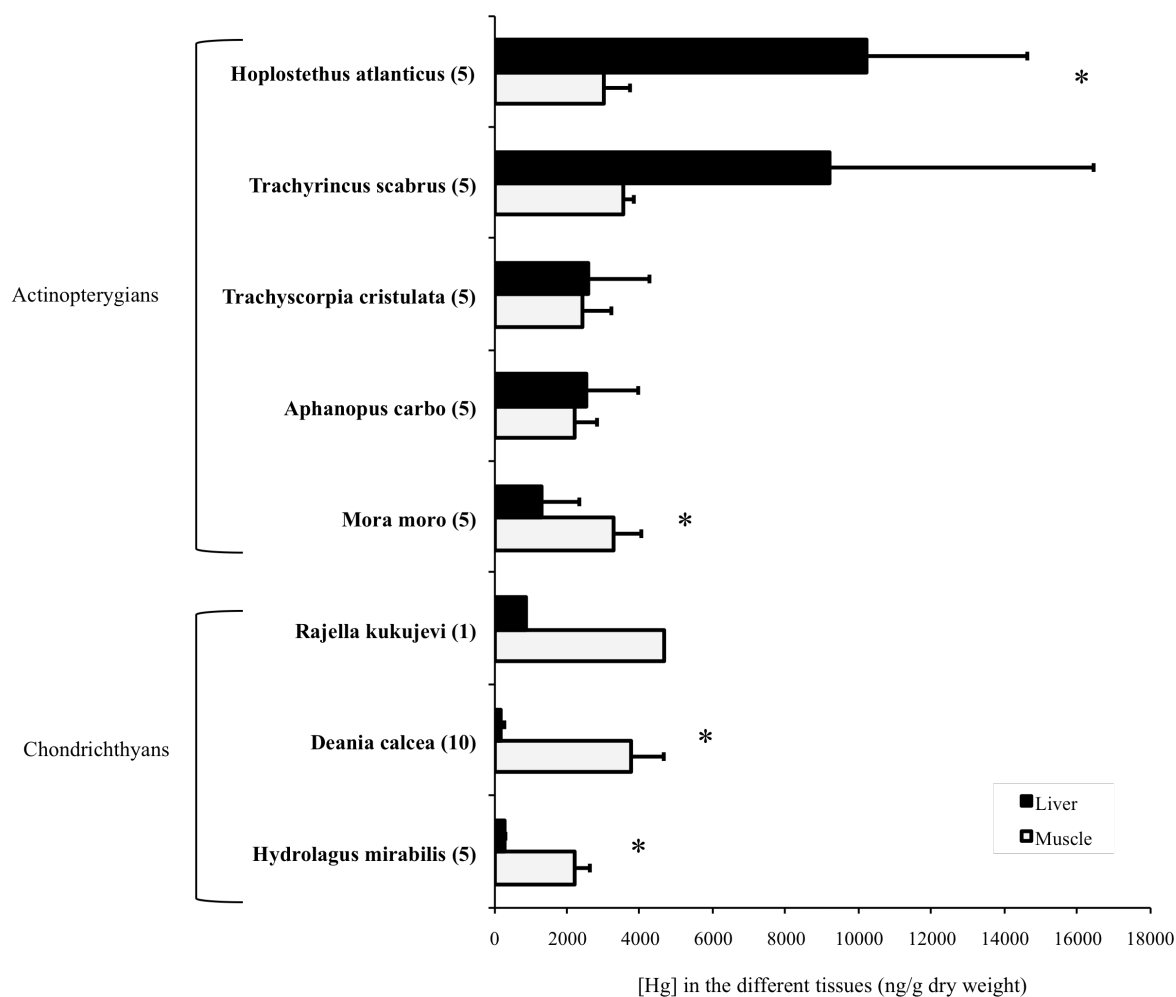


Figure II-3 : Concentrations en Hg dans le muscle et le foie de plusieurs espèces de poissons prédateurs des profondeurs du Golfe de Gascogne (résultats obtenus au cours de cette thèse). Les poissons osseux (Actinoptérygiens) présentent des concentrations dans le foie plus élevées que les poissons cartilagineux (Chondrichthyens), ces derniers possédant un foie est bien plus imposant (voir texte) et dans lequel les quantités de métaux peuvent ainsi se retrouver très diluées. Le chiffre entre parenthèses indique le nombre d'individus analysés par espèce. * indique une différence significative de concentrations entre les deux tissus (test de Wilcoxon, $p < 0.05$).

Comme dans le cas du Hg, la bioaccumulation du Cd peut être très importante chez certains organismes marins, notamment certains amphipodes pélagiques du genre *Themisto*, les céphalopodes, de nombreux mammifères marins et oiseaux de mer. Cependant, cette bioaccumulation du Cd ne semble pas dépendre directement du niveau trophique des organismes, comme cela est vraisemblablement le cas pour le Hg d'une façon générale, même si la voie trophique reste la principale voie d'incorporation et d'accumulation du Cd chez de nombreux organismes. La bioamplification du Cd dans les réseaux trophiques n'est donc pas établie comme dans le cas du Hg, même si des auteurs ont montré que cela pouvait être le cas

pour certaines « chaînes » trophiques (Wang 2002, Croteau et al. 2005, Cheung et Wang 2008).

Le Cd ionique (Cd^{2+}) est en fait considéré comme la forme physico-chimique la plus biodisponible pour le phytoplancton (Neff 2002). Le transfert du Cd dans les réseaux trophiques et sa biodisponibilité vis-à-vis des prédateurs dépend ensuite essentiellement des mécanismes de détoxification développés par les différents organismes proies. Ainsi, seul le métal lié à des fractions solubles telles que des protéines cytosoliques (e.g., métallothionéines) est fortement biodisponible pour les niveaux trophiques supérieurs, alors que le métal lié à des composés insolubles n'est pas transféré efficacement (Wallace et Lopez 1997).

Comme pour le Hg, le foie ou la glande digestive et les reins sont, *a priori*, les organes accumulateurs du Cd chez les organismes marins (Eisler 2010). En revanche, le muscle ne présente généralement que de très faibles concentrations de ce métal (Neff 2002). Le cadmium peut ainsi s'accumuler dans les organes de taxons très variés (i.e., crustacés, mollusques et vertébrés), dans des environnements très variés également (Bargagli et al. 1996, Bustamante et al. 1998, 2004, Zauke et al. 1999). Cet élément chimique a donc montré son potentiel pour l'étude des préférences alimentaires de certains prédateurs, qui consomment alors en grande quantité des proies accumulant fortement le métal par rapport à d'autres proies l'accumulant très peu. En Atlantique Nord-Est par exemple, les céphalopodes et notamment les céphalopodes océaniques présentent des teneurs en Cd très élevées par rapport aux poissons proies potentielles. Ils constituent de ce fait un vecteur indéniable de Cd pour leurs prédateurs que sont les oiseaux et les mammifères marins (Caurant et Amiard-Triquet 1995, Bustamante et al. 1998). Les concentrations en Cd dans les reins des dauphins communs du Golfe de Gascogne ont ainsi permis l'identification d'une ségrégation à long terme entre les populations néritiques et océaniques du Golfe, sur la base de leurs préférences alimentaires (Lahaye et al. 2005).

Pour en revenir au contexte de la thèse, l'objectif était de nous intéresser, *in fine*, à l'ensemble des maillons composant les réseaux trophiques du Golfe de Gascogne. Ces réseaux complexes incluent les niveaux trophiques inférieurs (e.g., plancton), les niveaux trophiques les plus élevés (e.g., mammifères marins), mais aussi et surtout de nombreux maillons intermédiaires. Ainsi nous avons estimé, d'après les avantages et les inconvénients liés aux différentes méthodes décrites ci-dessus, que les **traceurs isotopiques et métalliques** (i.e., Hg et Cd, d'après les études antérieures réalisées dans la zone ; Lahaye 2006) étaient appropriés et judicieux à mettre en œuvre pour l'étude des relations trophiques par traceurs écologiques dans l'écosystème Golfe de Gascogne.

Chapitre III

UN PEU DE PROTOCOLE, DE STRATEGIE ET DE MISE AU POINT METHODOLOGIQUE

III.1 La nécessité d'un échantillonnage adapté aux traceurs choisis

III.1.1 Tissus prélevés

Pour l'utilisation des ratios isotopiques du carbone et de l'azote en tant que traceurs de l'alimentation, **le muscle est pour nombre de taxons un intégrateur de la nourriture assimilée sur le moyen à long terme** (temps relatif bien sûr par rapport à la longévité de l'espèce considérée) (e.g., Tieszen et al. 1983, Pinnegar et Polunin 1999, Dalerum et Angerbjörn 2005, Herzka 2005, Stowasser et al. 2006). Chez les poissons, par exemple, le muscle est effectivement susceptible d'apporter une information sur le régime alimentaire à plus long terme que le foie dont les ratios isotopiques sont plus variables, car ce dernier tissu a un taux métabolique bien plus élevé que le muscle (Pinnegar et Polunin 1999). Des données expérimentales ont confirmé une telle différence chez d'autres organismes marins tels que les céphalopodes, cette fois entre le muscle et la glande digestive (Stowasser et al. 2006).

Les ratios isotopiques dans le muscle reflètent en fait l'alimentation des organismes lors de la formation des tissus musculaires en période de croissance (Miller 2000, Perga et Gerdeaux 2005). Celle-ci a lieu principalement lors du passage de la phase juvénile à la phase adulte (Herzka 2005), mais également lors de la croissance des organismes tout au long de la vie. En effet, chez la plupart des organismes marins, et notamment chez les poissons, la croissance et/ou le gain de biomasse sont continus (Mommsen 2001), même si la croissance en taille finit par atteindre un certain plateau. Bien sûr, l'atteinte de l'équilibre en termes de signature isotopique d'un consommateur par rapport à ses proies, liée au taux de renouvellement

protéique, sera plus rapide chez les plus jeunes individus que chez les individus plus âgés (Herzka 2005, Sakano et al. 2005), ou chez les espèces moins longévives.

Enfin, **le muscle est généralement le tissu de référence dans les études par approche isotopique de la structure et du fonctionnement de réseaux trophiques** considérés dans leur ensemble (Hobson et Welch 1992, Pinnegar et Polunin 1999). Il permet effectivement de comparer les signatures isotopiques entre individus et entre différents taxons, minimisant au mieux les différences intertissulaires évoquées précédemment, c'est-à-dire en termes de propriétés biochimiques et physiologiques comme le turnover protéique des tissus, ou le « routing métabolique » des différents isotopes en fonction des tissus (Cherel et al. 2005, 2009). Nous avons donc utilisé le tissu musculaire pour les analyses isotopiques, afin d'avoir une image moyenne sur le moyen à long terme du régime alimentaire des organismes prélevés pour la reconstruction des réseaux trophiques dans le Golfe de Gascogne.

Pour l'analyse du **Hg**, le **muscle** a également été préféré à d'autres organes car il peut être considéré comme un **intégrateur de l'exposition des organismes à ce métal sur le plus long terme**. En général, les tissus tels que les reins, le foie ou la glande digestive, suivant les groupes taxinomiques, sont effectivement davantage associés au devenir plus ou moins direct du métal suivant son incorporation, c'est-à-dire à sa détoxification, son stockage et/ou son élimination. Chez les poissons et la plupart des invertébrés, le foie ou la glande digestive reflètent ainsi une exposition à plus court terme que le muscle aux éléments traces en général (Reinfelder et al. 1998).

Pour l'estimation du transfert de contaminants entre les compartiments d'un écosystème, et notamment entre des proies et un prédateur, l'analyse entière des proies est généralement recommandée (e.g., Cherel et al. 2005, Lahaye et al. 2005, Caut et al. 2011). Cependant, une étude préliminaire nous a permis de vérifier l'existence d'une bonne corrélation entre les ratios isotopiques mesurés dans le muscle et ceux mesurés dans l'organisme entier, ainsi qu'entre la concentration de Hg dans le muscle et celle dans l'organisme entier, ceci chez plusieurs espèces de petits poissons dites « fourrages » (Fig. III-1 et III-2). Ces corrélations nous ont ainsi confirmé la possibilité de ne prélever que le muscle pour la suite des analyses isotopiques (Cherel et al. 2005) et celles de Hg.

En revanche, pour les organismes dont le **Cd** serait analysé comme traceur écologique potentiel, le prélèvement des organes d'accumulation reconnus s'imposait, c'est-à-dire **le foie ou la glande digestive**, le muscle n'accumulant quasiment pas ce métal chez de nombreux organismes marins comme cela a été évoqué précédemment.

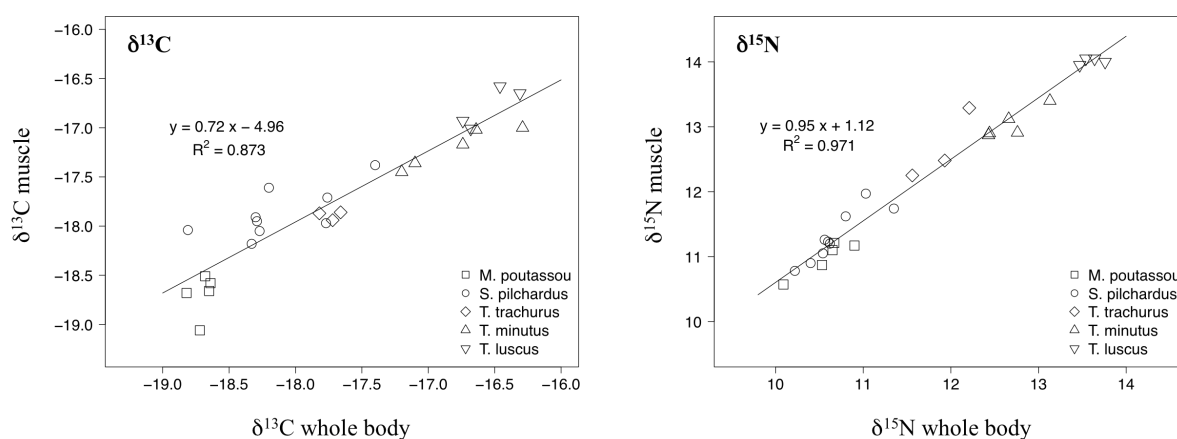


Figure III-1 : Relation entre les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ (en ‰) entre le muscle et l'organisme entier chez plusieurs espèces de poissons fourrages du Golfe de Gascogne : *Micromesistius poutassou* (merlan bleu), *Sardina pilchardus* (sardine), *Trachurus trachurus* (chinchard), *Trisopterus minutus* (petit tacaud) et *Trisopterus luscus* (tacaud commun). L'équation de la droite de régression linéaire et le coefficient de corrélation au carré de Pearson (R^2) sont indiqués pour chaque ratio isotopique.

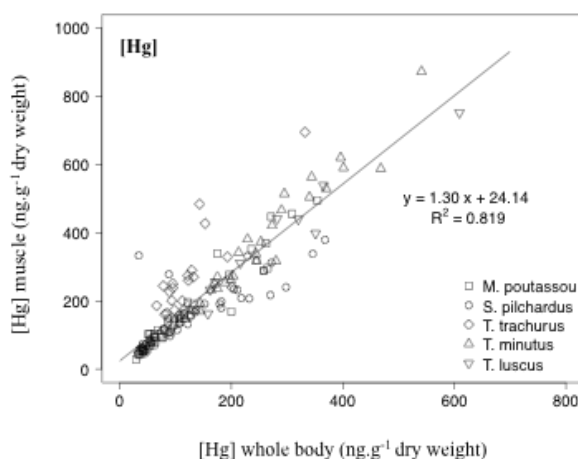


Figure III-2 : Relation entre les concentrations en mercure (Hg) du muscle et de l'organisme entier chez plusieurs espèces de poissons fourrages du Golfe de Gascogne : *Micromesistius poutassou* (merlan bleu), *Sardina pilchardus* (sardine), *Trachurus trachurus* (chinchard), *Trisopterus minutus* (petit tacaud) et *Trisopterus luscus* (tacaud commun). L'équation de la droite de régression linéaire et le coefficient de corrélation au carré de Pearson (R^2) sont indiqués.

III.1.2 Espèces et individus échantillonnés

Afin d'obtenir un jeu de données assez représentatif des différents types de réseaux trophiques pouvant exister au sein du Golfe de Gascogne (i.e., benthique vs. pélagique, côtier/néritique vs. océanique), **un grand nombre d'espèces couvrant un maximum de taxons a été prélevé dans les différents environnements du Golfe** (milieux néritiques, talus, milieux océaniques). Ainsi, plus de 140 espèces d'invertébrés et de vertébrés ont été analysées en isotopie, dont 11 espèces de mammifères marins, 14 espèces de poissons cartilagineux (Chondrichthyens), 74 espèces de poissons osseux (Actinoptérygiens), 22 espèces de mollusques céphalopodes, 5 espèces de mollusques bivalves et gastéropodes, et 15 espèces de crustacés. De plus, un ensemble d'espèces constituant le mésoplancton (principalement constitué de zooplancton, de taille comprise entre 0,2 et 20 mm) a également été analysé. Par ailleurs, les espèces prélevées dont le nombre d'individus était inférieur à trois n'ont pas été considérées comme vraiment représentatives des réseaux trophiques du Golfe de Gascogne, et n'ont donc finalement pas été incluses dans les résultats de la thèse.

Pour l'ensemble des espèces, nous avons choisi de prélever des individus ayant atteint le **stade adulte** (i.e., plateau de la relation taille-âge), et, dans la plupart des cas, ceux ayant atteint entre 60 et 80% de la taille maximale connue pour l'espèce. Idéalement, différentes espèces doivent effectivement être comparées à un stade équivalent de leur histoire de vie (Jennings et al. 2001). De nombreuses espèces changent en effet de régime alimentaire au cours de l'ontogénèse puisque leur morphologie, leur taille et leurs besoins énergétiques évoluent également au cours du temps (Hjelm et al. 2000, Karpouzi et Stergiou 2003). Pour les mammifères marins par exemple, le problème d'utiliser des juvéniles encore allaités vient cette fois du fait que leur signature isotopique s'en trouve alors plus élevée que celle de leur mère (Hobson et al. 1997).

Bien sûr, notre choix d'analyser les individus adultes pour la plupart des espèces implique qu'une partie de la population seulement est prise en compte pour chaque espèce, et ainsi que certains composants de l'écosystème ne soient pas inclus dans notre reconstruction des réseaux trophiques. Cependant, pour certaines espèces caractéristiques des différents environnements du Golfe et dont de jeunes individus étaient capturés lors des campagnes (e.g., la sole, espèce benthique côtière ; le merlan, espèce benthopélagique côtière ; le merlu, espèce benthopélagique du plateau ; ou encore la sardine, espèce pélagique du plateau), les

différentes classes de taille d'individus disponibles ont été prélevées, puis traitées séparément en termes de compartiments trophiques constituant les réseaux trophiques. Pour beaucoup d'autres espèces, les individus juvéniles notamment n'étaient de toute façon pas disponibles, les nurseries ne se situant généralement pas dans la fenêtre spatiale et/ou temporelle échantillonnée(s) lors des campagnes (e.g., nurseries très côtières ou très océaniques). Enfin, dans un contexte d'étude *in fine* de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques en estimant, par exemple, la longueur des chaînes alimentaires dans le Golfe de Gascogne (Post et Takimoto 2007, Vander Zanden et Fetzer 2007), il apparaissait surtout intéressant d'avoir accès aux stades adultes des espèces prédatrices notamment, qui se nourrissent *a priori* aux niveaux trophiques les plus élevés dans leur environnement spécifique.

III.1.3 Campagnes océanographiques (saisons/années échantillonnées)

La signature isotopique d'une espèce (pour une même classe d'âge considérée) peut varier dans le temps, saisonnièrement ou d'année en année, en raison de changements en termes de signature à la base des réseaux trophiques, ou encore des changements de disponibilité et/ou de composition en proies. C'est pourquoi nous avons favorisé **l'échantillonnage du matériel biologique dans une fenêtre de temps restreinte** pour notre étude, notamment pour la reconstruction des réseaux trophiques dans le Golfe de Gascogne. Ainsi, la majeure partie des individus analysés au cours de la thèse provient de la campagne EVHOE³ de l'automne 2008. Néanmoins, certaines espèces provenant de zones spécifiques du Golfe (e.g., environnement profond), ou considérées comme importantes au sein des réseaux trophiques à reconstituer et n'ayant pas pu être échantillonnées en 2008, ont été prélevées au cours d'autres campagnes EVHOE qui ont toujours lieu à l'automne. Malgré une variabilité interannuelle possible de la signature des espèces, variabilité que nous avons exploré pour certaines d'entre elles (**Annexe 5**), nous avons effectivement montré qu'il était possible de moyenner la signature d'individus prélevés sur plusieurs années pour avoir une idée générale de la position de l'espèce au sein des réseaux trophiques du Golfe de Gascogne. Enfin, les mammifères marins représentent un cas particulier, puisqu'ils sont issus d'échouages le long

³ **E**valuation des ressources **H**alieu**t**iques de l'**O**uest de l'**E**urope.

des côtes françaises, ayant lieu toute l'année et mis à disposition pour l'étude par le Centre de Recherche sur les Mammifères Marins de l'Université de La Rochelle.

Les campagnes EVHOE sont des campagnes océanographiques organisées chaque année à l'automne depuis 1987 par l'IFREMER⁴, sur le navire hauturier Thalassa. Elles ont pour principal objectif l'évaluation récurrente des stocks de poissons démersaux et benthiques de l'Atlantique Nord-Est, plus précisément sur les plateaux continentaux du Golfe de Gascogne et de la Mer Celtique. La majorité du temps, ce sont donc des chalutages de fond diurnes qui sont menés au cours de la campagne. Néanmoins, depuis plusieurs années, quelques chalutages pélagiques profonds nocturnes sont également réalisés dans les canyons situés aux abords du talus continental. Ils permettent d'échantillonner les espèces méso et bathypélagiques remontant dans la colonne d'eau la nuit, et devenant ainsi une ressource disponible aux prédateurs supérieurs marins du Golfe de Gascogne.

Par ailleurs, le chalutage de fond, qui reste le principal chalutage mené lors de ces campagnes automnales, permet un échantillonnage très diversifié en espèces et en taxons constituant les réseaux trophiques du Golfe de Gascogne. Même si ce chalutage cible avant tout les espèces démersales et benthiques, il permet également d'avoir accès à de nombreuses espèces pélagiques (mais ne permet évidemment pas une représentativité de ces espèces en termes de biomasse), l'inverse n'étant pas vrai lors du chalutage pélagique. De plus, l'exploration de la variabilité saisonnière des signatures isotopiques chez deux espèces de petits poissons pélagiques (**Annexe 5**), la sardine et l'anchois, a montré qu'un échantillonnage à l'automne était plus à même de représenter la plasticité trophique et/ou la plasticité en termes de zones d'alimentation des espèces de bas niveaux trophiques en particulier. Les signatures interindividuelles sont effectivement apparues bien plus variables à l'automne, c'est-à-dire en absence de blooms phytoplanctoniques connus. En effet, ces blooms favorisent le développement quasi exclusif de certaines espèces de plancton, qui vont alors constituer la source trophique principale sur laquelle une grande partie des individus, voire des espèces de même niveau trophique, peuvent alors se nourrir (i.e., au printemps).

Pour certains aspects de l'étude seulement (i.e., la variabilité saisonnière des signatures isotopiques et les relations trophiques plancton-petits poissons pélagiques, étudiées en **Annexes 5 et 6**), nous avons donc également échantillonné du matériel biologique lors des

⁴ Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER.

campagnes océanographiques PELGAS, organisées également par l'IFREMER, cette fois au printemps. Ces campagnes ont lieu chaque année depuis 2000 dans le Golfe de Gascogne avec pour principal objectif l'évaluation des populations de petits poissons pélagiques par méthode acoustique. Cette méthode est validée par la réalisation de chalutages pélagiques en parallèle.

III.2 La nécessité d'une approche technique adaptée aux analyses effectuées

III.2.1 Conservation des échantillons

Comme cela est classiquement réalisé pour l'analyse des isotopes stables et des éléments traces, et dans la mesure où cela était techniquement possible, nous avons choisi la **congélation à -20°C** comme méthode de conservation de tous nos échantillons. Cependant à bord de certains navires, la conservation des tissus prélevés à -20°C n'est pas toujours envisageable, et peut alors se faire dans de l'éthanol dilué à 70%. *A priori*, ce type de conservation ne pose pas de problème pour l'analyse future des isotopes stables du carbone et de l'azote dans les tissus biologiques, les variations étant généralement faibles (Sarakinis et al. 2002). Néanmoins, l'effet de l'éthanol n'est pas toujours constant, et surtout, des contradictions et des incertitudes persistent dans la littérature (Kaehler et Pakhomov 2001, Barrow et al. 2008). L'effet de la conservation dans l'éthanol à 70% pour l'analyse future d'éléments traces n'a en revanche, à notre connaissance, pas encore vraiment été étudié.

Au cours de la thèse, nous avons donc exploré l'effet de la conservation plus ou moins longue dans de l'éthanol à 70% (de 1 semaine à 1 an, 3 répliquats à chaque fois), sur les ratios isotopiques de carbone et d'azote dans le muscle, et sur les concentrations en Hg dans le muscle et le foie d'un même individu d'une espèce de requin (*Squalus acanthias*), par comparaison avec la congélation à -20°C. Cette étude fait ainsi l'objet de l'**Annexe 1**.

Les résultats obtenus ont montré que la conservation plus ou moins longue dans l'éthanol à 70% ne modifiait pas significativement la signature isotopique en azote de l'échantillon. Les signatures en carbone se sont révélées être un peu plus variables. Cependant, à la fin de l'expérience (1 an), les valeurs mesurées de $\delta^{13}\text{C}$ dans les répliquats de muscle congelés ou préservés dans l'éthanol à 70% n'ont pas montré de différence significative. Ainsi, d'une façon

générale, les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ sont restées relativement stables durant le temps de l'expérience (sachant l'erreur analytique du spectromètre de masse d'environ 0,2‰), gravitant toujours autour de -18.1‰ en $\delta^{13}\text{C}$ et de 13.0‰ en $\delta^{15}\text{N}$ respectivement, pour les deux types de conservation (Fig. III-3).

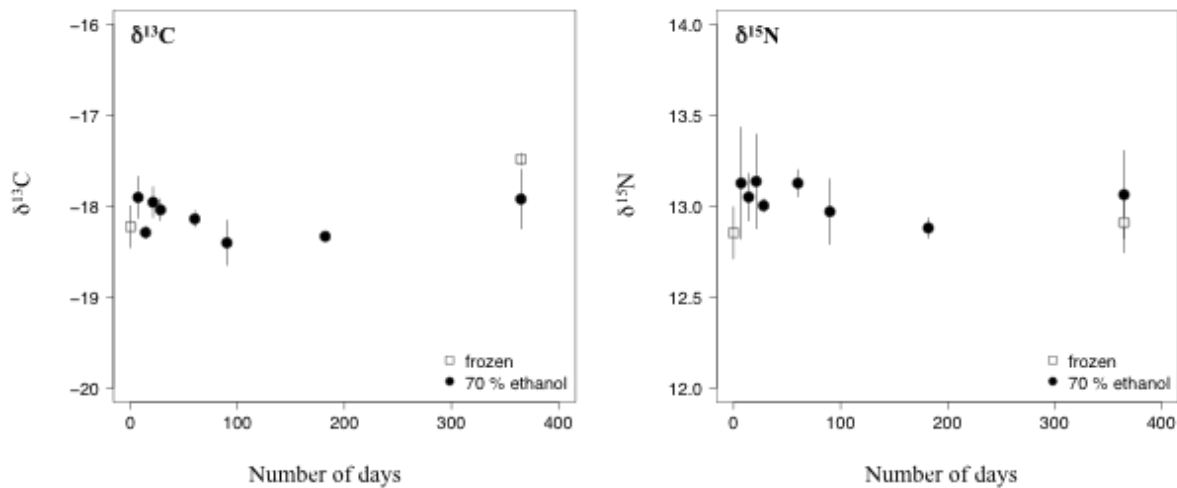


Figure III-3 : Valeurs isotopiques (moyennes \pm écart-type de 3 répliquats en ‰) dans le muscle d'un individu de requin (*Squalus acanthia*), congelé à -20°C ou conservé dans l'éthanol à 70%, et analysé à différents pas de temps pendant un an (le détail des tests statistiques est donné en **Annexe 1**).

En ce qui concerne les concentrations en Hg dans le muscle et le foie de ce même individu, la conservation plus ou moins longue dans l'éthanol à 70% n'a pas montré d'effet significatif non plus sur les valeurs obtenues au cours du temps, et par comparaison avec la congélation à -20°C . Dans le muscle, la concentration en Hg a ainsi toujours varié entre 3500 et 4500 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ poids sec environ ; dans le foie, entre 500 et 700 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ poids sec environ (Fig. III-4).

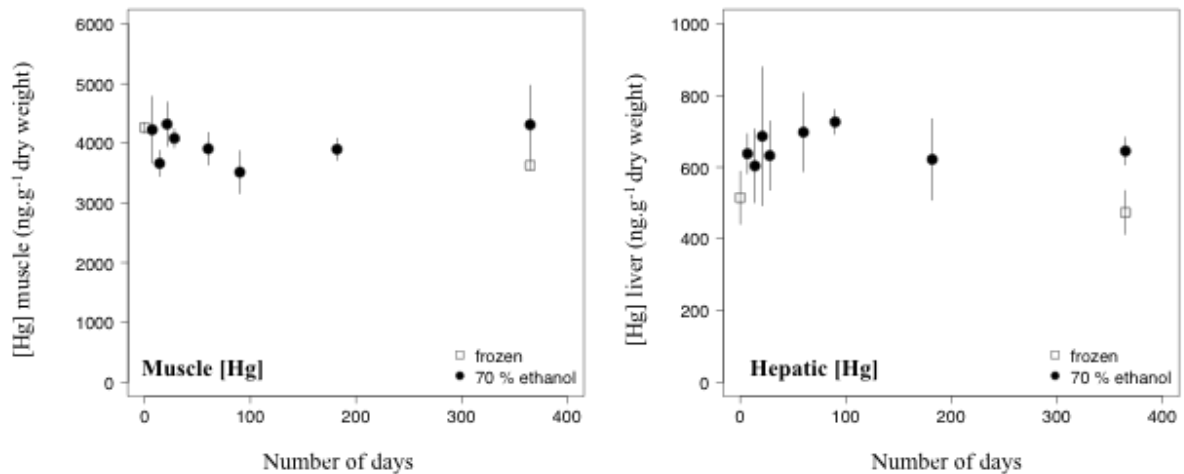


Figure III-4 : Concentrations en Hg (moyennes \pm écart-type de 3 répliquats) dans le muscle et le foie d'un individu de requin (*Squalus acanthia*), congelés à -20°C ou conservés dans l'éthanol à 70%, et analysés à différents pas de temps pendant un an (le détail des tests statistiques est donné en Annexe 1).

Si les résultats de ces tests permettent d'envisager la conservation des tissus dans l'éthanol à 70% pour analyses futures d'isotopes stables et du Hg, il semble que la conservation à -20°C reste néanmoins à privilégier lorsqu'elle est possible (Kaehler et Pakhomov 2001). Ceci est particulièrement recommandé dans le cas des analyses métalliques, pour lesquelles très peu de données sur ce sujet de la conservation des tissus sont disponibles. Par exemple, Lesage et al. (2010) ont étudié l'effet d'un autre solvant conservateur (le diméthyl-sulfoxyde) sur 14 éléments traces autres que le Hg dans des tissus de cétacés, et ont montré un effet non prévisible et très variable de ce solvant sur les différents métaux. De plus, notre expérience a testé l'effet de l'éthanol à 70% sur les concentrations en Hg dans les tissus d'une espèce de requin, espèce de niveau trophique *a priori* élevé, et présentant ainsi des concentrations en Hg relativement élevées (notamment dans le muscle). L'effet de cette conservation sur les concentrations en Hg d'autres types d'organismes, présentant des concentrations de métal relativement faibles, ainsi que l'effet de l'éthanol à 70% sur les concentrations d'autres éléments traces, reste donc entièrement à explorer.

III.2.2 Préparation des échantillons pour analyses

Après congélation, les échantillons ont été lyophilisés au minimum 48h, et broyés pour produire une poudre fine et homogène. Pour l'analyse du mercure à l'AMA 254 (pour les détails analytiques, voir l'**Annexe 3**), aucune préparation supplémentaire des échantillons n'est nécessaire. Pour l'analyse d'autres éléments métalliques et notamment celle du Cd, une mise en solution par minéralisation à l'acide est nécessaire avant passage des échantillons à l'ICP-OES (pour les détails de la méthode, voir l'**Annexe 3**). Enfin, pour l'analyse des isotopes stables du carbone et de l'azote par un analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse (pour les détails de la méthode, voir en **Annexe 3**), une délipidation préalable des échantillons a été réalisée, selon ce qui est recommandé dans la littérature pour éviter un effet des lipides sur la signature en ^{13}C (Post et al. 2007). En effet, les lipides sont particulièrement appauvris en ^{13}C par rapport aux autres constituants tissulaires (De Niro et Epstein 1977). Ils peuvent ainsi contraindre la comparaison des signatures isotopiques entre tissus et/ou espèces aux teneurs en lipides très différentes. Souvent, cette délipidation est effectuée avec un mélange chloroforme-méthanol ou dichlorométhane-méthanol. Néanmoins, ces méthodes sont encore discutées dans la littérature puisqu'elles impactent souvent les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ (Sotiropoulos et al. 2004, Murry et al. 2006, Post et al. 2007). Les solvants utilisés ne sont effectivement pas spécifiques aux lipides et peuvent ainsi également extraire des composés azotés (Radin 1981). Certains auteurs recommandent alors de passer un répliquat délipidé pour l'obtention de la signature en carbone de l'échantillon, et un répliquat non délipidé pour la signature en azote. Cela engendre une duplication des analyses qui ne nous semblait pas envisageable ici pour l'étude de réseaux trophiques dans leur ensemble (en termes de coût et de temps alloué à la préparation des échantillons). Au cours de la thèse, nous avons donc testé l'effet d'une délipidation au cyclohexane, solvant *a priori* moins agressif et moins toxique, sur les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ dans le muscle d'individus appartenant à différentes espèces et différents taxons (i.e., crustacés, mollusques et poissons). Cette étude fait précisément l'objet de l'**Annexe 2**.

Contrairement au mélange chloroforme-méthanol couramment utilisé, la délipidation au cyclohexane a révélé que ce solvant ne modifiait pas les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ des échantillons (Fig. III-5), qu'il s'agisse ainsi d'échantillons très gras à l'origine ($\text{C/N} > 4$ pour le répliquat non délipidé, ce qui est le cas de certains petits poissons pélagiques type sardines), ou non

gras à l'origine. En ce qui concerne les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$, l'expérience a montré un effet significatif de la délipidation au cyclohexane, ce qui est justement l'effet recherché lors de la délipidation d'échantillons (i.e., obtention d'échantillons présentant tous des teneurs basses en lipides et donc comparables entre eux). L'effet du cyclohexane sur les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ des échantillons très peu gras est ainsi apparu constant et prévisible, quel que soit l'espèce et/ou le taxon analysé (Fig. III-5). En revanche, l'effet du cyclohexane est apparu moins prévisible en ce qui concerne les échantillons très gras à l'origine. Cependant, le traitement est efficace puisqu'il permet, comme cela est recherché, d'abaisser le ratio C/N de ces échantillons très gras, et ainsi de réduire le biais lié à leur teneur importante en lipides sur leur valeur de $\delta^{13}\text{C}$. Il semble donc que la délipidation au cyclohexane pourrait n'être envisagée que sur les échantillons présentant un ratio C/N élevé avant délipidation (i.e. $C/N > 3,5$ selon Post et al. 2007), ce qui permet un gain de temps et de matériel important.

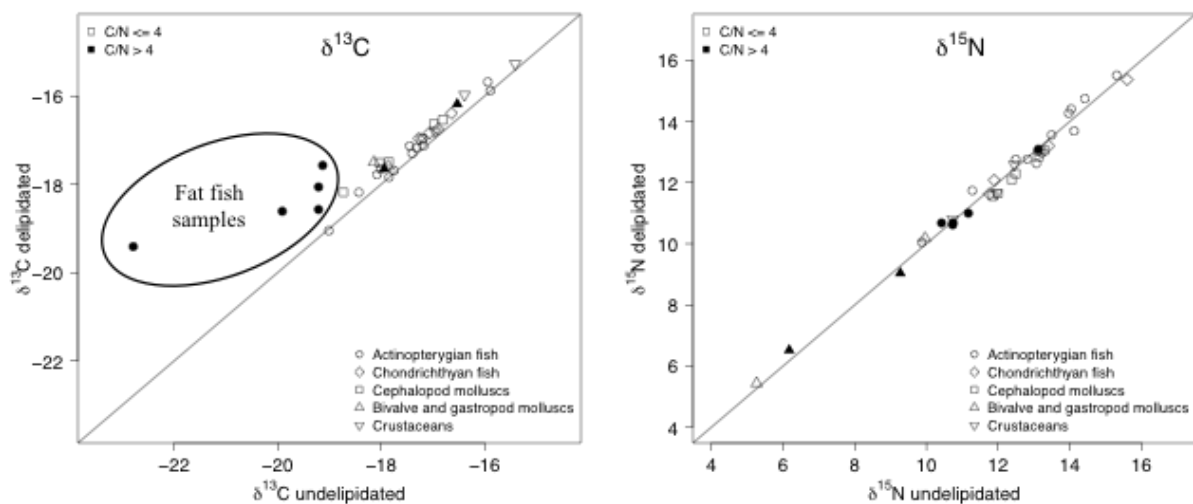


Figure III-5 : Relation entre les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ (en ‰) mesurées dans le muscle non délipidé et les valeurs mesurées dans le muscle délipidé chez plusieurs espèces et taxons du Golfe de Gascogne. Les échantillons particulièrement gras affectés par la délipidation au cyclohexane (i.e., petits poissons pélagiques type sardines, ayant un rapport C/N > 4 avant délipidation) sont entourés. Le détail des valeurs (valeurs de C/N notamment) se trouve en **Annexe 2**. Enfin, la droite de correspondance 1:1 est indiquée.

Cependant, Kojadinovic et al. (2008) ont montré un léger effet possible du cyclohexane sur les signatures en azote dans le muscle d'une espèce d'oiseaux marins, posant ainsi la question de l'effet d'une délipidation au cyclohexane sur les tissus d'homéothermes marins (i.e., oiseaux et mammifères marins). Ces taxons n'ont effectivement pas été inclus dans notre

expérience. Malgré nos tests préliminaires, et dans un souci d'harmonisation des procédures techniques tout au long de la thèse, nous avons donc finalement choisi d'appliquer **le même traitement à tous les échantillons** (i.e., délipidation au cyclohexane avant toute analyse isotopique), afin que les différents composants de nos réseaux trophiques restent *a priori* comparables entre eux (Murry et al. 2006). En effet, les méthodes de normalisation possible des données *a posteriori* qui sont proposées dans la littérature (Post et al. 2007), lorsque la délipidation n'a pas été réalisée, ne sont pas toujours applicables à tous les tissus et/ou taxons biologiques (Lesage et al. 2010).

Pour l'utilisation de traceurs écologiques en environnement marin, les expériences méthodologiques réalisées au cours de la thèse nous permettent de conclure que :

✓ **La congélation à -20°C des échantillons prélevés doit être favorisée**, même si une conservation dans l'éthanol à 70% est envisageable en cas d'impossibilité de congeler. Ceci doit cependant être confirmé pour les analyses métalliques en particulier.

✓ **La délipidation au cyclohexane pour l'analyse isotopique du carbone et de l'azote semble très bien appropriée pour l'extraction grossière des lipides des échantillons les plus gras**, affectant les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ des échantillons les moins gras de façon très prévisible, mais surtout **n'affectant pas les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ de l'ensemble des échantillons**.

Chapitre IV

FACTEURS DE VARIATIONS BIOLOGIQUES DES TRACEURS : VARIABILITE INTRA ET INTERSPECIFIQUE, ECHELLES DES INDIVIDUS ET DE L'ESPECE

Tout au long de ce chapitre et dans le reste du manuscrit, l'espace réservé aux résultats isotopiques sera souvent plus important, ces traceurs ayant été analysés chez un nombre plus conséquent d'organismes composant les différents réseaux trophiques de notre écosystème d'étude que les éléments traces.

IV.1 Un petit état des lieux des facteurs de variations biologiques possibles

Au cours de la thèse, un seul type de tissu a été analysé par traceur. Nous ne nous attarderons donc pas sur les mécanismes qui engendrent en soit une source de variation à ce niveau d'intégration biologique (i.e., le tissu), par ailleurs déjà évoqués dans le chapitre II du manuscrit tels que le routing isotopique dans le cas des isotopes stables du carbone et de l'azote (Gannes et al. 1998). Comme indiqué dans le titre, nous nous sommes donc attachés, dans un premier temps, à étudier **les sources possibles de variabilité pour les traceurs à l'échelle des individus et des espèces.**

Dans le cas des **isotopes stables du carbone et de l'azote, deux grandes catégories de facteurs** vont principalement influencer le fractionnement isotopique entre une source et son consommateur (Vanderklift et Ponsard 2003, Caut et al. 2009), et ainsi la signature finale du consommateur. La première catégorie comprend des facteurs liés au **métabolisme** des

organismes, au sens large du terme, c'est-à-dire, le métabolisme et la physiologie aux différents niveaux d'intégration biologique au-delà du tissu analysé. Ainsi la phylogénie, le sexe, le cycle reproducteur, ou encore les processus ontogéniques d'une façon générale (impliquant l'avancée en âge des individus, les changements de taille et de morphologie) peuvent conduire à des variations de la signature isotopique des consommateurs pour une même source consommée. À côté de cela, un stress nutritionnel ou un jeûne prolongé à certains moments du cycle de vie d'un organisme peuvent également résulter en une remobilisation de certaines protéines et modifier la signature isotopique d'un consommateur (e.g., Hobson et al. 1993). La seconde grande catégorie de facteurs influençant le fractionnement isotopique et/ou la signature d'un consommateur que nous considérerons est **l'exposition via la nourriture** assimilée par les organismes : le type et la qualité (source végétale ou animale, richesse relative en protéines, etc.), enfin également, la position trophique des proies (i.e., leur valeur en ratios isotopiques).

Cependant, ces deux grandes catégories de facteurs de variations (i.e., facteurs « métaboliques » et facteurs « d'exposition ») peuvent être étroitement liées. En effet, les différences de métabolisme sont généralement associées aux besoins énergétiques très différents des espèces et des individus au cours de leur cycle de vie, entraînant de ce fait un régime alimentaire différent. Il existerait ainsi un lien fort entre le métabolisme et le régime alimentaire des animaux, au-delà même de la phylogénie (Muñoz-Garcia et Williams 2005). Par exemple, même pour des espèces très proches taxinomiquement, les besoins énergétiques et ainsi les régimes alimentaires peuvent varier très fortement ; de fortes différences de régime alimentaire, liées aux besoins énergétiques, ont ainsi été mises en évidence entre le dauphin commun et le dauphin bleu et blanc (Spitz 2010).

Concernant le **Hg dans le muscle**, c'est principalement l'âge des individus qui va influencer les concentrations retrouvées dans ce tissu chez les organismes marins (Monteiro et Lopes 1990, Rossi et al. 1993, Cronin et al. 1998), ainsi que la position trophique des proies du fait de la bioamplification du Hg dans les réseaux trophiques (Eisler 1987, Cossa et al. 1990, Gray 2002). Puis, comme dans le cas du **Cd dans le foie ou la glande digestive**, et pour les métaux d'une façon générale, ce sont les mécanismes de régulation mis en place au cours de l'évolution qui vont jouer sur les concentrations métalliques finalement mesurées dans un organe, ou au sein d'une espèce. Ainsi, les mécanismes de détoxification vont conduire

schématiquement soit à l'excrétion du métal, soit à son stockage sous une forme qui en limite la toxicité potentielle (Rainbow 2002). Enfin, comme nous l'avons également déjà évoqué, la concentration dans le milieu abiotique (i.e., eau de mer) et/ou biotique (i.e., nourriture), mais aussi la forme physico-chimique du métal en présence (déterminant sa biodisponibilité) vont jouer un rôle crucial. Chez les organismes supérieurs, **le métabolisme** (âge, régulation du métal, dilution *via* la croissance, etc.) **et l'exposition**, par l'environnement abiotique mais surtout ***via* la nourriture** et/ou le niveau trophique des proies (concentrations et biodisponibilité des métaux), apparaissent donc également comme **deux grandes catégories de facteurs qui influencent les concentrations en métaux** retrouvées chez les individus d'une même espèce, et entre les différentes espèces.

Au cours de la thèse, il nous semblait donc primordial d'étudier **l'influence du métabolisme et du régime alimentaire sur les différents traceurs écologiques** choisis (i.e., isotopiques et métalliques), pour certaines espèces représentatives de l'écosystème Golfe de Gascogne en question, et en considérant des espèces dont l'écologie trophique est *a priori* différente. Nous avons abordé cette question par une approche s'intéressant tout d'abord à la **variabilité intraspécifique** des signatures isotopiques et des concentrations métalliques *via* les changements ontogéniques au sein de quelques espèces. Puis, nous avons considéré la **variabilité interspécifique** de ces traceurs, par la comparaison d'espèces physiologiquement différentes, aux stratégies alimentaires et/ou à la plasticité trophique différente(s). En d'autres termes, nous souhaitons répondre à la question suivante : **les isotopes stables et les éléments traces choisis (Hg et Cd) reflètent-ils bien la nourriture assimilée par les individus et les espèces ? Et cela, malgré une différence de métabolisme** entre individus d'une espèce ou entre espèces, pouvant également impacter la signature isotopique finale et les concentrations en métaux retrouvées chez les consommateurs ?

IV.2 Quelles informations sont apportées par la variabilité intraspécifique et les changements ontogéniques ?

Cette question est traitée de façon plus détaillée dans les **Annexes 3** (article publié) et **4** (article en préparation) de ce manuscrit. Depuis la publication de l'**Annexe 3** en particulier,

des analyses complémentaires ont été réalisées, et l'ensemble des données a finalement été inclus dans des modèles additifs généralisés (« *Generalized Additive Models* » ou GAMs en anglais). Les GAMs permettent effectivement de prendre également en compte les facteurs environnementaux (cet aspect est traité dans le chapitre suivant) en plus de la variation ontogénique. La façon dont ces GAMs ont été réalisés est détaillée en **Annexe 4** ; ce sont donc ces nouveaux résultats qui sont repris ici pour la synthèse. Ces résultats restent cependant en accord avec ceux publiés en **Annexe 3**. Les « smoothers » obtenus lors d'une modélisation par GAMs présentent en fait l'avantage, par rapport aux nuages de points plus classiques tels que ceux présentés en **Annexe 3**, de pouvoir visualiser l'effet d'une variable continue (i.e., ici la taille des individus) sur la variable à expliquer (i.e., les valeurs du traceur testé), une fois l'effet des autres variables explicatives incluses dans le modèle pris en compte (e.g., la zone d'échantillonnage). Le tableau IV-1 synthétise le nombre d'individus et les espèces ayant été analysées pour l'effet de l'ontogénèse sur les différents traceurs potentiels.

Tableau 2 : Espèces de céphalopodes et de poissons échantillonnées pour l'étude de l'effet de l'ontogénèse sur les différents traceurs potentiels. IS = isotopes stables du carbone et de l'azote.

Ordre	Famille	Espèce	Habitat	N	Tailles en mm ^a (min-max)	Analyses effectuées		
						IS	Hg	Cd
Céphalopodes (Annexe 3)								
Teuthida	Loliginidae	<i>Loligo vulgaris</i>	côte/plateau benthopélagique	46	72 - 302	X	X	X
		<i>Loligo forbesi</i>	plateau/talus benthopélagique	62	39 - 490	X	X	X
Sepida	Sepiidae	<i>Sepia officinalis</i>	côte/plateau benthopélagique	51	48 - 264	X	X	X
Poissons (Annexe 4)								
Gadiformes	Gadidae	<i>Merlangius merlangus</i>	côte/plateau benthopélagique	47	80 - 480	X	X	—
	Merlucciidae	<i>Merluccius merluccius</i>	plateau/talus benthopélagique	90	65 - 720	X	X	—
Perciformes	Carangidae	<i>Trachurus trachurus</i>	côte/plateau pélagique	87	80 - 410	X	X	—
Lophiiformes	Lophiidae	<i>Lophius piscatorius</i>	plateau/talus benthopélagique	61	80 - 1020	X	X	—

^a Longueur du manteau pour les céphalopodes, longueur totale pour les poissons.

IV.2.1 Cas des isotopes stables du carbone et de l'azote dans le muscle (céphalopodes et poissons)

Chez les céphalopodes comme chez les poissons, les **isotopes stables du carbone et de l'azote** sont apparus comme étant de bons traceurs de l'alimentation des organismes tout au long de l'ontogénèse, par comparaison avec des résultats publiés d'analyse de contenus stomacaux pour les différentes espèces, et ce malgré une influence possible du métabolisme. En effet, même pour deux espèces très proches taxinomiquement (e.g., les deux encornets commun *Loligo vulgaris* et veiné *L. forbesi*), les profils des valeurs isotopiques en fonction de la taille peuvent être très différents (Fig. IV-1 A), malgré une physiologie sans doute très proche comme cela a été montré pour la physiologie digestive (Boucher-Rodoni et Boucaud-Camou 1987). Ces résultats suggèrent que ces deux espèces présentent des **stratégies alimentaires différentes** au cours de l'ontogénèse. Cependant, l'augmentation linéaire apparente du niveau trophique des individus avec la taille, chez *L. forbesi*, doit être relativisée par un effet du sexe : l'espèce présentant un fort dimorphisme sexuel, les individus aux tailles et aux valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ les plus importantes sont en fait tous des mâles (l'effet sexe ne peut être inclus dans les modèles, à cause de sa covariation avec la taille liée au dimorphisme sexuel).

À l'inverse des *Loligo*, certaines espèces très éloignées taxinomiquement et en termes de guildes trophiques telles que le chinchard *Trachurus trachurus* et la baudroie *Lophius piscatorius* peuvent présenter des profils de valeurs isotopiques très similaires au cours de l'ontogénèse, les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ atteignant une sorte de plateau à partir d'une certaine taille (Fig. IV-1 B). Cette stabilité des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ à un stade donné de l'espèce (à l'atteinte de la maturité sexuelle par exemple) pourrait correspondre à une certaine spécialisation de l'espèce sur un type de proies, malgré une croissance/un gain de biomasse continu. Enfin, d'autres espèces comme le merlan *Merlangius merlangus* ou le merlu *Merluccius merluccius* présentent des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ qui augmentent continuellement avec la taille des individus (Fig. IV-1 B), ce qui suggère une évolution du type de proies recherchées tout au long de l'ontogénèse.

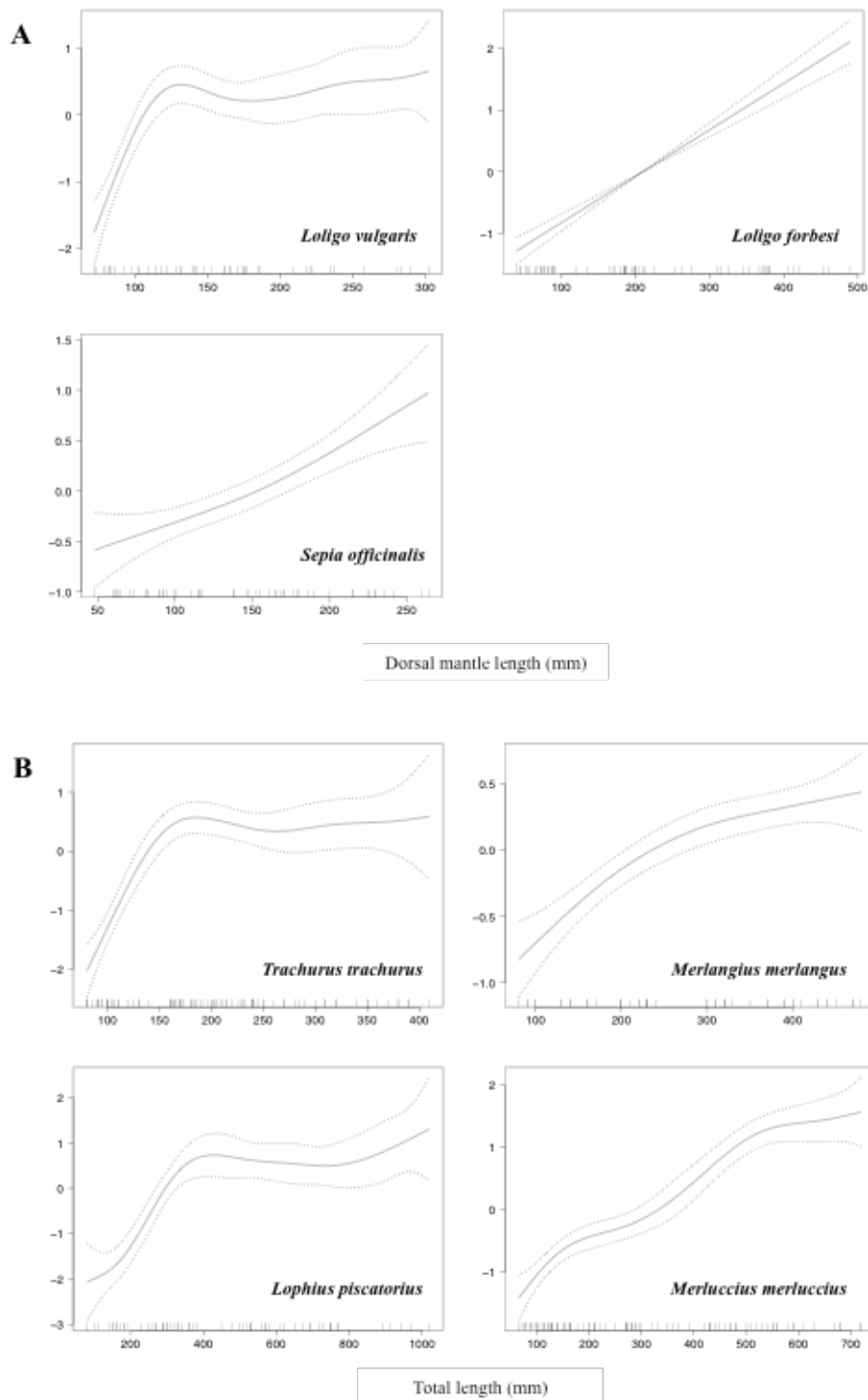


Figure IV-1 : Smoothers issus des GAMs effectués pour **A)** 3 espèces de céphalopodes (*Loligo vulgaris*, *L. forbesi*, *Sepia officinalis*) et **B)** 4 espèces de poissons osseux (*Trachurus trachurus*, *Merlangius merlangus*, *Lophius piscatorius*, *Merluccius merluccius*), modélisant l'effet de la taille des individus (longueur du manteau pour les céphalopodes, longueur totale pour les poissons) sur les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ dans le muscle, une fois l'effet des autres variables explicatives potentielles pris en compte par le modèle (i.e., strate/profondeur d'échantillonnage, zone d'échantillonnage - nord vs. sud du Golfe -, année d'échantillonnage ; les détails de ces catégories sont donnés en **Annexe 4** concernant les poissons). L'axe des ordonnées correspond à la contribution du smoother à la fonction prédictive (en unités arbitraires). Les lignes en pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95% du smoother.

IV.2.2 Cas des concentrations en Hg dans le muscle (céphalopodes et poissons)

Par comparaison avec les signatures isotopiques qui font apparaître différentes stratégies alimentaires, les schémas spécifiques obtenus pour les concentrations en Hg dans le muscle des individus au cours de l'ontogénèse se révèlent plus uniformes. Qu'il s'agisse des céphalopodes (Fig. IV-2 A) ou des poissons (Fig. IV-2 B), les concentrations de Hg augmentent continuellement avec la taille des individus, même si la tendance est plus linéaire pour certaines espèces (e.g., *Sepia officinalis*, *Merluccius merluccius*) que pour d'autres (e.g., *L. forbesi*, *Trachurus trachurus*, *Merlangius merlangus*). Chez ces dernières espèces, l'atteinte d'une sorte de plateau avant une réaugmentation des concentrations de Hg dans le muscle pourrait suggérer un changement de niveau trophique à ce stade de l'ontogénèse. Néanmoins, lorsque les concentrations de Hg dans le muscle sont modélisées en fonction des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ (i.e., *a priori* proxy de la position trophique) au sein de chaque espèce, la part de variabilité expliquée est alors toujours moins importante que dans le cas d'une modélisation des concentrations en fonction de la taille (le détail de l'analyse statistique, avec la part de variabilité des concentrations en Hg expliquée par chaque modèle se trouve en **Annexe 4**). Cela tendrait à confirmer que **l'âge (*a priori* reflété par la taille des individus) reste un facteur déterminant pour l'accumulation du Hg chez les organismes marins** (e.g., Monteiro et Lopes 1990, Rossi et al. 1993, Cronin et al. 1998). Néanmoins, les concentrations de Hg dans le muscle restent liées dans une certaine mesure au niveau trophique des organismes, comme par exemple chez *L. vulgaris*. Cette espèce présente effectivement des valeurs plus élevées et un plateau chez les individus adultes de niveau trophique *a priori* plus élevé, par rapport aux individus de stade juvénile (Fig. IV-2 A).

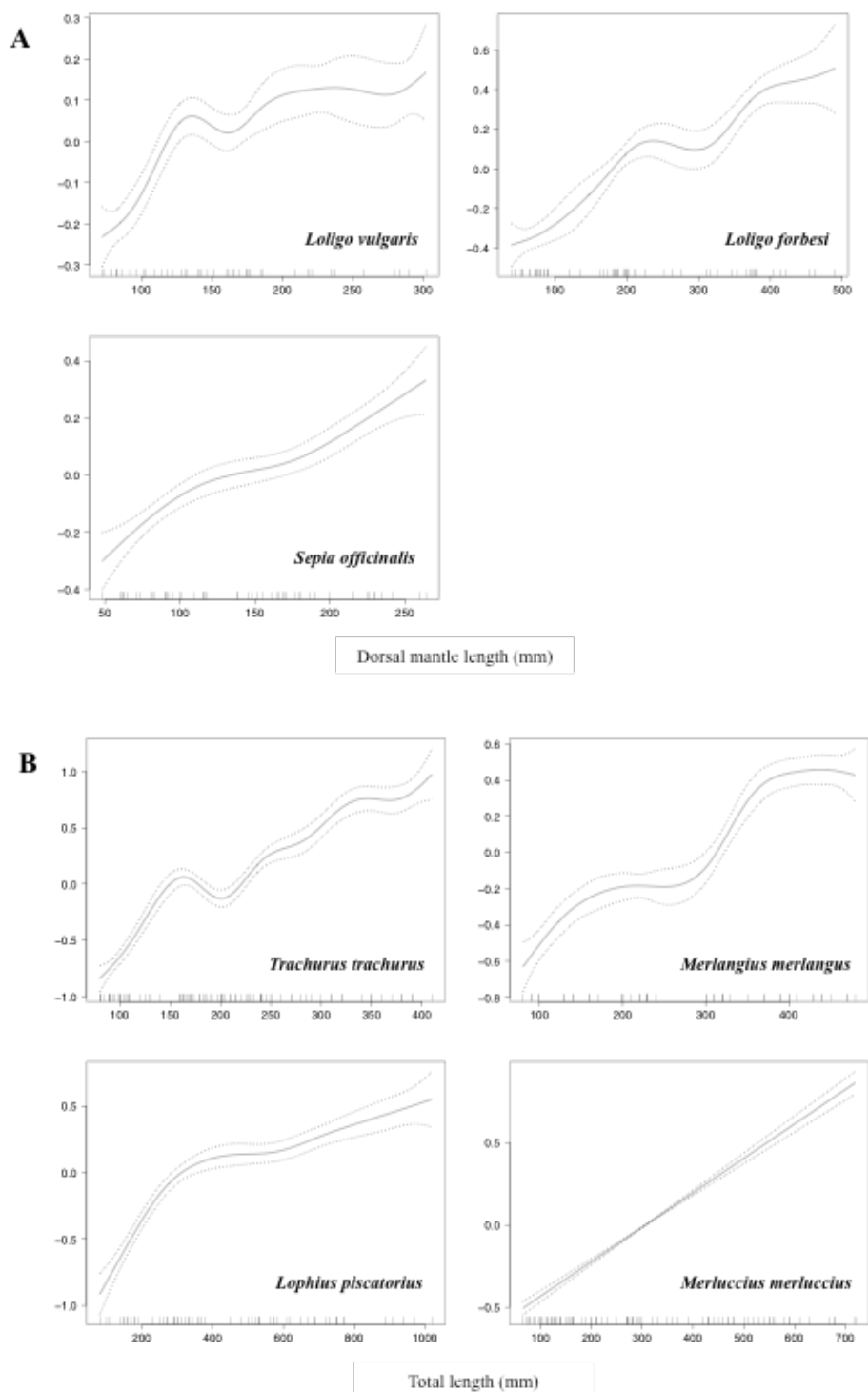


Figure IV-2 : Smoothers issus des GAMs effectués pour **A)** 3 espèces de céphalopodes (*Loligo vulgaris*, *L. forbesi*, *Sepia officinalis*) et **B)** 4 espèces de poissons osseux (*Trachurus trachurus*, *Merlangius merlangus*, *Lophius piscatorius*, *Merluccius merluccius*), modélisant l'effet de la taille des individus (longueur du manteau pour les céphalopodes et longueur totale pour les poissons) sur les concentrations de Hg dans le muscle (données en log), une fois l'effet des autres variables explicatives potentielles pris en compte par le modèle (i.e., strate/profondeur d'échantillonnage, zone d'échantillonnage - nord vs. sud du Golfe -, année d'échantillonnage ; les détails de ces catégories sont donnés en **Annexe 4** concernant les poissons). L'axe des ordonnées correspond à la contribution du smoother à la fonction prédictrice (en unités arbitraires). Les lignes en pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95% du smoother.

IV.2.3 Cas des concentrations en Cd dans la glande digestive (céphalopodes)

L'effet de l'ontogénèse sur les concentrations de Cd n'a été exploré que chez les céphalopodes (**Annexe 3**), principalement parce que ceux-ci bioaccumulent fortement ce métal alors que les poissons montrent généralement de faibles concentrations dans les environnements non pollués. Les trois espèces de céphalopodes étudiées montrent ainsi des **schémas différents des concentrations de Cd dans la glande digestive en fonction de la taille des individus**. Alors que les grands individus des deux espèces de *Loligo* ont des concentrations de Cd dans la glande digestive qui diminuent avec l'accroissement en taille, la seiche montre une très légère tendance à l'augmentation de ces concentrations avec la taille des individus (Fig. IV-3). Ces résultats sont en accord avec la littérature (Miramand et al. 2006, Pierce et al. 2008), et **s'expliqueraient ainsi davantage par la biologie et/ou la physiologie des individus et des espèces, que par des différences et/ou des changements de régime alimentaire au cours de l'ontogénèse**. Dans le cas des *Loligo*, les concentrations de Cd qui décroissent avec la taille seraient effectivement liées à une dilution du métal accumulé du fait de la croissance très rapide de ces espèces (Pierce et al. 2008). Alors que chez la seiche, les cellules de la glande digestive contiennent des structures appelées « boules » qui seraient impliquées dans la bioaccumulation de ce métal (Bustamante et al. 2002a, Miramand et al. 2006), ces « boules » sont inexistantes chez les Loliginidae (Boucaud-Camou et Yim 1980, Boucher-Rodoni et Boucaud-Camou 1987). Ces structures pourraient favoriser le stockage à long terme du Cd chez les individus de cette espèce (Miramand et al. 2006), le Cd ayant par ailleurs une demi-vie relativement longue chez la seiche (> 250 jours) suivant son incorporation par la nourriture (Bustamante et al. 2002b).

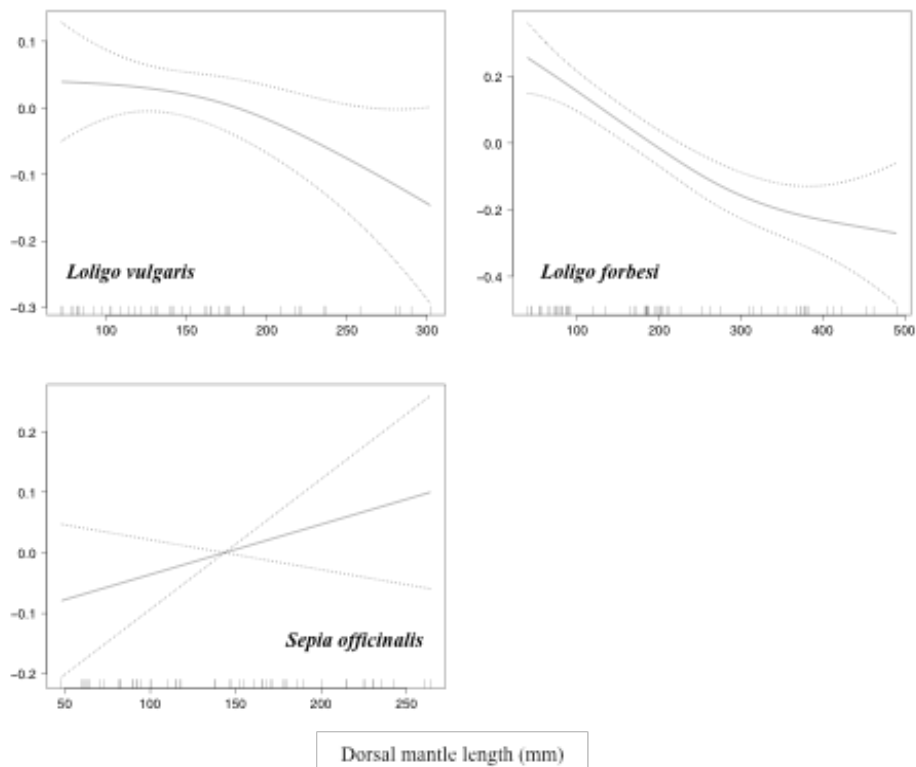


Figure IV-3 : Smoothers issus des GAMs effectués pour 3 espèces de céphalopodes (*Loligo vulgaris*, *L. forbesi*, *Sepia officinalis*), modélisant l'effet de la taille des individus (longueur du manteau) sur les concentrations de Cd dans la glande digestive, une fois l'effet des autres variables explicatives potentielles pris en compte par le modèle (i.e., strate/profondeur d'échantillonnage, zone d'échantillonnage - nord vs. sud du Golfe -, année d'échantillonnage ; les détails de ces catégories sont donnés en **Annexe 4** concernant les poissons). L'axe des ordonnées correspond à la contribution du smoother à la fonction prédictive (en unités arbitraires). Les lignes en pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95% du smoother.

IV.3 Quelles informations sont apportées par la variabilité interspécifique ?

Comme nous venons de le voir, l'étude de la variabilité intraspécifique chez quelques espèces de poissons et de céphalopodes nous apporte quelques réponses quant aux préférences alimentaires des individus d'une espèce au cours de l'ontogénèse, telles que reflétées par les différents traceurs potentiels. Ainsi, les isotopes stables révèlent qu'il existe différentes stratégies alimentaires à l'échelle spécifique au cours de l'ontogénèse. La variabilité intraspécifique montrée par les différents traceurs permet d'aborder la question de l'**écologie trophique générale de différentes espèces vue sous l'angle des traceurs**, question que nous allons davantage détailler dans cette partie en s'intéressant à la variabilité interspécifique et à deux cas d'étude, les céphalopodes et les cétacés.

IV.3.1 Exemple des céphalopodes : hétérothermes marins de niveau trophique *a priori* intermédiaire

Deux autres espèces de céphalopodes (le toutenon commun *Todarodes sagittatus*, espèce pélagique de la zone plateau/talus, et l'élédone commune *Eledone cirrhosa*, espèce benthique du plateau), présentant une moindre variabilité de tailles disponibles, ont été comparées aux trois espèces de la partie précédente (i.e., *L. vulgaris*, *L. forbesi* et *S. officinalis*). Comme évoqué plus haut, des individus supplémentaires ont été analysés en isotopes, Hg et Cd depuis la publication de l'**Annexe 3**. Ces nouveaux résultats ont confirmé ceux obtenus précédemment. Lorsque l'ensemble des individus est analysé en Analyse Composante Principale (ACP), il apparaît ainsi que **les différentes espèces se discriminent le mieux sur l'axe 1, c'est-à-dire à partir des valeurs isotopiques dans le muscle**, suivies, dans une moindre mesure, des concentrations de Cd dans la glande digestive (Fig. IV-4). Néanmoins, on ne peut pas exclure un effet important de l'habitat des individus (i.e., profondeur d'échantillonnage des différentes espèces sur l'axe 1 de l'ACP), ni de la zone échantillonnée, sur la valeur des différents traceurs (i.e., regroupement des individus pêchés au nord du Golfe vs. sud du Golfe, sur l'axe 1 principalement). Ces facteurs de variations possibles, considérés comme "environnementaux", sont ainsi explorés plus en détail dans le chapitre suivant. D'autre part, la discrimination par le Cd est peut-être, encore ici, davantage liée à la physiologie des espèces qu'à leur zone d'alimentation, *T. sagittatus*, *E. cirrhosa* et *S. officinalis* possédant les structures appelées « boules » dans les cellules de la glande digestive que n'ont pas les deux espèces de *Loligo* (Mangold et Bidder 1989). Enfin, cet exemple sur cinq espèces de céphalopodes souligne de nouveau la **faible capacité du Hg dans le muscle à discriminer les espèces d'après leur régime alimentaire**, celui-ci discriminant davantage les stades ontogéniques (i.e., juvéniles vs. mâles et femelles) sur l'axe 2 de l'ACP (Fig. IV-4).

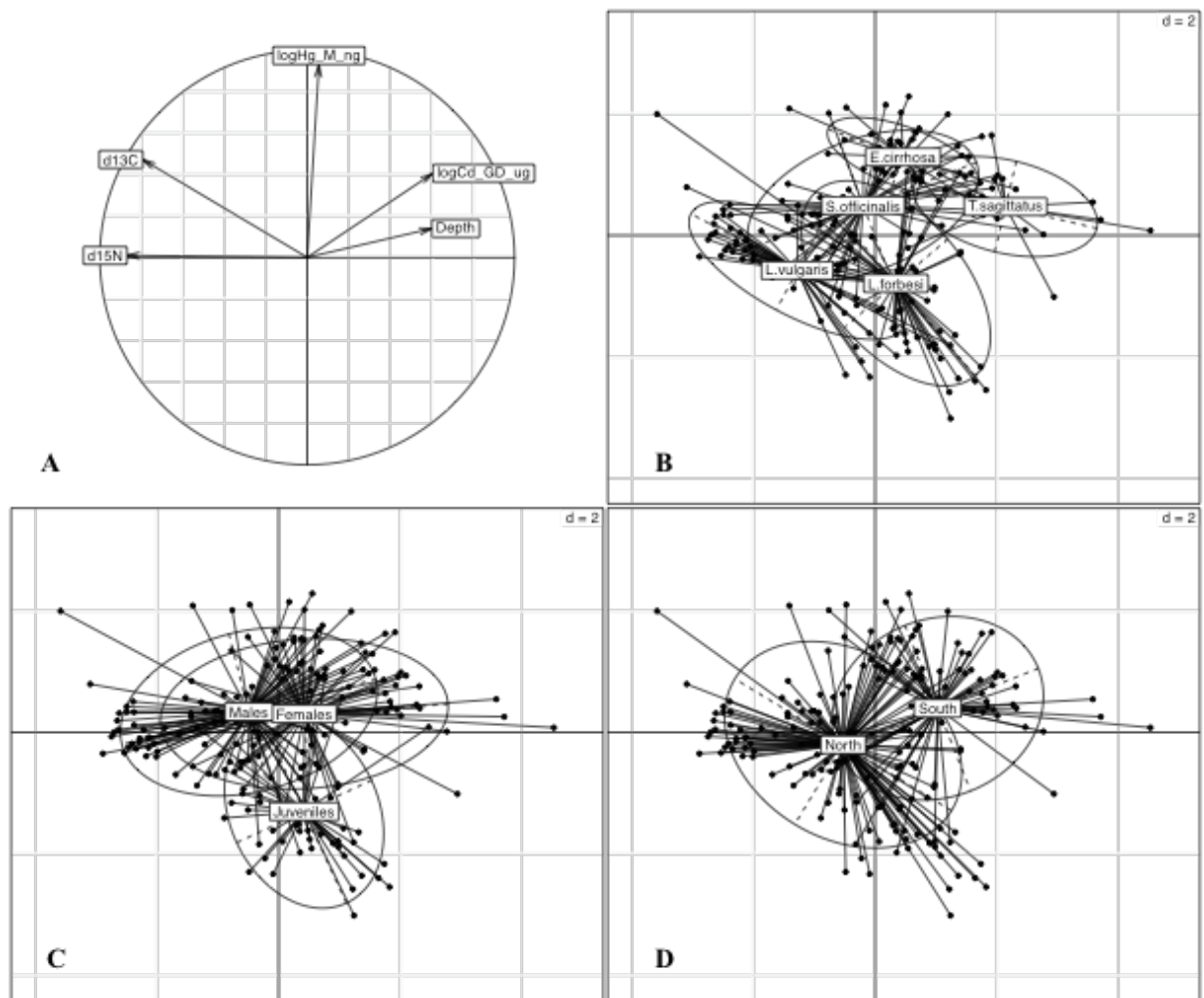


Figure IV-4 : Projection des individus et des variables (profondeur sous le bateau lors de l'échantillonnage ; $\delta^{13}\text{C}$; $\delta^{15}\text{N}$; Hg dans le muscle et Cd dans la glande digestive, valeurs en log) sur les 2 premières composantes de l'Analyse en Composante Principale (ACP) réalisée chez 5 espèces de céphalopodes du Golfe de Gascogne (*Loligo vulgaris*, *L. forbesi*, *Sepia officinalis*, *Todarodes sagittatus*, *Eledone cirrhosa*). Axe horizontal : composante 1 (valeur propre = 2,1 ; c'est-à-dire, 42% de la variabilité expliquée par l'axe 1) ; axe vertical : composante 2 (valeur propre = 1,3 ; c'est-à-dire, 26% de la variabilité expliquée par l'axe 2). **A)** Projection des variables sur le plan de l'ACP constitué par les 2 premiers axes. Les variables pointant dans la même direction sont positivement corrélées. Les variables pointant dans la direction opposée sont négativement corrélées. Les variables avec un angle de 90° ont un coefficient de corrélation proche de 0. **B)** Regroupement des individus par espèce. **C)** Regroupement des individus par stade ontogénique et/ou sexe (les détails sur ce point spécifique sont donnés en **Annexe 3**). **D)** Regroupement des individus par zone d'échantillonnage, c'est-à-dire, nord vs. sud du Golfe.

IV.3.2 Exemple des cétacés: homéothermes marins de niveau trophique *a priori* supérieur

Au cours de la thèse, seuls les traceurs isotopiques ont été considérés pour estimer le reflet de l'alimentation par les traceurs, malgré une influence de métabolisme possible, chez les cétacés.

Chez les mammifères marins en général, le muscle est un tissu qui peut être utilisé pour comparer les performances physiologiques de différentes espèces (par exemple en termes de stockage de l'oxygène pour les plongées ; Kooyman et Ponganis 1998, Noren et Williams 2000), ou encore leurs niveaux d'activité et leurs « coûts d'existence » (Spitz 2010). La composition du tissu musculaire détermine effectivement l'activité de locomotion générale d'un organisme. Dans un premier temps, nous avons donc comparé la différence de fractionnement (*via* les différences de signature isotopique) entre le foie et le muscle de différentes espèces de cétacés du Golfe de Gascogne (Fig. IV-5 A), soit entre deux tissus aux propriétés biochimiques et au taux de renouvellement différent. Ceci nous permettait de mettre en évidence, en partie, **la part du facteur métabolisme dans les variations de signatures isotopiques obtenues dans le muscle des différentes espèces**, en faisant l'hypothèse suivante que les variations dues à des changements de régime alimentaire entre le court terme (foie) et le moyen terme (muscle) sont négligeables, et l'effet du métabolisme important, si certains groupes d'espèces au métabolisme *a priori* proche montrent un schéma de différence semblable entre le foie et le muscle. Pour cela, les espèces ont donc été regroupées en trois grands groupes, selon leur métabolisme et leur physiologie *a priori* différents, notamment liés à la phylogénie, à la taille, et aux capacités de plongée des différentes espèces pour leur recherche de nourriture (Noren et Williams 2000, Tyack et al. 2006, Ponganis 2011) : mysticètes/grandes baleines à fanons *vs.* odontocètes grands plongeurs type baleines à becs, *vs.* odontocètes de surface type petits delphinidés et phocoenidés. Dans un second temps, les signatures isotopiques en carbone et en azote dans le muscle des différentes espèces ont finalement été comparées entre elles (Fig. IV-5 B), et reliées à des données de régime alimentaire publiées issues de l'analyse de contenus stomacaux. Ceci nous a permis d'estimer **la valeur des ratios isotopiques comme traceurs de l'alimentation des différentes espèces, et ce malgré la différence de métabolisme possible.**

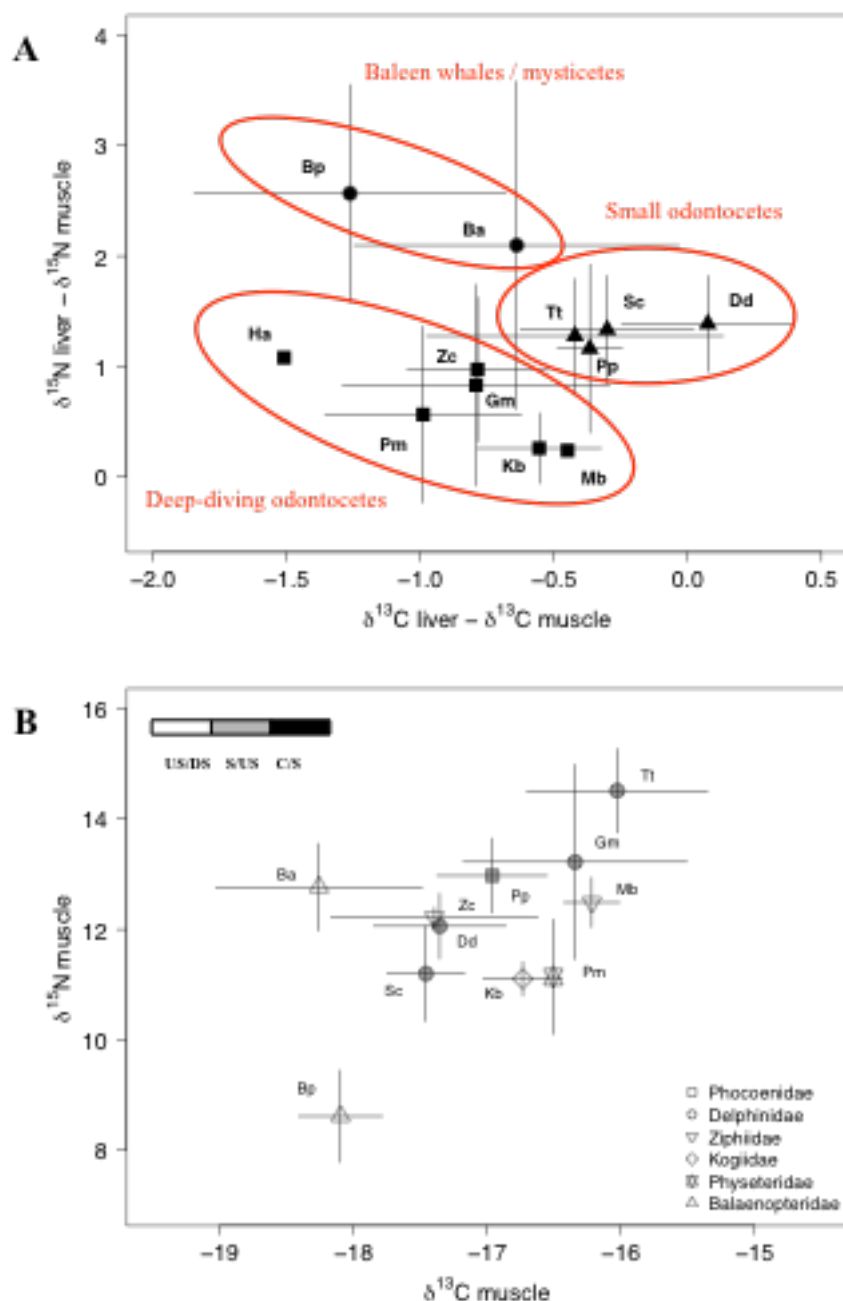


Figure IV-5 : **A)** Différence de signatures isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$; moyennes \pm écart-type) entre le foie et le muscle de plusieurs espèces de cétacés du Golfe de Gascogne, regroupées en 3 grands groupes de métabolisme et/ou physiologie *a priori* proches (voir texte). **B)** Signatures isotopiques dans le muscle de plusieurs espèces de cétacés du Golfe de Gascogne ; les individus et la figure sont issus de l'Annexe 5, l'échelle ayant été réadaptée par rapport à l'article. Bp = *Balaenoptera physalus* ; Ba = *Balaenoptera acutorostrata* ; Ha = *Hyperoodon ampullatus* ; Pm = *Physeter macrocephalus* ; Zc = *Ziphius cavirostris* ; Gm = *Globicephala melas* ; Kb = *Kogia breviceps* ; Mb = *Mesoplodon bidens* ; Tt = *Tursiops truncatus* ; Pp = *Phocoena phocoena* ; Sc = *Stenella coeruleoalba* ; Dd = *Delphinus delphis*. C/S = Coastal/Shelf ; S/US = Shelf/Upper Slope ; US/DS = Upper Slope/Deep Sea (classification utilisée pour l'Annexe 5).

L'effet "groupe de cétacés" (i.e., métabolisme) s'est révélé être significatif pour la différence de composition isotopique entre le foie et le muscle des différentes espèces analysées, carbone et azote considérés ensemble (MANOVA, test de Wilks, $p < 0.0001$). Les grands cétacés à fanons présentent ainsi des différences de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ relativement importantes entre le foie et le muscle ; les odontocètes grands plongeurs présentent également une différence de $\delta^{13}\text{C}$ relativement importante entre le foie et le muscle, mais une différence de $\delta^{15}\text{N}$ moins importante que les mysticètes ; enfin, les petits odontocètes montrent une différence faible en $\delta^{13}\text{C}$ entre foie et muscle par rapport aux deux autres groupes, et une différence en $\delta^{15}\text{N}$ proche de celle des grands plongeurs (Fig. IV-5 A). **La différence de métabolisme expliquerait donc en partie les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ relativement élevées dans le muscle de certaines espèces d'odontocètes grands plongeurs** (e.g., *Kogia breviceps*, *Mesoplodon bidens*, *Physeter macrocephalus* ; Fig. IV-5 B). On aurait effectivement pu s'attendre à des valeurs plus faibles, étant donné l'habitat et/ou zone d'alimentation océaniques généralement décrits pour ces espèces (la comparaison avec d'autres taxons est présentée dans le chapitre suivant et l'Annexe 5). Ceci étant, en regardant plus finement à l'échelle des espèces et au-delà de ce regroupement en trois grandes catégories de cétacés, il semble que **la qualité de la nourriture assimilée par les différentes espèces intervient également pour expliquer les schémas de différences de signatures isotopiques** entre le foie et le muscle obtenus pour les différentes espèces. En effet, par exemple, le petit rorqual *Balaenoptera acutorostrata* apparaît tout de même très proche des petits odontocètes (Fig. IV-5 A). Or, son alimentation serait finalement très similaire à celle des petits odontocètes tels que le marsouin commun *Phocoena phocoena*, le grand dauphin *Tursiops truncatus* ou le dauphin bleu et blanc *Stenella coeruleoalba* dans le Golfe de Gascogne, par opposition notamment avec l'alimentation du rorqual commun *B. physalus* qui se nourrit de krill et qui est pourtant plus proche taxinomiquement de *B. acutorostrata* (Spitz 2010). Un autre exemple est celui du dauphin commun *Delphinus delphis*, qui s'écarte ainsi quelque peu des trois autres espèces de petits odontocètes analysées, et avec lesquelles il était *a priori* regroupé sur la base de la phylogénie et de la taille (Fig. IV-5 A). Ce petit cétacé présente en fait le régime alimentaire le plus énergétique dans le Golfe de Gascogne, régime par ailleurs associé à des « coûts d'existence » plus élevés chez cette espèce (Spitz 2010). Ainsi, **malgré une différence de métabolisme et de physiologie indéniable entre les espèces et les différents types de cétacés, les isotopes stables du carbone et de l'azote dans le muscle peuvent constituer dans une certaine mesure des signatures pertinentes de la nourriture assimilée par les mammifères marins.** Lorsque les signatures en $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ dans le muscle des différentes espèces sont analysées

(Fig. IV-5 B, issue de l'**Annexe 5**), elles sont effectivement en accord avec les données de régime alimentaire et de zone d'alimentation issues de l'analyse des contenus stomacaux, et disponibles dans la littérature pour des individus provenant du Golfe de Gascogne (Spitz et al. 2006ab, 2011). Ainsi, par exemple, le mésoplodon de Sowerby (*Mesoplodon bidens*), qui se nourrit en grande partie de poissons néritiques du Golfe (Spitz et al. 2011), présente des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et de $\delta^{15}\text{N}$ plus élevées que les autres odontocètes grands plongeurs (e.g., *Ziphius cavirostris*, *Physeter macrocephalus* ou *Kogia breviceps*). Ceux-ci se nourrissent effectivement quasiment exclusivement de céphalopodes océaniques du Golfe d'après l'analyse des contenus stomacaux (Spitz et al. 2011).

IV.4 Isotopes ou métaux, faut-il choisir ?

Quel que soit le type d'organisme testé au cours de la thèse concernant l'impact des facteurs biologiques sur les traceurs potentiels, nous avons ainsi mis en évidence une **variabilité intra et interspécifique des valeurs liées au métabolisme et à la nourriture assimilée par les individus et les espèces, ces deux facteurs évoluant d'ailleurs souvent conjointement.**

Dans une optique d'utilisation de traceurs écologiques des préférences alimentaires, les **isotopes stables du carbone et de l'azote se sont révélés être de meilleurs traceurs du régime alimentaire et/ou de la zone d'alimentation** des individus au cours de l'ontogénèse, et des différentes espèces, que les éléments traces Hg et Cd, **chez les organismes hétérothermes de niveau trophique intermédiaires testés dans le Golfe de Gascogne.** En effet, pour les concentrations de Hg mesurées dans le muscle (céphalopodes et poissons), et celles de Cd mesurées dans la glande digestive (céphalopodes), la variation liée au métabolisme des organismes au sens large (e.g., l'âge des individus, les mécanismes de régulation du métal chez les différentes espèces, etc.) reste difficile à distinguer de celle liée aux préférences alimentaires, surtout à partir des seules données dont nous disposons (données *in situ*). Plus d'études expérimentales seraient nécessaires pour cela, et/ou plus de données sur les concentrations en métaux (notamment Cd) et leur forme physico-chimique, dans les différentes proies potentielles de ces espèces et provenant des différents environnements considérés (e.g., crustacés benthiques néritiques et profonds, petits poissons pélagiques néritiques et océaniques). **Chez les organismes homéothermes testés**

uniquement en isotopie (i.e., cétacés), les isotopes stables du carbone et de l'azote sont également apparus comme de bons traceurs du régime alimentaire et/ou de la zone d'alimentation des différentes espèces, malgré un effet du métabolisme, qui doit ainsi être pris en considération lors de l'interprétation de données isotopiques.

Ces résultats ont donc eu des conséquences importantes pour la suite de l'utilisation de ces différents traceurs écologiques dans le cadre de la thèse. En effet, les isotopes stables du carbone et de l'azote ont toujours été considérés comme traceurs écologiques pour l'étude des relations trophiques dans le Golfe de Gascogne (i.e., dans les **Annexes 6, 7 et 8**), et ont aussi été utilisés pour : 1) étudier l'accumulation du Hg et/ou du Cd en fonction des variations de régime alimentaire au cours de l'ontogénèse (i.e., analyse des concentrations en métaux en fonction des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$, au lieu de la taille des individus ; **Annexes 3 et 4**) ; 2) décrire le comportement du Hg dans les réseaux trophiques du Golfe de Gascogne (**Annexe 9**). Le Cd en particulier n'a donc plus été considéré dans la suite de l'étude, notamment par manque de résultats analytiques pour différentes espèces représentatives des différents environnements, et des différents compartiments trophiques dans le Golfe de Gascogne (autres que les céphalopodes).

√ Au sein d'une espèce, les **variations ontogéniques** (liées à des différences d'âge, de métabolisme, et/ou de régime alimentaire entre individus, etc.) affectent les valeurs des traceurs isotopiques et métalliques (Hg, Cd) mesurés dans les tissus biologiques. **Pour des comparaisons interspécifiques, des individus au même stade de vie (i.e., même classe d'âge environ) doivent donc être considérés pour chaque espèce.**

√ Malgré un **effet du métabolisme et de la physiologie** des différentes espèces à comparer, les **isotopes stables du carbone et de l'azote** mesurés dans le tissu musculaire apparaissent comme de **bons traceurs du régime alimentaire et/ou de la zone d'alimentation** (voire comme de meilleurs traceurs que les éléments traces), en ce qui concerne les espèces prélevées dans le Golfe de Gascogne pour les objectifs de la thèse.

√ Enfin, les analyses statistiques et les modélisations par GAMs réalisées pour tester l'impact des facteurs biologiques sur les différents traceurs, et notamment sur les traceurs isotopiques, ont suggéré l'effet de facteurs de variations plutôt environnementaux également, liés à la zone d'échantillonnage des individus et des espèces dans le Golfe de Gascogne. Cela nous amène donc à poser la question suivante : **quelle est l'importance des facteurs environnementaux par rapport aux facteurs biologiques dans la variabilité des signatures isotopiques des organismes provenant du Golfe de Gascogne ?** Cette question fait précisément l'objet du chapitre V suivant.

Chapitre V

FACTEURS DE VARIATIONS ENVIRONNEMENTAUX DES TRACEURS : VARIABILITE SPATIO-TEMPORELLE, ECHELLES DES RESEAUX TROPHIQUES ET DE L'ECOSYSTEME

Suite aux résultats du chapitre précédent, et comme évoqué en conclusion de ce dernier chapitre, la variabilité spatio-temporelle des traceurs écologiques potentiels n'a été explorée que pour les traceurs isotopiques.

V.1 Un petit rappel des spécificités du Golfe de Gascogne

Le Golfe de Gascogne est une grande baie ouverte sur l'Atlantique Nord-Est dont le plateau continental, dans la partie française, est très large au nord et très étroit au sud (Fig. V-1 A), et incrémenté de nombreux canyons au niveau du talus. La structure hydrologique sur le plateau continental (i.e., température, salinité, densité, sels nutritifs/nutriments, soit les principaux paramètres conditionnant les productions primaire et secondaire) est largement influencée par les conditions climatiques générales, et les panaches de deux principaux fleuves, la Loire au nord et la Gironde au sud (Fig. V-1 B). Le débit annuel moyen de ces deux fleuves est d'environ $900 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (Lazure et Jégou 1998). L'évolution des panaches fluviaux est directement liée aux variations des débits et des régimes de vent. En hiver et au printemps, périodes auxquelles le débit des fleuves est le plus important, ainsi que d'une année sur l'autre, l'évolution des panaches fluviaux est différente (Lazure et Jégou 1998). **La structure hydrologique sur le plateau continental varie donc fortement spatio-**

temporellement (Planque et al. 2004, Puillat et al. 2004, Loyer et al. 2006). Cependant, au printemps, saison à laquelle de nombreuses espèces marines se reproduisent, et à laquelle les conditions hydrologiques vont directement déterminer les zones de ponte et/ou impacter la survie des œufs et des larves (Mion et al. 1998, Bellier et al. 2007), plusieurs paysages hydrologiques caractérisent le Golfe de Gascogne (Fig. V-II B ; Planque et al. 2004). Malgré une extension spatiale qui peut varier assez largement, l'existence de ces différentes zones hydrologiques dans le Golfe est constante d'années en années (Planque et al. 2004). D'autre part, les courants de pente existant aux abords du talus continental (Koutsikopoulos et Le Cann 1996), et la génération d'ondes internes sur le bord du talus en période de thermocline établie et de vives eaux peut provoquer la remontée d'eaux profondes ou upwellings (Mazé 1987). À ces endroits, la production primaire est alors favorisée, du fait de l'enrichissement en nutriments (Lampert 2001). Cela a par ailleurs été décrit un peu plus au nord de la zone, au niveau du talus de l'ouest des îles britanniques (Holligan et Groom 1986). L'occurrence d'upwellings localisés en périodes de vents favorables est également connue dans le Golfe de Gascogne, au niveau de la côte des Landes notamment (Koutsikopoulos et Le Cann 1996), et parfois même au sud de la Bretagne (Puillat et al. 2004, 2006).

D'un point de vue biologique, ce n'est qu'assez récemment que l'occurrence de **blooms phytoplanctoniques hivernaux**, au niveau de l'estuaire de la Gironde et de ses eaux marines adjacentes, a été mise en évidence dans le Golfe de Gascogne (Herbland et al. 1998, Labry et al. 2001). Ces blooms hivernaux ont ensuite également été décrits au niveau de l'estuaire de la Loire et de ses eaux adjacentes (Gohin et al. 2003). À cette période de l'année (fin d'hiver), la stratification haline est effectivement importante et permet une bonne pénétration de la lumière dans la couche de surface, ce qui favorise le développement du phytoplancton (Labry et al. 2001, Lampert et al. 2002, Gohin et al. 2003).

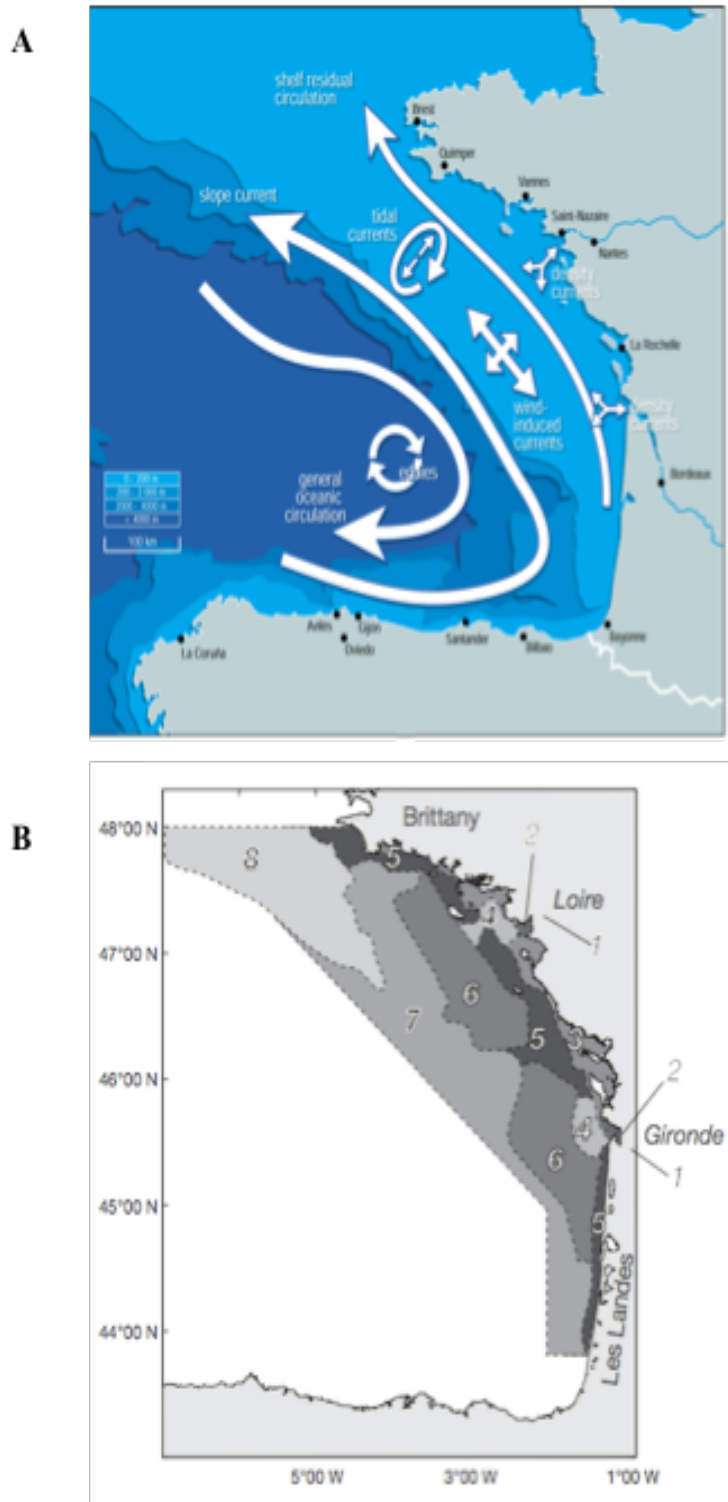


Figure V-1 : **A)** Schéma général de la circulation des masses d'eau et des principaux courants dans le Golfe de Gascogne : (1) circulation océanique générale ; (2) tourbillons ; (3) courants de pente ; (4) circulation résiduelle de plateau ; (5) courants de marée ; (6) courants induits par les vents ; (7) courants de densité (tiré de Koutsikopoulos et Le Cann 1996). **B)** Distribution spatiale des 8 zones hydrologiques caractérisant le Golfe de Gascogne au printemps : (1) amont d'estuaire ; (2) aval d'estuaire ; (3) zones côtières ; (4) panaches fluviaux ; (5) zones proches de la côte ; (6) plateau central ; (7) plateau ouvert ; (8) plateau nord-ouest (tiré de Planque et al. 2004).

Ces blooms hivernaux ont la caractéristique de blooms printaniers ayant normalement lieu en milieu tempéré, dans le sens où ce sont de larges diatomées qui se développent. Suite à ces blooms hivernaux, le phosphore (un des éléments nécessaires à la production primaire avec l'azote) devient limitant pour les blooms printaniers, pendant lesquels la production nouvelle va alors s'établir à partir de la consommation de nitrate provenant des eaux fluviales, ou de sources d'azote et de phosphore régénérées (Herbland et al. 1998, Labry et al. 2001). Cette production primaire nouvelle est ainsi dominée par de petites cellules autotrophes dont se nourrit le microzooplancton (Sautour et al. 2000), les diatomées hivernales n'étant par ailleurs pas bien consommées par ce microzooplancton (Marquis 2007). Le microzooplancton est à son tour consommé par le mésozooplancton au printemps, période à laquelle les flux microbiens sont aussi très importants (Marquis 2007), notamment liés aux processus de régénération de la matière organique qui ont lieu à cette période et qui perdurent en été (Loyer et al. 2006).

Dans l'ensemble, le Golfe de Gascogne apparaît donc comme un écosystème fortement contrasté, d'un point de vue hydrologique notamment, ce qui favorise sûrement la grande diversité biologique qui le caractérise (OSPAR 2010). Au vu de ces éléments, plusieurs questionnements scientifiques émergent : **Quel impact peut-on attendre de ces variations environnementales sur les signatures isotopiques des organismes fréquentant les différents environnements du Golfe de Gascogne ? À niveau trophique *a priori* similaire dans les différents environnements, les signatures seront-elles comparables ? Quels sont les principaux facteurs environnementaux qui vont ainsi influencer spatio-temporellement les signatures isotopiques ?** Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons considéré un grand nombre de taxons et d'espèces composant les différents réseaux trophiques du Golfe de Gascogne, depuis les consommateurs primaires jusqu'aux prédateurs supérieurs (e.g., des mollusques bivalves aux mammifères marins). En effet, les consommateurs primaires (et supérieurs) sont *a priori* mieux appropriés pour refléter des variations sur le moyen à long-terme, à l'échelle d'un écosystème, lissant quelque peu les variations à très court terme qui affectent les producteurs primaires et la matière organique particulière en général (Cabana et Rasmussen 1996, Vander Zanden et Rasmussen 1999, Post 2002a).

V.2 Une variabilité spatiale des signatures isotopiques incontestable

V.2.1 Mise en évidence d'un gradient côte-large, et de différences entre les systèmes nord-sud et benthique-pélagique

L'étude de la variabilité spatiale des signatures fait précisément l'objet de l'**Annexe 5**. **Un gradient côte-large des signatures s'est révélé significatif à tous les niveaux d'intégration biologique envisagés dans cette thèse**, c'est-à-dire, depuis l'échelle de l'espèce jusqu'à l'échelle des réseaux trophiques du Golfe de Gascogne, en passant par l'échelle de grands taxons et/ou de groupes d'espèces de niveaux trophiques *a priori* similaires (les détails de ces regroupements sont présentés en **Annexe 5** et dans la Fig. V-2 ci-après). Ainsi, sur l'axe horizontal de la distribution des organismes prélevés dans le Golfe (i.e., de la côte vers le large), **les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ décroissent des organismes du domaine néritique à ceux du domaine océanique.**

Par exemple, des différences très nettes apparaissent entre des espèces de la même guildes trophique, c'est-à-dire les petits poissons pélagiques et plutôt planctonophages. Les espèces très côtières telles que le lançon commun *Hyperoplus lanceolatus* ou le prêtre *Atherina presbyter* présentent ainsi des valeurs moyennes d'environ -16,4 et -16,5‰ en $\delta^{13}\text{C}$, et de 14,3 et 14,8‰ en $\delta^{15}\text{N}$, respectivement, alors que les petits planctonophages mésopélagiques tels que le cassigné nu *Xenodermichthys copei* ou le lanternule-gueulu crocodile *Lampanyctus crocodilus* présentent des valeurs moyennes d'environ -19,1 et -18,5‰ en $\delta^{13}\text{C}$, et de 9,2 et 10,6‰ en $\delta^{15}\text{N}$, respectivement. Au sein d'une même espèce, les individus de coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (bivalve filtreur) ou ceux du gastéropode *Scaphander lignarius* (brouleur) prélevés à la côte ou sur le plateau présentent également des signatures plus élevées en $\delta^{13}\text{C}$ (de 2,4‰ en moyenne) et en $\delta^{15}\text{N}$ (de 4‰ en moyenne) que les individus de ces mêmes espèces prélevés sur le talus (le détail des valeurs se trouve dans le Tableau 1 de l'**Annexe 5**).

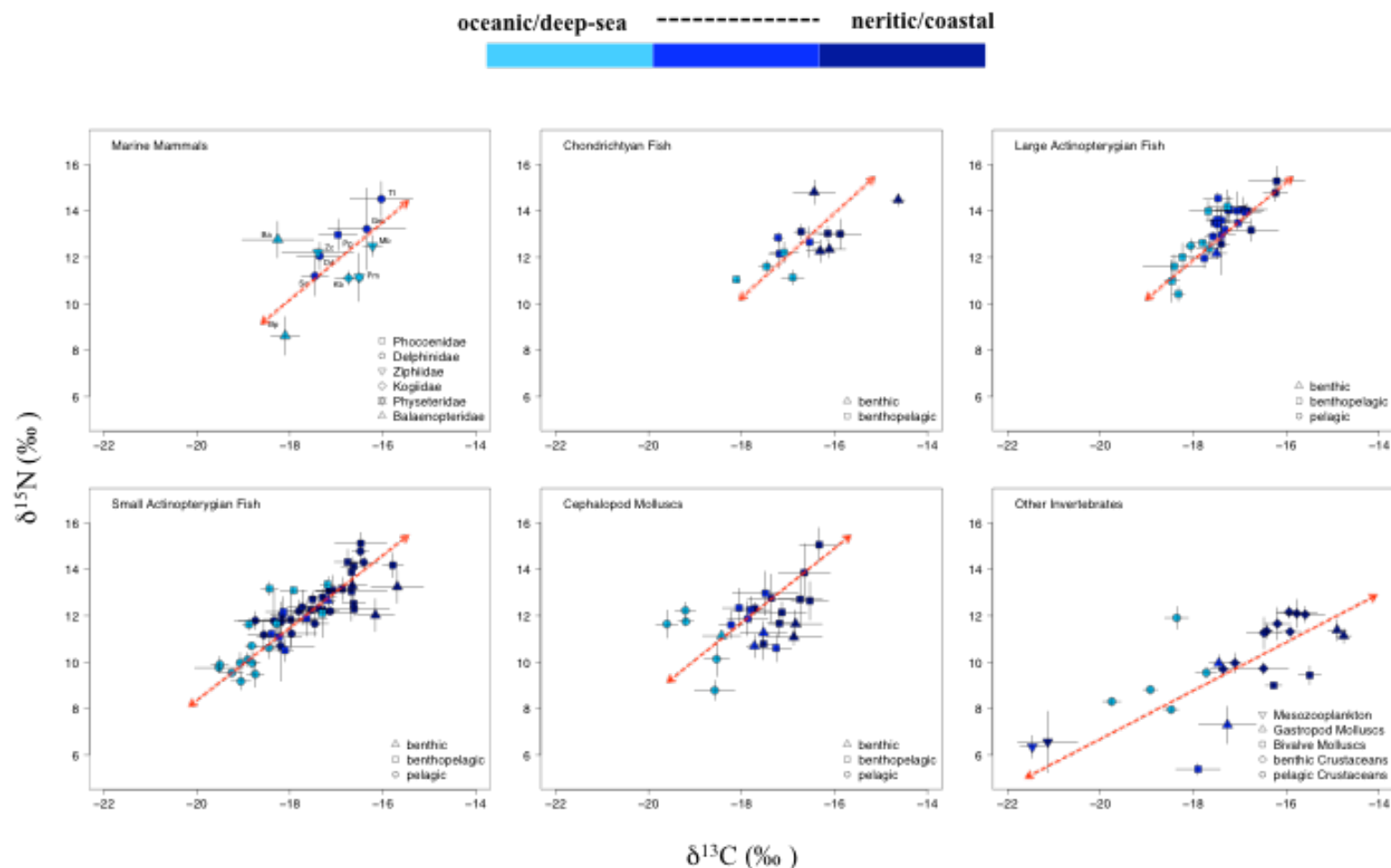


Figure V-2 : Signatures isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$; moyennes \pm écart-type) dans le muscle (sauf mésozooplancton, analysé en entier) de plusieurs espèces et taxons du Golfe de Gascogne ; les individus/les espèces sont issus de l'**Annexe 5**. Mammifères marins : Bp = *Balaenoptera physalus* ; Ba = *Balaenoptera acutorostrata* ; Ha = *Hyperoodon ampullatus* ; Pm = *Physeter macrocephalus* ; Zc = *Ziphius cavirostris* ; Gm = *Globicephala melas* ; Kb = *Kogia breviceps* ; Mb = *Mesoplodon bidens* ; Tt = *Tursiops truncatus* ; Pp = *Phocoena phocoena* ; Sc = *Stenella coeruleoalba* ; Dd = *Delphinus delphis*. La même échelle a été appliquée pour faciliter la lecture et les comparaisons entre groupes. Le gradient de couleurs discrimine les espèces néritiques à océaniques, selon des données de distribution et/ou de régime alimentaire issues de la littérature (le détail de tous les regroupements est présenté en **Annexe 5**). Les flèches rouges en pointillés symbolisent l'étendue de la variabilité des données au sein de chaque groupe (voir texte).

Par ailleurs, toujours à l'échelle spécifique, une différence entre les individus pêchés au nord (sous influence de la Loire) et les individus pêchés au sud (sous influence de la Gironde) a également été révélée (moins importante cependant que dans le cas du gradient côte-large). En effet, cette différence nord-sud n'est significative que chez les espèces très côtières telles que l'encornet commun *Loligo vulgaris* ou la grande vive *Trachinus draco* (le détail des analyses statistiques se trouve dans le Tableau 2 de l'**Annexe 5**). Dans le Golfe de Gascogne, on observe ainsi toujours un **enrichissement en $\delta^{13}\text{C}$ (de 0,5‰ en moyenne) et en $\delta^{15}\text{N}$ (1,2‰ en moyenne) des individus prélevés près de la côte nord par rapport à ceux de la côte sud** : la latitude 46°N environ séparent donc deux zones, pour les espèces côtières, ces zones correspondant en fait aux zones VIIa et VIIb du CIEM.

Enfin, une variabilité spatiale des signatures est également apparue entre organismes benthiques et pélagiques, mais uniquement pour les organismes de niveaux trophiques faibles, et bien sûr sur la base d'une comparaison d'espèces provenant de la même zone sur l'axe horizontal de la distribution (i.e., sur le gradient côte-large). Ainsi **les consommateurs dépendants du benthos présentent généralement des signatures plus enrichies en $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ que les organismes dépendants du pélagos** (différents exemples sont présentés en **Annexe 5**).

V.2.2 Processus à l'origine de ces variations spatiales, et des variations en $\delta^{15}\text{N}$ en particulier

D'une façon générale, en environnement marin, les microalgues benthiques et macroalgues côtières sont souvent enrichies en ^{13}C et/ou en ^{15}N par rapport au phytoplancton (France 1995, Riera et Richard 1996, Riera et al. 2009). Cette différence se transmet ensuite dans les réseaux trophiques soutenus par ces différents producteurs primaires. Cet enrichissement est généralement lié à une fixation distincte des différents isotopes par les différents autotrophes, mais aussi, parfois, à l'enrichissement en ^{15}N du milieu benthique et/ou côtier par des apports azotés d'origine anthropique, et charriés par les fleuves (e.g., McClelland et al. 1997, Riera et al. 2000). Enfin, le dépôt sur le fond de matière organique particulièrement enrichie, et/ou le comportement nécrophage de certains organismes benthiques, peuvent également être à l'origine de valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ plus élevées chez les organismes dépendant des réseaux trophiques benthiques.

Cependant, dans les deux premiers cas de variations étudiés dans la partie précédente (i.e., gradient côte-large et différence nord-sud), et en considérant des organismes comparables (i.e., même guildes trophique ou individus d'une même espèce), **les différences en $\delta^{15}\text{N}$ sont généralement apparues plus importantes que les différences en $\delta^{13}\text{C}$** . Cela remet ainsi en question l'utilisation possible des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ "brutes", et surtout l'utilisation d'une ligne de base unique, pour le calcul des niveaux trophiques à partir des signatures isotopiques dans les réseaux trophiques du Golfe de Gascogne et en environnement marin ouvert en général. De plus, cela suggère que les variations en $\delta^{15}\text{N}$ "brutes" seraient également, voire davantage, indicatrices de l'habitat et/ou de la zone d'alimentation que les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ (e.g., Ménard et al. 2007), alors que ce sont généralement ces dernières valeurs qui sont utilisées à ces fins.

Plutôt que des changements dans la structure trophique et/ou des différences d'habitudes alimentaires des espèces entre les différents habitats, **ces différences en $\delta^{15}\text{N}$ seraient en fait davantage liées à des processus opérant au niveau du pool d'azote inorganique dissous disponible pour la production primaire** (sur ce sujet, voir la courte synthèse de Sherwood et Rose 2005, ou encore celle plus complète de Montoya 2007). Nous allons ainsi davantage détailler ici quelques-uns de ces processus susceptibles d'entrer en jeu dans le Golfe de Gascogne, par rapport à l'**Annexe 5**.

À l'exception de certains procaryotes (i.e., les diazotrophes) capables de fixer l'azote atmosphérique (N_2), la plupart des autotrophes marins sont incapables d'utiliser le N_2 comme substrat pour leur croissance, et utilisent alors les autres formes d'azote disponibles dans l'environnement marin (i.e., NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+) (Fig. V-3). Cependant, l'ion nitrate NO_3^- , présent en grandes concentrations dans les eaux profondes situées sous la thermocline et la pycnocline, est généralement considéré comme la source d'azote dominante supportant la production primaire dans les eaux océaniques (Montoya 2007).

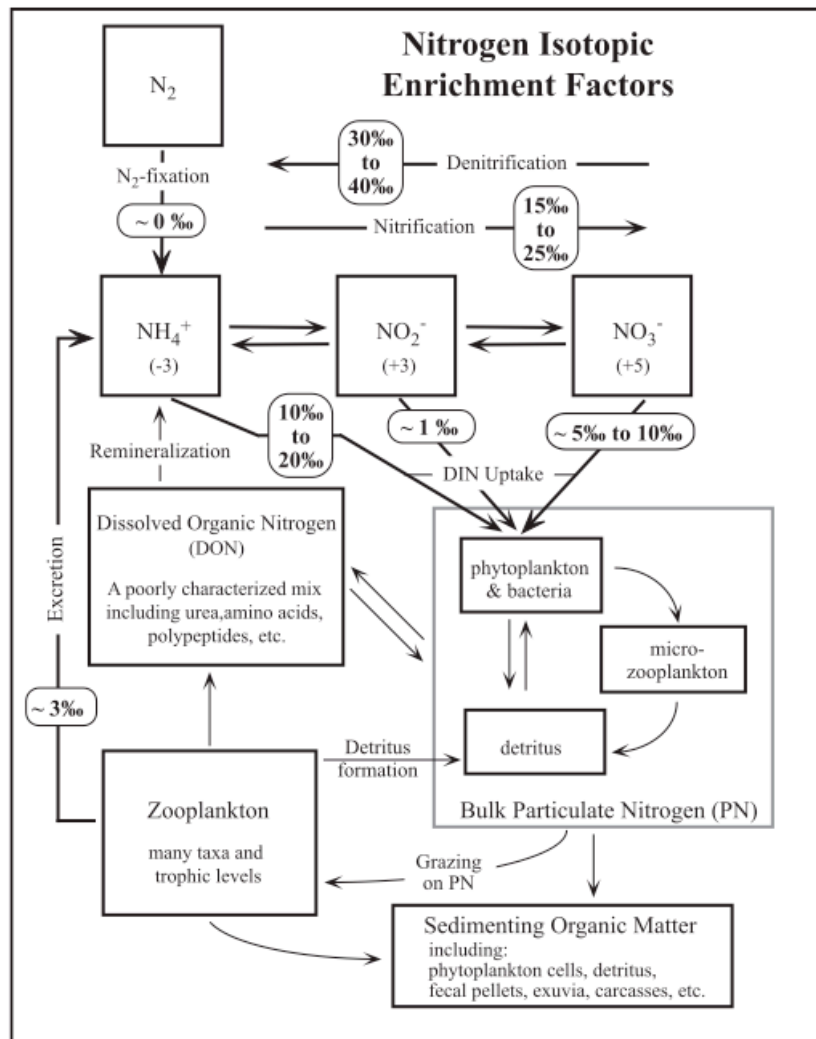


Figure V-3 : Schéma général du cycle de l'azote en environnement marin et ordre de grandeur du fractionnement isotopique associé aux différentes réactions. Chaque boîte représente un pool fonctionnel majeur de l'azote dans l'océan. Certains composants importants des pools hétérogènes sont listés en dessous du nom du pool, comme l'est l'état d'oxydation des formes d'azote inorganique dissous. Les flèches représentent les transformations biologiques majeures de l'azote. Les valeurs typiques du facteur d'enrichissement isotopique (ϵ) sont données pour les réactions ayant été caractérisées isotopiquement et disponibles dans la littérature (tiré de Montoya 2007).

La composition isotopique du pool de NO_3^- disponible va ainsi être affectée par différents processus, dont la fixation de N_2 par certains autotrophes (suivie ou non d'une nitrification ; Fig. V-3) et la dénitrification par des bactéries :

1) Ayant généralement lieu dans les eaux oligotrophes, la fixation du N_2 par certains organismes dits diazotrophes, et ainsi capables de réduire et d'assimiler le N_2 en biomasse, produit de la matière organique appauvrie en ^{15}N par rapport au NO_3^- des eaux profondes. Cette matière organique finira par être reminéralisée en NH_4^+ , lequel pourra subir une

nitrification en NO_3^- dont la signature sera donc appauvrie en ^{15}N (Fig. V-3). Dans les eaux oligotrophes, **la fixation de N_2 par des diazotrophes contribue ainsi à abaisser la signature en $\delta^{15}\text{N}$ du NO_3^- en présence**, alors que celui-ci s'ajoute au pool océanique d'azote inorganique dissous disponible pour les autres autotrophes ;

2) A l'inverse, en environnement pélagique profond, la **dénitrification** (Fig. V-3) consommant seulement une partie du pool de NO_3^- disponible discrimine fortement à l'encontre du ^{15}N (i.e., consommation préférentielle de l'isotope léger ^{14}N) ; ce qui, au fur et à mesure, **résulte en un enrichissement significatif en ^{15}N du NO_3^- résiduel** (i.e., restant disponible pour la production primaire) ;

3) En zone euphotique, **en période de bloom phytoplanctonique**, le phytoplancton exerce également une discrimination à l'encontre du ^{15}N lors de l'absorption de NO_3^- pour sa croissance ; ce qui conduit, comme dans le cas de la dénitrification, à une **augmentation de la valeur en $\delta^{15}\text{N}$ du NO_3^- résiduel**. Suite à ce bloom, la matière organique produite à partir de du NO_3^- résiduel aura donc des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ plus élevées également (Fig. V-4), et la **"perturbation isotopique" ainsi associée à une période de bloom peut se propager dans le(s) réseau(x) trophique(s)** (Fig. V-4 ; Montoya 2007).

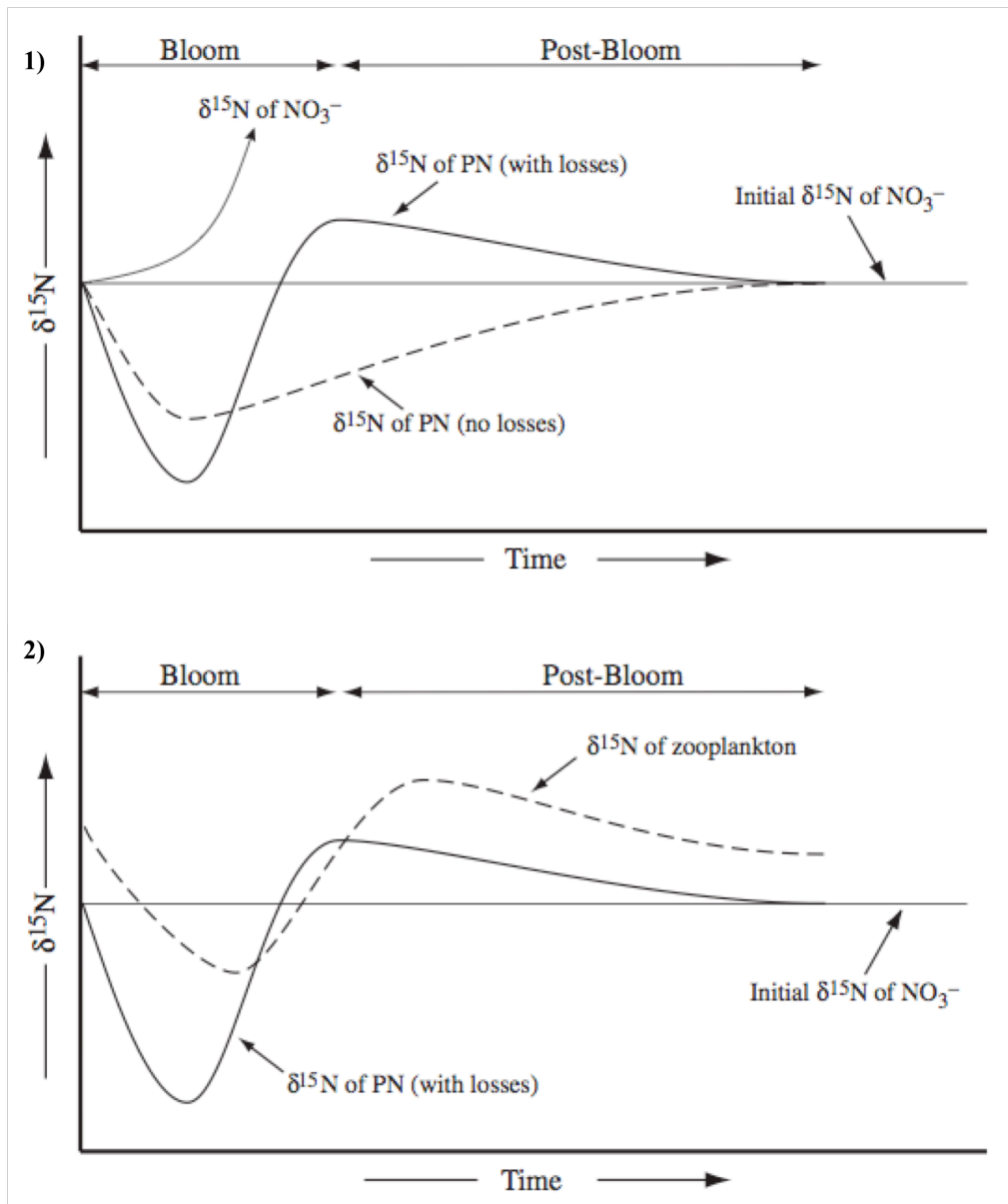


Figure V-4 : Schéma montrant l'impact d'un bloom sur la valeur de $\delta^{15}\text{N}$ des particules en suspension (PN) et du zooplancton. **1)** Les processus biologiques peuvent créer un schéma de variation du $\delta^{15}\text{N}$ différent avec le temps, alors que le pool initial de substrat (ici NO_3^-) est consommé. Au début du bloom, le fractionnement isotopique pendant l'absorption de NO_3^- par le phytoplancton produit des PN avec une faible valeur de $\delta^{15}\text{N}$. Lorsque le bloom progresse, la valeur de $\delta^{15}\text{N}$ du NO_3^- résiduel augmente, conduisant à son tour à une augmentation de la valeur de $\delta^{15}\text{N}$ des PN formés. Si le bloom est rapide, avec peu de matériel perdu par sédimentation ou par broutage, la valeur de $\delta^{15}\text{N}$ des PN va converger vers la valeur de $\delta^{15}\text{N}$ du pool initial de NO_3^- disponible pour supporter la croissance phytoplanctonique (ligne en pointillés). Si des pertes significatives ont lieu par sédimentation ou par broutage la valeur de $\delta^{15}\text{N}$ des PN peut dépasser la valeur de $\delta^{15}\text{N}$ du pool initial de NO_3^- (ligne pleine). **2)** La perturbation isotopique associée à un bloom peut se propager dans le réseau trophique. La valeur de $\delta^{15}\text{N}$ du zooplancton changeant moins vite que celle des PN, l'ampleur de la perturbation isotopique va décroître avec la position trophique des organismes, et le schéma temporel de variation en $\delta^{15}\text{N}$ peut être compensé par celui des PN (tiré de Montoya 2007).

Ces processus et cet impact des blooms ayant lieu en environnement marin ouvert, sont donc susceptibles d'avoir lieu dans le Golfe de Gascogne (e.g., blooms hivernaux puis printaniers), et sont finalement à l'origine des grands schémas suivants (Wu et al. 1997, Sherwood et Rose 2005) :

- lorsque la demande en azote inorganique dissous devient supérieure à l'approvisionnement (e.g., **après un bloom** ayant consommé en grande partie le stock de nutriments disponibles), **les producteurs primaires restants ou suivants disposent alors d'une source d'azote enrichie en ^{15}N** (i.e., NO_3^- résiduel enrichi, ou bien source d'azote recyclée, d'autant plus enrichie si elle vient des niveaux trophiques plus élevés). **Cet enrichissement se répercute et peut perdurer dans le(s) réseau(x) trophique(s)** (notamment chez les consommateurs benthiques, du fait du dépôt des particules sur le fond) ;

- au contraire, **dans les zones d'upwellings** par exemple où de "nouveaux" nutriments sont apportés, l'approvisionnement est plus important que la demande en azote inorganique dissous par les autotrophes, et cela favorise la **disponibilité d'une source d'azote appauvrie en ^{15}N (en tout cas non enrichie comme précédemment) pour les producteurs primaires.**

Enfin, bien que la matière organique terrestre (i.e., débris de végétaux terrestres) éventuellement apportée par les fleuves soit généralement appauvrie en ^{15}N par rapport à la matière organique marine, **les fleuves peuvent également être un vecteur important de matière organique très enrichie en ^{15}N du fait des rejets d'eaux usées qu'ils charrient**, siège d'une forte activité microbienne (Fry 1988, Hansson et al. 1997, McClelland et al. 1997, Riera et al. 2000, Vizzini et Mazzola 2006, Montoya 2007). Ceci est d'autant plus vrai si la population humaine autour de ces fleuves est importante (Cabana et Rasmussen 1996).

Tous ces éléments (différence entre producteurs primaires, impacts des blooms, upwellings, apports fluviaux, régénération de matière organique et/ou activité microbienne importante, etc.) contribuent donc à expliquer les variations spatiales des signatures isotopiques en $\delta^{13}\text{C}$, mais surtout en $\delta^{15}\text{N}$ retrouvées dans le Golfe de Gascogne, étant donné notamment ses caractéristiques hydrologiques décrites en début de chapitre. **L'influence des panaches fluviaux apparaît donc comme un facteur très important, suivie de l'influence des courants de pente et/ou upwellings** (comme sur la côte des Landes). En effet, 1) certaines petites espèces très côtières présentent des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ particulièrement élevées par rapport à leur prédateurs connus dans la zone (e.g., *Atherina presbyter*, *Sepiola atlantica* vs. petits cétacés) ; 2) seules les espèces très côtières sont affectées par une différence

significative en $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ entre les individus pêchés au nord et ceux pêchés au sud ; 3) le schéma est constant pour quasiment toutes ces espèces côtières, c'est-à-dire que les individus du nord, *a priori* sous influence de la Loire, sont enrichis en ^{13}C et surtout en ^{15}N par rapport aux individus du sud, *a priori* sous influence de la Gironde (**Annexe 5**). De plus, l'estuaire de la Loire (et ses eaux adjacentes) est soumis à un risque d'eutrophisation (i.e., apport de nitrates notamment) potentiellement plus important que celui de la Gironde, car la densité de population humaine sur son bassin versant rapportée au débit fluvial y est plus élevée (Abril et al. 2002, OSPAR 2010). Nos résultats isotopiques tendent d'ailleurs à le démontrer (i.e., individus de la côte nord particulièrement enrichis en azote ^{15}N).

V.3 Une variabilité temporelle moins constante : exemple de quelques espèces fourrages

V.3.1 Mise en évidence de variations interannuelles et saisonnières des signatures isotopiques

L'étude des variations temporelles est détaillée en **Annexe 5**. À chaque fois, une gamme de taille très restreinte a été sélectionnée au sein de chaque espèce analysée, pour éviter un biais dû aux variations ontogéniques détaillées dans le chapitre IV, et telles que présentées en **Annexes 3 et 4**. De même, lorsque les espèces ciblées pour cette partie "variations temporelles" comprenaient des individus d'une espèce typiquement côtière et ainsi susceptible d'être soumise à un biais lié aux variations spatiales évoquées dans la partie précédente (i.e., différence nord-sud), les individus provenant des deux zones (Nord et sud) ont été traités séparément. Enfin, seules les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ ont été statistiquement testées (considérées *a priori* comme un proxy du niveau trophique malgré les réserves évoquées précédemment), les signatures isotopiques en carbone et en azote étant généralement corrélées en environnement marin (Kelly 2000 ; voir aussi Fig. V-2).

Les variations interannuelles des signatures isotopiques ($\delta^{15}\text{N}$) ont ainsi été explorées chez quatre espèces de poissons et quatre espèces de céphalopodes, échantillonnées chaque année en automne entre 2005 ou 2006 et 2010 selon les espèces (les détails de l'échantillonnage sont donnés dans les tableaux de résultats de l'**Annexe 5**). Si certaines différences significatives

ont été révélées entre les années d'échantillonnage, **les analyses n'ont montré aucun schéma temporel clair ni de schéma temporel constant chez l'ensemble des espèces fourrages étudiées** (le détail des analyses statistiques se trouve dans les Tableaux 3 et 4 de l'**Annexe 5**). Autrement dit, l'ensemble des espèces n'a pas montré une augmentation ou une diminution des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$, ou encore un cycle interannuel constant de variations de ces valeurs. Cependant, la fenêtre temporelle étudiée (5 à 6 ans) n'est peut-être pas suffisante pour cela. D'autre part, lorsque les signatures isotopiques des individus échantillonnés sur plusieurs années sont finalement moyennées au sein de chaque espèce, **les valeurs moyennes de $\delta^{15}\text{N}$ (et de $\delta^{13}\text{C}$) alors obtenues sont en accord avec l'écologie trophique généralement décrite pour ces espèces** (Fig. V-5 ; plus de détails sur l'écologie trophique de chaque espèce analysée sont ainsi donnés en **Annexe 5**). Cela est notamment vrai en termes de reflet possible de la zone d'alimentation – néritique vs. océanique – à partir des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$, comme évoqué précédemment.

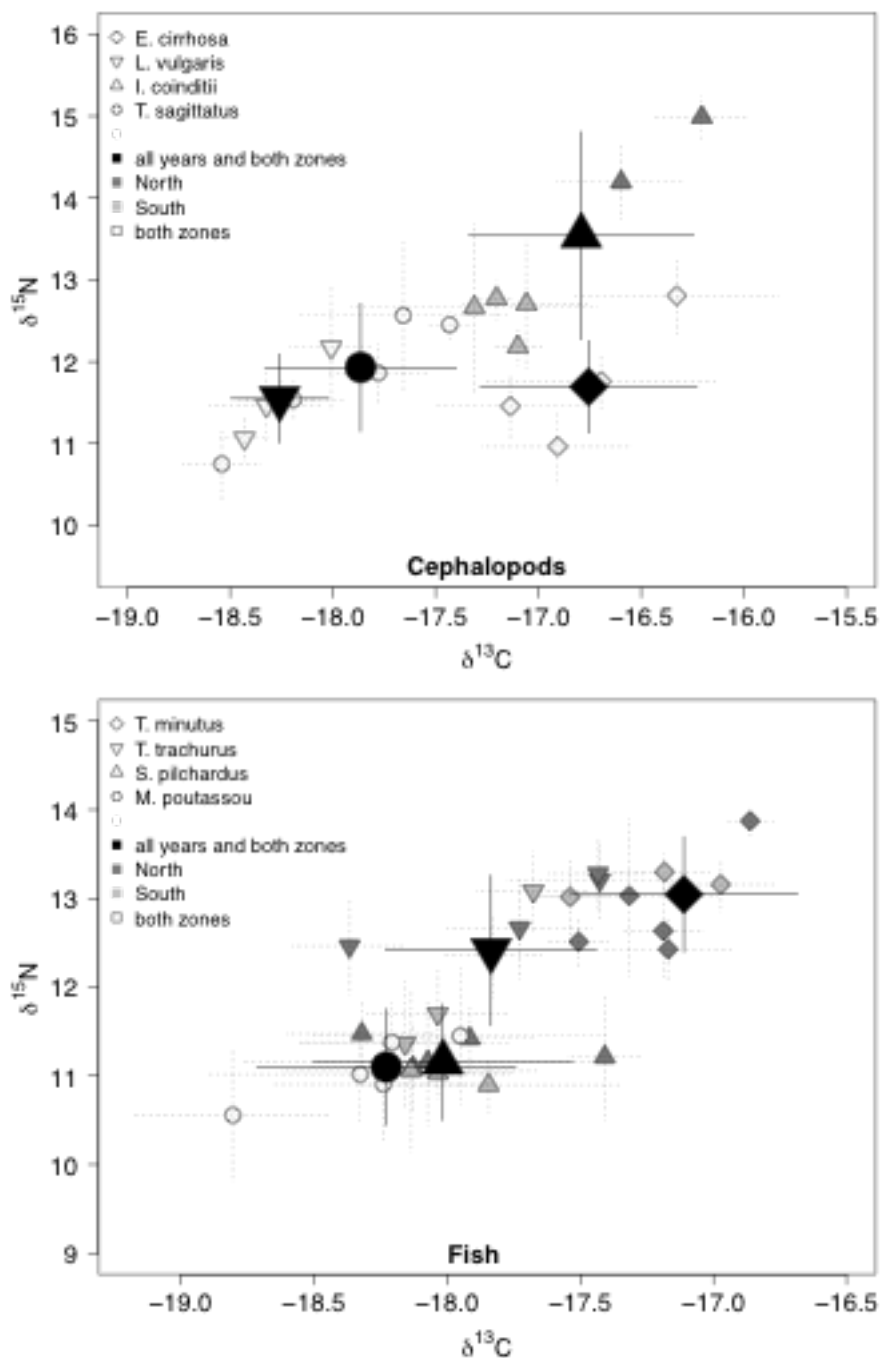


Figure V-5 : Signatures isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$; moyennes \pm écart-type en ‰) dans le muscle des espèces de céphalopodes et de poissons fourrages analysées pour les variations interannuelles des signatures dans le Golfe de Gascogne (le détail des analyses statistiques est présenté en **Annexe 5**). Chaque symbole grisé représente une année d'échantillonnage et/ou une zone d'échantillonnage (i.e., zones nord et sud), les zones ayant effectivement été séparées chez les espèces côtières présentant une différence significative (voir texte). Chaque symbole blanc représente une année d'échantillonnage pour les espèces dont la distribution n'est pas particulièrement côtière, et/ou n'ayant pas montré de différence significative nord-sud précédemment (voir texte également). Les symboles noirs représentent la valeur moyenne des signatures isotopiques pour chaque espèce testée lorsque les années d'échantillonnage et/ou les zones sont regroupées, soit la « niche isotopique » (telle que décrite par Newsome et al. 2007) "moyenne" de chaque espèce (nous reviendrons en détails sur le concept de niche isotopique dans le chapitre VI).

Les variations saisonnières des signatures isotopiques ($\delta^{15}\text{N}$) ont été explorées chez deux espèces de petits poissons pélagiques planctonophages, la sardine *Sardina pilchardus* et l'anchois *Engraulis encrasicolus*, sur des individus prélevés en automne et au printemps entre 2008 et 2010. Ces espèces planctonophages ont en effet été choisies car les variations saisonnières de la ressource exploitée (i.e., assemblage d'espèces mésozooplanctoniques) sont *a priori* très importantes. À l'exception de l'année 2008 chez l'anchois, **aucune différence significative des valeurs moyennes de $\delta^{15}\text{N}$ n'a été globalement révélée entre les individus du printemps et ceux de l'automne chez les deux espèces étudiées** (le détail des analyses se trouve en Fig. 4 de l'**Annexe 5**). Cependant, l'étendue des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ est apparue plus importante chez les individus pêchés en automne, particulièrement chez l'anchois, suggérant ainsi des variations temporelles à court terme dans la ressource disponible, et/ou des variations en termes de stratégies individuelles et spécifiques en fonction des fluctuations de la ressource, comme nous allons le discuter dans la partie suivante.

V.3.2 Processus à l'origine de ces variations temporelles

Étant donnée l'influence importante des panaches fluviaux dans les variations spatiales des signatures démontrée précédemment, on pouvait s'attendre à ce que ces mêmes panaches, variables dans le temps, soient aussi une source importante de variations temporelles des signatures ; par exemple, en instaurant une ligne de base différente d'année en année ou saisonnièrement, qui se reflèterait alors chez l'ensemble des espèces étudiées (au moins celles dont la distribution est plus côtière). Ce n'est cependant pas le cas. D'autre part, si les poissons plutôt côtiers semblent affectés par des variations interannuelles de leurs signatures, ce n'est pas le cas des céphalopodes, pour lesquels les signatures sont plus variables d'année en année chez les espèces les plus océaniques (le détail par espèce est présenté en **Annexe 5**). Enfin, si la "situation" trophique (valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ combinées) d'une espèce peut changer d'une année sur l'autre, l'estimation de son appartenance à l'un des réseaux trophiques du Golfe (i.e., néritique vs. océanique, benthique vs. pélagique) à partir des signatures isotopiques moyennées sur plusieurs années d'échantillonnage n'est pas vraiment impactée (Fig V-5). Autrement dit, **la « niche isotopique »** (telle que décrite par Newsome et al. 2007) **"moyenne" que l'on peut attribuer aux différentes espèces en disposant de valeurs d'individus analysés sur plusieurs années est cohérente avec les résultats d'écologie**

alimentaire publiés et obtenus par d'autres méthodes pour ces espèces (plus de détails sur ce point spécifique sont donnés en **Annexe 5**). Ce résultat suggère que les isotopes stables dans le muscle constituent un outil robuste et fiable pour l'étude des relations trophiques à court et moyen terme dans ce type d'écosystème.

En fait, **les variations interannuelles des signatures néanmoins observées au sein de certaines espèces sont peut-être davantage liées à un ajustement des espèces vis-à-vis de variations dans la nourriture disponible**, pour éviter la compétition avec d'autres classes d'âge de l'espèce et/ou d'autres espèces de même guilda trophique (e.g., Lefebvre et al. 2009). Ainsi, les variations interannuelles et saisonnières chez les deux espèces de poissons planctonophages étudiées (sardines et anchois) supporteraient également cette théorie. En effet, l'étendue des valeurs isotopiques est bien plus importante chez les individus pêchés à l'automne que ceux pêchés au printemps, particulièrement chez l'anchois. Or, lorsqu'un type de nourriture est particulièrement abondant (e.g., certaines espèces de micro et mésozooplancton suivant les blooms hivernaux et printaniers dans le Golfe de Gascogne), on peut penser que les individus et/ou les espèces tendent à se nourrir sur ce même type de nourriture, et présentent ainsi des signatures proches (i.e., individus du printemps). Au contraire, en fin d'été et à l'automne, la ressource serait plus variable et/ou moins abondante, et les individus et/ou les espèces présenteraient alors des comportements et/ou un régime alimentaire plus variés. L'étude de telles stratégies individuelles et/ou spécifiques possibles, en lien avec la ressource présente aux différentes saisons et/ou entre différentes années, serait ainsi un point intéressant à développer à l'avenir.

Enfin, une autre hypothèse concernant ces variations interindividuelles et temporelles est la forte mobilité des espèces de poissons et céphalopodes étudiés ici (Nøttestad et al. 1999, Semmens et al. 2007). En effet, du fait de leur grande mobilité, on ne peut pas exclure que certains individus et/ou partie de la population de ces espèces s'alimentent dans des habitats présentant différentes signatures de base dans le Golfe de Gascogne (i.e., domaine néritique vs. domaine océanique). Tout comme la diversification des proies privilégiées, pour éviter une certaine forme de compétition, la diversification des zones d'alimentation dans le temps pourrait également être particulièrement importante à l'automne lorsque la production primaire est plus faible qu'en périodes de blooms. Cette production primaire reflète effectivement un certain approvisionnement en nourriture du réseau trophique pélagique. En étant moins importante et/ou plus étalée dans l'espace à certaines périodes, cette production pourrait alors conditionner les zones d'alimentation des organismes à mésoéchelle.

V.4 Quelle implication des variations spatio-temporelles pour l'utilisation des traceurs isotopiques en environnement marin ouvert ?

Cette étude à mésoéchelle des variations spatio-temporelles des signatures isotopiques de nombreux taxons et espèces représentatifs du Golfe de Gascogne, environnement marin ouvert et complexe, suggère que **les variations spatiales (principalement dues à l'influence des panaches fluviaux) sont plus importantes que les variations temporelles (interannuelles et saisonnières, à l'échelle des espèces)**. Ceci a des implications pour 1) l'étude ultérieure des relations trophiques de type proies-prédateurs (objet du chapitre VI), et 2) l'étude de la structure et du fonctionnement de ce type d'écosystème marin (objet du chapitre VII).

Les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ apparaissent effectivement comme de bons indicateurs de la zone d'alimentation sur l'axe horizontal de la distribution des organismes (i.e., gradient néritique-océanique évident) à l'échelle du Golfe de Gascogne. Dans une moindre mesure, car cette conclusion est seulement valable pour les espèces très côtières directement soumises à l'influence des panaches, les isotopes stables du carbone et de l'azote discriminent également les individus d'une espèce exploitant plutôt la zone nord des individus exploitant la zone sud. De même, chez les espèces plutôt de niveaux trophiques faibles, ces isotopes discriminent celles qui exploitent le benthos de celles qui exploitent plutôt le pélagos.

Pour les espèces de niveaux trophiques supérieurs et/ou très mobiles (sur tous les axes de la distribution ; e.g., mammifères marins), **il apparaît ainsi évident que les traceurs isotopiques seuls ne suffisent pas pour élucider leur écologie trophique et/ou servir d'indicateurs de leur distribution en termes d'habitats exploités dans de tels écosystèmes.** Les isotopes stables du carbone et de l'azote doivent alors être combinés à d'autres approches et/ou données publiées concernant ces espèces. En milieu tempéré notamment, les consommateurs de haut niveau trophique, souvent mobiles, représentent effectivement un mélange très important de différentes sources (e.g., Chassot et al. 2008). Ils intègrent ainsi toutes les variations qui affectent déjà les niveaux trophiques inférieurs. Cela est d'ailleurs bien illustré par la plus faible variabilité du gradient côte-large observée chez les mammifères marins, les poissons cartilagineux et les grands poissons osseux (les détails des espèces sont donnés en **Annexe 5**), comparée à la variabilité plus importante observée chez

les petits poissons osseux, les céphalopodes et autres invertébrés (Fig. V-2), espèces de niveaux trophiques sans doute inférieurs.

Cependant, la principale implication des variations spatiales (sur l'axe néritique-océanique principalement) reste que **les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ peuvent être revisitées comme de bons indicateurs de la zone d'alimentation également**, comme suggéré par Hansson et al. (1997), Sherwood et Rose (2005), ou encore Ménard et al. (2007) pour d'autres cas d'étude, **alors que cela n'est généralement envisagé que pour les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$** . Jusqu'à présent dans la littérature, les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ sont effectivement souvent uniquement utilisées comme indicateurs de la position trophique des espèces dans un écosystème donné, et comme base pour le calcul des niveaux trophiques dans ces écosystèmes (e.g., Hobson et Welch 1992, Le Loc'h et al. 2008). **Dans un écosystème aussi contrasté que le Golfe de Gascogne considéré dans son ensemble, et dans de tels environnements marins ouverts, il semble évident qu'une seule ligne de base ne peut être utilisée pour le calcul des niveaux trophiques à partir des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$** , comme cela a d'ailleurs été suggéré pour d'autres écosystèmes côtiers pourtant moins vastes tels que l'estran rocheux de la baie de Roscoff en Bretagne (Riera et al. 2009). L'utilisation de consommateurs primaires, intégrateurs des variations à plus long terme, idéalement sessiles et provenant des différents environnements de l'écosystème, serait alors mieux appropriée pour le calcul des niveaux trophiques des consommateurs supérieurs que l'on peut retrouver dans ces différents environnements (Cabana et Rasmussen 1996, Vander Zanden et Rasmussen 1999, Post 2002a). Néanmoins pour cela, il faut pouvoir définir des frontières assez nettes entre les réseaux trophiques et les différents environnements de l'écosystème, ce qui reste difficile dans les grands écosystèmes marins ouverts, et ce qui est d'ailleurs bien illustré par le continuum de signatures isotopiques obtenu ici entre espèces néritiques et espèces océaniques (Fig. V-2).

Dans tous les cas, cette variabilité spatiale des signatures en $\delta^{15}\text{N}$ en particulier semble très importante à intégrer pour la suite de l'étude. Effectivement, même lorsque l'on s'intéresse aux variations temporelles, on doit supposer qu'elles peuvent être liées, en partie, à cette variabilité spatiale (i.e., alimentation de certains individus, à l'automne notamment, dans différentes zones du Golfe, comme évoqué précédemment pour l'anchois). De plus, la variabilité spatiale peut avoir d'importantes conséquences dans le calcul des niveaux trophiques à partir des valeurs "brutes" de $\delta^{15}\text{N}$ (des exemples sont donnés en **Annexe 5** et au chapitre VIII constituant la discussion générale), ou encore dans l'utilisation de ces valeurs et/ou des niveaux trophiques dérivés de ces valeurs pour étudier correctement, par exemple, le

transfert de contaminants dans les réseaux trophiques (e.g., Hobson et al. 2002, Dehn et al. 2006). Enfin, malgré les précautions que cela impose de prendre et les contraintes que cela peut engendrer, cette variabilité spatiale apparaît également comme un atout indéniable pour comprendre l'exploitation des différentes ressources et/ou habitats de tels écosystèmes par les espèces pour se nourrir. Cette variabilité est effectivement bien prise en compte dans certains modèles de mélange (e.g., SIAR), et permet de regrouper aisément des proies potentielles par guildes trophiques et/ou habitats dans ces modèles, comme nous allons le voir dans le chapitre VI suivant.

✓ **Les variations spatiales des signatures isotopiques sont évidentes dans le Golfe de Gascogne, notamment sur l'axe horizontal de la distribution, avec des signatures en $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ qui décroissent des organismes néritiques aux organismes océaniques.** Ces variations sont constantes, quel que soit le niveau d'intégration (e.g., individus ou espèces) et/ou le regroupement d'espèces envisagé (e.g., taxinomique ou par guildes/niveau trophique). Les variations spatiales sur l'axe latitudinal (i.e., nord vs. sud) ou vertical (i.e., benthique vs. pélagique) de la distribution ne sont en revanche significatives que pour certains composants des réseaux trophiques de l'écosystème (i.e., espèces côtières dans le premier cas, espèces *a priori* de niveaux trophiques faibles dans le second cas). Dans tous les cas, **l'influence des panaches fluviaux surtout, mais aussi des courants de pente et/ou des upwellings, apparaît comme majoritairement déterminante dans l'existence de ces variations spatiales.**

✓ **Des variations temporelles des signatures existent également, interannuelles et saisonnières, mais semblent avoir des conséquences moins importantes à l'échelle des réseaux trophiques** du Golfe de Gascogne tout au moins. Elles suggèrent que la majorité de l'échantillonnage d'individus et/ou d'espèces à comparer (dans le cas d'étude de relations proies-prédateur notamment) doit être fait dans une période de temps relativement restreinte (e.g., une année, à une saison idéalement). Cependant, l'analyse de ces variations temporelles permet d'envisager également que pour certaines espèces rares, on puisse échantillonner des individus sur plusieurs années. Cela permet d'obtenir tout de même des valeurs isotopiques moyennes et ainsi avoir une idée assez fidèle et robuste de la « niche isotopique » moyenne pour ces espèces.

✓ Les variations spatiales doivent donc être intégrées dans la suite de l'étude (e.g., calcul des niveaux trophiques), et apparaissent comme un atout pour l'étude des relations trophiques dans le Golfe de Gascogne. Ces relations trophiques font ainsi l'objet des chapitres VI et VII suivants.

Chapitre VI

UTILISATION DES TRACEURS POUR L'ETUDE DE L'ÉCOLOGIE TROPHIQUE D'UNE ESPECE ET DES RELATIONS INTERSPECIFIQUES

VI.1 Que peut apporter le traçage isotopique naturel dans l'étude des relations interspécifiques ?

VI.1.1 Relations interspécifiques et niche trophique d'une espèce au sein d'un écosystème

Différents types de relations, directes et indirectes, peuvent exister entre les espèces au sein d'un réseau trophique ou d'un écosystème, i.e., prédation, compétition, amensalisme, commensalisme, mutualisme. Ces relations interspécifiques ont pour la plupart d'entre elles un caractère trophique très important, ce caractère définissant même complètement certaines de ces relations interspécifiques (e.g., prédation). Ces relations vont finalement impacter la dynamique des populations en présence dans l'écosystème à court et à moyen terme (e.g., modèle de prédation de Lotka-Volterra), avoir des conséquences évolutives à long terme, et ainsi structurer d'une façon générale la composante biologique des écosystèmes ou affecter la stabilité de ces écosystèmes à toutes les échelles de temps (May 1973).

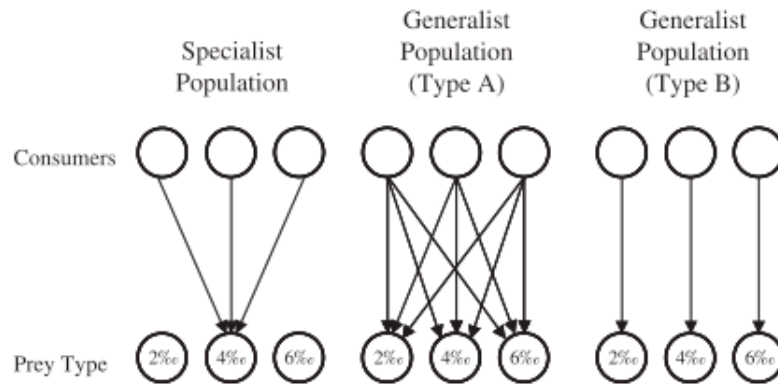
À partir des traceurs écologiques, principalement deux types de relations interspécifiques peuvent être étudiés : la prédation et la compétition. Nous définirons la prédation comme le fait de se nourrir de proies, qu'elles soient animales ou végétales, s'opposant ainsi directement à la production. Tous les consommateurs peuvent donc être considérés comme prédateurs. La compétition a lieu lorsqu'une ressource, biotique ou abiotique, est convoitée et exploitée par deux ou plusieurs consommateurs. Ce dernier type de relation interspécifique nous conduit au

concept de **niche trophique**, fondamental dans l'étude d'une espèce en particulier, et de son rôle dans un écosystème d'intérêt, et bien sûr dans l'étude des relations interspécifiques au sein d'une communauté biologique (Begon et al. 2005).

La niche trophique d'une espèce est en fait une composante de sa **niche écologique**. Cette dernière a été définie en 1957 par Hutchinson comme un hypervolume à n dimensions, dont les n axes représentent les variables environnementales (i.e., facteurs biotiques et abiotiques dans l'environnement d'une espèce). Les écologistes peuvent par ailleurs distinguer la *niche fondamentale*, qui réunit en théorie toutes les conditions nécessaires à l'existence et au développement de l'espèce, de la *niche réalisée*, qui est finalement la niche écologique à laquelle l'espèce est bien sûr adaptée (proche de la niche fondamentale), mais qu'elle est "contrainte" d'occuper notamment du fait de ses relations avec les autres espèces. La niche trophique d'un consommateur réunit finalement tous les aspects de la niche écologique qui ont un rapport avec son alimentation, soient : 1) une dimension caractérisée par les ressources (proies) qu'il exploite ; 2) une dimension spatiale composée par la zone d'alimentation (habitat) dans lequel il exploite ces proies ; 3) une dimension temporelle comprenant la rythmicité de son activité d'alimentation.

Pour définir la niche trophique d'un consommateur, la caractérisation de son régime alimentaire (i.e., proies consommées) et l'étendue de ses variations (soit la largeur de la niche trophique) sont donc primordiales. C'est ce qui permet, *in fine*, de décrypter les relations trophiques interspécifiques, telles que les relations proies-prédateur ou la relation de compétition entre deux prédateurs exploitant une même ressource. Dans l'estimation de la largeur de niche trophique d'une espèce, les écologistes distinguent ainsi généralement **deux grands types de consommateurs : les spécialistes et les généralistes**, à l'échelle de l'espèce et/ou de ses individus. Une espèce spécialiste est une espèce dont tous les individus sont spécialistes et se nourrissent donc sur un même type de proie. Chez les espèces généralistes, on distingue deux types (Van Valen 1965, Grant et al. 1976) : le type A et le type B. Une espèce généraliste de type A est une espèce dont tous les individus sont généralistes et se nourrissent sur une large gamme de proies possibles. Une espèce généraliste de type B est une espèce dont certains individus sont spécialisés sur un type de proie, d'autres individus sur un autre type de proie, ces types de proies restant à chaque fois dans une gamme de proies possibles relativement restreinte (autrement dit l'espèce de type B est bien généraliste, mais les individus qui la composent sont spécialistes).

Dans le cadre d'une approche par traçage isotopique naturel de l'alimentation des organismes, certains auteurs proposent ainsi que les ratios isotopiques, mais surtout les variations autour de ces valeurs (i.e., valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$), puissent être utilisées comme indicateurs directs de la niche trophique et de sa largeur chez les différentes espèces. Cela permettrait ainsi de définir chaque espèce comme étant plutôt généraliste ou spécialiste au sein du réseau trophique auquel elle appartient (Bearhop et al. 2004, Sweeting et al. 2005, Cherel et al. 2007). Malgré ce potentiel, Bearhop et al. (2004) explicitent également les limites de l'utilisation des données isotopiques "brutes" dans l'estimation de la niche trophique et/ou du généralisme des espèces, en montrant comment, selon les conditions dans lesquelles les signatures et leurs variations sont analysées (en termes de tissu analysé notamment), l'interprétation directe des données isotopiques peut être différente et/ou biaisée (Fig. VI-1). Ainsi avec l'analyse des isotopes stables dans le muscle (tissu intégrateur de la nourriture assimilée à moyen/long terme), une variation importante (écart-type par exemple) autour de la valeur moyenne de $\delta^{15}\text{N}$ de certaines espèces peut seulement révéler des espèces généralistes de type B, mais ne peut distinguer les espèces spécialistes des espèces généralistes de type A (Fig. VI-1). En isotopie, un mélange de sources différentes peut effectivement mener à une même signature et minimiser ainsi les variations autour de la moyenne (par exemple dans le cas d'un généraliste de type A dont tous les individus sont généralistes); comme c'est évidemment le cas lorsque les sources sont identiques (espèces spécialistes avec des individus se nourrissant sur les mêmes proies). En revanche, des signatures différentes suggèrent clairement des sources différentes, ce qui peut engendrer d'importantes variations autour de la moyenne (par exemple dans le cas d'un généraliste de type B dont certains individus sont spécialisés sur certaines proies, d'autres individus sur d'autres proies).



If we assume that diet/tissue fractionation is constant (4‰), prey isotope ratios remain constant over time and that Type A individuals consume all prey types in equal amounts then:

(A) Sampling a tissue that integrated dietary information over long temporal scales would likely give consumer population values (mean \pm s^2) of

Specialist	Generalist (Type A)	Generalist (Type B)
$8\text{‰} \pm 0$	$8\text{‰} \pm 0$	$8\text{‰} \pm 4$

(B) Sampling a tissue that integrated dietary information over short temporal scales (with a large sample size) would likely give consumer population values (mean \pm s^2) of

Specialist	Generalist (Type A)	Generalist (Type B)
$8\text{‰} \pm 0$	$8\text{‰} \pm 4$	$8\text{‰} \pm 4$

(C) Assuming that the tissue being sampled integrates dietary information over a shorter period than the diet varies over, serial sampling the same tissue (integrating very short-term dietary information, such as blood plasma samples, or short sections from feathers, hair or possibly whiskers) from the same individual over time would likely give individual values (mean \pm s^2) of

Specialist	Generalist (Type A)	Generalist (Type B)
$8\text{‰} \pm 0$	$8\text{‰} \pm 4$	$6, 8 \text{ or } 10\text{‰} \pm 0$

Figure VI-1 : Types d'échantillonnage pouvant permettre l'utilisation de la variance des valeurs isotopiques dans les tissus animaux pour discriminer entre généralisme de type A et généralisme de type B. Pour des raisons de clarté, les exemples représentent des systèmes prédateur-proies idéalisés, dans lesquels les spécialisations alimentaires représentent des extrêmes du continuum spécialiste/généraliste et type A/type B. Les problèmes possibles d'estimation des variances au niveau populationnel sont aussi ignorés (tiré de Bearhop et al. 2004).

VI.1.2 Niche isotopique et approche quantitative de la niche trophique et des relations interspécifiques par les modèles de mélange

Dans la continuité des travaux de Bearhop et al. (2004), et par extension du concept de niche trophique revisité par l'approche isotopique, Newsome et al. (2007) ont défini le concept de « **niche isotopique** » (Fig. VI-2) : intuitivement, cette niche isotopique est donc la niche d'un consommateur visualisée dans l'espace à deux dimensions constitué par le biplot

couramment utilisé en isotopie (i.e., valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ en abscisses, proxy de la zone d'alimentation ou habitat ; valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ en ordonnées, proxy de la position trophique).

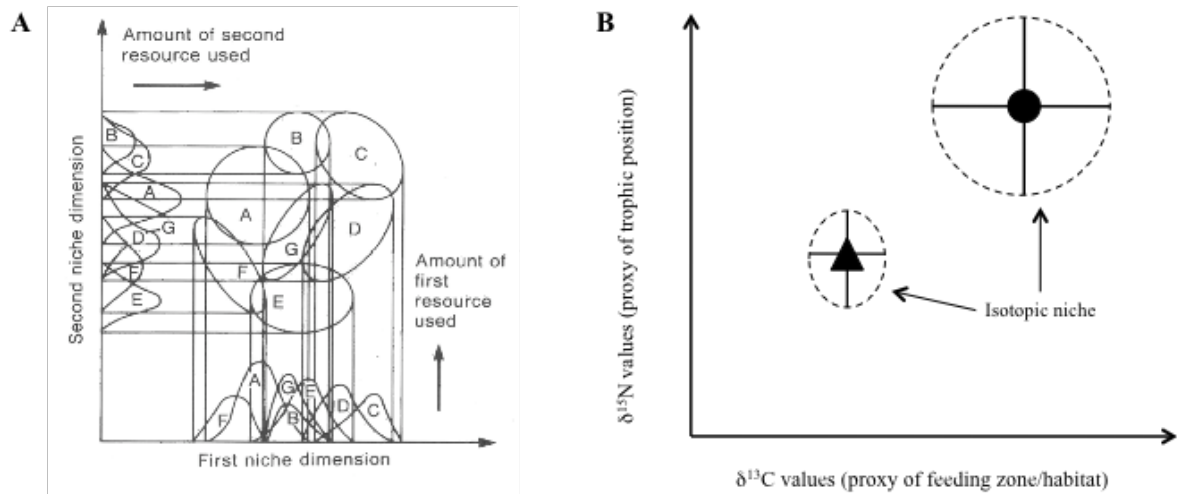


Figure VI-2 : **A)** Schéma illustrant la niche de 7 espèces différentes dans un espace à 2 dimensions (tiré de Chapman et Reiss 1999). **B)** Schéma illustrant la niche isotopique (telle que définie par Newsome et al. 2007) de 2 espèces différentes dans le biplot généralement utilisé en isotopie, soit l'espace à 2 dimensions représenté par les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ en abscisses, proxy de la zone d'alimentation/habitat, et les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ en ordonnées, proxy de la position trophique.

Cependant, Newsome et al. (2007) reviennent sur le fait que l'interprétation directe de la variation autour des données isotopiques dans ce « δ -space » (i.e., biplot lorsque deux éléments – carbone et azote – sont analysés) peut être problématique pour la mesure de la largeur de niche d'un consommateur, parce qu'elle dépend en fait fortement de la distance entre les compositions isotopiques des sources que ce consommateur utilise (Matthews et Mazumder 2004). Ainsi, un consommateur utilisant deux sources de compositions isotopiques très différentes aura nécessairement une niche isotopique plus large qu'un consommateur utilisant deux sources de compositions isotopiques peu distinctes ; pourtant, ils exploitent bien deux ressources différentes chacun.

Pour s'affranchir de ces limites, Newsome et al. (2007) proposent donc de transformer le « δ -space » en « p -space » (Fig. VI-3), dans lequel les axes représentent alors la proportion relative (p) des sources isotopiquement distinctes consommées par un prédateur, et incorporées dans ses tissus. C'est l'utilisation de **modèles de mélange** qui rend possible le calcul de la proportion relative des sources à partir de données isotopiques pour créer ce « p -

space ». Cela permet ensuite, par exemple, l'utilisation de métriques plus communément utilisées pour mesurer la largeur des niches de différentes espèces (e.g., Bolnick et al. 2002), au sein d'une communauté de prédateurs par exemple. Enfin, Newsome et al. (2007) suggèrent que les descriptions de niches isotopiques dans le « δ -space » et le « p -space » sont complémentaires plutôt qu'alternatives.

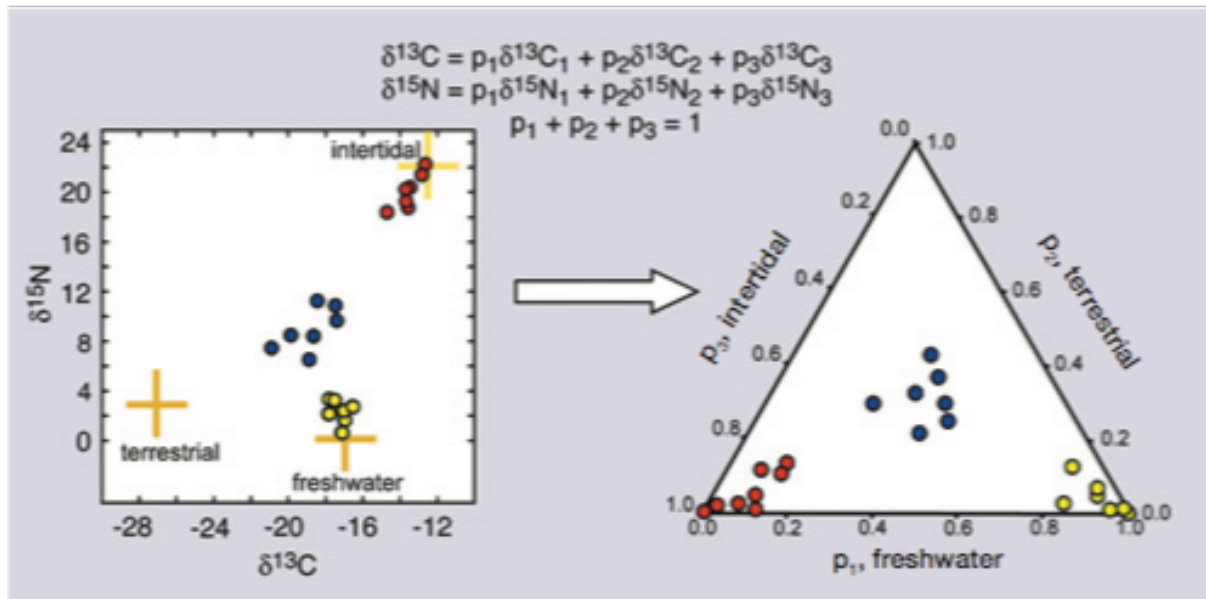


Figure VI-3 : Illustration de la transformation du « δ -space » en « p -space » pour 3 espèces supportées par un réseau trophique intertidal, d'eau douce et/ou terrestre, par la résolution d'un système de 3 équations linéaires avec 3 inconnues pour chaque point/individu (soit un modèle de mélange relativement simple, voir texte) (tiré de Newsome et al. 2007).

Les modèles de mélange permettent donc de calculer la proportion de chaque source potentielle dans le régime alimentaire d'un consommateur à partir des données isotopiques. Ils ont ainsi largement contribué au développement exponentiel de l'utilisation des isotopes stables (Martínez del Rio et al. 2009), principalement ceux du carbone et de l'azote, pour étudier la niche trophique d'un consommateur d'intérêt, dans ses trois dimensions parfois, ou étudier les relations interspécifiques comme la compétition au sein d'une communauté biologique ou d'une population (e.g., Wallace et al. 2009, Lefebvre et al. 2009, Quevedo et al. 2009).

Les premiers modèles de mélange ont été développés dans les années 1990. Au cours des années 1990 et 2000, de nombreuses approches ont été proposées pour résoudre ces modèles

de mélange (e.g., Schwarcz 1991, Ben-David et al. 1997, Phillips 2001, Lubetkin et Simenstad 2004). Néanmoins, les approches développées par Phillips et ses collaborateurs ont été le plus souvent adoptées. Celles-ci ont ainsi évolué du simple modèle linéaire calculant des solutions exactes pour n éléments (i.e., carbone et azote) et $n+1$ sources analysées (Phillips 2001), au développement de méthodes et/ou de logiciels permettant d'injecter une part d'incertitude autour de ces solutions (i.e., IsoError ; Phillips et Gregg 2001). Puis, il est devenu possible de prendre en compte les concentrations en éléments des différentes sources en plus de leur signature (ce qui peut améliorer un modèle effectué sur un omnivore alternant entre source végétale et animale par exemple ; Phillips et Koch 2002). Enfin, ont été développés des méthodes et des logiciels permettant de prendre en compte plus de $n+1$ sources dans le modèle, toujours avec n éléments analysés (i.e., Isosource ; Phillips et Gregg 2003). Ce dernier modèle Isosource en particulier a donc beaucoup été utilisé par les écologistes "isotopistes", car il peut intégrer de nombreuses sources et donne ainsi un **intervalle de contributions possibles de chaque source potentielle** dans le régime alimentaire d'un consommateur. Néanmoins, ce modèle ne précise pas vraiment quelle solution est la plus probable dans cet intervalle, et ne permet pas non plus d'intégrer, par exemple, la variabilité autour des valeurs de proies, et du prédateur, ainsi que la variabilité possible du facteur d'enrichissement trophique (TEF). En effet, l'utilisateur ne peut intégrer que les moyennes dans ce genre de modèle. Pour améliorer encore la performance des modèles de mélange et pallier à leurs limites, certains auteurs tels que Parnell et al. (2010) ont récemment développé l'utilisation des **statistiques bayésiennes** pour le calcul des contributions possibles de nombreuses sources dans le régime alimentaire d'un consommateur, développant par ailleurs un package facilement utilisable sous R par les écologistes (i.e., SIAR). Dans ce dernier type de modèle de mélange, **la variabilité associée à l'ensemble des données intégrées dans le modèle peut donc être précisée par l'utilisateur**. Les statistiques bayésiennes permettent de créer de l'inférence statistique, capable de retrouver les proportions des sources à partir de leurs valeurs isotopiques (moyennes \pm écartype) et des valeurs individuelles, cette fois, du consommateur, en utilisant les lois de probabilités associées (les détails de la méthode bayésienne sont développés dans Parnell et al. 2010). Un intervalle de confiance est alors associé à chaque contribution de sources estimée. Malheureusement, lorsque cet intervalle de confiance est trop important, la transformation du « δ -space » en « p -space » telle que proposée par Newsome et al. (2007) pour évaluer la niche trophique d'un consommateur devient vite inutile, car pas plus

informative que les données isotopiques "brutes" (Newsome et al. 2007). Cela est également le cas lorsque les sources ne sont pas bien distinctes.

Quelle que soit la méthode utilisée, il faut de toute façon garder à l'esprit que l'on fait des hypothèses fortes quand on utilise les isotopes stables en écologie trophique, et *a fortiori* lorsqu'on utilise les modèles de mélange pour estimer des contributions de sources. Ces hypothèses sont : 1) que le consommateur est à l'équilibre par rapport à ses sources ; 2) que les signatures des sources sont suffisamment distinctes isotopiquement ; 3) que le TEF entre les sources et le consommateur est relativement sûr et constant au cours du temps, et pour toutes les proies consommées (dans le cas des carnivores au moins). Contrairement à Isosource, SIAR permet au moins d'inclure la variabilité et donc l'incertitude associées à ces deux dernières hypothèses.

Dans ce chapitre de la thèse, nous nous proposons donc d'utiliser les modèles de mélange dans le cadre de l'étude de quelques consommateurs d'intérêt dans le Golfe de Gascogne, c'est-à-dire, des espèces de fort intérêt commercial et écologique (i.e., les petits poissons pélagiques fourrages, sardines et anchois, puis le bar), ou à forte valeur patrimoniale (i.e., les mammifères marins). L'apport des modèles de mélange pour l'étude des niches trophiques et des relations interspécifiques (i.e, ici la compétition et la prédation) sera ainsi analysé à différents échelons des réseaux trophiques dans le Golfe de Gascogne principalement, dans un contexte où la forte variabilité associée aux signatures isotopiques dans cet environnement doit être prise en compte pour décrypter les relations trophiques (cf. conclusions des chapitres IV et V précédents).

VI.2 Une exploration du potentiel des modèles de mélange au niveau des échelons trophiques intermédiaires dans le Golfe de Gascogne

L'importance de la « boucle microbienne » dans les transferts d'énergie à la base du réseau trophique pélagique, et l'importance du microplancton (phyto et zooplancton de taille comprise entre 20 et 200 μm) comme relais trophique entre le réseau microbien et le mésozooplancton (0,2-20 mm), ont été étudiées par plusieurs auteurs (e.g., Azam et al. 1983, Fenchel 1988), et notamment dans le Golfe de Gascogne (Marquis 2007). Dans cette partie, nous nous sommes donc intéressés aux transferts trophiques intervenants ensuite, c'est-à-dire :

1) à la relation proies-prédateur entre le mésozooplancton et deux espèces *a priori* prédatrices de ce plancton (i.e., l'anchois commun *Engraulis encrasicolus* et la sardine commune *Sardina pilchardus*); puis 2) à la relation de compétition éventuelle pour la ressource mésozooplanctonique entre ces deux espèces de petits poissons pélagiques dans le Golfe de Gascogne. Cette étude fait spécifiquement l'objet de l'**Annexe 6**.

L'anchois et la sardine sont effectivement deux espèces de petits poissons fourrages qui entrent dans le régime alimentaire de nombreux prédateurs supérieurs tels que les mammifères marins dans le Golfe de Gascogne (Spitz et al. 2006ab, Meynier et al. 2008). De plus, ces espèces constituent d'importantes prises commerciales dans cette zone (ICES 2010a, OSPAR 2010). Or, définir le régime alimentaire et/ou les zones d'alimentation des petits poissons pélagiques est une étape essentielle pour décrypter le cycle de vie de ces espèces, et *in fine* les processus de recrutement et de maintien de ces stocks, éléments nécessaires pour en assurer une bonne gestion. Les sardines et les anchois se nourriraient ainsi sur une grande variété d'organismes planctoniques appartenant essentiellement au mésozooplancton; les adultes en particulier privilégieraient les stades adultes de copépodes quel que soit l'écosystème étudié (James 1988, Tudela et Palomera 1997, Plounevez et Champalbert 1999, Cunha et al. 2005, Sever et al. 2005, Raab et al. 2011). Cependant, très peu de données publiées existent actuellement concernant le régime alimentaire de ces deux espèces de forte importance écologique et économique dans la partie française du Golfe de Gascogne (e.g., Plounevez et Champalbert 1999 pour l'anchois). D'autre part, la taille réduite des organismes proies complique considérablement l'étude du régime alimentaire par l'analyse des contenus stomacaux. C'est pourquoi l'approche isotopique (déjà réalisée pour la zone espagnole du Golfe de Gascogne par Bode et al. 2004), couplée à l'utilisation des modèles de mélange, nous semblait particulièrement prometteuse pour étudier la prédation sur le mésozooplancton par la sardine et l'anchois, ainsi que la compétition éventuelle pour cette ressource entre les deux espèces.

VI.2.1 Variabilité spatiale des signatures isotopiques, encore et toujours

Plusieurs lots de sardines et d'anchois provenant de la campagne PELGAS (printemps) 2010 ont été analysés pour leur signature isotopique dans le muscle. Le travail a également consisté en un tri des assemblages mésozooplanctoniques prélevés à différentes stations du

Golfe, au printemps 2010 également (tous les détails de l'échantillonnage et du traitement des échantillons sont présentés en **Annexe 6**). Ce tri a donc permis de déterminer et d'analyser les espèces dominantes de mésozooplancton au sein de chaque station (analyse de plusieurs individus entiers pour chaque espèce de plancton). Une étude préliminaire effectuée au cours de la thèse avait en effet précédemment montré l'hétérogénéité très importante des signatures au sein des différentes classes de taille de mésozooplancton (i.e., 200-500 μm , 500-1000 μm , 1000-2000 μm , et $> 2000 \mu\text{m}$), probablement causée par l'omnivorie avérée de ce compartiment planctonique (e.g., Dam et Lopes 2003). L'analyse par espèce de mésozooplancton était donc inévitable, d'autant plus que certaines espèces appartenant à d'autres compartiments planctoniques (e.g., espèces phytoplanctoniques de plus petite taille) peuvent finalement se retrouver dans ces assemblages que l'on présume uniquement mésozooplanctoniques. Ce biais est généralement lié à l'échantillonnage au filet qui peut vite colmater lors de fortes abondances de microalgues.

L'analyse isotopique des différentes espèces de mésozooplancton prélevées à différents endroits du Golfe a donc tout d'abord permis de mettre en évidence une variabilité interspécifique importante au sein de chaque station (Fig. VI-4 A ; pour des raisons de clarté, seules quelques stations représentatives sont présentées sur la figure, mais les schémas décrits ici se retrouvent généralement pour l'ensemble des stations prélevées dans le Golfe). Ces résultats confirment la diversité des régimes alimentaires pouvant exister au sein du compartiment et des assemblages mésozooplanctoniques en général, et dans le Golfe de Gascogne en particulier. De plus, au sein d'une station, lorsque plusieurs classes de taille sont présentes, les espèces de petites tailles telles que *Oithona* sp. présentent généralement les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ les plus faibles, tandis que les espèces de grande taille telles que *Calanus helgolandicus* présentent assez logiquement les valeurs les plus élevées. Cela suggère ainsi **des variations de régime alimentaire au sein du mésozooplancton en partie dépendantes de la taille des organismes** (Fig. VI-4 A). En parallèle de cette amplitude importante des signatures isotopiques au sein d'un assemblage échantillonné sur une station, l'étude de ce compartiment mésozooplanctonique a également permis de révéler une **variabilité spatiale des signatures dès ces niveaux trophiques pélagiques faibles**. Celle-ci est par ailleurs cohérente avec celle déjà retrouvée au cours de la thèse pour l'ensemble des organismes supérieurs analysés. Ainsi, les espèces mésozooplanctoniques des stations du large présentent des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ plus faibles que celles des stations côtières (e.g., stations C1 vs. S11, Fig. VI-4). Cette différence spatiale côte-large, de même qu'une différence nord-sud, ont

ensuite été confirmées à l'échelle de deux espèces (i.e., *Acartia* sp. et *Calanus helgolandicus*) prélevées dans différentes stations (Fig. VI-4 B). À la côte et au large, ou entre le nord et le sud soumis à l'influence différente des apports fluviaux, les assemblages d'espèces ne sont effectivement pas les mêmes, limitant l'étude des variations spatiales à l'échelle spécifique à quelques espèces seulement (ici les deux espèces citées précédemment). Enfin, comme dans le cas des organismes supérieurs étudiés au cours de la thèse, **l'amplitude des variations spatiales en $\delta^{15}\text{N}$ pour le compartiment mésozooplanctonique s'est généralement révélée plus importante que celle des variations en $\delta^{13}\text{C}$** (Fig. VI-4), à l'exception de la différence nord-sud pour l'espèce *Calanus helgolandicus* (Fig. VI-4 B).

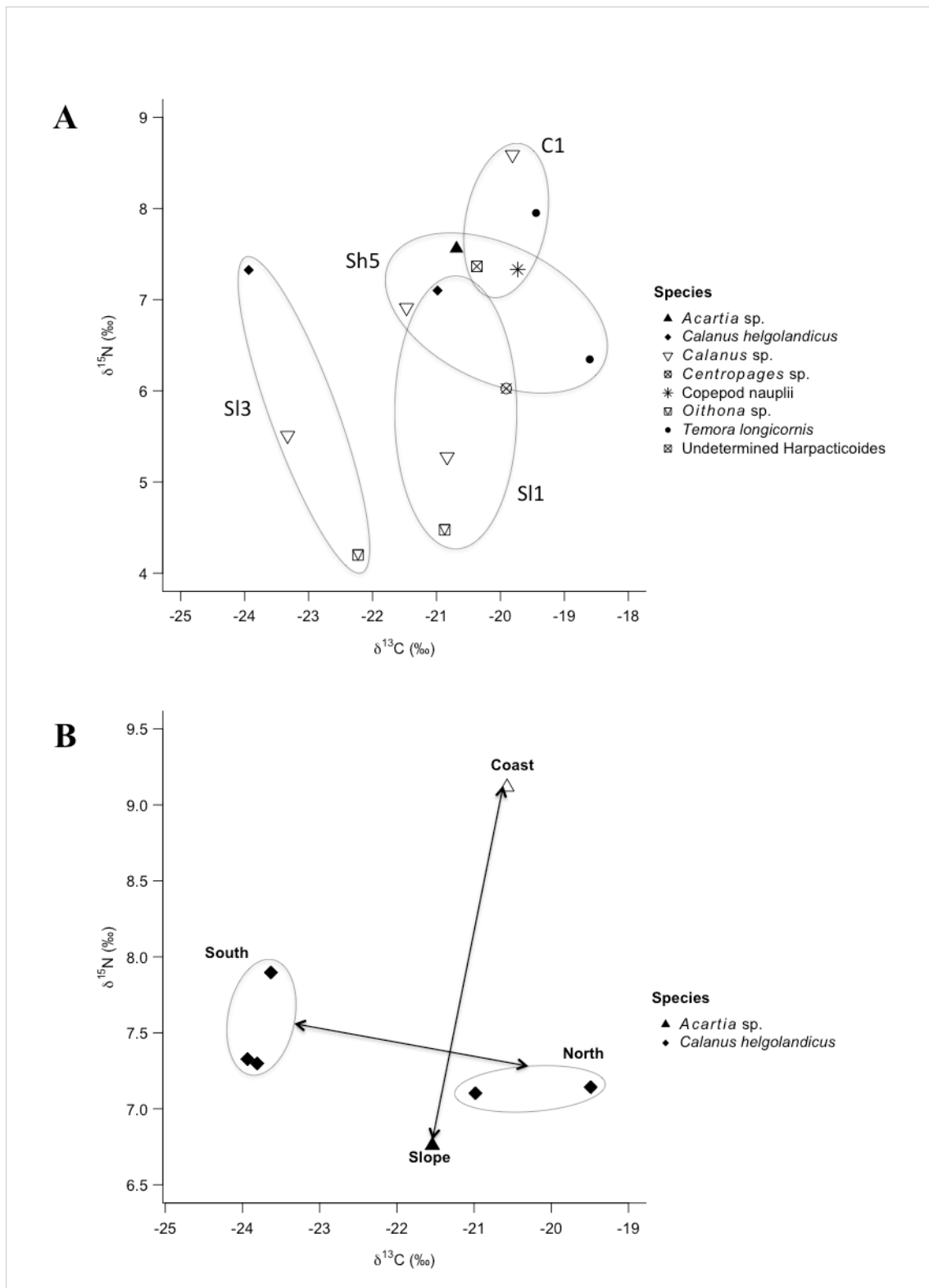


Figure VI-4 : **A)** Variabilité interspécifique des signatures isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) au sein de quatre stations exemples, soient quatre assemblages mésozooplanctoniques. C1 = station côtière de la radiale 1 ; SI1 = station du talus de la radiale 1 ; Sh5 = station du plateau de la radiale 5 ; SI3 = station du talus de la radiale 3 (le détail des radiales effectuées et des stations échantillonnées se trouve en **Annexe 6**). **B)** Variabilité spatiale (différences côte-large et nord-sud) des signatures isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) pour deux espèces mésozooplanctoniques, *Acartia* sp. et *Calanus helgolandicus*.

VI.2.2 Modèles de mélange et étude des relations trophiques mésozooplancton-petits poissons pélagiques dans le Golfe de Gascogne

Dans un modèle de mélange, un nombre de sources trop important nuit à la performance du modèle, qui calculera une contribution possible pour chaque source intégrée dans le modèle, même infime, et même si cette source n'est en réalité pas consommée. De même, un modèle de mélange ne peut évidemment pas calculer une contribution pour une source potentielle effectivement consommée, si elle n'a pas été intégrée dans le modèle.... Le choix des sources que l'on utilise dans un modèle de mélange est donc très important, puisqu'il détermine les résultats et les interprétations écologiques associées. Pour limiter le nombre de sources et/ou n'intégrer dans le modèle que des sources isotopiquement distinctes (ce qui conditionne également, la performance d'un modèle de mélange, comme évoqué précédemment), il est notamment possible d'effectuer des **agrégations de sources/de proies *a priori*** (Phillips et al. 2005). L'agrégation de sources *a priori* se fait généralement sur la base de signatures isotopiques peu différentes des sources regroupées (pour améliorer la distinction isotopique des agrégats de sources finalement rentrés dans le modèle), et/ou sur la base d'un regroupement de sources proches écologiquement/taxinomiquement/d'un point de vue trophique, etc. (Phillips et al. 2005). La contribution estimée par le modèle d'un agrégat de sources doit effectivement pouvoir, au final, être interprétable écologiquement.

Après la mise en évidence de variations interspécifiques (probablement liées à la taille des espèces) et intraspécifiques (liée à la variabilité spatiale) au sein du mésozooplancton, qui est *a priori* la source trophique principale des sardines et des anchois adultes, **nous avons choisi de réaliser un regroupement des espèces mésozooplanctoniques en fonction de leur taille approximative, et de leur lieu de prélèvement dans le Golfe de Gascogne** (i.e., côte vs. plateau vs. talus, et nord vs. sud ; les détails concernant ces regroupements sont donnés dans l'**Annexe 6**). D'autre part, au cours de l'étude, aucune variabilité spatiale ne s'est révélée significative au niveau des poissons (i.e., aucune différence entre les lots pêchés au nord et ceux pêchés au sud du Golfe pour chaque espèce). Ceci est probablement dû aux déplacements importants possibles des bancs dans le Golfe, dont la conséquence serait ainsi une homogénéisation des valeurs. Nous avons donc entrepris sous SIAR deux premiers modèles de mélange pour les **anchois adultes et les sardines adultes prélevés dans l'ensemble du Golfe** (un modèle pour chaque espèce), avec douze groupes de proies potentielles, et en intégrant donc la variabilité associée à l'ensemble des valeurs moyennes

incluses, comme ce genre de modèle permet de le faire (i.e., écart-type autour de la signature isotopique des douze agrégats, et autour du TEF estimé d'après la littérature). Ces premiers modèles ont ainsi montré que certains groupes de proies pêchées au sud du Golfe n'étaient visiblement pas consommés par les deux espèces, et ce, quelle que soit leur taille. Pour réduire ce bruit de fond inhérent à l'introduction de ces proies dans le modèle (celui-ci calcule forcément une contribution ce qui fait diminuer celles des proies principales), et ainsi améliorer la performance des modèles, nous avons entrepris deux nouveaux modèles de mélange en retirant les proies dont la contribution était < 5 % dans les premiers modèles (Fig. VI-5).

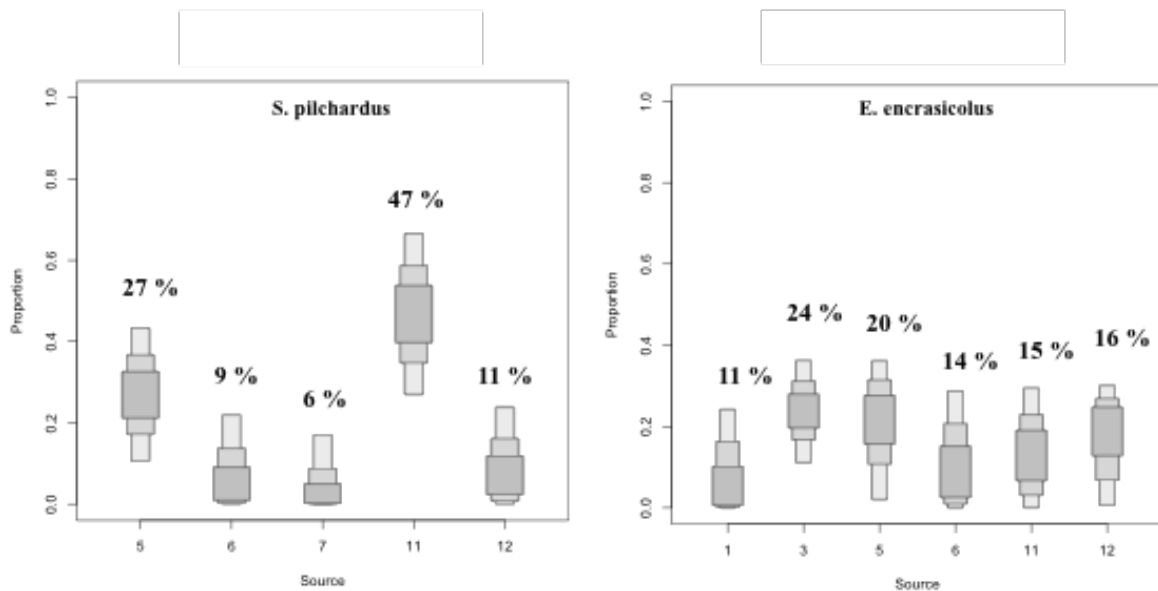


Figure VI-5 : Résultats des modèles de mélange effectués pour la sardine (*Sardina pilchardus*) et l'anchois (*Engraulis encrasicolus*) dans le Golfe de Gascogne, après exclusion pour chaque espèce des agrégats de proies contribuant pour moins de 5% en moyenne dans les modèles initiaux (voir texte). 1 = grosses espèces du talus en zone Nord ; 3 = petites espèces du talus en zone Nord ; 5 = espèces de taille moyenne de la côte en zone Nord ; 6 = espèces de taille moyenne de la côte en zone Sud ; 7 = petites espèces de la côte en zone Nord ; 11 = espèces de taille petite à moyenne du plateau en zone Nord ; 12 = espèces de taille petite à moyenne du plateau en zone Sud (les détails précis des espèces mésozooplanctoniques dans les agrégats sont donnés en **Annexe 6**). Les intervalles de confiance à 50, 75 et 95% autour de la moyenne des contributions estimées et indiquées pour chaque source sont respectivement représentés en gris foncé, gris moyen, et gris clair.

Pour la sardine, le modèle de mélange estime ainsi une alimentation principalement basée sur des copépodes de petite taille à taille moyenne, de la côte et du plateau Nord essentiellement, de type *Calanus* sp. et *Temora longicornis* (groupes 5 et 11 de la Fig. VI-6, contribuant à plus de 70% à l'alimentation en moyenne à eux deux). Pour l'anchois, les copépodes de petite taille à taille moyenne, de la côte et du plateau Nord essentiellement, constituent également des proies mésozooplanctoniques importantes dans son alimentation (i.e., groupe 5 de la Fig. VI-6, contribuant pour 20%). Néanmoins, les petites espèces du talus, toujours en zone Nord, représentent également une part importante (24%) pour cette espèce (i.e., groupe 3 de la Fig. VI-6). L'absence de source vraiment majoritaire pour l'anchois (toutes les sources incluses ont une contribution < 25%), contrairement à la sardine (pour laquelle une des sources contribue à près de 50% en moyenne), suggère par ailleurs une plasticité trophique potentiellement plus importante chez l'anchois. Ainsi, malgré un certain chevauchement des niches trophiques et ainsi une certaine forme de compétition possible entre les deux espèces, qui présentent des proies mésozooplanctoniques communes parmi celles considérées dans le modèle (e.g., groupe 5), les modèles de mélange révèlent aussi une certaine ségrégation trophique des deux espèces. En effet, l'anchois exploiterait davantage les abords du talus pour se nourrir, alors que la sardine semble rester davantage inféodée au milieu côtier pour s'alimenter. Dans ce sens, les valeurs moyennes des signatures en $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ relativement élevées de la sardine par rapport à l'anchois sur le biplot (différence significative ; cf. **Annexe 6**) suggèrent bien une alimentation plus côtière pour la sardine (i.e., d'après le gradient spatial côte-large des signatures existant au sein du Golfe de Gascogne, évoqué précédemment pour le plancton et démontré auparavant pour les organismes supérieurs). Enfin, une ségrégation temporelle pourrait aussi avoir lieu, avec une prédation plutôt diurne ou nocturne selon les espèces.

Par ailleurs, l'existence de zones d'alimentation récurrentes pour chacune des espèces pourrait expliquer l'homogénéité des valeurs entre individus prélevés au nord et ceux prélevés au sud au sein d'une même espèce de poisson. La pêche d'individus dans les deux zones s'expliquerait alors par le déplacement d'une partie des populations sur les zones de frai à cette période (zones essentiellement localisées dans le sud, au printemps, pour l'anchois tout au moins ; ICES 2010a). Les résultats isotopiques suggèrent également que les poissons ne se nourriraient donc quasiment pas dans ces zones de frai, privilégiant la zone Nord pour s'alimenter. L'analyse de la vacuité ou non des contenus stomacaux (et/ou une digestion déjà avancée des proies) suite à la capture des individus sur les zones de frai pourrait apporter

d'avantage d'informations à ce sujet. Quoi qu'il en soit, cette étude de cas à la base du réseau trophique pélagique montre bien que **les informations dérivées du biplot et des modèles de mélange sont complémentaires (Newsome et al. 2007) : d'une part, pour décrypter le régime alimentaire de consommateurs à partir des données isotopiques ; d'autre part, pour décrypter les relations interspécifiques dans un réseau trophique** (i.e., prédation sur certaines proies mésozooplanctoniques – petits et moyens copépodes en zone Nord – privilégiées par les deux espèces étudiées ; mais absence de réelle compétition entre ces deux consommateurs, pourtant proches, liée à une légère différence dans la dimension spatiale de leur niche).

VI.3 Suite de l'investigation au niveau des échelons trophiques supérieurs et à plus large échelle

VI.3.1 Cas du bar *Dicentrarchus labrax* dans le Golfe de Gascogne

Les populations sauvages de bar *Dicentrarchus labrax* constituent une ressource marine extrêmement prisée dans le Golfe de Gascogne et les eaux marines adjacentes, aussi bien par la pêche commerciale que par la pêche de loisir (ICES 2010b, Pickett et Pawson 1994). Cette espèce à forte valeur commerciale n'est pas soumise à quota et il n'existe aucune évaluation de ses stocks en Europe. Par contre, les schémas de migration et le cycle de vie général du bar (e.g., reproduction, survie, recrutement) sont relativement bien connus (Pickett et Pawson 1994), l'espèce ayant notamment fait l'objet de vastes programmes récents de capture-recapture dans les eaux européennes (Pickett et al. 2004, Fritsch et al. 2007, Pawson et al. 2007, et références associées). En revanche, les données publiées sur les habitudes alimentaires de ce consommateur important des réseaux trophiques sont finalement assez peu nombreuses, ou en tout cas peu récentes, en Atlantique Nord-Est et dans le Golfe de Gascogne en particulier (e.g., Boulineau-Coatanea 1969, Kennedy et Fitzmaurice 1972, Barnabe 1980, Kelley 1987). En outre, les quelques études plus récentes ne focalisent souvent que sur les juvéniles de l'espèce (Cabral et Costa 2001, Laffaille et al. 2001, Hampel et al. 2005, Martinho et al. 2008), les nourriceries de bar étant par ailleurs situées au niveau des estuaires et/ou en zones très côtières (Kelley 1987, Pickett et Pawson 1994). Au cours de son cycle de vie, l'espèce est donc essentiellement connue dans les zones côtières, et notamment

dans le Golfe de Gascogne. Néanmoins, des migrations saisonnières plus au large ont lieu pour la reproduction chez cette espèce (Pickett et Pawson 1994), et l'utilisation de ces zones plus au large sur le plateau continental est peu connue. Ces mouvements expliqueraient d'ailleurs la non différenciation génétique entre, notamment, les populations du Golfe de Gascogne et celles de la Manche (Fritsch et al. 2007). Du fait des études menées en zones côtières et estuariennes, le bar est généralement considéré comme un prédateur démersal, se nourrissant, d'après l'analyse de contenus stomacaux, de petits crustacés planctoniques pendant la phase juvénile, de faune épibenthique plus variée ensuite, enfin quelques petits poissons entreraient dans le régime alimentaire des plus grands individus (Kelley 1987, Pickett et Pawson 1994, Martinho et al. 2008, Rogdakis et al. 2010). Cependant, l'espèce montrerait un comportement alimentaire opportuniste à toutes les classes d'âge/de taille, c'est-à-dire, un régime alimentaire fonction de la disponibilité des proies (Pickett et Pawson 1994). La diversité des proies ingérées serait néanmoins accrue chez les plus grands individus (Rogdakis et al. 2010).

Sur le plateau continental du Golfe de Gascogne (i.e., en dehors des zones côtières), son écologie alimentaire n'est donc pas connue. Dans cette partie, nous nous proposons de confronter les informations sur le régime alimentaire issues de l'analyse de nombreux contenus stomacaux de bars capturés aux chaluts de fond et pélagique en automne et en hiver entre 2005 et 2006, sur le plateau continental du Golfe de Gascogne, et les informations dérivées de l'analyse isotopique du muscle d'individus prélevés au chalut de fond à l'automne 2008. L'analyse isotopique inclut également l'analyse du muscle des différentes proies potentielles (i.e., celles généralement retrouvées dans les estomacs, et communes sur le plateau continental du Golfe de Gascogne). Les données isotopiques ont enfin été traitées à travers des modèles de mélange, et cette étude fait en partie l'objet de l'**Annexe 7**.

Comme évoqué précédemment, la diversité taxinomique des proies retrouvées dans les estomacs de bars est généralement très importante (e.g., Pickett et Pawson 1994, Rogdakis et al. 2010). Il est apparu dans notre étude que c'est également le cas des individus adultes du Golfe de Gascogne. En effet, 40 espèces proies ont été retrouvées suite à l'analyse des contenus stomacaux (le détail de ces espèces est donné en **Annexe 7**). Cependant, environ 80% de la biomasse ingérée se concentre sur seulement quatre espèces de petits poissons pélagiques à forte valeur énergétique (i.e., maquereau, chinchard, anchois et sardine).

Considérant la grande diversité des proies possibles, nous avons dû procéder à certains regroupements *a priori* de proies potentielles pour pouvoir entreprendre des modèles de mélange à partir des signatures isotopiques. De plus, étant donné la variabilité de taille entre les individus de bars prélevés pour l'analyse isotopique, deux modèles de mélange ont été réalisés : un premier sur des individus de taille moyenne égale à 37 ± 2 cm ("small individuals" sur la Fig. VI-6), un second sur des individus de taille moyenne égale à 67 ± 2 cm ("large individuals" sur la Fig. VI-6). Enfin, pour les deux modèles, les mêmes groupes de proies potentielles ont été utilisés. Ces groupes ont ainsi été réalisés sur la base des différentes guildes trophiques présentes dans les contenus stomacaux, et en fonction de la variabilité spatiale des signatures démontrées au cours de cette thèse (poissons pélagiques, poissons démersaux et benthiques, poissons côtiers, céphalopodes, crustacés sur la Fig. VI-6 ; le détail des espèces composant les groupes est donné en **Annexe 7**).

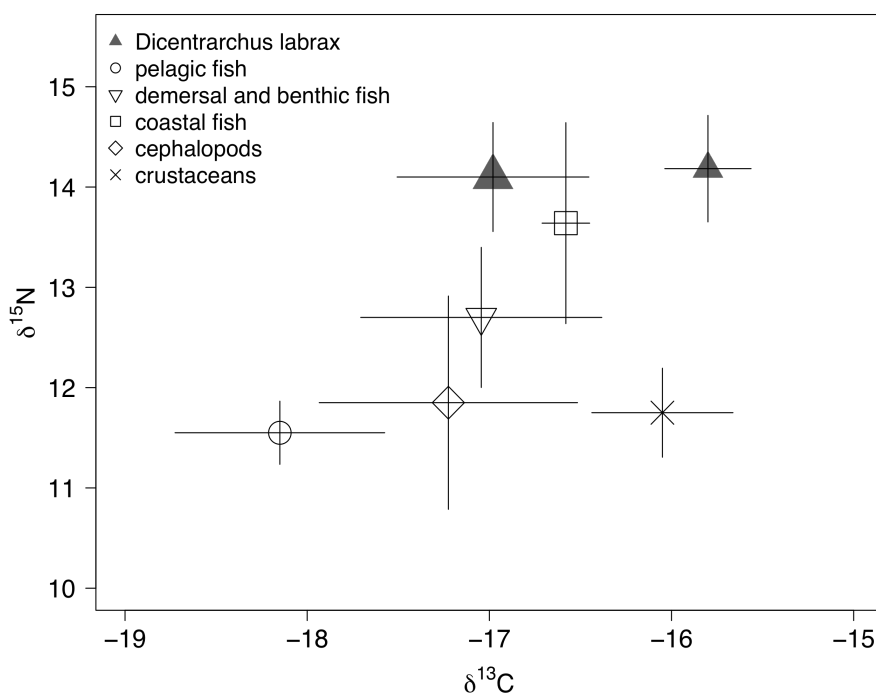


Figure VI-6 : Signatures isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$; moyennes \pm écart-types) des bars de grande taille (gros triangle gris, "large individuals"), des bars de taille moyenne (petit triangle gris, "small individuals") et des différents agrégats de proies considérés dans les modèles de mélange (le détail des espèces de chaque groupe de proies et des facteurs d'enrichissement trophiques ou TEFs est donné en **Annexe 7**).

Les modèles de mélange réalisés à partir des données isotopiques, sur des individus de deux classes de taille différentes, confirment la forte prédation de petits poissons pélagiques par les grands individus de bars, suggérée auparavant par l'analyse des contenus stomacaux. Les modèles de mélange estiment en effet une contribution moyenne de 45% ($\pm 17\%$) de ce compartiment « petits poissons pélagiques » dans l'alimentation des grands individus de bars analysés (Fig. VII-7). En revanche, pour les individus de taille inférieure analysés en isotopie, les crustacés benthiques contribueraient le plus à la signature de ces individus. Sur le plateau continental du Golfe de Gascogne, il existerait ainsi une ségrégation trophique, et donc une absence de compétition pour la ressource, entre les différents stades de vie chez le bar. Plus largement, au cours de l'ontogénèse, le régime alimentaire varierait d'un régime alimentaire zooplanctonophage chez les juvéniles (e.g., Rogdakis et al. 2010 ; juvéniles non analysés ici), passant ensuite à un régime plutôt soutenu par des espèces de la faune épibenthique chez les jeunes adultes, puis à un régime davantage soutenu par les petits poissons pélagiques chez les plus grands individus du Golfe de Gascogne.

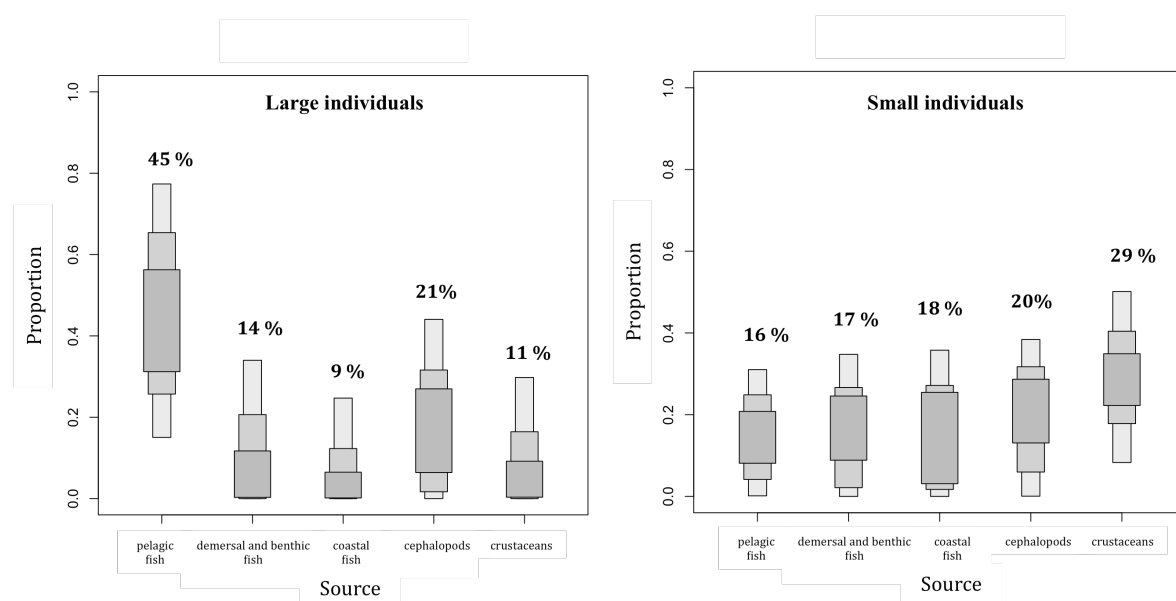


Figure VI-7 : Résultats des modèles de mélange effectués pour chaque groupe de bars (le détail des espèces dans chaque groupe de proies et des facteurs d'enrichissement trophiques ou TEFs est donné en **Annexe 7**). Les intervalles de confiance à 50, 75 et 95% autour de la moyenne des contributions estimées et indiquées pour chaque source sont respectivement représentés en gris foncé, gris moyen, et gris clair.

Des études antérieures ont montré ce **changement ontogénique de niche trophique chez le bar** dans d'autres zones, néanmoins les poissons prédatés par les plus grands individus de bars sont généralement benthopélagiques ou démersaux (e.g., Rogdakis et al. 2010). De plus, le bar est généralement considéré comme un prédateur démersal, et opportuniste (Pickett et Pawson 1994). Dans notre étude, l'évaluation de la sélectivité sur certains types de proies par les grands individus de bars a également été effectuée par le calcul de l'indice de Chesson, qui permet de comparer les proies retrouvées dans les contenus stomacaux des bars avec la composition en espèces dans les traits de chalut respectifs des bars capturés et analysés (le détail du calcul de cet indice est présenté en **Annexe 7**). Pour le calcul de cet indice, les proies ont été regroupées de la même façon que pour le modèle de mélange. L'indice de Chesson révèle ainsi que les bars adultes sélectionnent positivement les petits poissons pélagiques, tandis que les petits poissons démersaux ou benthiques sont aléatoirement consommés, et que les autres types de proies (e.g., poissons très côtiers) sont plutôt négligés. Cette étude est ainsi la première à démontrer, sur le plateau continental de l'écosystème marin ouvert du Golfe de Gascogne, en couplant analyse des contenus stomacaux et analyse isotopique, **la sélectivité des bars adultes et l'importance des petits poissons pélagiques en tant que ressource trophique chez ces bars ayant atteint la taille minimale de commercialisation** (i.e., > 36 cm).

VI.3.2 Cas du dauphin commun *Delphinus delphis* dans le nord-ouest de la péninsule ibérique

N.B. : Cette étude est issue du travail de thèse de Paula Mèndez-Fernandez sur la communauté de cétacés à dents du nord-ouest de la péninsule ibérique par approche multitraceurs (cf. avant-propos de cette thèse). Nous avons choisi de l'inclure dans cette partie pour l'opportunité que cela représentait d'avoir un focus sur les niveaux trophiques supérieurs que sont les mammifères marins, et d'appréhender une zone à l'océanographie complètement différente de celle du Golfe de Gascogne dans sa partie française ; enfin, parce que ce travail a fait l'objet d'une publication commune actuellement soumise à Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.

Dans le nord-ouest de la péninsule ibérique, au contraire de la partie française du Golfe de Gascogne, le plateau continental est très étroit (environ 25-30 km de largeur). Cette zone est caractérisée par des upwellings saisonniers qui ont lieu aux abords du talus d'avril à

septembre (Fraga 1981). Ces upwellings récurrents enrichissent en nutriments les eaux côtières de la péninsule, et supportent ainsi une forte productivité et une grande diversité biologique dans cette zone, dont de nombreuses espèces de mammifères marins (Fernández de la Cigöña 1990, Pierce et al. 2010). Malgré une ressource abondante, comprendre le régime alimentaire des mammifères marins et le partage de cette ressource entre ces différents prédateurs est un enjeu crucial de conservation de ces espèces, dans un contexte où les interactions entre prédateurs et pêcheries locales sont fortes et où les captures accidentelles sont nombreuses (López et al. 2002, 2003).

La description des régimes alimentaires par l'analyse des contenus stomacaux d'animaux échoués le long des côtes est relativement bien documentée pour les principales espèces fréquentant la zone (i.e., par Santos et al. 2004ab, 2007). Ces espèces comprennent le dauphin commun *Delphinus delphis*, le grand dauphin *Tursiops truncatus*, le marsouin commun *Phocoena phocoena*, le globicéphale noir *Globicephala melas*, et, dans une moindre mesure, le dauphin bleu et blanc *Stenella coeruleoalba*, d'après les données d'échouages et les données d'observations de cétacés dans la zone (López et al. 2002, 2004). Dans l'étude présentée ici, nous avons effectué l'analyse des isotopes stables du carbone et de l'azote dans le muscle de ces cinq espèces de cétacés et dans le muscle des proies principales retrouvées dans les contenus stomacaux et dans la zone. Les objectifs étaient ainsi 1) d'étudier la ségrégation trophique potentielle des mammifères marins de la zone, ségrégation permettant d'éviter la compétition pour la ressource sur le moyen à long terme ; 2) de comparer les informations issues de différentes méthodes d'analyse. Les données isotopiques ont effectivement été intégrées à des modèles de mélange, mais pour le dauphin commun uniquement. Cette étude fait ainsi l'objet de l'**Annexe 8**.

Le nombre d'espèces proies potentielles échantillonnées et incluses dans le modèle était un peu plus restreint que dans les cas précédents ($n = 8$), et correspondait au nombre de proies principales entrant dans le régime alimentaire du dauphin commun d'après les résultats publiés de contenus stomacaux (Santos et al. 2004b). De plus, ces différentes proies étant relativement bien distinctes isotopiquement, aucun regroupement *a priori* n'a été effectué et les modèles de mélange ont été réalisés en considérant donc chaque espèce proie séparément. D'autre part, comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, le TEF entre une proie et son consommateur peut être très variable, notamment en fonction du groupe taxinomique du prédateur considéré. Concernant les mammifères marins, très peu d'études expérimentales ont été réalisées pour déterminer des valeurs de TEF proches de la réalité pour ce modèle

biologique. Hobson et al. (1996) ont calculé des TEFs de 1,3 et 2,4‰ en $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$, respectivement, dans le muscle d'un phoque mort en captivité. Caut et al. (2011) ont calculé des TEFs de 0,3 et 1,2‰ en $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$, respectivement, dans le muscle d'un orque morte en captivité. Ces TEFs sont donc bien inférieurs au théorique 3,4‰ en $\delta^{15}\text{N}$ habituellement considéré pour les carnivores (Post 2002a). Dans cette étude, deux modèles de mélange ont ainsi été réalisés pour le dauphin commun, et les résultats comparés aux données de contenus stomacaux : un premier modèle avec les TEFs issus de Hobson et al. (1996), un second modèle avec les TEFs issus de Caut et al. (2011).

Pour ce qui est de la ségrégation entre les cinq espèces de mammifères marins, les données isotopiques "brutes" (valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ en particulier) ont permis de mettre en évidence : 1) une exploitation plus importante des proies océaniques par le dauphin bleu et blanc dans la zone ; 2) une consommation préférentielle des proies côtières et néritiques et/ou démersales chez le grand dauphin, le marsouin commun et le globicéphale noir (les données isotopiques ne permettant cependant pas de ségréger ces trois espèces) ; 3) une exploitation intermédiaire pour le dauphin commun, c'est-à-dire de possibles allers-retours, entre le large et la côte pour s'alimenter, et/ou une consommation préférentielle de proies inféodées au talus. D'une façon générale, cette ségrégation des espèces de cétacés, révélée par les données isotopiques, est donc en accord avec les informations publiées sur le régime alimentaire à partir de l'analyse des contenus stomacaux, ainsi qu'avec les données d'observation de ces espèces dans la zone (effectuées à partir de la côte ou en mer).

Dans un second temps, la comparaison des informations issues de l'analyse des contenus stomacaux et des modèles de mélange réalisés pour le dauphin commun a permis de confirmer que la valeur du TEF en $\delta^{15}\text{N}$ pour les cétacés était vraisemblablement plus basse que le 3,4‰ théorique, et plus proche du 1,2‰ estimé par Caut et al. (2011) sur un individu captif d'orque (Fig. VI-8). Le modèle de mélange prenant en compte ce TEF de 1,2‰ donne effectivement des résultats beaucoup plus cohérents avec les données issues de l'analyse des contenus stomacaux, indiquant une alimentation préférentielle du dauphin commun sur une proie typique du talus en particulier, le merlan bleu *Micromesistius poutassou*, suivi de la sardine *Sardina pilchardus* et du chinchard *Trachurus trachurus* (Fig. VI-8). Enfin, lorsque la signature isotopique de chacune des cinq espèces de cétacés est comparée à la signature de la proie principale retrouvée dans leurs contenus stomacaux respectifs, le TEF moyen en $\delta^{15}\text{N}$ déduit est d'environ 1,3‰. Ceci conforte une fois de plus l'hypothèse d'un TEF inférieur au 3,4‰ traditionnellement utilisé, pour les cétacés tout au moins. Cela a également une

implication considérable pour le calcul des positions trophiques dans les écosystèmes où une grande variété d'espèces est présente, et considérée pour analyse isotopique.

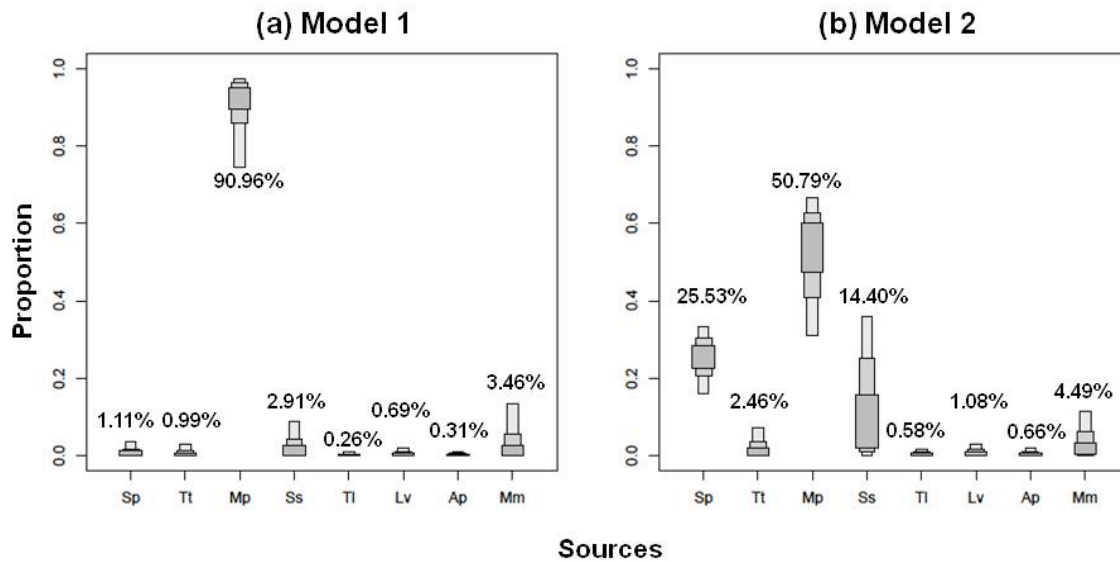


Figure VI-8 : Résultats des modèles de mélange effectués pour le dauphin commun de la péninsule ibérique (figure issue de l'Annexe 8). Le modèle 1 est celui effectué avec des TEFs de $1,3 \pm 0,1\text{‰}$ et $2,4 \pm 0,3\text{‰}$ pour les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ respectivement (Hobson et al. 1996). Le modèle 2 est celui effectué avec des TEFs de $0,34 \pm 0,2\text{‰}$ et $1,21 \pm 0,15\text{‰}$ pour les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$, respectivement (Caut et al. 2011). Sp = *Sardina pilchardus* ; Tt = *Trachurus trachurus* ; Mp = *Micromesistius poutassou* ; Ss = *Scomber scombrus* ; Tl = *Trisopterus luscus* ; Lv = *Loligo vulgaris* ; Ap = *Atherina presbyter* ; Mm = *Merluccius merluccius*. Les intervalles de confiance à 50, 75 et 95% autour de la moyenne des contributions estimées et indiquées pour chaque source sont respectivement représentés en gris foncé, gris moyen, et gris clair.

VI.4 Traçage isotopique naturel et contenus stomacaux pour l'étude d'une ou quelques espèces et des relations interspécifiques : un duo gagnant

Dans les chapitres IV et V, nous avons déjà évoqué et/ou démontré la possibilité de suivre les changements de régime alimentaire d'une espèce au cours du temps à partir des signatures isotopiques dans le muscle de différents individus ; ces individus étant différents par leur stade de vie, leur zone de prélèvement, ou encore la date et la période de prélèvement, ils permettent de suivre des changements ontogéniques de régime alimentaire, des changements liés à des variations annuelles et/ou interannuelles, ou encore des changements liés à des migrations (e.g., Graham et al. 2006, Ménard et al. 2007, Parry 2008). Dans ce

chapitre, nous avons davantage essayé d'avoir une approche plus quantitative dans l'étude des variations de la niche trophique d'une espèce, et/ou dans l'étude de ses relations trophiques avec d'autres espèces (i.e., proies potentielles considérées et analysées également, ou considération d'espèces de niche trophique *a priori* proche). Pour cela, des modèles de mélange ont été utilisés. Pour améliorer la performance de certains de ces modèles, et en fonction des objectifs de l'étude (par exemple pour la détermination de zones d'alimentation préférentielles, en plus du type de proies consommées), les proies ont été regroupées *a priori*. Ces regroupements ont généralement été effectués par guildes trophiques, et en fonction de leur distribution générale, du fait de la variabilité spatiale des signatures démontrée auparavant dans le Golfe (i.e., gradient côte-large à tous les niveaux, différence benthique-pélagique aux niveaux trophiques inférieurs, et différence nord-sud chez les espèces très côtières ; cf. conclusions de l'**Annexe 5**).

Cependant, les modèles de mélange sur lesquels nous nous sommes appuyés dans les différents cas d'étude présentés ici ne donnent qu'une **estimation des contributions possibles pour chaque source** dans le régime alimentaire du prédateur étudié, contributions qui ne peuvent être considérées comme des valeurs exactes. Des intervalles de confiance sont par ailleurs associés à ces estimations dans les figures de résultats. D'autant plus que, comme nous l'avons vu dans le cas d'étude de la sardine et de l'anchois vis-à-vis de la ressource mésozooplanctonique, les résultats d'un modèle de mélange dépendent inévitablement des sources et/ou du nombre de sources considérées. Ils dépendent également des valeurs de TEFs prises en compte (Caut et al. 2008), comme nous l'avons vu dans le cas d'étude du dauphin commun de la péninsule ibérique. Néanmoins, les modèles de mélange entrepris sous SIAR (utilisant les statistiques bayésiennes) permettent d'inclure une variabilité associée aux TEFs relativement importante, ce que nous avons donc fait dans le cas des sardines, des anchois et des bars étudiés. Nous avons alors testé si les résultats changeaient beaucoup lorsque : 1) on intégrait une incertitude importante autour des TEFs théoriques "universels" (e.g., 3,4‰ en $\delta^{15}\text{N}$; Post 2002a) ; ou 2) lorsque l'on intégrait des TEFs moins variables et plus précis (tirés de la littérature) pour ces espèces de poissons (e.g., Sweeting et al. 2007ab). Cela n'a pas été le cas. Nous avons donc finalement choisi de garder les TEF "universels" pour ces espèces, avec l'incertitude associée, d'autant plus que plusieurs estimations de TEFs issues d'études expérimentales sont disponibles pour ces modèles biologiques. De plus, dans ces études, les valeurs sont finalement toujours proches des TEFs "universels" et/ou rentrent dans le large écart-type que nous leur avons associé (cf. synthèses de McCutchan et al. 2003, Vanderklift et

Ponsard 2003, Sweeting et al. 2007ab). En revanche, pour les espèces dont on suppose d'après la littérature que les TEFs sont très éloignés des valeurs supposées "universelles" (pour le $\delta^{15}\text{N}$ en particulier, car ces TEFs sont plus variables ; Vanderklift et Ponsard 2003), il apparaît important d'utiliser une valeur plus adaptée de TEFs (e.g., mammifères marins ; Caut et al. 2008).

Enfin, les résultats de modèles de mélange se sont généralement révélés cohérents et/ou complémentaires avec ceux issus d'une simple observation des signatures isotopiques "brutes" dans le biplot généralement utilisé en isotopie ; ceci en termes d'évaluation du recouvrement des niches trophiques de deux espèces *a priori* proches, ou d'une même guildes trophique (i.e., sardines et anchois ; **Annexe 6**), ou encore de différents stades ontogéniques d'une même espèce (i.e., bars ; **Annexe 7**). **L'avantage indéniable des modèles de mélange est qu'ils permettent de chiffrer l'importance relative de sources potentielles les unes par rapport aux autres.** Ceci permet ainsi plus facilement de comparer les données de régime alimentaire d'un consommateur, issues de l'analyse isotopique dans ses tissus, avec des données provenant de l'analyse des contenus stomacaux par exemple. Cela permet également d'augmenter encore, *in fine*, la connaissance des ressources exploitées par une espèce en particulier, d'avoir une idée plus juste de sa niche trophique et/ou écologique, enfin d'étudier ses relations avec les autres espèces (i.e., prédation et compétition potentielle dans les cas étudiés ici). Les résultats présentés ici encouragent donc le **regroupement de données issues de plusieurs méthodes d'étude du régime alimentaire**, soient des méthodes complémentaires, en écologie trophique marine.

√ La niche trophique d'une espèce, et les relations interspécifiques au caractère trophique souvent important, sont deux concepts clés en écologie générale pour lesquels les traceurs isotopiques peuvent indéniablement apporter des informations. Ces traceurs permettent également **d'intégrer en partie la dimension spatiale de la niche trophique**. C'est ce que nous avons démontré dans ce chapitre en s'intéressant à plusieurs cas d'étude, à différents niveaux des réseaux trophiques.

√ **La description des régimes alimentaires et des ressources et/ou zones d'alimentation exploitées, à l'échelle d'une espèce et de ses individus, est en effet considérablement améliorée dans sa résolution lorsque :** 1) les **données isotopiques** sont analysées à travers le biplot couramment utilisé en isotopie (i.e., valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ en abscisses, proxy de la zone d'alimentation ou habitat ; valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ en ordonnées, proxy de la position trophique) ; 2) elles sont ensuite intégrées dans des **modèles de mélange** (permettant une approche quantitative dans l'exploitation des données isotopiques) ; 3) elles sont enfin **mises en relation avec des données issues de l'analyse des contenus stomacaux, par exemple** (Annexes 6, 7 et 8).

√ Cependant, ce genre de couplage pour l'étude des relations trophiques en environnement marin semble difficilement réalisable à l'échelle des réseaux trophiques et d'un écosystème considéré dans son ensemble. Cela pose ainsi la question des possibilités d'utilisation des traceurs (isotopiques en particulier) pour l'étude de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques en environnement marin ouvert, tel que le Golfe de Gascogne. Cette question fait précisément l'objet du chapitre VII suivant.

Chapitre VII

UTILISATION DES TRACEURS POUR L'ETUDE DE LA STRUCTURE ET DU FONCTIONNEMENT DES RESEAUX TROPHIQUES EN ENVIRONNEMENT MARIN OUVERT : LE CAS DU GOLFE DE GASCOGNE

VII.1 Les traceurs isotopiques face à quelques concepts clés dans l'étude de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques

VII.1.1 Une donnée centrale en écologie : la position trophique (TP) des organismes

Dans un premier temps, il est utile de préciser qu'au cours de ce chapitre et jusqu'à la fin de ce manuscrit, nous ferons une **distinction entre le "niveau trophique"** des espèces (concept, donnée absolue), **et la "position trophique" des espèces** (niveau trophique que nous considérerons "réel", car calculé, et ceci par rapport à d'autres espèces). De ce point de vue, la position trophique pourra donc inclure toutes les déclinaisons entre deux niveaux trophiques théoriques.

Les transferts d'énergie étant à la base de la structure des communautés biologiques dans un écosystème, le **concept de niveau trophique** est effectivement un concept clé qui a depuis longtemps suscité l'intérêt des écologistes, aussi bien dans le cadre d'études théoriques qu'appliquées de la structure et du fonctionnement des écosystèmes, et de leur composante biologique. Le nombre de niveaux trophiques est une propriété fondamentale qui caractérise les réseaux trophiques et leur complexité au sein d'un écosystème (Elton 1927, Lindeman 1942, Hutchinson 1959, Pimm 1980).

La **longueur des chaînes alimentaires** (nous utiliserons ensuite **FCL** pour « *Food Chain Length* » en anglais) représente, d'une façon générale, une mesure de la taille des réseaux trophiques d'intérêt (Post 2002b). Elle serait ainsi un régulateur important de la structure des communautés et du fonctionnement des écosystèmes (Hairston et Hairston 1993), jouant notamment un rôle dans la régulation des flux biogéochimiques (Schindler et al. 1997), dans la productivité des écosystèmes (Pauly et Christensen 1995), ou encore dans le transfert de certains contaminants et/ou leur bioaccumulation chez les prédateurs supérieurs (Vander Zanden et Rasmussen 1996). Cependant, il existe différentes définitions et différentes façons de mesurer cette FCL (Post 2002b). Dans cette thèse, nous considérerons la FCL comme la **position trophique (TP) maximale** définie au sein du pool de prédateurs supérieurs dans un écosystème, qui est la définition la plus généralement employée. Basée sur les flux de matière et d'énergie dans les réseaux trophiques, elle permet effectivement d'estimer la FCL en milieu naturel (calcul du niveau trophique "réel" comme évoqué précédemment), notamment à partir des traceurs isotopiques (Post et al. 2000, Post et Takimoto 2007, Vander Zanden et Fetzer 2007).

En théorie, plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de variations dans la FCL dans un écosystème, et leur importance relative a été largement débattue dans la littérature (Yodzis 1984, Pimm et Kitching 1987, Schoener 1989, Polis et Strong 1996, Hairston et Hairston 1997, Post et al. 2000, Post 2002b, Williams et Martinez 2004, Post et Takimoto 2007, Vander Zanden et Fetzer 2007). Deux hypothèses principales ont ainsi longtemps été discutées, suite aux premières prédictions d'Elton (1927), pour tenter d'expliquer pourquoi, en milieu naturel, les chaînes alimentaires sont finalement toujours assez courtes. La première hypothèse est l'**hypothèse énergétique**, ou de productivité, qui est aussi la plus reconnue (Elton 1927, Yodzis 1984, Jenkins et al. 1992, Post 2002b). Elle propose que les pertes importantes d'énergie lors des passages d'un niveau trophique à l'autre empêchent la constitution de chaînes très longues. De ce fait, seuls les écosystèmes les plus productifs pourraient supporter de très nombreux niveaux trophiques. Une variante de cette hypothèse associe productivité et taille de l'écosystème pour expliquer les variations de FCL (Schoener 1989). Elle a même mené certains écologistes à n'envisager que la taille de l'écosystème comme principal déterminant de la FCL (Post et al. 2000). La seconde hypothèse principale pour expliquer les longueurs de chaînes limitées est l'**hypothèse de la stabilité dynamique**. Elle propose que les chaînes longues sont dynamiquement instables (Pimm et Lawton 1977, Pimm et Kitching 1987), car les perturbations survenant à la base des réseaux trophiques

s'amplifiant dans les niveaux supérieurs, elles augmenteraient la probabilité de disparition des espèces en bout de chaîne (dans le cas des systèmes contrôlés « bottom-up » au moins). Seuls les écosystèmes stables pourraient donc supporter des chaînes relativement longues.

Des études récentes suggèrent cependant que ces deux hypothèses ne suffisent pas à elles seules pour expliquer les variations de FCL en milieu naturel (e.g., Sterner et al. 1997 ; voir également à ce sujet la synthèse de Post 2002b). Dans ce sens, Post et Takimoto (2007) distinguent donc les **mécanismes "ultimes"** (« *ultimate mechanisms* ») des **mécanismes "de proximité"** (« *proximate mechanisms* ») pour expliquer ces variations de FCL. Les mécanismes "ultimes" correspondent plutôt aux variables environnementales qui vont fortement influencer la structure trophique générale au sein d'un écosystème, et modifier de cette façon indirecte la FCL. Ces mécanismes incluent donc les changements dans la disponibilité des ressources, la productivité de l'écosystème, la taille de l'écosystème (associée généralement à la richesse spécifique ou l'hétérogénéité d'habitats disponibles), les perturbations de toutes sortes (e.g., perturbations anthropiques), ou au contraire la stabilité des réseaux trophiques en question, et donc d'une façon générale l'histoire de l'assemblage des communautés biologiques étudiées. Les mécanismes "de proximité" correspondent plutôt aux types de changements qui vont effectivement avoir lieu dans la structure trophique (Post et Takimoto 2007), et être directement à la base des variations dans la FCL. La valeur de FCL est en fait immédiatement affectée par :

1) l'inclusion ou l'exclusion de prédateurs supérieurs, ou mécanisme additif, qui change l'identité du prédateur à l'apex du (des) réseau(x) trophique(s) étudié(s). Ce mécanisme est d'ailleurs artificiellement provoqué lorsque différentes espèces prédatrices sont par exemple considérées, lors de différentes approches de l'écosystème étudié (e.g., inclusion de mammifères marins ou non, Vander Zanden et Fetzer 2007) ;

2) un changement de la position trophique des prédateurs supérieurs et du prédateur à l'apex en particulier modifie également la FCL. Ce changement peut être lui-même être causé par :
a) l'inclusion ou l'exclusion de consommateurs intermédiaires, dit mécanisme d'insertion ;
b) un changement dans le degré d'omnivorie des prédateurs supérieurs et du prédateur à l'apex en particulier, dit mécanisme d'omnivorie ; c) un changement de la position trophique des consommateurs intermédiaires, proies des prédateurs supérieurs et du prédateur à l'apex en particulier (Post et Takimoto 2007, Fig. VII-1).

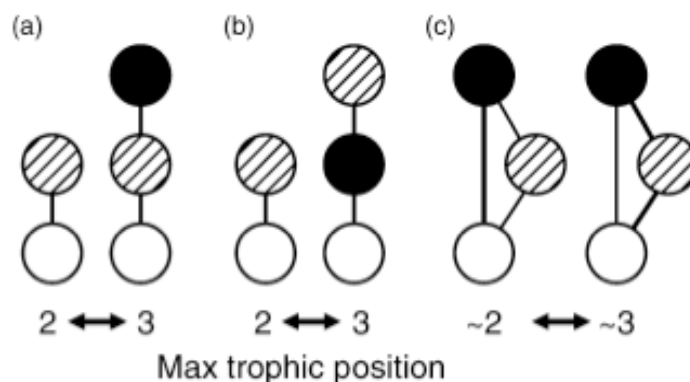


Figure VII-1 : Schématisation des 3 mécanismes structuraux ou mécanismes "de proximité" à la base de changements dans la longueur des chaînes alimentaires (FCL). Les cercles représentent différentes espèces ou stades de vie, l'épaisseur des lignes représente des différences dans les flux d'énergie. La FCL change quand : a) l'inclusion ou l'exclusion d'un nouveau prédateur supérieur ou stade de vie ajoute ou retire un lien au sommet du réseau trophique (cercle noir) ; b) l'inclusion ou l'exclusion d'un consommateur intermédiaire ou stade de vie change les liens intermédiaires dans le réseau trophique (cercle noir) ; ou c) il y a un changement dans le degré d'omnivorie (tiré de Post et Takimoto 2007).

L'**omnivorie**, c'est-à-dire le fait de se nourrir sur plusieurs niveaux trophiques pour un consommateur donné (Pimm et Lawton 1978), jouerait ainsi un rôle majeur sur la FCL et les TP calculées en général (Post et Takimoto 2007). Néanmoins, tous les écologistes ne s'accordent pas sur l'importance effective de l'omnivorie, en particulier dans les réseaux trophiques marins. Dans le cadre de cette thèse, nous considérerons qu'une espèce omnivore est une espèce généraliste (cf. définition en chapitre VI), dans le sens où cette espèce peut se nourrir sur une large gamme de proies possibles, et dans le sens où cette large gamme de proies comprend donc des niveaux trophiques différents. Nous reviendrons sur ce concept d'omnivorie un peu plus loin, dans le cadre de cette étude sur la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques dans le Golfe de Gascogne.

VII.1.2 Quels indicateurs de structure et de fonctionnement des réseaux trophiques sont donc envisageables avec les traceurs isotopiques ? Un petit tour d'horizon

Depuis l'utilisation courante des isotopes stables du carbone et de l'azote en tant que traceurs de l'alimentation des organismes, l'émergence de concepts tels que l'évaluation possible de la largeur des niches trophiques à partir de ces données (Bearhop et al. 2004) ou celui de « niche isotopique » (Newsome et al. 2007), et le développement des modèles de

mélange (Phillips et Gregg 2003, Parnell et al. 2010), ont fortement contribué à avoir une approche plus quantitative dans la façon de traiter les données isotopiques, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent (e.g., calcul de la contribution relative de différentes proies dans le régime alimentaire d'un consommateur dans le cas des modèles de mélange). Cependant, du fait de leur principe d'utilisation, ces approches quantitatives conduisent souvent, malheureusement, à se limiter aux flux d'énergie entre quelques espèces seulement (e.g., entre quelques proies potentielles et un prédateur). On peut ainsi se demander quelles sont les possibilités d'avoir une telle vision plus dynamique des liens trophiques, cette fois à l'échelle des réseaux trophiques d'un écosystème, à partir des traceurs isotopiques ? Autrement dit, **quels métriques ou quels indicateurs de structure et de fonctionnement des réseaux trophiques peuvent être envisagés à partir de ces données ?**

Dans le cadre de l'étude de la structure trophique au sein d'un écosystème à partir des traceurs isotopiques, l'utilisation des données (principalement $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$) reste effectivement encore trop souvent, actuellement, très descriptive. Des approches plus quantitatives visant à développer et/ou utiliser de vraies métriques (et non uniquement les valeurs brutes des ratios isotopiques) permettraient davantage, par exemple, de suivre l'évolution dans l'espace et dans le temps de la structure trophique au sein des écosystèmes. Dans la littérature "isotopique" à l'échelle des réseaux trophiques, ces approches manquent donc encore cruellement, même s'il existe quelques études préliminaires (Layman et al. 2007, Schmidt et al. 2007). Layman et al. (2007) proposent ainsi une série de six métriques de la structure trophique au sein d'un ensemble de communautés biologiques, basées sur la mesure des ratios isotopiques des deux éléments principalement utilisés en écologie (i.e., carbone et azote), et dérivées des méthodes normalement utilisées en écomorphologie et pour l'étude de l'assemblage des communautés. Les quatre premières métriques correspondent en fait à des mesures de l'étendue des moyennes des valeurs isotopiques des espèces analysées, dans l'espace à deux dimensions (biplot) généralement utilisé pour représenter les résultats obtenus en isotopie. Ces quatre métriques constitueraient ainsi des indicateurs en termes de « diversité trophique » au sein des réseaux. Les deux dernières métriques proposées s'attachent plutôt à décrire l'espace relatif entre les différentes espèces analysées dans le biplot, et seraient ainsi davantage indicatrices de « redondance trophique » au sein des réseaux étudiés (Layman et al. 2007). Dans cette volonté d'approche plus quantitative pour élucider les liens trophiques au sein d'un écosystème, Schmidt et al. (2007) proposent quant à eux l'utilisation de « statistiques circulaires » pour analyser les données isotopiques. Les métriques développées sont dans ce

cas dérivées des métriques utilisées pour quantifier le mouvement des organismes à travers les paysages. Dans leur étude, les auteurs démontrent en fait comment cette branche des statistiques peut permettre de quantifier et de tester des hypothèses quant aux changements directionnels de niche trophique dans l'espace et dans le temps des différentes espèces et des communautés (Schmidt et al. 2007).

Cependant, le premier cas d'approche décrit (celui de Layman et al. 2007) suggère clairement que d'une part, tous les composants possibles de l'écosystème soient bien pris en compte dans le calcul des six métriques, et notamment, les sources à la base des réseaux trophiques en question (voir à ce sujet la critique faite à Layman et al. 2007 par Hoeninghaus et Zeug en 2008 de ne suggérer que l'utilisation de consommateurs dans leurs calculs) ; d'autre part, et cela est d'ailleurs énoncé comme étant l'étape primordiale pour une telle approche par Layman et al. 2007 eux-mêmes, cela nécessite que l'écosystème d'intérêt soit clairement défini (i.e., qu'il possède des frontières nettes et bien décrites). Or, dans un écosystème marin ouvert tel que le Golfe de Gascogne, nous avons déjà évoqué qu'il était très difficile, voire impossible, de délimiter de telles frontières (Vander Zanden et Fetzer 2007). Par ailleurs, dans leur critique de l'approche proposée par Layman et al. (2007), Hoeninghaus et Zeug (2008) démontrent que des structures trophiques identiques peuvent au final présenter des valeurs de métriques différentes, alors que des réseaux trophiques très différents peuvent avoir des valeurs de métriques identiques.

Dans le second cas d'approche quantitative décrit ci-dessus (celui de Schmidt et al. 2007), l'analyse proposée s'attache davantage à identifier des changements spatio-temporels de la structure trophique dans l'écosystème. La limite de cette approche tient donc dans le fait que cela nécessite des données isotopiques initiales, puis à différents pas de temps, pour de nombreuses espèces représentatives des réseaux trophiques d'intérêt.

Dans un contexte plus appliqué de l'étude de la structure et du fonctionnement des écosystèmes, certains auteurs ont depuis plusieurs années déjà tout simplement utilisé et/ou prôné l'utilisation de la TP des organismes qui composent les réseaux trophiques d'un écosystème, ou l'utilisation de la FCL, comme indicateurs fiables de la structure et du fonctionnement et/ou des changements induits par des perturbations d'origine anthropique par exemple, ceci notamment à partir des données isotopiques (e.g., Vander Zanden et al. 1999). Dans ce cas d'étude précis dédié aux lacs, Vander Zanden et al. (1999) démontrent ainsi que le changement (abaissement) de position trophique de l'espèce prédatrice endémique dans un

des lacs étudiés, calculée à partir des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$, permet de révéler l'impact de l'introduction d'un autre prédateur sur la structure et le fonctionnement du lac impacté, par rapport à un lac n'ayant subi aucune introduction. Autre exemple, dans les écosystèmes impactés par la pêche, le « spectre trophique », soit la distribution des biomasses, des abondances ou des captures par niveau trophique, serait un indicateur fiable de l'état d'un écosystème et des perturbations potentielles causées par la pêche (Gascuel et al. 2005). Quelques années auparavant, l'intérêt de calculer les positions trophiques des organismes au sein des écosystèmes exploités par la pêche avait déjà été souligné par l'instauration du fameux concept « *fishing down marine food webs* » par Pauly et al. (1998). Dans leur étude, les auteurs montrent ainsi l'abaissement du niveau trophique moyen des espèces capturées au cours du temps, notamment à cause de la pêche intensive des grands prédateurs (e.g., les plus grands individus au sein des espèces) dans les écosystèmes marins.

D'une façon générale, quelle que soit l'approche quantitative proposée ou utilisée, on remarque que les données isotopiques, lorsqu'elles sont utilisées à ces fins (i.e., calcul des positions trophiques, ou autres métriques pour décrypter la structure et le fonctionnement des écosystèmes), deviennent finalement particulièrement intéressantes lorsque les variations spatiales mais surtout temporelles sont analysées. Or, pour la partie française du Golfe de Gascogne, une seule étude à notre connaissance, celle de Le Loc'h et al. (2008), a pour l'instant fournit une base de données isotopiques concernant cette zone marine, mais qui ne concerne qu'un secteur particulier de ce vaste écosystème (i.e., le secteur de la Grande Vasière sur le plateau continental nord). Aucune étude à large échelle spatiale, celle du Golfe de Gascogne dans son ensemble en partie française, ni à très large échelle taxinomique, n'a donc pour l'instant été entreprise d'un point de vue isotopique. D'autre part, dans le contexte décrit plus haut, **le calcul des positions trophiques des organismes, donnée centrale en écologie trophique, apparaît finalement comme un indicateur facilement et directement mesurable à partir des données isotopiques (Post 2002a), et peut-être le plus facile à suivre dans le temps au sein d'un écosystème.**

A ce stade de la thèse et après avoir étudié les différentes sources de variations potentielles des traceurs isotopiques, nous nous sommes donc attachés à calculer la TP des différents organismes provenant des différents réseaux trophiques dans la partie française du Golfe de Gascogne (i.e., état des lieux à grande échelle) à partir de nos données isotopiques. Ceci nous

a permis, dans un second temps, d'évaluer l'apport de cet indicateur en termes d'étude de la structure et du fonctionnement de l'écosystème considéré dans son ensemble. Enfin, cela nous a permis d'étudier le comportement d'un contaminant, le Hg, dans les réseaux trophiques d'un tel écosystème marin ouvert.

VII.2 Application et apport de l'indicateur TP développé dans le Golfe de Gascogne à partir des traceurs isotopiques

VII.2.1 Mise en place dans un environnement contrasté et spatialement très variable d'un point de vue isotopique

Au cours du chapitre V, nous avons vu que la variabilité spatiale, et notamment le gradient côte-large identifié à tous les niveaux d'intégration (trophiques, taxinomiques), devait absolument être intégrée pour effectuer des mesures fiables à partir des données isotopiques, comme ici le calcul des positions trophiques des espèces à partir des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$. L'étude des variations spatiales ayant principalement été réalisée à l'échelle des réseaux trophiques et de l'écosystème, nous avons poursuivi notre investigation du gradient côte-large à l'échelle de l'espèce et de ses individus (i.e., variabilité intraspécifique). Pour cela, trois espèces qui incluent des individus provenant de différents habitats le long du gradient côte-large ont été sélectionnées. Ces trois espèces appartiennent par ailleurs à trois guildes trophiques différentes : la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (bivalve filtreur de matière organique particulaire en suspension), le gastéropode *Scaphander lignarius* (brouteur de phytobenthos et/ou de matière organique déposée sur le fond), et l'anchois commun *Engraulis encrasicolus* (petit poisson pélagique mésozooplanctonophage). Au sein de ces trois espèces, le gradient côte-large (i.e., valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et de $\delta^{15}\text{N}$ qui décroissent des individus provenant du domaine néritique à ceux du domaine océanique) a été confirmé. La pente des droites de régression obtenues est par ailleurs très similaire pour les trois types de consommateurs (Fig. VII-2).

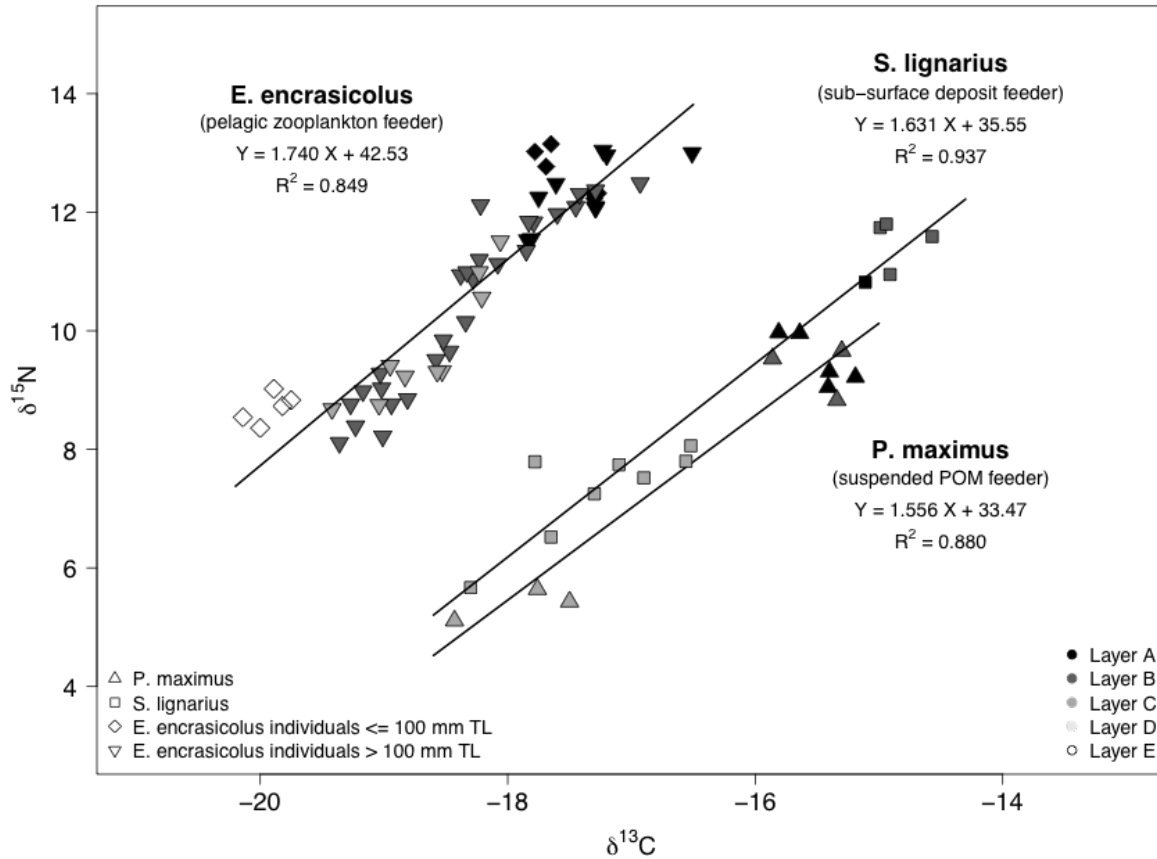


Figure VII-2 : Signatures isotopiques individuelles, et mise en évidence du gradient côte-large (côte = valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ élevées, large = valeurs plus faibles) à l'échelle de trois espèces appartenant à trois guildes trophiques différentes : la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (bivalve filtreur de matière organique particulaire en suspension), le gastéropode *Scaphander lignarius* (brouteur de phytobenthos et/ou de matière organique déposée sur le fond), et l'anchois commun *Engraulis encrasicolus* (petit poisson pélagique mésozooplanctonophage). L'équation de la droite de régression linéaire et le coefficient de corrélation au carré de Pearson (R^2) sont indiqués pour chaque espèce. Le dégradé de couleurs correspond à la strate d'échantillonnage (i.e., profondeur sous le bateau lors du chalutage) pour chaque individu : A : ≤ 30 m ; B : 31-120 m ; C : 121-200 m ; D : 201-600 m ; E : > 600 m. POM = Particulate Organic Matter (matière organique particulaire).

Le calcul des positions trophiques à partir de données isotopiques s'effectue généralement selon l'équation suivante (Vander Zanden et Rasmussen 1999, Post 2002a) :

$$TP_{\text{consommateur}} = TP_{\text{base}} + (\delta^{15}\text{N}_{\text{consommateur}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{base}}) / \text{TEF}$$

dans laquelle :

- TP_{base} est la position trophique du consommateur primaire utilisé pour estimer la TP des autres consommateurs. Dans notre étude, nous avons ainsi considéré que le bivalve filtreur *P. maximus* était le consommateur primaire le mieux approprié pour refléter directement la

matière organique à la base des réseaux trophiques en général, cette matière étant finalement un mélange de production primaire fraîche (i.e., phytoplancton et/ou phytobenthos en zone côtière) et d'autres matières organiques détritiques ou régénérées. Le gastéropode brouteur *S. lignarius* a été considéré comme étant trop soumis à l'influence benthique (i.e., production phytobenthique et matière détritique) ; quant à *E. encrasicolus*, il s'agit d'une part d'un consommateur supérieur (mésozooplanctonophage), d'autre part, il nous semblait trop soumis à l'influence pélagique (i.e., production phytoplanctonique). La TP_{base} a donc été fixée à 2, qui est par ailleurs la moyenne des TP finalement obtenue pour l'ensemble des bivalves filtreurs (dont *P. maximus*) analysés dans l'ensemble du Golfe de Gascogne (les valeurs détaillées par espèce sont données dans le Tableau 1 de l'**Annexe 9**) ;

- $\delta^{15}\text{N}_{\text{consommateur}}$ est la valeur directement mesurée d'un consommateur dont on veut calculer la TP ;

- $\delta^{15}\text{N}_{\text{base}}$ est normalement la valeur de $\delta^{15}\text{N}$ du consommateur primaire utilisé (i.e., *P. maximus* dans notre cas). Après mise en évidence du gradient côte-large, cette valeur $\delta^{15}\text{N}_{\text{base}}$ a donc été corrigée en fonction des paramètres de la droite de régression obtenue pour *P. maximus* (Fig. VII-2), et en fonction de la valeur de $\delta^{13}\text{C}$ du consommateur dont on veut ici calculer la TP, soit :

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{base}} = Y = 1,556 * \delta^{13}\text{C}_{\text{consommateur}} + 33,47$$

- TEF est le facteur d'enrichissement trophique pour la différence de $\delta^{15}\text{N}$ entre une proie et son consommateur. Le TEF le plus couramment utilisé est 3,4‰, qui est une moyenne théorique des TEF lorsqu'un réseau trophique est considéré dans son ensemble (Post 2002a). Néanmoins, comme nous l'avons déjà discuté dans les chapitres précédents, il est de plus en plus évident dans la littérature que le TEF peut être largement variable en fonction du taxon du consommateur considéré, ou encore en fonction du type et de la qualité de sa nourriture. Etant donnée la grande variété de consommateurs retrouvés dans le Golfe de Gascogne et analysés dans cette étude, il nous a donc semblé plus judicieux et approprié d'utiliser ici, autant que possible, un TEF adapté à chaque grand type de consommateur, selon le critère taxinomique en particulier. Les TEFs finalement utilisés sont ainsi détaillés dans le Tableau 2 de l'**Annexe 9** (en ce qui concerne les mammifères marins non inclus dans cette annexe, le TEF appliqué est indiqué dans le Tableau VII-1 de ce chapitre).

Enfin, les TP calculées de cette façon (c'est-à-dire de manière à intégrer la variabilité spatiale importante des signatures dans le Golfe de Gascogne) ont été comparées aux TP dérivées d'un modèle Ecopath réalisé récemment par Lassalle et al. (sous presse) dans le Golfe de Gascogne, pour le réseau trophique du plateau continental en partie française. Les comparaisons ont été effectuées pour les espèces utilisées comme compartiment unique dans le modèle. Cela nous a permis de vérifier que les TP ainsi dérivées des ratios isotopiques et corrigées du gradient spatial dans cet écosystème contrasté étaient bien cohérentes avec celles prédites par le modèle Ecopath (Fig. VII-3).

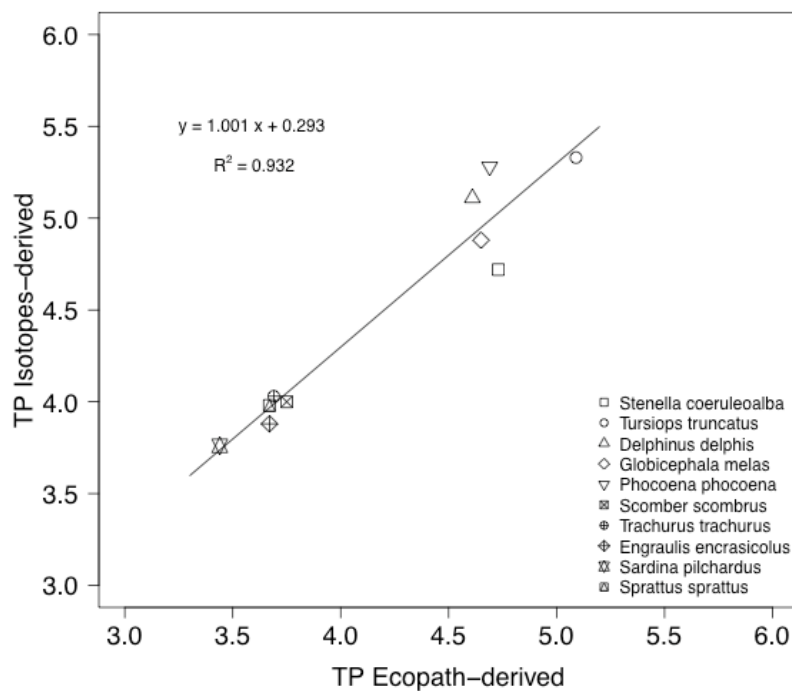


Figure VII-3 : Comparaison des positions trophiques (TP) dérivées des ratios isotopiques avec celles dérivées du modèle Ecopath effectué pour la partie plateau continental du Golfe de Gascogne (Lassalle et al. sous presse), pour les quelques espèces (mammifères marins et petits poissons pélagiques) considérées comme compartiment unique dans le modèle Ecopath. L'équation de la droite de régression linéaire et le coefficient de corrélation au carré de Pearson (R^2) sont indiqués.

VII.2.2 Quelles informations sont apportées par l'évaluation initiale des TP ainsi calculées à large échelle dans le Golfe de Gascogne ?

Les TP calculées sont détaillées pour chaque espèce analysée dans le Tableau 1 de l'**Annexe 9**, sauf pour les mammifères marins où elles sont indiquées dans le Tableau VII-1 suivant. Ces TP varient en accord avec les niveaux trophiques théoriques auxquels on peut s'attendre lorsque l'on considère la variété de consommateurs analysés au sein de cet écosystème tempéré, s'échelonnant de 2,0 en moyenne pour les mollusques bivalves à 4,8 en moyenne pour les mammifères marins.

Tableau VII-1 : Positions trophiques (TP, moyenne \pm écart-type) calculées à partir des ratios isotopiques pour les espèces de mammifères marins analysées dans le Golfe de Gascogne. Le facteur d'enrichissement trophique (TEF) en azote utilisé pour ces espèces est de 1,8‰, soit une moyenne entre le TEF de 2,4‰ estimé par Hobson et al. 1996 dans le muscle d'un phoque mort captif (*Pagophilus groenlandicus*), et le TEF de 1,2‰ estimé par Caut et al. (2011) dans le muscle d'une orque morte captive (*Orcinus orca*). À notre connaissance, ces données de TEFs sont effectivement les seules données de TEFs disponibles pour du muscle de mammifères marins, obtenues en conditions contrôlées et non *in situ*. Le nombre d'individus analysé par espèce est indiqué (N). Les espèces sont classées par ordre croissant des TP calculées.

Espèce	N	Taille (cm) (Moyenne \pm écart-type)	TP (Moyenne)
<i>Balaenoptera physalus</i>	4	1785 \pm 204	3.8
<i>Physeter macrocephalus</i>	3	1063 \pm 27	3.9
<i>Kogia breviceps</i>	6	225 \pm 47	4.0
<i>Ziphius cavirostris</i>	11	521 \pm 76	4.4
<i>Stenella coeruleoalba</i>	11	185 \pm 31	4.7
<i>Globicephala melas</i>	16	448 \pm 73	4.9
<i>Delphinus delphis</i>	26	200 \pm 11	5.1
<i>Mesoplodon bidens</i>	5	389 \pm 51	5.2
<i>Phocoena phocoena</i>	10	153 \pm 20	5.3
<i>Tursiops truncatus</i>	7	256 \pm 38	5.3
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	7	576 \pm 91	6.3

Dans le Golfe de Gascogne, les mammifères marins présentent ainsi, en moyenne, les valeurs de TP les plus importantes, ce qui est en accord avec les valeurs de TP obtenues par modélisation Ecopath de l'écosystème pour la partie plateau continental (Lassalle et al. sous

presse). Lorsque les mammifères marins sont retirés, la FCL ou TP maximale retrouvée en considérant l'ensemble des réseaux trophiques du Golfe est de 5,0 (TP calculée pour la torpille marbrée *Torpedo marmorata*), et cette FCL se situe donc dans la distribution des FCL retrouvées en environnement marin lorsque les mammifères marins sont effectivement exclus (Vander Zanden et Fetzer 2007). Lorsque les mammifères marins sont inclus, le petit rorqual *Balaenoptera acutorostrata* présente la TP la plus élevée (i.e., 6,3). À l'exception de ce cas, la valeur de TP maximale calculée à partir des ratios isotopiques, soit 5,3 pour le grand dauphin *Tursiops truncatus* et le marsouin commun *Phocoena phocoena*, est très proche de la TP maximale trouvée par le modèle Ecopath soit 5,1 pour le grand dauphin *Tursiops truncatus*. Ce modèle ne considère d'ailleurs que certains mammifères marins exploitant le plateau continental du Golfe, et non le petit rorqual en particulier, considéré comme hors de cette zone de distribution. La TP particulièrement élevée calculée pour cette espèce pourrait aussi être due à l'analyse d'individus exploitant des écosystèmes autres que le Golfe de Gascogne (e.g., Manche ou mer du Nord), mais retrouvés échoués sur les côtes atlantiques.

Parmi les mécanismes "de proximité" qui influencent directement la FCL, nous avons vu précédemment que l'omnivorie pouvait jouer un rôle majeur (Post et Takimoto 2007, Fig. VII-1). Depuis plusieurs années, le concept d'omnivorie est cependant au centre de nombreux débats en écologie trophique, particulièrement à l'échelle des réseaux trophiques. En effet, les études se contredisent : 1) sur le fait que l'omnivorie est omniprésente (Polis et Strong 1996, Thompson et al. 2007) ou non (Pimm et Lawton 1978, Yodzis 1984) ; 2) sur le fait qu'elle est plus importante aux niveaux trophiques élevés (Lindeman 1942, Hutchinson 1959, Peters 1977, France 1997) ou au contraire aux niveaux trophiques faibles et intermédiaires (Broman et al. 1992, Cabana et Rasmussen 1994) ; 3) sur le fait que l'omnivorie constitue un facteur qui déstabilise (Pimm 1979) ou au contraire stabilise les réseaux trophiques (Polis et Strong 1996, Fagan 1997), quand d'autres considèrent encore que les deux cas de figure sont possibles (voir à ce sujet Vandermeer 2006) ; etc. Pour intéresser autant les écologistes, l'omnivorie dans les écosystèmes marins complexes a donc un rôle important à jouer (Polis et Strong 1996, Post et Takimoto 2007), quel qu'il soit. **La quantification de l'omnivorie semble ainsi être un élément fondamental pour comprendre la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques dans un écosystème d'intérêt.** Quelles informations peuvent donc nous apporter les isotopes stables et les TP dérivées de ces données concernant l'omnivorie dans les réseaux trophiques du Golfe de Gascogne ?

Dans notre étude, les TP dérivées des ratios isotopiques de certaines petites espèces apparaissent relativement importantes, lorsqu'elles sont comparées aux TP d'espèces qui peuvent notamment se nourrir sur ces espèces de petite taille et dont le niveau trophique est donc théoriquement élevé. Ainsi, des petits poissons pélagiques comme le chinchard *Trachurus trachurus* ou le maquereau commun *Scomber scombrus*, présentent des TP calculées de 4,0 pour des individus d'environ 30 cm alors que la baudroie *Lophius piscatorius* lorsqu'elle dépasse 70 cm, ou le merlu *Merluccius merluccius* au delà de 55 cm présentent des TP respectives de 4,2 et 4,3. Néanmoins, ces TP calculées pour les petits poissons pélagiques sont en accord avec celles dérivées du modèle Ecopath (Fig. VII-3). Ce premier constat nous conduit à penser qu'une relative spécialisation des petites espèces (i.e., principalement mésozooplanctonophages pour celles citées), et l'omnivorie des espèces de prédateurs citées pour exemple, pourraient expliquer ces valeurs de TP finalement assez proches entre les deux types de consommateurs ; à moins que cela ne soit directement causé par une organisation "en réseau" très importante des relations trophiques dans l'écosystème (cf. Fig. VII-4). Nous allons voir qu'il n'est pas si facile de faire la part des choses avec les seules données isotopiques dont nous disposons. Néanmoins, certaines hypothèses peuvent clairement être confirmées lorsque les résultats sont comparés à d'autres approches (e.g., modélisation Ecopath).

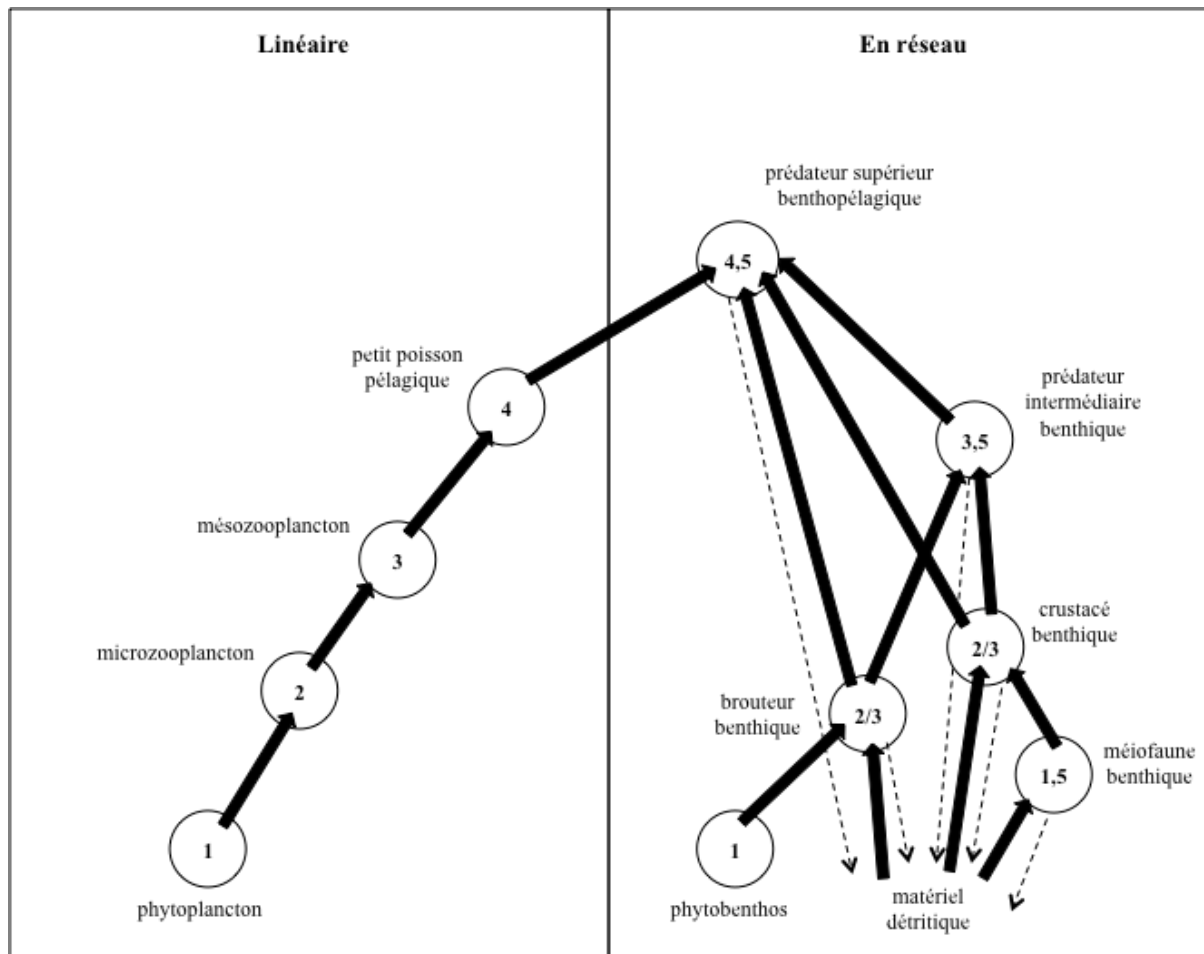


Figure VII-4 : Schématisation de deux types de chaînes alimentaires et/ou relations trophiques possibles en milieu naturel, pouvant mener 1) à des positions trophiques relativement élevées chez certaines espèces (e.g., petit poisson pélagique spécialiste, combiné à des relations trophiques linéaires), ou 2) à des positions trophiques relativement basses chez des espèces pourtant au sommet des chaînes alimentaires (e.g., prédateur supérieur benthopélagique omnivore, combiné à des relations trophiques organisées en réseau). Les chiffres dans les cercles correspondent à la position trophique calculée des organismes. Les organismes associés à ces positions trophiques et les positions trophiques elles-mêmes sont uniquement donnés à titre d'exemple.

D'une façon générale, le degré d'omnivorie dans un écosystème est souvent estimé à partir de la TP des organismes composant les réseaux trophiques, selon plusieurs méthodes possibles. Ainsi certains auteurs proposent que le degré d'omnivorie d'une espèce soit représenté par la variation autour de la TP calculée pour une espèce (i.e., écart-type SD ou erreur standard SE ; Williams et Martinez 2004, Pauly et al. 1998, respectivement). D'autres auteurs, tels que Thompson et al. (2007) proposent qu'un degré d'omnivorie élevé dans un écosystème est indiqué par une faible proportion d'espèces dont la valeur de TP est un chiffre entier. Mais dans ce dernier cas, cela suppose : 1) que l'on fait la forte hypothèse d'avoir un échantillon vraiment représentatif de toutes les TP que l'on peut trouver dans l'écosystème, et 2) que les

TP estimées, quelle que soit la méthode, sont vraiment exactes, or il peut y avoir quelques variations selon les méthodes utilisées (e.g., contenus stomacaux, isotopes stables, bases de données type Fishbase ; voir à ce sujet Chassot et al. 2008). Il existe encore d'autres façons de mesurer l'omnivorie mais elles n'apportent en fait pas toutes exactement la même information, surtout si l'omnivorie est calculée au niveau de l'individu ou au contraire au niveau de l'espèce. Ainsi l'indice d'omnivorie proposé par Christensen et Pauly (1992) peut être calculé individuellement, et permet ainsi de discriminer entre les généralistes de type A ou B, d'autant plus lorsqu'il est combiné à la variabilité de la TP calculée pour chaque espèce (Chassot et al. 2008). La variation autour de la TP peut en effet, en théorie, prendre une valeur nulle s'il s'agit d'une espèce généraliste de type A (dont tous les individus sont généralistes et peuvent donc présenter une TP égale, se nourrissant tous sur une large gamme de proies ; cf. définition en chapitre VI) ; comme dans le cas des espèces spécialistes finalement. Cependant, calculer l'indice d'omnivorie de Christensen et Pauly (1992) nécessite de revenir, pour chaque espèce voire pour chaque individu, à une connaissance détaillée de leurs régimes alimentaires par analyse des contenus stomacaux (Chassot et al. 2008), ce qui semble difficilement envisageable pour un écosystème traité dans son ensemble.

À la lumière de ces informations et de celles évoquées dans le chapitre VI (i.e., potentiels et limites de l'outil isotopique dans l'évaluation de la largeur de niche trophique d'une espèce ; Bearhop et al. 2004, Newsome et al. 2007), et ne disposant enfin que des valeurs isotopiques dans le muscle pour l'ensemble des individus et des espèces prélevées pour la reconstruction des réseaux trophiques dans le Golfe de Gascogne, nous avons alors envisagé une **estimation de l'omnivorie générale dans l'écosystème à partir de la variation autour des TP estimées pour chaque espèce** (Pauly et al. 1998, Williams et Martinez 2004). Nous faisons ainsi l'hypothèse que la conversion des données isotopiques "brutes" en TP, avec correction du gradient spatial, nous permet de nous affranchir un peu des limites et des biais engendrés par l'analyse isotopique pour vraiment appréhender le degré d'omnivorie des espèces (Bearhop et al. 2004). L'estimation de l'omnivorie ainsi faite a bien sûr été comparée ensuite aux résultats du modèle Ecopath pour la partie continentale du Golfe de Gascogne (Lassalle et al. sous presse), et aux hypothèses développées dans la littérature sur ce concept dans les réseaux trophiques, pour pouvoir en tirer des conclusions. Le modèle Ecopath calcule en effet l'index d'omnivorie proposé par Christensen et Pauly (1992) pour chaque compartiment considéré dans le modèle, et un index d'omnivorie moyen pour l'ensemble du réseau en question.

Dans notre exploration du degré d'omnivorie, il est ainsi apparu une **tendance à l'augmentation de l'omnivorie (se traduisant par un important SD autour de la TP) avec la TP des organismes analysés** (Fig. VII-6). Cela soutiendrait par ailleurs l'hypothèse d'une omnivorie plus importante chez les hauts niveaux trophiques (Lindeman 1942, Hutchinson 1959, Peters 1977, France 1997). Cependant, comme on peut également le constater sur la Fig. VII-5, la très grande hétérogénéité des valeurs de SD aux niveaux trophiques intermédiaires à élevés (i.e., aux TP comprises entre 3,0 et 4,5) empêche clairement la corrélation entre les deux paramètres d'être significative (i.e., entre la TP et le SD de la TP ; Fig. VII-5). Aux niveaux trophiques bien supérieurs ($TP \geq 5,0$), il existe une certaine hétérogénéité des valeurs de SD également. Néanmoins, les valeurs de SD autour des TP sont nettement plus élevées (i.e., de 0,3 à 0,8) qu'aux niveaux inférieurs, pour lesquels très peu d'espèces ont une $SD > 0,4$. **L'ensemble des résultats indique finalement une omnivorie moyenne chez la plupart des espèces prélevées et analysées pour les réseaux du Golfe de Gascogne étudiés** (Fig. VII-5).

Sur le plateau continental du Golfe de Gascogne, le modèle Ecopath prédit effectivement une omnivorie plutôt moyenne dans cet écosystème (Lassalle et al. sous presse), même pour la plupart des niveaux trophiques élevés inclus dans le modèle (e.g., mammifères marins, poissons ichtyophages). Néanmoins, comme suggéré par les données isotopiques, les plus forts indices d'omnivorie sont retrouvés chez les prédateurs supérieurs, en particulier chez certains mammifères marins et oiseaux de mer. Majoritairement soutenu par les niveaux trophiques faibles et la biomasse détritique (le modèle Ecopath prédit en effet un fonctionnement de type « bottom-up »), l'écosystème du Golfe de Gascogne serait selon cette approche un écosystème "mature", dans lequel il existe normalement une certaine étroitesse des niches trophiques et donc finalement une certaine spécialisation des espèces (Odum 1969). Ceci semble effectivement être le cas de la majorité des espèces analysées ici (plus de 90% des espèces analysées avec une valeur de SD autour de la TP $\leq 0,3$) (Fig. VII-5). Le peu de TP très élevées laisse aussi penser à une forte organisation des liens trophiques "en réseau", comme cela a été évoqué précédemment dans ce chapitre (Fig. VII-4). Nos résultats sont donc cohérents avec les prédictions du modèle Ecopath (Lassalle et al. sous presse).

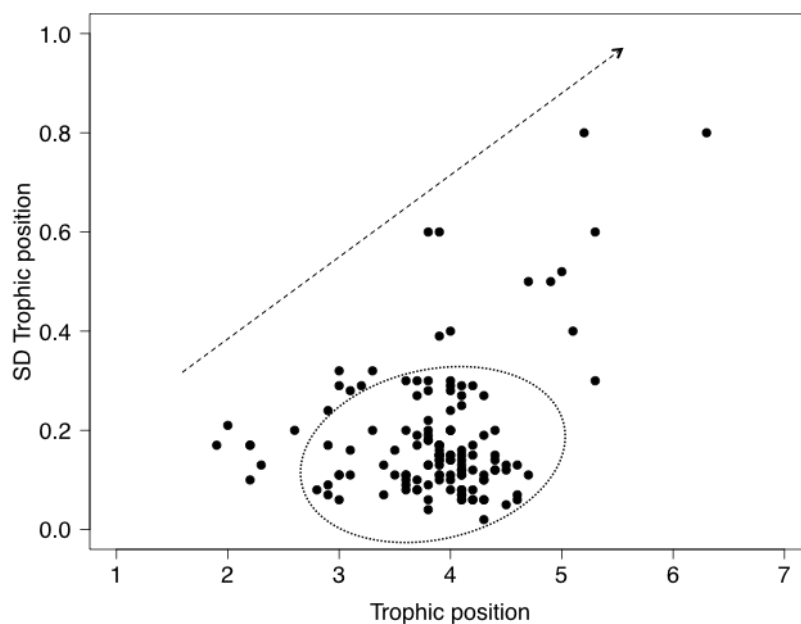


Figure VII-5 : Relation entre la position trophique (TP) dérivée des ratios isotopiques dans le muscle et l'écart-type (SD) de cette TP (considéré comme *a priori* proxy de l'omnivorie) pour chaque espèce analysée dans le Golfe de Gascogne. Si une légère tendance à l'augmentation du SD semble exister avec l'augmentation de la position trophique (flèche en pointillé), la corrélation entre les deux paramètres n'est pas significative du fait de la forte hétérogénéité des valeurs et de nombreuses valeurs de SD inférieures à 0,3 pour les espèces de niveau trophique compris entre 3,0 et 4,5 environ (cercle en pointillés).

VII.3 Apport de l'indicateur TP pour l'étude du comportement des contaminants dans les réseaux trophiques du Golfe de Gascogne : exemple du Hg

Pour les contaminants et plus précisément les métaux comme le Hg dont la bioamplification dans les réseaux trophiques marins est avérée (Cossa et al. 1990, Gray 2002), l'étude du transfert dans ces réseaux à l'aide des traceurs isotopiques et en incluant plusieurs niveaux trophiques est particulièrement appropriée (Vander Zanden et Rasmussen 1996, Wang 2002). Le calcul des TP réalisé précédemment, sur de nombreuses espèces provenant des différents environnements du Golfe de Gascogne (i.e., néritiques à océaniques), trouve donc ici tout son intérêt pour l'étude du comportement de ce métal non essentiel dans les différentes composantes biologiques du Golfe. L'influence de la TP sur les concentrations de Hg mesurées dans le muscle de plus de 1000 individus, appartenant à 120 espèces des différents réseaux du Golfe de Gascogne (à l'exception des mammifères marins), a ainsi été évaluée. L'influence d'autres facteurs comme l'habitat des organismes (déterminé par la

profondeur du chalutage lors de l'échantillonnage ; le détail des strates de profondeur est présenté dans la légende de la Fig. VII-6), la distribution verticale dans la colonne d'eau (i.e., pélagique vs. benthopélagique vs. benthique), ou encore l'appartenance à un grand groupe taxinomique (i.e., poissons osseux vs. poissons cartilagineux vs. crustacés vs. mollusques) a également été examinée. Cette étude fait précisément l'objet de l'**Annexe 9**.

VII.3.1 Un effet de la TP finalement assez limité et l'importance d'autres facteurs tels que l'habitat

Au sein des organismes analysés dans le Golfe de Gascogne, les concentrations de Hg varient de 39 ng.g⁻¹ poids sec en moyenne chez le pétoncle blanc *Aequipecten opercularis* à 5074 ng.g⁻¹ poids sec en moyenne chez le sagre commun *Etmopterus spinax* qui est un petit requin des profondeurs. D'une façon générale, les espèces appartenant aux catégories qui comprennent une plus grande proportion de consommateurs aux TP élevées présentent également les concentrations de Hg les plus élevées (i.e., les espèces prélevées dans les strates de profondeur > 200 m, les espèces benthopélagiques sur l'axe vertical de la distribution, et les espèces de poissons) (Fig. VII-6).

Cependant, dans le modèle GAM appliqué aux concentrations de Hg, l'effet de la TP des espèces n'est pas significatif ($p = 0,080$), malgré une p-value relativement faible. En fait, il existe bien une tendance à l'augmentation des concentrations de Hg avec la TP des espèces jusqu'à environ TP = 4,3, puis les concentrations de Hg peuvent être très variables chez les espèces de TP supérieure (Fig. VII-7). Ceci suggère **l'importance d'autres facteurs pour expliquer la variabilité des concentrations de Hg retrouvées chez les espèces analysées, notamment chez les organismes de TP supérieure**. L'effet des trois autres variables explicatives incluses dans le GAM s'est en effet révélé être largement significatif à chaque fois. La distribution verticale est le facteur qui contribue le plus à expliquer la variabilité des concentrations de Hg ($p < 0,0001$), suivie de l'habitat/profondeur d'échantillonnage ($p = 0,002$), enfin du groupe taxinomique ($p = 0,004$). Les espèces pélagiques analysées présentent des concentrations de Hg significativement plus faibles ($p = 0,013$) que les espèces benthiques et benthopélagiques. Les espèces pêchées au-delà de 200 m de profondeur, et les poissons cartilagineux (Chondrichthyens), présentent des concentrations de Hg significativement plus importantes que les espèces des strates moins profondes et que les

autres taxons ($p = 0,013$, $p = 0,023$ et $p = 0,047$ pour les espèces des strates profondes > 200 m, et pour les poissons cartilagineux, respectivement).

Enfin, à l'échelle de l'espèce, les individus des deux espèces relativement sessiles et de position trophique faible, prélevées à différentes profondeurs dans le Golfe de Gascogne (i.e., *P. maximus* et *S. lignarius*), montrent une différence significative des concentrations de Hg entre ceux pêchés proches de la côte et/ou sur le plateau continental, et ceux pêchés aux abords du talus (test de Wilcoxon, $p = 0,012$ et $p = 0,005$ pour *P. maximus* et *S. lignarius*, respectivement). Les individus prélevés à proximité de la côte et/ou sur le plateau continental présentent ainsi des concentrations de Hg plus faibles (moyennes de 44 ± 13 et 42 ± 14 ng.g⁻¹ poids sec pour *P. maximus* et *S. lignarius*, respectivement) que ceux pêchés aux abords du talus (moyennes de 103 ± 11 et 135 ± 45 ng.g⁻¹ poids sec pour *P. maximus* et *S. lignarius*, respectivement).

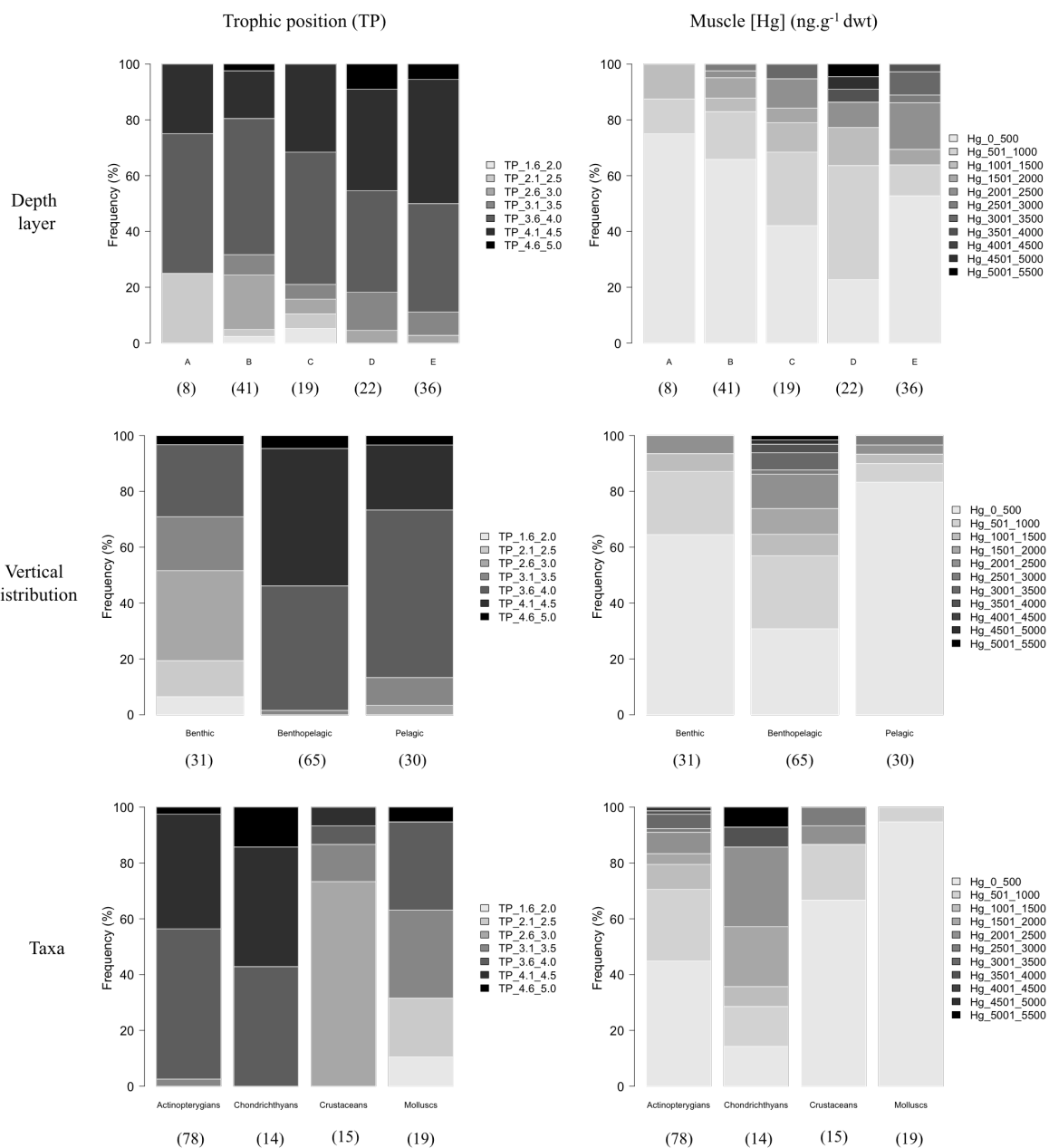


Figure VII-6 : Fréquence (en %) des différentes positions trophiques (TP) calculées et des différentes concentrations de Hg mesurées dans le muscle chez les différentes espèces composant les réseaux trophiques du Golfe de Gascogne. Les espèces sont classées selon leur strate/profondeur moyenne d'échantillonnage (i.e., profondeur sous le bateau à la remontée du chalut), leur distribution verticale dans la colonne d'eau, ou encore leur grand groupe taxinomique. Strates/profondeurs d'échantillonnage : A : ≤ 30 m ; B : 31-120 m ; C : 121-200 m ; D : 201-600 m ; E : > 600 m. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre d'espèces dans chaque catégorie.

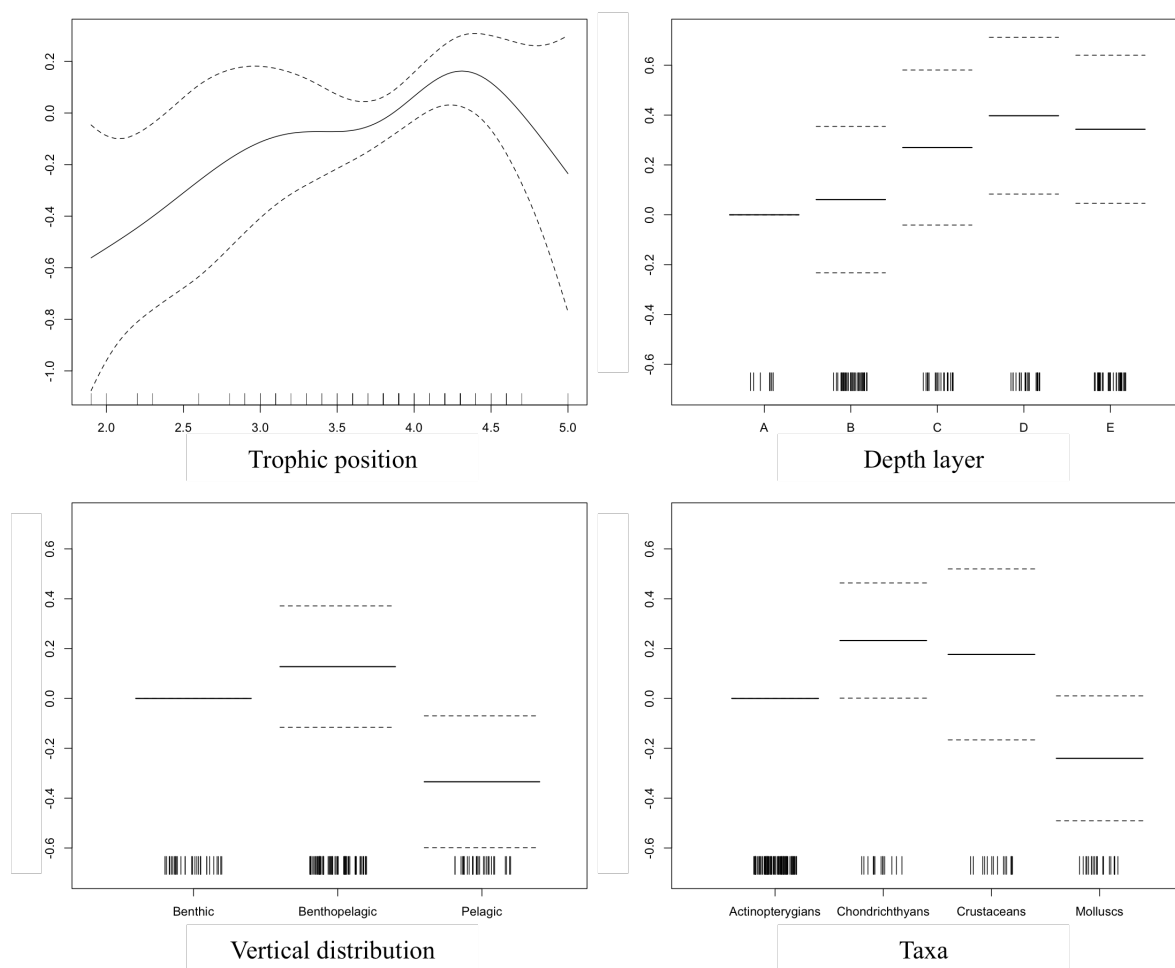


Figure VII-7 : Résultats issus du modèle GAM réalisé sur les concentrations de Hg (valeurs en log) dans le muscle de différentes espèces des réseaux trophiques du Golfe de Gascogne. Les concentrations de Hg ont ainsi été modélisées en fonction de la position trophique dérivée des ratios isotopiques pour chaque espèce (variable continue dont l'effet est représenté par un smoother), en fonction de la strate de profondeur de l'espèce lors de l'échantillonnage, de la distribution verticale dans la colonne d'eau de l'espèce, et de son grand groupe taxinomique (variables catégoriques/facteurs dont l'effet de chaque sous-catégorie est calculé par rapport à la première sous-catégorie, i.e., strate A, benthique et Actinoptérygiens, respectivement). Le modèle indique également l'effet global pour chaque variable et/ou facteur (voir texte), une fois l'effet des autres variables explicatives potentielles pris en compte par le modèle. L'axe des ordonnées correspond à la contribution du smoother et ainsi du facteur à la fonction prédictrice des concentrations de Hg (en unités arbitraires). Les lignes en pointillés représentent les intervalles de confiance à 95%.

VII.3.2 Discussion de ces résultats dans le contexte des traceurs écologiques

Le Hg est le seul métal dont la bioamplification dans les réseaux trophiques n'est aujourd'hui plus discutée (Gray 2002). Au regard de nos résultats, il est donc logique que les concentrations de Hg dans le muscle augmentent entre les consommateurs aux TP les plus faibles et ceux présentant des TP plus élevées (Fig. VII-6 et VII-7). Néanmoins, au-delà d'une certaine TP, c'est-à-dire chez les prédateurs supérieurs analysés en général (les mammifères marins n'étant cependant ici pas inclus), la variabilité des concentrations de Hg mesurées dans le muscle devient alors très importante, et la TP seule ne suffit plus pour expliquer les différences de concentrations retrouvées. Il est donc clair que malgré le fort potentiel de bioamplification du Hg dans les réseaux trophiques, d'autres facteurs jouent un rôle important, voire plus important, dans l'accumulation du Hg chez les consommateurs supérieurs. Ainsi dans notre étude, parmi les autres facteurs que la TP incluse dans le modèle, la distribution verticale apparaît comme le facteur le plus important des trois testés, suivie de la strate d'échantillonnage (*via* la profondeur sous le bateau lors des chalutages), et enfin du taxon. Cependant, l'importance de la distribution verticale est peut-être en partie biaisée par une répartition finalement assez subjective (néanmoins appuyée par l'analyse bibliographique) des espèces dans l'une ou l'autre des sous-catégories, i.e., pélagique *vs.* benthopélagique *vs.* benthique. Par exemple, certaines espèces peuvent effectivement effectuer des migrations spécifiques dans la colonne d'eau pour s'alimenter (e.g., migrations nyctémérales ; Roe et Badcock 1984). Pour les espèces très mobiles en général, il est ainsi toujours assez difficile d'être aussi catégorique sur leur répartition verticale, et beaucoup sont donc attribuées à la sous-catégorie "benthopélagique", dont de nombreux consommateurs supérieurs aux concentrations élevées. En revanche, la répartition des espèces dans une sous-catégorie, pour les strates de profondeur et le taxon, est totalement objective. L'effet de ces deux variables sur la variabilité des concentrations de Hg n'est donc pas discutable.

Dans le chapitre IV de ce manuscrit, nous avons déjà évoqué que le métabolisme au sens large du terme (comprenant ainsi les facteurs âge, mécanismes de régulation/de détoxification d'un métal, dilution possible *via* la croissance, etc.), ainsi que l'exposition *via* la nourriture (i.e., concentrations et biodisponibilité des métaux dans la nourriture, niveau trophique des proies) et/ou parfois, *via* le milieu abiotique également, étaient les deux grandes catégories de facteurs qui influencent généralement les concentrations de métaux accumulés chez les individus. L'importance relative du métabolisme par rapport à la nourriture reste néanmoins

souvent difficile à évaluer dans le cas des éléments traces, en tout cas en milieu naturel non contrôlé. Cependant pour le Hg, **l'âge** resterait un facteur déterminant pour l'accumulation du Hg dans le muscle chez de nombreux organismes marins (e.g., Monteiro et Lopes 1990, Rossi et al. 1993, Cronin et al. 1998).

Dans cette partie concernant le comportement du Hg dans les différents réseaux trophiques du Golfe de Gascogne (mammifères marins exclus), l'analyse des seuls individus adultes d'une façon générale ne nous affranchit malheureusement pas de ce facteur âge, étant donné les différences de longévité entre espèces (e.g., un anchois pourrait vivre 5 ans maximum, un chinchard jusqu'à 15 ans, une sole jusqu'à 25 ans environ ; données IFREMER). D'autre part, pour certaines espèces très étudiées (celles à forte valeur commerciale notamment), les relations taille-âge sont bien connues et permettraient de traduire la taille d'un individu en âge assez facilement. Cela n'est pas du tout le cas des espèces profondes encore très mal connues de ce point de vue en particulier. La lecture des stries de croissance sur les otolithes ou autres méthodes de détermination de l'âge sont effectivement encore très discutées chez ces espèces, notamment parce qu'il est très difficile ou impossible de déterminer expérimentalement la signification temporelle de ces stries de croissance (Allain et Lorance 2000, Cailliet et al. 2001). A ce sujet, le fait que les mollusques, et notamment les mollusques céphalopodes dont la TP est relativement élevée, présentent des concentrations de Hg faibles par rapport aux poissons de même TP élevée (ceux de la faune profonde en particulier), n'est peut-être pas sans lien avec l'âge. Les céphalopodes sont effectivement connus pour avoir une durée de vie relativement brève (i.e., une à quelques années pour la majorité des espèces, excepté le nautille qui pourrait vivre presque 20 ans ; Calow 1987, Wood et O'Dor 2000). En revanche, les poissons profonds (e.g., certains Sebastidae, ou l'empereur *Hoplostethus atlanticus*) pourraient vivre plus de 100 ans selon certains auteurs (Allain et Lorance 2000, Cailliet et al. 2001). C'est ce cycle de vie très lent, lié aux conditions du milieu, qui les rend d'ailleurs particulièrement vulnérables à une pêche intensive, les stocks se reconstituant lentement (Koslow et al. 2000, Roberts 2002).

De même que pour l'âge, d'autres facteurs "métaboliques" tels que les différents **processus de détoxification** mis en place par les différents organismes, ou des facteurs d'exposition tels que les **différents taux d'ingestion** des différents organismes, qui ont aussi un effet probablement important sur l'accumulation du Hg, n'ont pu être inclus dans le modèle. En modélisant les données de concentrations de Hg par GAM, nous estimons ainsi que les résidus du modèle (i.e., la part de la variabilité non expliquée par les variables explicatives incluses dans le

modèle) peuvent en partie refléter et/ou donner une idée de la part éventuellement expliquée par ces facteurs dont l'importance est difficilement quantifiable et/ou ne peut être contrôlée en milieu naturel. Ainsi, dans le modèle GAM réalisé sur les concentrations de Hg des 120 espèces analysées, en fonction de la TP des espèces, leur strate d'échantillonnage (i.e., profondeur) et leur distribution verticale dans la colonne d'eau (ces trois variables étant ainsi des proxies de la nourriture et/ou zone d'alimentation), enfin en fonction de leur groupe taxinomique (proxy du métabolisme général), **la variabilité des données de Hg expliquée n'est finalement que de 52,4%**. Cela suggère l'effet d'autres facteurs non rentrés dans le modèle tels que l'âge comme cela a été évoqué précédemment.

De plus, dans les eaux océaniques profondes peu oxygénées situées sous la thermocline, la méthylation du Hg (i.e., transformation en monométhyl-Hg) serait accrue (cf. chapitre II de ce manuscrit). Or, cette forme organique du Hg est la plus stable, la plus biodisponible et donc la mieux accumulée par les organismes marins (Fitzgerald et al. 2007). Cela pourrait alors également expliquer en partie une bioaccumulation du Hg plus importante par les organismes profonds, à cause d'une exposition plus importante en général. **Le Hg pourrait-il donc être considéré comme un traceur potentiel de la zone d'alimentation des organismes (i.e., néritique vs. océanique et/ou milieu profond) ?** Les concentrations de Hg restent cependant du même ordre de grandeur pour des espèces de niveau trophique similaire entre les deux environnements néritique et océanique (i.e., quelques dizaines à quelques centaines de ng.g^{-1} poids sec pour les espèces de niveau trophique intermédiaire, quelques milliers de ng.g^{-1} poids sec pour la plupart des espèces de haut niveau trophique ; cf. détails des concentrations par espèce dans le Tableau 1 de l'Annexe 9). **L'utilisation du Hg en tant que traceur reste donc encore peu convaincante.**

En revanche, nos résultats montrent une **bioaccumulation du Hg particulièrement accrue chez les espèces mésopélagiques, bathypélagiques et bathydémersales** du Golfe de Gascogne (Fig. VII-6 et VII-7). Ceci est cohérent avec d'autres études réalisées dans d'autres zones (Monteiro et al. 1996, Thompson et al. 1998, Choy et al. 2009), et cela est probablement lié à un effet important de l'âge des organismes dans ces milieux profonds qu'il faudrait pouvoir, à l'avenir, mieux évaluer. Ces résultats suggèrent également un **risque sanitaire vis-à-vis du Hg lié à la consommation de ces espèces des pêcheries profondes**, risque plus important que dans le cas de la consommation d'espèces néritiques.

VII.4 Quelles perspectives pour les indicateurs de structure et de fonctionnement des réseaux trophiques issus des traceurs écologiques ?

Notre étude de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques du Golfe de Gascogne, effectuée ici à partir des traceurs écologiques, a essentiellement reposé sur le calcul des TP dérivées des signatures isotopiques des différentes espèces analysées composant ces réseaux. Comme nous l'avons vu en introduction de ce chapitre, cet indicateur est effectivement à la base de nombreux concepts fondamentaux concernant la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques à l'échelle d'un écosystème, tels que la longueur des chaînes alimentaires. C'est aussi l'indicateur qui nous semblait le plus accessible à notre jeu de données actuel, étant donné le manque d'études isotopiques à aussi vaste échelle dans le Golfe de Gascogne au début de cette thèse. Cet environnement qui présente un contraste fort en termes de variations spatiales des signatures isotopiques a nécessité l'adaptation du calcul des TP des organismes au sein de cet écosystème.

D'après les TP dérivées des ratios isotopiques et corrigées ainsi de la variabilité spatiale, il est apparu que **les mammifères marins, dont la diversité est importante dans le Golfe de Gascogne, semblent fortement structurer les réseaux trophiques du Golfe** (Bowen 1997), puisqu'ils présentent les TP les plus élevées (Lesage et al. 2001). Cela ne s'oppose pas au fait qu'en termes de fonctionnement, le Golfe de Gascogne (sur sa partie continentale) serait un écosystème dominé par la biomasse bactérienne et son activité, et par les bas niveaux trophiques en général, soit un fonctionnement/contrôle de type "bottom-up" (Lassalle et al. sous presse). Les flux microbiens et les processus de régénération de la matière organique y sont effectivement importants, au moins au printemps et en été (Loyer et al. 2006, Marquis 2007). Enfin, la sédimentation des diatomées de grandes tailles provenant des blooms hivernaux approvisionnerait le milieu benthique, tandis que les petites espèces autotrophes des blooms printaniers, limitées par le phosphore, soutiendraient la production de petits poissons pélagiques (Marquis et al. 2011).

Pour approfondir l'étude des processus de fonctionnement des réseaux trophiques du Golfe de Gascogne à partir des données isotopiques, il aurait notamment été intéressant de pouvoir développer un indice (e.g., pourcentage) de dépendance des différents consommateurs analysés vis-à-vis de la production primaire benthique et/ou de la matière détritique *vs.* production primaire pélagique (e.g., Vander Zanden et Vadeboncoeur 2002, Sherwood et

Rose 2005, Le Loc'h et al. 2008). Malheureusement, notre échantillonnage n'était pas adapté pour cela. Il aurait effectivement fallu avoir une idée du gradient spatial pour le phytoplancton, et pour la matière benthique/détritique (en vérifiant s'ils existent bien), pour corriger cet indice de la même façon que pour le calcul de la TP. Le consommateur primaire représentatif de la POM dont nous disposions (*P. maximus*) représentait, à notre avis, un mélange des deux "productions" (c'est pourquoi il a d'ailleurs été choisi pour le calcul des TP comme évoqué précédemment). Le brouteur *S. lignarius* aurait pu être utilisé pour le gradient benthique, mais il nous manquait ainsi le gradient pour un "vrai" consommateur primaire pélagique (e.g., microzooplancton herbivore). Cela pourrait donc être développé à l'avenir.

Avec les données isotopiques, et sans disposer des données de biomasse, il est difficilement envisageable de calculer vraiment des flux de matière ou d'énergie entre les différents compartiments biologiques, à l'échelle d'un écosystème, comme permettent de le faire les modèles de type Ecopath ou d'analyse inverse. Néanmoins, **d'un point de vue de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques marins, les résultats isotopiques (et les TP dérivées) apportent des informations**, qui sont cohérentes avec ce qu'on peut obtenir avec d'autres méthodes (i.e., ces modèles de réseaux trophiques), notamment ici dans le cas du Golfe de Gascogne **en termes de FCL, d'omnivorie moyenne, et de liens trophiques fortement organisés en "réseau"**. D'autre part, notre travail constituant un premier jeu de données à aussi vaste échelle dans le Golfe de Gascogne (spatialement et taxinomiquement), il serait envisageable à l'avenir, à partir de nouvelles mesures, de développer les métriques proposés par certains auteurs à l'échelle des réseaux trophiques (e.g., Layman et al. 2007, Schmidt et al. 2007). Cela permettrait de suivre l'évolution dans le temps de ces réseaux trophiques, de leur structure et de leur fonctionnement sous-jacent. Ceci est d'autant plus approprié dans un contexte où la demande de suivi des écosystèmes marins, dont le Golfe de Gascogne, et ceci *via* des indicateurs, est complètement d'actualité (e.g., DCSMM, directive européenne introduite dans le chapitre I).

Il serait aussi intéressant, à l'avenir, de pouvoir distinguer les différents réseaux trophiques du Golfe de Gascogne, pour pouvoir mieux les comparer en termes de structure et de fonctionnement (e.g., plateau continental et milieu profond). Or, les données isotopiques révèlent un continuum de signatures entre les organismes néritiques et océaniques (cf. Fig. V-2 du chapitre V). En 2007, Vander Zanden et Fetzer soulignaient bien la difficulté fondamentale de définir des frontières entre environnements et réseaux trophiques dans les

systèmes ouverts, et l'importance de trouver des moyens innovants pour définir des frontières dans de telles situations.

L'analyse du Hg dans le muscle de différentes espèces de ces réseaux trophiques nous a effectivement montré qu'au-delà de la TP des organismes, d'autres facteurs tels que la zone d'alimentation et/ou l'habitat (i.e., facteurs d'exposition en général) jouaient un rôle important dans la bioaccumulation de ce métal non essentiel par les prédateurs supérieurs en particulier (et *in fine*, par les humains qui en consomment). **Les espèces profondes présentent ainsi les concentrations de Hg les plus élevées dans leur chair.** Pour confirmer ces résultats, il serait tout de même intéressant d'intégrer dans le modèle des données concernant les différentes espèces de mammifères marins présentes dans les différents environnements du Golfe de Gascogne. Dans ce cas en particulier et d'une façon générale, il faudrait également pouvoir mieux intégrer le facteur âge des individus dans le modèle, ainsi que, par exemple, les taux d'ingestion des différentes espèces. **L'étude du comportement des contaminants, et/ou leur évaluation en tant que traceurs potentiels de la zone d'alimentation en utilisant les données isotopiques (ici transformées en TP) apparaît en tout cas à encourager** (Broman et al. 1992, Cabana et Rasmussen 1994, Vander Zanden et Rasmussen 1996, Wang 2002).

√ Le concept de niveau trophique est un concept fondamental en écologie trophique et dans l'étude de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques au sein d'un écosystème. Les positions trophiques calculées à partir des ratios isotopiques, et corrigées du fort gradient spatial côte-large révèlent que dans cet écosystème : 1) **les mammifères marins sont un compartiment structurant** des réseaux trophiques, car ils présentent les positions les plus élevées ; 2) **les chaînes alimentaires sont relativement courtes** ; 3) **les chaînes alimentaires et les relations trophiques sont fortement organisées en "réseau"** ; 4) **le degré d'omnivorie est plutôt moyen dans l'écosystème**, plus élevé chez les prédateurs supérieurs en général, et assez hétérogène chez les niveaux trophiques intermédiaires. Ces résultats dérivés des signatures isotopiques d'une grande variété d'organismes des réseaux trophiques du Golfe sont ainsi en accord avec les prédictions d'un modèle Ecopath récemment développé pour la partie continentale française du Golfe de Gascogne.

√ Le fonctionnement et le contrôle général de cet écosystème étant de type « bottom up » d'après le modèle Ecopath, l'importance relative de la production primaire phytoplanctonique vs. production primaire benthique/matières détritiques sédimentées pour soutenir les niveaux trophiques supérieurs mériterait d'être quantifiée par approche isotopique, et d'être comparée aux résultats obtenus par d'autres méthodes. Cela n'a pu être développé ici. Cependant, **la forte structuration des chaînes alimentaires "en réseau" suggère l'importance des deux voies (production primaire et matière détritique ou régénérée) dans le fonctionnement général des différents réseaux trophiques du Golfe de Gascogne.**

√ La définition de frontières plus nettes entre les différents réseaux trophiques du Golfe de Gascogne mériterait également d'être développée, pour pouvoir mieux comparer les différents environnements qui le composent (i.e., plateau continental vs. milieu profond), notamment de ce point de vue de l'importance des différentes "productions" pour soutenir les niveaux trophiques supérieurs. Le continuum de signatures isotopiques selon le gradient côte-large démontré au chapitre V empêchant quelque peu l'approche isotopique de permettre de définir de telles frontières, d'autres approches sont ainsi requises.

√ L'analyse du comportement du Hg dans les différents réseaux trophiques du Golfe de Gascogne aurait pu initier cette délimitation entre les différents environnements, les **espèces prélevées dans les strates de profondeur > 200 m montrant une bioaccumulation plus accrue du Hg dans le tissu musculaire que les espèces côtières et/ou néritiques**. Cette différence est particulièrement importante chez les niveaux trophiques supérieurs. Cependant, les ordres de grandeur des concentrations rendent **l'utilisation du Hg en tant que traceur des zones d'alimentation/de l'habitat encore peu convaincante**. Le modèle d'accumulation mériterait notamment d'être amélioré par l'inclusion des différentes espèces de mammifères marins fréquentant les différents environnements du Golfe de Gascogne, mais aussi et surtout par une meilleure connaissance de l'âge des organismes (la détermination exacte de l'âge des espèces profondes restant encore assez discutée), ou encore une meilleure connaissance des taux d'ingestion et des mécanismes de détoxification.

Chapitre VIII

DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

VIII.1 Traceurs écologiques et réseaux trophiques complexes en environnement marin ouvert : un bilan général de cette étude dans le Golfe de Gascogne

La structure, le fonctionnement des réseaux trophiques, et les relations interspécifiques souvent complexes qui soutiennent ces réseaux constituent le support de processus majeurs ayant lieu au sein des écosystèmes (Polis et Strong 1996). Cependant, en environnement marin en particulier, l'étude des relations trophiques n'est d'une manière générale pas aisée. L'utilisation des traceurs écologiques et notamment des traceurs isotopiques s'est donc logiquement développée de façon considérable ces dernières années (Michener et Kaufman 2007). Les traceurs représentent effectivement une méthode d'étude indirecte de l'écologie trophique des organismes, sur la base du postulat « je suis ce que je mange ». Néanmoins, les valeurs de ces paramètres (bio)chimiques mesurés dans les tissus biologiques sont le résultat d'un ensemble de processus qui se déroulent en amont de l'incorporation des différents éléments dans la matière biologique analysée. Avant de pouvoir utiliser ces outils dans les environnements marins ouverts, présentant généralement de forts contrastes en termes d'hydrologie et une grande diversité biologique tels que le Golfe de Gascogne, nous faisons ainsi l'hypothèse que de nombreux facteurs de variations pouvaient mener aux valeurs de traceurs mesurées chez les consommateurs. En réponse aux objectifs annoncés, les résultats de ce travail de thèse ont ainsi permis de mieux comprendre ce que reflètent les valeurs de certains traceurs écologiques mesurés dans les tissus biologiques des consommateurs, pour tendre vers un « bon usage » et/ou un usage « raisonné » de ces outils aux différentes échelles d'intégration biologiques (i.e., de l'espèce aux différentes communautés d'un écosystème).

- ⇒ Dans un premier temps, une analyse bibliographique sur les différents traceurs écologiques potentiellement utilisables, et les études antérieures disponibles réalisées à partir de ces outils sur certains secteurs de la zone cible de cette thèse et/ou de ses composants biologiques (e.g., Le Loc'h 2004, Lahaye 2006), nous ont permis de nous orienter sur deux types de traceurs écologiques : **les isotopes stables du carbone et de l'azote et les éléments traces Hg et Cd**. Ces traceurs nous semblaient ainsi les plus pertinents à mettre en œuvre, en termes de temps et de coût notamment, sur les nombreux réseaux trophiques et compartiments biologiques envisagés dans ce travail (e.g., du domaine néritique au domaine océanique, du plancton aux mammifères marins). Puis, quelques aspects techniques concernant la conservation et la préparation des échantillons pour analyse ont été étudiés. Les résultats des tests effectués ont ainsi suggéré, d'une façon générale, de favoriser la conservation à -20°C pour les deux types d'analyses envisagés, et la délipidation au cyclohexane des échantillons avant l'analyse isotopique en particulier.
- ⇒ Dans un second temps, nous avons exploré l'importance de certains **facteurs de variations biologiques, à l'échelle des individus et de celle de l'espèce, pour les deux types de traceurs choisis**. À ces échelles d'intégration biologique, deux grandes catégories de facteurs de variations ont ainsi été identifiées et considérées : les facteurs métaboliques au sens large du terme (e.g., croissance des individus, ou physiologie différente entre espèces), et les facteurs d'exposition *via* la nourriture (e.g., changement de régime alimentaire des individus et différence de stratégies alimentaires entre espèces au cours de l'ontogénèse, ou encore différence de qualité de l'alimentation entre espèces). Par une approche s'intéressant tout d'abord à la variabilité intraspécifique puis à la variabilité interspécifique des valeurs de traceurs, à la lumière des facteurs de variations possibles décrits ci-dessus, **les résultats obtenus nous ont confortés dans l'utilisation approfondie des traceurs isotopiques pour la suite de l'étude**. Nous les avons d'ailleurs finalement utilisés pour mieux comprendre, *in fine*, le transfert de certains métaux (i.e., le Hg) dans les réseaux trophiques du Golfe de Gascogne.
- ⇒ L'importance de certains **facteurs de variations environnementaux a ensuite été explorée, à l'échelle des réseaux trophiques et de celle de l'écosystème, pour les**

traceurs isotopiques. La variabilité spatio-temporelle des signatures isotopiques a donc été étudiée grâce à l'analyse de plus de 140 espèces provenant des différents réseaux trophiques du Golfe de Gascogne, couvrant ainsi une vaste échelle spatiale, une vaste gamme d'habitats, et une vaste gamme de taxons représentatifs de la diversité biologique de cet écosystème. L'influence des panaches fluviaux, et celle des courants de pente et/ou upwellings en bord de plateau, ont été suggérées comme principaux déterminants des **variations spatiales mises en évidence**. Il est également apparu que l'impact des blooms phytoplanctoniques n'était pas à négliger, notamment pour leur rôle dans la transmission des variations induites dès la base dans les différents réseaux trophiques. Étudiée sur quelques espèces fourrages, la variabilité temporelle a également été avérée, mais elle s'est révélée moins importante en termes d'implication pour la suite de l'étude que les variations spatiales, aux échelles d'intégration (e.g., réseaux trophiques) considérées dans cette étude.

- ⇒ Une fois les **facteurs de variations étudiés intégrés** dans la suite de l'étude, nous avons démontré la possibilité d'entreprendre, par exemple, des modèles de mélange plus rigoureux pour traiter les données isotopiques en environnement marin ouvert contrasté. Les modèles de mélange permettent d'avoir une approche plus quantitative dans la description de la niche trophique de consommateurs d'intérêt, ou pour l'étude des relations interspécifiques telles que la prédation et la compétition par approche isotopique. **Les résultats des modèles de mélange réalisés à plusieurs échelons des réseaux trophiques, en intégrant la variabilité auparavant démontrée, sont ainsi apparus cohérents lorsqu'ils étaient comparés à d'autres méthodes d'étude du régime alimentaire des organismes** (e.g., analyse des contenus stomacaux). Dans cette partie, l'importance de considérer des facteurs d'enrichissement trophiques ou TEFs appropriés à chaque grand type de consommateur, a également été démontrée.
- ⇒ De même, une fois **l'ensemble des facteurs de variations étudiés intégrés**, et malgré les précautions que cela impose de prendre, nous avons démontré la possibilité de calculer les positions trophiques (TP) de la variété d'organismes composant les différents réseaux trophiques de tels écosystèmes. La TP des organismes est effectivement une donnée fondamentale en écologie trophique et pour l'étude de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques. Ainsi, **dans le Golfe de Gascogne, l'analyse des TP calculées à partir des signatures isotopiques a permis**

de mettre en évidence plusieurs caractéristiques des réseaux trophiques de cet écosystème. Par ailleurs, ces résultats issus des données isotopiques corrigées des facteurs de variations possibles sont apparus cohérents avec ceux du modèle écosystémique Ecopath récemment réalisé sur la partie plateau continental du Golfe de Gascogne.

⇒ Enfin, **l'étude du comportement du Hg dans les différents réseaux trophiques de cet environnement marin ouvert et contrasté a pu être envisagée** (mammifères marins exclus). L'analyse du Hg dans le muscle de 120 espèces a permis de mettre en évidence, d'une façon générale, un effet limité de la TP des organismes pour l'accumulation du Hg, et l'importance de l'habitat. En effet, **une bioaccumulation accrue du Hg dans le muscle des espèces mésopélagiques, bathypélagiques et bathydémersales du Golfe de Gascogne a été révélée**, apportant des résultats nouveaux concernant l'état de contamination en Hg des différentes communautés en présence dans cet écosystème d'intérêt. D'autres facteurs d'exposition ou métaboliques que ceux testés (i.e., autres que la TP, la distribution spatiale et le taxon), non étudiés ici pour des raisons de non disponibilité des données, amélioreraient probablement le modèle de bioaccumulation. Cela inclurait par exemple la connaissance précise de l'âge des organismes, de leurs taux d'ingestion et d'assimilation, ou encore les mécanismes de détoxification qu'ils mettent en œuvre à l'échelle spécifique.

VIII.2 Les limites de l'approche aux échelles d'intégration envisagées

VIII.2.1 Des limites inhérentes à la volonté d'échantillonner un écosystème complexe

Lorsque l'on veut reconstruire les réseaux trophiques d'un écosystème à l'étendue spatiale particulièrement importante, pour en étudier la structure et le fonctionnement, un échantillonnage exhaustif des différentes espèces composant ces réseaux n'est évidemment pas envisageable et ceci pour plusieurs raisons.

Pour prélever les différents composants biologiques de l'écosystème d'intérêt de cette étude (i.e., le Golfe de Gascogne), nous nous sommes logiquement appuyés sur les campagnes

menées annuellement dans la zone pour l'évaluation des ressources halieutiques en présence, et de la faune associée (i.e., campagnes EVHOE et PELGAS de l'IFREMER décrites en chapitre III de ce manuscrit). Ainsi, **l'image que l'on peut avoir des communautés biologiques composant les différents réseaux trophiques, et l'accès aux différentes espèces de cet écosystème, dépendent fortement des stratégies et des protocoles d'échantillonnage mis en œuvre dans le cadre de ces campagnes.** Les engins de pêche utilisés, le type de chalutage (i.e., chalutage de fond pour EVHOE, pélagique pour PELGAS), le nombre de traits effectués dans chaque strate bathymétrique, la durée de ces traits, et donc l'effort global de pêche et l'échelle spatiale couverte d'une année sur l'autre par ces campagnes conditionnent inéluctablement les espèces et/ou les stades de vie des espèces accessibles pour notre propre échantillonnage. De ce fait, dans notre étude par exemple, nous n'avons pu disposer des grands prédateurs océaniques de type grands thons ou espadons qui fréquentent également le Golfe de Gascogne. D'autre part, ces campagnes étant effectuées chaque année à la même saison par souci de comparaison et de suivi de l'évolution des ressources halieutiques dans le temps (i.e, automne pour EVHOE, printemps pour PELGAS), la fenêtre temporelle couverte peut aussi empêcher ou favoriser, par exemple, l'échantillonnage d'espèces migratrices qui ne sont présentes que saisonnièrement dans la zone d'étude.

De même, **l'échantillonnage des mammifères marins**, qui jouent pourtant un rôle majeur dans les écosystèmes marins (Bowen 1997), et qui représentent un groupe d'espèces à la diversité particulièrement importante dans le Golfe de Gascogne (Kiszka et al. 2007, Certain et al. 2008), ne pouvait être envisagé par les campagnes évoquées ci-dessus. Le prélèvement de ces échantillons a donc été rendu possible par l'effort constant du Réseau National d'Echouages, qui depuis plus de trente ans collecte des tissus biologiques sur les animaux retrouvés échoués sur l'ensemble des côtes françaises ou capturés accidentellement dans les pêcheries côtières. Cependant, l'échantillonnage n'est encore une fois qu'en partie maîtrisé (e.g., choix possible d'individus retrouvés en bon état nutritionnel), puisqu'il **dépend grandement de la fréquence d'échouage de chaque espèce.** De plus, la **représentativité des échouages** vis-à-vis de la communauté de mammifères marins présente en mer (et donc la communauté réellement dépendante, *a priori*, des réseaux trophiques que nous souhaitions étudier), est encore une question en cours d'étude.

VIII.2.2 Des limites inhérentes à la considération d'une grande diversité biologique associée à ces écosystèmes complexes

Une fois réalisée l'optimisation de la représentativité de nos prélèvements vis-à-vis des différents taxons importants de l'écosystème (e.g., prélèvement des espèces qui apparaissent régulièrement, et en quantité significative, d'années en années lors des campagnes), se pose alors la question de la **comparabilité de ces différentes espèces pour une étude à partir des traceurs écologiques**. Le choix d'un même tissu pour toutes les espèces permet, par exemple, de limiter certains biais en termes de propriétés biochimiques et de routing isotopique (Cherel et al. 2005, 2009). Cependant, **la physiologie et le métabolisme sont évidemment très différents** entre une espèce de cétacé et un petit crustacé, et l'information sur le régime alimentaire intégrée dans le tissu choisi ne correspondra pas tout à fait à la même fenêtre temporelle. Pour limiter ce biais, le choix d'un tissu intégrateur sur une fenêtre temporelle assez longue et moins variable à court terme (i.e., le muscle blanc), à l'échelle de chaque organisme, est donc généralement de rigueur et/ou recommandé pour l'étude de réseaux trophiques dans leur ensemble à partir de l'outil isotopique (e.g., Hobson et Welch 1992, Pinnegar et Polunin 1999). C'est donc ce que nous avons choisi de faire. D'autre part, il existe encore un manque évident dans la littérature de données expérimentales sur lesquelles s'appuyer pour traiter les données isotopiques *in situ* (Gannes et al. 1997, Martínez del Rio et al. 2009). **Les connaissances sont effectivement encore trop limitées en ce qui concerne la dynamique d'incorporation des différents isotopes dans les tissus, le routing isotopique, ou encore la précision des TEFs** entre les différences sources potentielles et les tissus des différents consommateurs qui peuvent être considérés dans de tels écosystèmes marins. Or, nous avons vu que ces TEFs ont une importance considérable lors de l'utilisation de modèles de mélange, par exemple. Enfin, dans les écosystèmes marins ouverts et complexes tels que le Golfe de Gascogne, il semble évident que **les traceurs isotopiques seuls ne peuvent permettre de décrypter finement l'écologie alimentaire des consommateurs de haut niveau trophique en particulier, qui sont souvent des espèces très mobiles** (e.g., mammifères marins), **et/ou omnivores** (i.e., se nourrissant sur plusieurs niveaux trophiques). Leur signature isotopique représente effectivement un mélange complexe de toutes les sources de variations possibles, et notamment celles qui affectent les niveaux inférieurs eux-mêmes. Il est alors **nécessaire de coupler l'approche isotopique avec**

d'autres méthodes d'étude du régime alimentaire et/ou d'autres traceurs, pour ces espèces en particulier.

Enfin, **pour les métaux** non essentiels tels que le Hg ou autres contaminants, **leur utilisation en tant que traceurs est encore compliquée par les mécanismes de régulation** de ces molécules mis en place par les organismes au cours de l'évolution, et qui peuvent être **très différents selon les espèces**. Ces mécanismes de régulation vont ainsi conditionner le stockage du métal dans certains organes (variables selon les organismes), et/ou l'excrétion du métal (e.g., Rainbow 2002). Dans le cas du Hg, pour optimiser la comparaison entre espèces, nous avons donc choisi un tissu (i.e., le muscle) dans lequel le métal s'accumule de façon relativement prévisible. Sous sa forme principalement bioaccumulable qu'est le méthyl-Hg, le Hg se lie effectivement aux protéines, permettant ainsi une rétention importante du métal dans le tissu musculaire de nombreux organismes marins (Bloom 1992, Neff 2002, Bustamante et al. 2006). Cependant, cela n'empêche pas la possibilité d'une dynamique de bioaccumulation du Hg dans l'organisme et des transferts vers le muscle sensiblement différents au sein de la variété d'espèces et/ou taxons considérés dans cette étude.

D'une façon générale, malgré ces limites, les analyses statistiques effectuées sur un nombre conséquent d'espèces et/ou d'individus dans chaque partie de la thèse, ainsi que leur significativité élevée, nous permettent de soutenir les conclusions avancées.

VIII.3 Vers un « bon usage » des traceurs écologiques

VIII.3.1 La petite sépiole ne mange pas le cachalot

Dans le Golfe de Gascogne, nous aurions pu conclure que la sépiole se nourrit du cachalot si nous avions utilisé : 1) les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ directement mesurées dans les tissus de ces deux espèces provenant du Golfe de Gascogne ; 2) une même ligne de base pour le calcul de leur TP respective dans cet environnement marin ouvert ; 3) le même TEF en $\delta^{15}\text{N}$ pour ces deux consommateurs ; 4) ou encore, les TEFs considérés comme "universels" pour entreprendre un modèle de mélange par exemple (i.e., 0,4‰ en $\delta^{13}\text{C}$ et 3,4‰ en $\delta^{15}\text{N}$ selon Post 2002a). De cette façon, la sépiole *Sepiolo atlantica* ($\delta^{13}\text{C}$: $-16.3 \pm 0.0\text{‰}$; $\delta^{15}\text{N}$: $15.1 \pm 1.0\text{‰}$), mollusque céphalopode de taille maximale égale à 5 cm, aurait effectivement

été positionnée plus d'un niveau trophique au-dessus du cachalot *Physeter macrocephalus* ($\delta^{13}\text{C}$: $-16.5 \pm 0.0\text{‰}$; $\delta^{15}\text{N}$: $11.1 \pm 1.0\text{‰}$), cétacé pouvant mesurer entre 11 et 16 m en moyenne selon le sexe, ce qui est évidemment un non-sens total. Avant d'étudier l'écologie trophique d'espèces d'intérêt à partir de l'outil isotopique, ou de décrypter la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques dans un écosystème aussi contrasté que le Golfe de Gascogne, il était donc primordial d'identifier les facteurs gouvernant cet outil, et d'avoir une idée plus juste de la signification des valeurs de traceurs mesurés dans les tissus des organismes. Ainsi, dans le cas du cachalot, il est vraisemblable que de telles valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ retrouvées chez cette espèce sont en partie dues : 1) au métabolisme spécifique des mammifères (i.e., le TEF en $\delta^{15}\text{N}$ approprié à ce taxon étant probablement inférieur au 3,4‰ théorique) ; 2) probablement couplé à un métabolisme spécifique aux cétacés « grands plongeurs » et/ou à la qualité de leur alimentation, ces espèces étant souvent considérées comme teuthophages (i.e., nous avons vu que ces espèces présentent de ce fait un tissu musculaire particulièrement enrichi en ^{13}C , en comparaison avec d'autres taxons et avec la zone d'alimentation généralement décrite pour ces espèces) ; 3) enfin, sans aucun doute en grande partie à la variation spatiale très importante des signatures en $\delta^{15}\text{N}$ en particulier, dès la base des différents réseaux trophiques, démontrée dans le Golfe de Gascogne (et qui affecte ainsi également la valeur de $\delta^{15}\text{N}$ de la sépiole).

VIII.3.2 Un schéma conceptuel pour une utilisation « raisonnée » des traceurs isotopiques et métalliques en environnement marin ouvert

Évaluer le potentiel et les limites des outils choisis pour tendre davantage, à l'avenir, vers un « bon usage » de ces traceurs écologiques, est important pour éviter le risque, notamment, de tirer des conclusions écologiques erronées, comme nous venons de le voir avec l'exemple (certes, extrême) de la sépiole et du cachalot. Les résultats obtenus permettent ainsi de compléter le schéma conceptuel présenté en introduction générale de ces travaux de thèse, soit un **schéma de l'utilisation possible des traceurs écologiques dans un contexte où de nombreuses sources de variations des valeurs mesurées sont attendues** (e.g., en environnement marin ouvert et contrasté d'un point de vue hydrologique et biologique ; Fig. VIII-1).

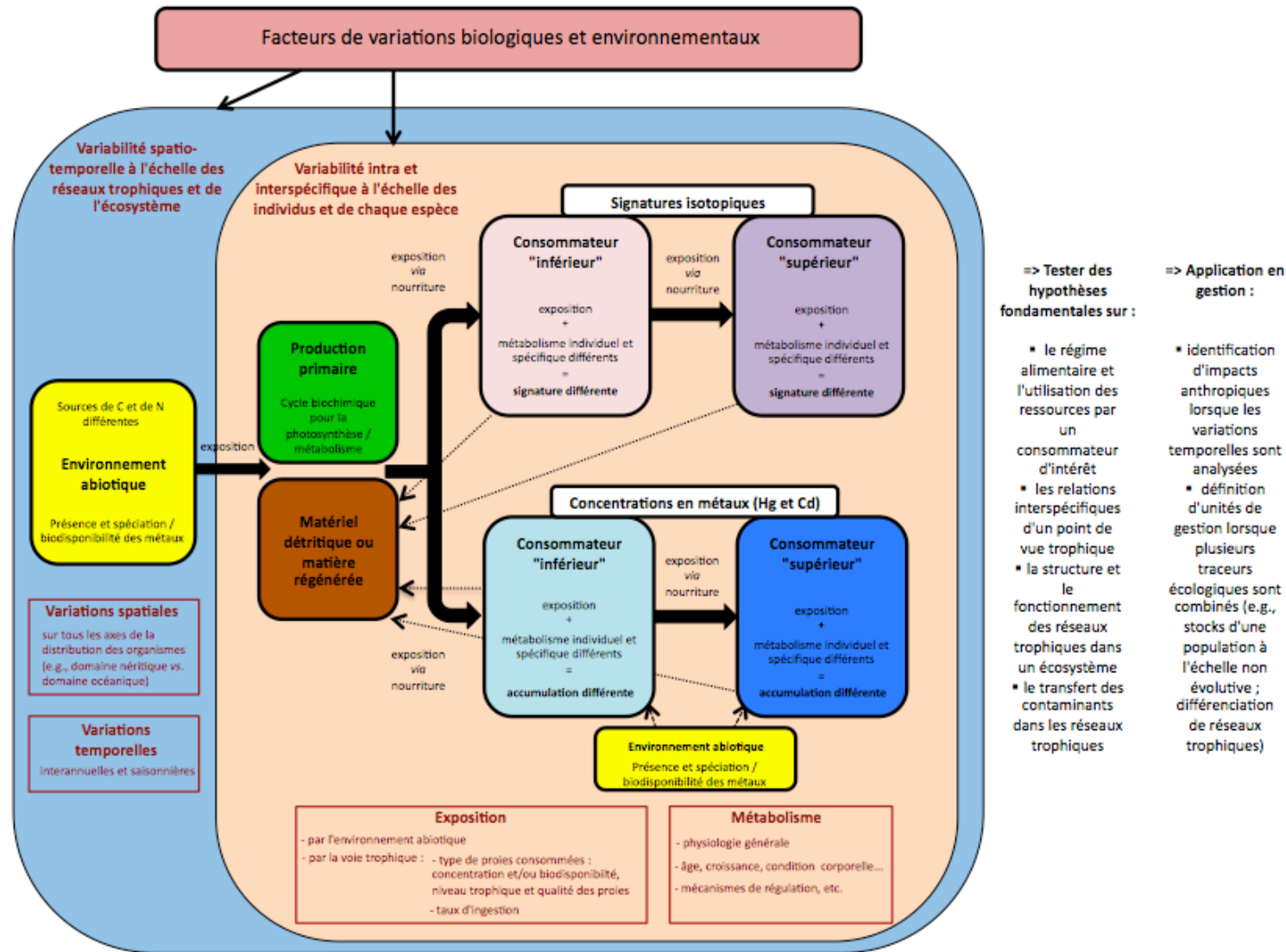


Figure VIII-1 : Schéma conceptuel de l'utilisation possible des traceurs écologiques, dans un contexte où de nombreuses sources de variations des valeurs mesurées dans les tissus biologiques sont attendues (e.g., en environnement marin ouvert et contrasté d'un point de vue hydrologique et biologique). Les grandes catégories de facteurs de variations identifiées au cours de cette thèse sont indiquées pour, et au sein de chaque type de compartiment de l'écosystème ici simplifié. Une liste non exhaustive de "sous-facteurs" de variations entrant dans chacune des grandes catégories et pouvant être considérés, est également donnée (éléments en rouge foncé).

Dans le cas des traceurs isotopiques, la voie unique de transfert de la matière organique, dont les éléments carbone et azote sont analysés, est la voie trophique. Dans le cas des métaux étudiés au cours de cette thèse (i.e., Hg et Cd), la voie trophique représente également une voie importante, voire principale, pour le transfert de ces éléments lorsqu'ils sont sous une forme biodisponible. Pour l'utilisation de ces deux types de traceurs en écologie trophique, nous avons ainsi identifié et/ou étudié plusieurs facteurs de variations pouvant affecter les valeurs de ces paramètres (bio)chimiques mesurés dans les tissus biologiques (Fig. VIII-1 : éléments en rouge foncé) :

- À l'échelle des individus et de l'espèce, deux grandes catégories de facteurs de variations doivent ainsi être prises en compte lors de l'étude de l'écologie trophique d'une espèce, ou de sa stratégie alimentaire au cours de l'ontogénèse, ou encore de ses relations trophiques avec les autres espèces : les facteurs métaboliques et les facteurs d'exposition, dont une liste non exhaustive est présentée Fig. VIII-1.

- À l'échelle d'une communauté, d'un réseau trophique, ou d'un écosystème, ces mêmes facteurs métaboliques et d'exposition doivent être pris en compte, puisque dans ces cas d'étude, différentes espèces et/ou individus sont amenés à être comparés. Cependant, d'autres facteurs de variation tels que la variabilité spatio-temporelle de l'environnement, doivent être envisagés. Cette variabilité spatio-temporelle, qui trouve son origine dès la base des différents réseaux trophiques, peut en effet se transmettre à plus ou moins long terme dans les différents compartiments biologiques considérés.

Une fois ces différents facteurs de variations possibles intégrés, la compréhension de la significativité des différentes valeurs mesurées est améliorée, et les traceurs écologiques peuvent alors offrir des opportunités prometteuses en recherche fondamentale ou appliquée (une liste non exhaustive est présentée Fig. VIII-1). Dans le cas où certains facteurs de variations ne pourraient être testés, ils peuvent tout au moins être discutés. Cependant, pour certains facteurs tels que la variabilité spatiale dans notre cas, nous avons vu qu'ils ne peuvent être ignorés. Ils peuvent effectivement avoir des conséquences importantes en termes de résultats : par exemple, pour le calcul des positions trophiques des organismes. Dans cette étude, cela a ainsi été montré pour le Golfe de Gascogne, mais cela a également été démontré pour d'autres environnements marins ouverts sur l'océan (e.g., région de Terre Neuve et du Labrador, Sherwood et Rose 2005), des environnements marins plus fermés (e.g., mer

Baltique, Hansson et al. 1997), ou encore des écosystèmes lacustres (e.g., lacs du nord canadien, Vander Zanden et Rasmussen 1999).

VIII.4 Les traceurs écologiques dans le contexte d'un besoin d'indicateurs et d'outils de suivi de la structure, du fonctionnement, et de l'état des écosystèmes marins

Le maintien de la structure et du fonctionnement des écosystèmes marins pour pérenniser les biens et services qu'ils procurent est devenu aujourd'hui une priorité. Actuellement, par le biais de diverses politiques publiques et de Directives Cadres, les scientifiques doivent ainsi être en mesure : 1) d'apporter la connaissance nécessaire à la gestion et au maintien de l'intégrité des écosystèmes marins ; 2) de fournir des outils de diagnostic permettant d'évaluer des changements dans la structure et le fonctionnement de ces écosystèmes marins, ces changements pouvant notamment être liés aux activités anthropiques. Pour remplir de tels objectifs, par exemple dans le contexte de la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM) mise en œuvre en 2008 concernant les écosystèmes marins européens, Borja et al. (2010, 2011) soulignent : 1) qu'il est nécessaire d'avoir des approches cohérentes et des principes constants pour mettre en place les critères et les cibles permettant de définir et/ou de maintenir le « bon état écologique » (BEE) de ces écosystèmes, et ce malgré des différences de structure et de fonctionnement ou encore d'activités anthropiques entre aires marines ; 2) qu'il est nécessaire de disposer de suffisamment de données concernant tous les descripteurs proposés pour l'évaluation du BEE dans les différents écosystèmes ; autrement, les indicateurs au sein de chaque descripteur deviennent peu fiables et cela rend difficile la classification finale de ces écosystèmes.

Dans ce contexte, les traceurs écologiques ont donc un potentiel certain : 1) de par leur valeur d'indicateurs du transfert de la matière organique ou d'éléments chimiques dans les différents compartiments biologiques ; 2) de par la valeur même des paramètres (bio)chimiques mesurés dans les tissus biologiques. Si l'on se base par exemple sur les onze descripteurs envisagés par la DCSMM pour définir et maintenir le BEE des écosystèmes marins (Commission européenne 2008, 2010), l'utilisation des traceurs isotopiques et métalliques mérite alors d'y contribuer dans le cadre d'au moins cinq descripteurs :

- Descripteur 2 : "*les espèces non indigènes introduites par le biais des activités humaines sont à des niveaux qui ne perturbent pas l'écosystème*". Par un suivi régulier de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques d'un écosystème par traçage isotopique naturel, en envisageant par exemple l'analyse régulière des signatures de plusieurs espèces caractéristiques de cet écosystème (i.e., toujours les mêmes espèces et couvrant les différents niveaux trophiques potentiels), le maintien ou à l'inverse des changements dans la structure et le fonctionnement trophiques de l'écosystème d'intérêt pourraient être détectés (e.g., Vander Zanden et al. 1999).

- Descripteur 4 : "*tous les éléments constituant le réseau trophique marin, dans la mesure où ils sont connus, sont présents en abondance, avec une diversité normale, et à des niveaux pouvant garantir l'abondance des espèces à long terme et le maintien total de leurs capacités reproductives. Ce descripteur concerne d'importants aspects fonctionnels tels que les flux d'énergie et la structure du réseau trophique (taille et abondance). Il est nécessaire de consolider les connaissances scientifiques et techniques à ce stade afin de mettre au point des indicateurs potentiellement utiles, ainsi que des critères permettant de traiter les relations au sein du réseau trophique*". De même que précédemment, les traceurs isotopiques en particulier peuvent apporter des connaissances non négligeables sur ces aspects (i.e., structure et fonctionnement des réseaux trophiques en termes de niveaux trophiques, d'omnivorie des espèces en présence, etc.), comme nous l'avons vu pour le Golfe de Gascogne dans le cadre de cette thèse.

- Descripteur 5 : "*l'eutrophisation d'origine humaine, en particulier pour ce qui est de ses effets néfastes, tels que l'appauvrissement de la biodiversité, la dégradation des écosystèmes, la prolifération d'algues toxiques et la désoxygénation des eaux de fond, est réduite au minimum*". La connaissance et le suivi des signatures des différentes sources de matières azotées potentiellement introduites dans le milieu (e.g., rejets agricoles et industriels, aquacoles ou encore effluents d'égouts), ainsi que les signatures de quelques espèces soumises à ces influences (i.e., espèces estuariennes ou très côtières), pourraient permettre de suivre l'évolution de l'eutrophisation de zones côtières d'intérêt, et/ou comparer les zones à risque entre elles (e.g., McClelland et al. 1997, McClelland et Valiela 1998, Vizzini et Mazzola 2004).

- Descripteur 8 : "*le niveau de concentration des contaminants ne provoque pas d'effets dus à la pollution*". Lors de l'utilisation de traceurs métalliques par exemple, les concentrations en

métaux mesurées pourraient être comparées aux valeurs définies qui peuvent induire des effets sur les organismes marins, disponibles dans la littérature ; les sources potentielles de pollution pourraient aussi, éventuellement, être caractérisées (e.g., Caurant et al. 2006).

- Descripteur 9 : "*les quantités de contaminants présents dans les poissons et autres fruits de mer destinés à la consommation humaine ne dépassent pas les seuils fixés par la législation communautaire ou les autres normes applicables*". De même que précédemment, lors de l'utilisation de traceurs métalliques, il serait possible de calculer, à partir des concentrations en métaux mesurées dans les tissus biologiques, le risque sanitaire encouru par une exposition aiguë (dépassement des seuils définis par l'UE) et chronique (dépassement de la Dose Hebdomadaire Tolérable définie par l'OMS) à ces contaminants (e.g., Pierce et al. 2008, Chauvelon et al. 2009).

VIII.5 Perspectives

Au cours de la thèse, notamment suite aux premiers résultats obtenus, une attention plus particulière a finalement été portée au potentiel et aux limites de l'outil isotopique dans le contexte de recherche actuel, par rapport aux traceurs métalliques. Cependant, de nombreux aspects concernant l'utilisation des traceurs isotopiques restent encore à approfondir. La plupart des perspectives annoncées ci-dessous se rapportent donc à cet outil, qui apparaît effectivement comme un outil prometteur en écologie en général (West et al. 2006) et en écologie trophique en particulier.

VIII.5.1 Perspectives à l'échelle d'une ou quelques espèces

Affiner notre compréhension de la part du métabolisme, par rapport à celle de l'alimentation, menant à des valeurs particulières de ratios isotopiques mesurés chez les différentes espèces

Pour utiliser les traceurs isotopiques de façon pertinente, nous avons vu qu'il était notamment important de pouvoir estimer le rôle du métabolisme ou de la physiologie des espèces, par rapport à celui de l'alimentation, pour vraiment comprendre ce que reflètent les

valeurs des paramètres mesurés dans les tissus de différentes espèces. Pour cela, la première approche qui doit être envisagée est l'approche expérimentale en conditions contrôlées (Gannes et al. 1997, Martínez del Rio et al. 2009), qui permet par exemple d'estimer le taux de renouvellement des éléments dans les tissus, les TEFs, etc. Pour certains modèles biologiques, cette approche reste cependant difficilement envisageable (e.g., mammifères marins, grands poissons, etc.). Chez ces dernières espèces, le couplage de plusieurs types de données *in situ* pourrait ainsi être envisagé pour dégager, éventuellement, différents profils d'espèces en termes d'impact de la physiologie sur la capacité des isotopes stables à refléter l'alimentation, tels que : 1) des données issues de la littérature en termes de performance de locomotion ou de capacité de plongée, ou encore de régulation de la température corporelle de ces espèces ; 2) des données de régime alimentaire et de qualité de l'alimentation ; 3) la mesure d'indicateurs moléculaires de « coûts d'existence » dans le tissu musculaire (Spitz 2010) ; 4) la mesure de la différence de valeurs des ratios isotopiques mesurés dans différents tissus ; etc. C'est ce que nous avons commencé à entreprendre pour les différentes espèces de mammifères marins du Golfe de Gascogne en chapitre IV de ce manuscrit, pour lesquelles l'ensemble de ces données était effectivement disponible. Cette approche pourrait ainsi être développée chez d'autres taxons pour mieux interpréter et exploiter les données isotopiques à l'avenir (poissons, céphalopodes, crustacés).

Approfondir l'étude de la plasticité alimentaire chez des espèces d'intérêt d'un écosystème à partir des traceurs isotopiques

Dans cette étude, la volonté initiale était d'avoir une approche à l'échelle de l'écosystème de l'utilisation des traceurs en écologie trophique, en utilisant généralement un seul tissu pour les mesures, c'est-à-dire le muscle, pour comparer les différentes espèces composant les réseaux trophiques en question. Ceci n'a donc pas permis d'avoir le degré de finesse requis pour l'étude approfondie de la plasticité alimentaire d'une espèce ou de quelques espèces. Cela est pourtant envisageable avec les traceurs isotopiques lorsqu'ils sont mesurés dans plusieurs tissus biologiques, chez de nombreux individus d'une espèce (eg., Dalerum et Angerbjörn 2005). En effet, la distinction entre les différents types de généralisme, ou le spécialisme de l'espèce étudiée serait alors possible (Bearhop et al. 2004). De plus, le traçage isotopique naturel a bien montré ici son potentiel pour l'intégration de la dimension spatiale dans la description de la niche trophique d'une espèce. Dès lors, cette

approche par traçage isotopique naturel en analysant plusieurs tissus mous, couplée à l'utilisation de tissus « archives » par exemple pour distinguer finement les stratégies individuelles au sein d'une espèce (notamment au cours de l'ontogénèse ; e.g., Lorrain et al. 2011), ou encore le couplage avec des données issues de l'analyse des contenus stomacaux à différentes périodes de temps, améliorerait grandement la résolution concernant la description de la niche trophique et de la plasticité alimentaire d'une espèce d'intérêt.

Améliorer la précision du calcul du niveau trophique des organismes, et l'identification des sources primaires dont ils dépendent par l'analyse des acides aminés dans les tissus

L'utilisation de l'outil isotopique en écologie trophique repose largement sur les différences de signatures entre une proie et son consommateur en $\delta^{13}\text{C}$ (différence généralement faible) et $\delta^{15}\text{N}$ (plus élevée). Cependant, au sein d'un tissu analysé entièrement, ces différences représentent en fait une moyenne des différences de signatures observées selon les acides aminés (AA) entre une proie et son consommateur. En effet, en théorie, la différence de signature en $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ est importante entre une proie et son consommateur pour les AA non essentiels synthétisés *de novo* par les organismes. Au contraire, les AA essentiels subissent peu d'altération et sont incorporés directement de la nourriture. Ils présentent donc généralement très peu de différence, voire une différence nulle entre une proie et son consommateur (McClelland et Montoya 2002, Chikaraishi et al. 2009, McMahon et al. 2010). Les AA ne subissant quasiment aucun fractionnement au cours des transferts trophiques sont ainsi considérés comme « sources », tel que la phénylalanine (phe), car ils préservent l'information sur les sources de carbone et d'azote à la base du réseau trophique auquel le consommateur appartient (McClelland et Montoya 2002, Chikaraishi et al. 2009, McMahon et al. 2010). Les AA qui subissent au contraire un fractionnement important, relativement prévisible et constant d'un niveau trophique à l'autre tel que l'acide glutamique (glu), sont considérés comme « trophiques ». Ils permettent effectivement de mieux appréhender le niveau trophique réel du consommateur étudié, en utilisant par exemple la différence $\delta^{15}\text{N}_{\text{glu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{phe}}$ mesurée au sein du consommateur d'intérêt (e.g., Chikaraishi et al. 2009, Hannides et al. 2009, Lorrain et al. 2009). Ainsi, pour le calcul des niveaux trophiques à partir de l'outil isotopique, l'analyse des acides aminés permet, par exemple, de s'affranchir de la nécessité d'avoir une signature de la base du réseau trophique normalement requise (e.g., Post 2002a). Celle-ci est effectivement souvent difficile à obtenir de manière fiable

et/ou est très variable en milieu naturel. Cette méthode permet aussi de s'affranchir des TEFs (différence de signature entre une proie et son consommateur) qui peuvent être très différents entre les taxons de consommateurs considérés. Néanmoins, la précision du TEF correspondant à chaque acide aminé entre deux niveaux trophiques (e.g., près de 0‰ pour la phénylalanine, 7 à 8‰ pour l'acide glutamique) reste à affiner pour le calcul des niveaux trophiques supérieurs en particulier (e.g., Lorrain et al. 2009). La méthode utilisant les signatures des acides aminés est effectivement encore très récente. Sa robustesse a cependant déjà été prouvée en considérant différents niveaux trophiques potentiels, et par comparaison avec le calcul de niveaux trophiques issus de l'analyse de tissus pris en entier (e.g., Chikaraishi et al. 2009). L'analyse des acides aminés au lieu des tissus entiers apparaît ainsi comme une voie très prometteuse pour un traçage encore plus précis de "l'information trophique" dans les prochaines années (Martínez del Rio et al. 2009). D'autant plus que, d'infimes quantités de matière sont nécessaires pour les analyses (i.e., application possible sur des microorganismes, sur les stries de croissance d'otolithes ou d'écailles, etc.). La principale limitation aujourd'hui réside finalement dans le fait que ces analyses sont encore très onéreuses et coûteuses en temps.

VIII.5.2 Perspectives à l'échelle des réseaux trophiques et de l'écosystème

Améliorer la connaissance des processus isotopiques à la base des réseaux trophiques, et développer des indices de fonctionnement des différents réseaux en présence

De même que précédemment concernant l'approfondissement de l'étude de quelques espèces d'intérêt, un focus sur les consommateurs primaires et détritivores en particulier, mériterait d'être réalisé. Concernant le Golfe de Gascogne, un indice de contribution de la production primaire fraîche vs. matériel détritique ou matière régénérée à supporter les différentes espèces qui composent les différents réseaux trophiques étudiés dans ce travail pourrait effectivement être développé (e.g., Vander Zanden et Vadeboncoeur 2002, Sherwood et Rose 2005, Le Loc'h et al. 2008). En parallèle, un focus sur la matière organique (MO) à la base des réseaux trophiques mériterait également d'être réalisé. Une caractérisation des différentes sources composant cette MO pourrait effectivement être entreprise à partir des traceurs isotopiques et d'autres données (i.e., concentration en matière en suspension, mesures de chlorophylle a, etc. ; e.g., Savoye et al. 2003). L'ensemble de ces résultats permettrait peut-

être, ainsi, de définir des "zones isotopiques", qui seraient à mettre en relation avec les "zones hydrologiques" définies au printemps dans le Golfe de Gascogne, uniquement pour le plateau continental néanmoins, à partir d'autres paramètres physico-chimiques (e.g., température, salinité, etc.) (Planque et al. 2004). La variabilité temporelle, probablement importante (notamment à cause de l'évolution des panaches fluviaux), devrait alors également être considérée. Le couplage de toutes ces informations permettrait enfin, peut-être, d'améliorer la distinction entre les différents réseaux trophiques de l'écosystème, et d'améliorer notre connaissance de la structure et du fonctionnement des différents réseaux trophiques en présence. Bien sûr, les indices et/ou méthodes développées pourraient et devraient permettre leur application dans d'autres systèmes, pour, *in fine*, pouvoir comparer ces écosystèmes. Enin, comme évoqué précédemment, l'analyse isotopique des acides aminés améliorerait ici aussi la compréhension des processus de fonctionnement des réseaux trophiques (lorsque ces analyses deviendront moins coûteuses pour se généraliser, et notamment à l'échelle d'un écosystème).

Etudier le comportement d'autres métaux que le Hg ou d'autres contaminants dans les réseaux trophiques, pour évaluer leur potentiel en tant que traceurs écologiques

L'étude du comportement et/ou du transfert d'autres métaux que le Hg et des molécules organiques (e.g., PCB, PBDE, DDT), en utilisant les isotopes stables du carbone et de l'azote, pourrait être envisagée. L'investigation commencée au cours de cette thèse sur le Cd par exemple, autre métal *a priori* non essentiel, mériterait d'être poursuivie. Dans le cas de l'étude d'autres métaux ou contaminants que le Hg, le choix du ou des tissu(s) à analyser serait cependant à réévaluer, ainsi que les variables à inclure dans les modèles d'accumulation. Cela permettrait, *in fine*, d'apprécier leur potentiel en tant que traceurs écologiques. De plus en plus, les écologistes tendent effectivement à développer des approches multitraceurs pour minimiser les biais liés à chaque traceur et/ou méthodes d'études du régime alimentaire. La combinaison des informations provenant de différentes méthodes permet en effet de tirer des conclusions écologiques plus robustes, nécessaires pour la gestion des espèces protégées ou exploitées (e.g., Caurant et al. 2009 dans le cas du dauphin commun de l'Atlantique Nord-Est).

Intégrer davantage les données isotopiques dans les modèles écosystémiques

En tant que traceurs des sources de matière organique et de l'alimentation des organismes, les isotopes stables du carbone et de l'azote et les informations qu'ils fournissent ont tout intérêt à alimenter les modèles écosystémiques récents de réseaux trophiques (e.g., modèle Ecopath). Certains auteurs ont ainsi déjà utilisé les données isotopiques pour affiner la connaissance du régime alimentaire des différents compartiments considérés dans ce type de modèles (e.g., modèle Ecopath de la Grande Vasière dans le Golfe Gascogne ; Le Loc'h 2004). L'intégration des traceurs isotopiques dans les modèles d'analyse inverse est également possible (e.g., Van Oevelen et al. 2006). Selon cet auteur, l'intégration des données isotopiques améliore d'ailleurs considérablement la qualité des modèles d'analyse inverse en particulier. Or, les modèles écosystémiques (e.g., Ecopath ou analyse inverse) sont considérés comme des outils indispensables pour avoir la vision d'ensemble souhaitée dans la gestion des écosystèmes (Larkin 1996, Curtin et Prellezo 2010).

Enfin, malgré les précautions que les nombreux facteurs de variations possibles nécessitent de prendre lors de l'utilisation des traceurs écologiques, ces outils présentent le grand avantage d'être applicables à de nombreux écosystèmes, même les plus complexes comme nous l'avons vu dans ce travail. Ainsi, dans le Golfe de Gascogne, une base de données isotopiques est désormais disponible pour plus de 140 espèces composant les différents réseaux trophiques de cet écosystème, ainsi que pour plusieurs stades ontogéniques de certaines espèces. Une base de données sur les concentrations en Hg dans le muscle de plus de 120 espèces est également à disposition. Dans le cadre de cette thèse, ces bases de données ont permis d'affiner notre compréhension de l'écologie trophique d'espèces d'intérêt dans cet écosystème (e.g., sardines, anchois, bars), notre compréhension de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques dans cet écosystème, enfin d'apporter des informations nouvelles quand à la contamination en Hg des espèces profondes. L'application possible des traceurs écologiques à de nombreux écosystèmes, et leur relative facilité de mise en œuvre grâce aux progrès technologiques, trouve ainsi tout son intérêt pour la comparaison de sites d'étude entre eux ; ceci, pour répondre à des questions spécifiques concernant leur état écologique, dans le cadre plus général d'une approche écosystémique nécessaire à une bonne gestion du milieu marin.

REFERENCES

- Abril G, Nogueira M, Etcheber H, Cabeçadas G, Lemaire E, Brogueira MJ (2002) Behaviour of organic carbon in nine contrasting european estuaries. *Estuar Coast Shelf S* 54: 241-262.
- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 10: 257-263.
- Allain V, Lorance P (2000) Age estimation and growth of some deep-sea fish from the Northeast Atlantic Ocean. *Cybiurn* 24: 7-16.
- Arkema KK, Abramson SC, Dewsbury BM (2006) Marine ecosystem-based management: from characterization to implementation. *Front Ecol Environ* 4: 525-532.
- Bargagli R, Nelli L, Ancora S, Focardi S (1996) Elevated cadmium accumulation in marine organisms from Terra Nova Bay (Antarctica). *Polar Biol* 16: 513-520.
- Barnabe G (1980) Exposé synoptique de données biologiques sur le loup *Dicentrarchus labrax* (Linné, 1758). *FAO Fisheries Synopses* 126, FAO, Rome, Italy.
- Barrett RT, Camphuysen KCJ, Anker-Nilssen T, Chardine JW, Furness RW, Garthe S, Hüppop O, Leopold MF, Montevecchi WA, Veit RR (2007) Diet studies of seabirds: a review and recommendations. *ICES J Mar Sci* 64: 1675-1691.
- Barrow LM, Bjorndal KA, Reich KJ (2008) Effects of preservation method on stable carbon and nitrogen isotope values. *Physiol Biochem Zool* 81: 688-693.
- Bearhop S, Adams CE, Waldron S, Fuller RA, MacLeod H (2004) Determining trophic niche width: a novel approach using stable isotope analysis. *J Anim Ecol* 73: 1007-1012.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL (2005) *Ecology: from individuals to ecosystems*, 4th ed., Oxford, Blackwell Science.
- Bellier E, Planque B, Petitgas P (2007) Historical fluctuations in spawning location of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and sardine (*Sardina pilchardus*) in the Bay of Biscay during 1967-73 and 2000-2004. *Fish Oceanogr* 16: 1-15.
- Ben-David M, Flynn RW, Schell DM (1997) Annual and seasonal changes in diets of martens: evidence from stable isotope analysis. *Oecologia* 111: 280-291.
- Bloom NS (1992) On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue. *Can J Fish Aquat Sci* 49: 1010-1017.
- Bode A, Álvarez-Ossorio MT, Carrera P, Lorenzo J (2004) Reconstruction of trophic pathways between plankton and the North Iberian sardine (*Sardina pilchardus*) using stable isotopes. *Sci Mar* 68: 165-178.
- Boening D (2000) Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere* 40: 1335-1351.
- Bolnick DI, Yang LH, Fordyce JA, Davis JM, Svanbäck R (2002) Measuring individual-level resource specialization. *Ecology* 83: 2936-2941.
- Borja A, Elliott M, Carstensen J, Heiskanen AS, van de Bund W (2010) Marine management - Towards an integrated implementation of the European Marine Strategy Framework and the Water Framework Directives. *Mar Pollut Bull* 60: 2175-2186.
- Borja A, Galparsoro I, Irigoien X, Iriondo A, MENCHACA I, Muxika I, Pascual M, Quincoces I, Revilla M, Rodríguez JG, Santurtún M, Solaun O, Uriarte A, Valencia V, Zorita I (2011) Implementation of the European Marine Strategy Framework Directive: a methodological approach for the assessment of environmental status, from the Basque Country (Bay of Biscay). *Mar Pollut Bull* 62: 889-904.

- Boucaud-Camou E, Yim M (1980) Fine structure and function of the digestive cell of *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). *J Zool* 191: 89-105.
- Boucher-Rodoni R, Boucaud-Camou E (1987) Fine structure and absorption of ferritin in the digestive organs of *Loligo vulgaris* and *L. forbesi* (Cephalopoda, Teuthoidea). *J Morphol* 193: 173-184.
- Boulineau-Coatanea F (1969) Contribution à l'étude du bar *Dicentrarchus labrax* (Linné). Thèse de 3ème cycle, Université de Paris, France.
- Bowen WD (1997) Role of marine mammals in aquatic ecosystems. *Mar Ecol Prog Ser* 158: 267-274.
- Boyle PR, Grisley MS, Robertson G (1986) Crustacea in the diet of *Eledone cirrhosa* (Mollusca: Cephalopoda) determined by serological methods. *J Mar Biol Assoc UK* 66: 867-879.
- Braune BM, Outridge PM, Fisk AT, Muir DCG, Helm PA, Hobbs K, Hoekstra PF, Kuzyk ZA, Kwan M, Letcher RJ, Lockhart WL, Norstrom RJ, Stern GA, Stirling I (2005) Persistent organic pollutants and mercury in marine biota of the Canadian Arctic: an overview of spatial and temporal trends. *Sci Total Environ* 351-352: 4-56.
- Broman D, Naf C, Rolff C, Zebuhr Y, Fry B, Hobbie J (1992) Using ratios of stable nitrogen isotopes to estimate bioaccumulation and flux of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in two food chains from the northern Baltic. *Environ Toxicol Chem* 11: 331-345.
- Budge SM, Iverson SJ, Koopman HN (2006) Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: a primer on analysis and interpretation. *Mar Mamm Sci* 22: 759-801.
- Bustamante P, Caurant F, Fowler SW, Miramand P (1998) Cephalopods as a vector for the transfer of cadmium to top marine predators in the north-east Atlantic Ocean. *Sci Total Environ* 220: 71-80.
- Bustamante P, Cosson RP, Gallien I, Caurant F, Miramand P (2002a) Cadmium detoxification processes in the digestive gland of cephalopods in relation to accumulated cadmium concentrations. *Mar Environ Res* 53: 227-241.
- Bustamante P, Morales CF, Mikkelsen B, Dam M, Caurant F (2004) Trace element bioaccumulation in grey seals *Halichoerus grypus* from the Faroe Islands. *Mar Ecol Prog Ser* 267: 291-301.
- Bustamante P, Lahaye V, Durnez C, Churlaud C, Caurant F (2006) Total and organic Hg concentrations in cephalopods from the North Eastern Atlantic waters: influence of geographical origin and feeding ecology. *Sci Total Environ* 368: 585-596.
- Bustamante P, Teyssié JL, Fowler SW, Cotret O, Danis B, Miramand P, Warnau M (2002b) Biokinetics of zinc and cadmium accumulation and depuration at different stages in the life cycle of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Mar Ecol Prog Ser* 231: 167-177.
- Cabana G, Rasmussen JB (1994) Modeling food chain structure and contaminant bioaccumulation using stable nitrogen isotopes. *Nature* 372: 255-257.
- Cabana G, Rasmussen JB (1996) Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. *P Natl Acad Sci USA* 93: 10844-10847.
- Cabral H, Costa MJ (2001) Abundance, feeding ecology and growth of 0-group sea bass, *Dicentrarchus labrax*, within the nursery areas of the Tagus estuary. *J Mar Biol Assoc UK* 81: 679-682.
- Cailliet GM, Andrews AH, Burton EJ, Watters DL, Kline DE, Ferry-Graham LA (2001) Age determination and validation studies of marine fishes: do deep-dwellers live longer? *Exp Gerontol* 36: 739-764.
- Calow P (1987) Fact and theory - an overview. In: Boyle PR (ed) *Cephalopod life cycles: comparative reviews*. Vol. 2, Academic Press, London, pp 351-366.

- Caurant F, Amiard-Triquet C (1995) Cadmium contamination in pilot whales *Globicephala melas*: source and potential hazard to the species. *Mar Pollut Bull* 30: 207-210.
- Caurant F, Aubail A, Lahaye V, Van Canneyt O, Rogan E, López A, Addink M, Churlaud C, Robert M, Bustamante P (2006) Lead contamination of small cetaceans in European waters - The use of stable isotopes for identifying the sources of lead exposure. *Mar Environ Res* 62: 131-148.
- Caurant F, Chauvelon T, Lahaye V, Mendez-Fernandez P, Rogan E, Spitz J, Ridoux V (2009) The use of ecological tracers for discriminating populations: the case of the short-beaked common dolphin *Delphinus delphis* in the European Atlantic waters. International Whaling Commission, SC61/SM/34.
- Caut S, Angulo E, Courchamp F (2008) Caution on isotopic model use for analyses of consumer diet. *Can J Zool* 86: 438-445.
- Caut S, Angulo E, Courchamp F (2009) Variation in discrimination factors ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction. *J Appl Ecol* 46: 443-453.
- Caut S, Laran S, Garcia-Hartmann E, Das K (2011) Stable isotopes of captive cetaceans (killer whales and bottlenose dolphins). *J Exp Biol* 214: 538-545.
- Certain G, Ridoux V, Van Canneyt O, Bretagnolle V (2008) Delphinid spatial distribution and abundance estimates over the shelf of the Bay of Biscay. *ICES J Mar Sci* 65: 656-666.
- Chapmann JL, Reiss MJ (1999) *Ecology: principles and applications*, 2nd edition. Cambridge, Cambridge University Press.
- Chassot E, Rouyer T, Trenkel VM, Gascuel D (2008) Investigating trophic-level variability in Celtic Sea fish predators. *J Fish Biol* 73: 763-781.
- Cherel Y, Fontaine C, Jackson GD, Jackson CH, Richard P (2009) Tissue, ontogenic and sex-related differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the oceanic squid *Todarodes filippovae* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Mar Biol* 156: 699-708.
- Cherel Y, Hobson KA, Guinet C, Vanpe C (2007) Stable isotopes document seasonal changes in trophic niches and winter foraging individual specialization in diving predators from the Southern Ocean. *J Anim Ecol* 76: 826-836.
- Cherel Y, Hobson KA, Hassani S (2005) Isotopic discrimination between food and blood and feathers of captive penguins: implication for dietary studies in the wild. *Physiol Biochem Zool* 78: 106-115.
- Cheung MS, Wang WS (2008) Analyzing biomagnification of metals in different marine food webs using nitrogen isotopes. *Mar Pollut Bull* 56: 2082-2105.
- Chikaraishi Y, Ogawa NO, Kashiya Y, Takano Y, Suga H, Tomitani A, Miyashita H, Kitazato H, Ohkouchi N (2009) Determination of aquatic food-web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnol Oceanogr Methods* 7: 740-750.
- Chauvelon T, Warnau M, Churlaud C, Bustamante P (2009) Hg concentrations and related risk assessment in coral reef crustaceans, molluscs and fish from New Caledonia. *Environ Pollut* 157: 331-340.
- Choy CA, Popp BN, Kaneko JJ, Drazen JC (2009) The influence of depth on mercury levels in pelagic fishes and their prey. *P Natl Acad Sci USA* 106: 13865-13869.
- Christensen V, Pauly D (1992) ECOPATH II. A software for balancing steady-state ecosystem models and calculating network characteristics. *Ecol Model* 61: 169-185.
- Christensen V, Walters CJ (2004) Ecopath with Ecosim: methods, capabilities and limitations. *Ecol Model* 172: 109-139.
- Clarke MR, Merrett N (1972) The significance of squid, whale and other remains from the stomachs of bottom-living deep-sea fish. *J Mar Biol Assoc UK* 52: 599-603.

- Commission Européenne (2008) Directive 2008/56/CE du Parlement européen et du Conseil du 17 juin 2008, établissant un cadre d'action communautaire dans le domaine de la politique pour le milieu marin (directive-cadre « stratégie pour le milieu marin »). Journal Officiel de l'Union Européenne (JO L 164), pp 19-40.
- Commission Européenne (2010) Décision 2010/477/UE de la Commission du 1^{er} septembre 2010, relative aux critères et aux normes méthodologiques concernant le bon état écologique des eaux marines. Journal Officiel de l'Union Européenne (JO L 232), pp 14-24.
- Cossa D, Lassus P (1989) Le cadmium en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie. Rapports Scientifiques et Techniques de l'IFREMER 16, Issy-les-Moulineaux, France, 111 p.
- Cossa D, Thibaud Y, Roméo M, Gnassia-Barelli M (1990) Le mercure en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie. Rapports Scientifiques et Techniques de l'IFREMER 19, Brest, France, 130 p.
- Cronin M, Davies IM, Newton A, Pirie JM, Topping G, Swan S (1998) Trace metal concentrations in deep sea fish from the North Atlantic. *Mar Environ Res* 45: 225-238.
- Croteau MN, Luoma SN, Stewart AR (2005) Trophic transfer of metals along freshwater food webs: evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnol Oceanogr* 50: 1511-1519.
- Cunha ME, Garrido S, Pissarra J (2005) The use of stomach fullness and colour indices to assess *Sardina pilchardus* feeding. *J Mar Biol Assoc UK* 85: 425-431.
- Curtin R, Prellezo R (2010) Understanding marine ecosystem based management: a literature review. *Mar Policy* 34: 821-830.
- Dalerum F, Angerbjörn A (2005) Resolving temporal variation in vertebrate diets using naturally occurring stable isotopes. *Oecologia* 144: 647-658.
- Dalsgaard J, St John M, Kattner G, Müller-Navarra D, Hagen W (2003) Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv Mar Biol* 46: 225-340.
- Dam HG, Lopes RM (2003) Omnivory in the calanoid copepod *Temora longicornis*: feeding, egg production and egg hatching rates. *J Exp Mar Biol Ecol* 292: 119-137.
- Deagle BE, Tollit DJ, Jarman SN, Hindell MA, Trites AW, Gales NJ (2005) Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. *Mol Ecol* 14: 1831-1842.
- Dehn LA, Follmann EH, Thomas DL, Sheffield GG, Rosa C, Duffy LK, O'Hara TM (2006) Trophic relationships in an Arctic food web and implications for trace metal transfer. *Sci Total Environ* 362: 103-123.
- De Niro MJ, Epstein S (1976) You are what you eat (plus a few ‰): the carbon isotope cycle in food chains. *Geol Soc Am Conf Abstr* 8: 834-835.
- De Niro MJ, Epstein S (1977) Mechanism of carbon fractionation associated with lipid synthesis. *Science* 197: 261-263.
- De Niro MJ, Epstein S (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 42: 495-506.
- De Niro MJ, Epstein S (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 45: 341-351.
- Eisler R (1987) Mercury hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. US Fish and Wildlife Service Biological Report 85 (1.10).
- Eisler R (2010) Compendium of trace metals and marine biota. Volume 1: Plants and invertebrates et Volume 2: Vertebrates. Elsevier BV.
- Elsdon TS (2010) Unraveling diet and feeding histories of fish using fatty acids as natural tracers. *J Exp Mar Biol Ecol* 386: 61-68.
- Elton C (1927) Animal ecology. Sidgwick and Jackson Ltd, London, 209 p.

- Fagan WF (1997) Omnivory as a stabilizing feature of natural communities. *Am Nat* 150: 554-567.
- FAO (2010) The state of world fisheries and aquaculture 2010. Rome, FAO, 2010, 197 p.
- Fenchel T (1988) Marine plankton food chains. *Annu Rev Ecol Syst* 19: 19-38.
- Fernández de la Cigoña, E (1990) Os cabaleiros do mar: baleas e golfinhos das nosas augas. Guía dos cetáceos de Galicia e Iberia. In: *Natureza Galega. Asociación Galega para a Cultura e a Ecoloxía (AGCE)*, Vigo.
- Fisk AT, Tittlemier SA, Pranschke JL, Norstrom RJ (2002) Using anthropogenic contaminants and stable isotopes to assess the feeding ecology of Greenland shark. *Ecology* 83: 2162-2172.
- Fitzgerald WF, Lamborg CH, Hammerschmidt CR (2007) Marine biogeochemical cycling of mercury. *Chem Rev* 107: 641-662.
- Fleeger JW, Carman KR, Nisbet RM (2003) Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci Total Environ* 317: 207-233.
- Fraga F (1981) Upwelling of the Galician coast, Northwest Spain. In: Richards F (eds) *Coastal Upwelling*. American Geophysical Union Washington, DC, pp 176-182.
- France RL (1995) Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: food web implications. *Mar Ecol Prog Ser* 124: 307-312.
- France RL (1997) $\delta^{15}\text{N}$ examination of the Lindeman-Hutchinson-Peters theory of increasing omnivory with trophic height in aquatic food webs. *Res Popul Ecol* 39: 121-125.
- Fritsch M, Morizur Y, Lambert E, Bonhomme F, Guinand B (2007) Assessment of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) stock delimitation in the Bay of Biscay and the English Channel based on mark-recapture and genetic data. *Fish Res* 83: 123-132.
- Fry B (1983) Fish and shrimp migrations in the northern Gulf of Mexico analyzed using stable C, N, and S isotope ratios. *Fish Bull* 81: 789-801.
- Fry B (1988) Food web structure on Georges Bank from stable C, N, and S isotopic compositions. *Limnol Oceanogr* 33: 1182-1190.
- Fry B (2006) *Stable isotope ecology*. Springer (ed). 308 p.
- Gannes LZ, Martínez del Rio C, Koch P (1998) Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comp Biochem Physiol* 119: 725-737.
- Gannes LZ, O'Brien DM, Martínez del Rio C (1997) Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology* 78: 1271-1276.
- Gascuel D, Bozec YM, Chassot E, Colomb A, Laurans M (2005) The trophic spectrum: theory and application as an ecosystem indicator. *ICES J Mar Sci* 62: 443-452.
- Gohin F, Lampert L, Guillaud JF, Herbland A, Nézan E (2003) Satellite and *in situ* observations of a late winter phytoplankton bloom, in the northern Bay of Biscay. *Cont Shelf Res* 23: 1117-1141.
- Graeve M, Kattner G, Hagen W (1994) Diet-induced changes in the fatty acid composition of Arctic herbivorous copepods: Experimental evidence of trophic markers. *J Exp Mar Biol Ecol* 182: 97-110.
- Graeve M, Kattner G, Wiencke C, Karsten U (2002) Fatty acid composition of Arctic and Antarctic macroalgae: indicator of phylogenetic and trophic relationships. *Mar Ecol Prog Ser* 231: 67-74.
- Graham BS, Grubbs D, Holland K, Popp BN (2006) A rapid ontogenetic shift in the diet of juvenile yellowfin tuna from Hawaii. *Mar Biol* 150: 647-658.
- Grant PR, Grant BR, Smith JNM, Abbott IJ, Abbott LK (1976) Darwins finches: population variation and natural selection. *P Natl Acad Sci USA* 73: 257-261.

- Gray JS (2002) Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Mar Pollut Bull* 45: 46-52.
- Grumbine RE (1994) What is ecosystem management? *Conserv Biol* 8: 27-38.
- Haines EB (1976) Relation between the stable carbon isotope composition of fiddler crabs, plants and soils in a salt marsh. *Limnol Oceanogr* 21: 880-883.
- Hairston NGJ, Hairston NGS (1993) Cause-effect relationships in energy flow trophic structure and interspecific interactions. *Am Nat* 142: 379-411.
- Hairston NGJ, Hairston NGS (1997) Does food web complexity eliminate trophic-level dynamic? *Am Nat* 149: 1001-1007.
- Hampel H, Cattrijsse A, Elliott M (2005) Feeding habits of young predatory fishes in marsh creeks situated along the salinity gradient of the Schelde estuary, Belgium and the Netherlands. *Helgoland Mar Res* 59: 151-162.
- Hannides CCS, Popp BN, Landry MR, Graham BS (2009) Quantification of zooplankton trophic position in the North Pacific Subtropical Gyre using stable nitrogen isotopes. *Limnol Oceanogr* 54: 50-61.
- Hansson S, Hobbie JE, Elmgren R, Larsson U, Fry B, Johansson S (1997) The stable nitrogen isotope ratio as a marker of food-web interactions and fish migration. *Ecology* 78: 2249-2257.
- Hare PE, Fogel ML, Stafford TW, Mitchell AD Jr, Hoering TC (1991) The isotopic composition of carbon and nitrogen in individual amino acids isolated from modern and fossil proteins. *J Archaeol Sci* 18: 77-292.
- Herbland A, Delmas D, Laborde P, Sautour B, Artigas F (1998) Phytoplankton spring bloom of the Gironde plume waters in the Bay of Biscay: early phosphorus limitation and food web consequences. *Oceanol Acta* 21: 279-291.
- Herman DP, Burrows DG, Wade PR, Durban JW, LeDuc RG, Matkin CO, Krahn MM (2005) Feeding ecology of eastern North Pacific killer whales from fatty acid, stable isotope, and organochlorine analyses of blubber biopsies. *Mar Ecol Prog Ser* 302: 275-291.
- Herzka SZ (2005) Assessing connectivity of estuarine fishes based on stable isotope ratio analysis. *Estuar Coastal Shelf Sci* 64: 58-69.
- Hjelm J, Persson L, Christensen B (2000) Growth, morphological variation and ontogenetic niche shifts in perch (*Perca fluviatilis*) in relation to resource availability. *Oecologia* 122: 190-199.
- Hobson KA (1999) Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120: 314-326.
- Hobson KA, Alisauskas RT, Clark RG (1993) Stable-nitrogen isotope enrichment in avian tissues due to fasting and nutritional stress: implications for isotopic analyses of diet. *Condor* 95: 388-394.
- Hobson KA, Clark RG (1992) Assessing avian diets using stable isotopes. I: Turnover of C in tissues. *Condor* 94: 181-188.
- Hobson KA, Fisk A, Karnovsky N, Holst M, Gagnon JM, Fortier M (2002) A stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) model for the North Water food web: implications for evaluating trophodynamics and the flow of energy and contaminants. *Deep-Sea Res PT II* 49: 5131-5150.
- Hobson KA, Schell DM, Renouf D, Elizabeth N (1996) Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissues of captive seals: implications for dietary reconstructions involving marine mammals. *Can J Fish Aquat Sci* 53: 528-533.
- Hobson KA, Sease JL, Merrick RL, Piatt JF (1997) Investigating trophic relationships of pinnipeds in Alaska and Washington using stable isotope ratios of nitrogen and carbon. *Mar Mamm Sci* 13: 114-132.

- Hobson KA, Welch HE (1992) Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 84: 9-18.
- Hoeinghaus DJ, Zeug SC (2008) Can stable isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure? *Comment. Ecology* 89: 2353-2357.
- Holligan PM, Groom SB (1986) Phytoplankton distributions along the shelf break. *P Roy Soc Edinb B* 88: 239-263.
- Hunter MD, Price PW (1992) Playing chutes and ladders: heterogeneity and the relative roles of bottom-up and top-down forces in natural communities. *Ecology* 73: 724-732.
- Hutchinson GE (1957) Concluding remarks: Cold Spring Harbor symposium. *Quant Biol* 22: 415-427.
- Hutchinson GE (1959) Homage to Santa Rosalia: or, why are there so many kinds of animals? *Am Nat* 93: 145-159.
- Hyslop EJ (1980) Stomach contents analysis - a review of methods and their application. *J Fish Biol* 17: 411-429.
- ICES (2010a) Report of the Working Group on Anchovy and Sardine (WGANSAs). ICES WGANSAs Report 2010, ICES, 289 p.
- ICES (2010b) Report of the Working Group on Assessment of New MoU Species (WGNEW). ICES WGNEW Report 2010, ICES, 603 p.
- Iverson SJ, Field C, Bowen WD, Blanchard W (2004) Quantitative fatty acid signature analysis: a new method of estimating predator diets. *Ecol Monogr* 74: 211-235.
- James AG (1988) Are clupeid microphagists herbivorous or omnivorous? A review of the diets of some commercially important clupeids. *S Afr J Marine Sci* 7: 161-177.
- Jarman SN, Gales NJ, Tierney M, Gill PC, Elliott NG (2002) A DNA-based method for identification of krill species and its application to analysing the diet of marine vertebrate predators. *Mol Ecol* 11: 2679-2690.
- Jenkins B, Kitching RL Pimm SL (1992) Productivity, disturbance and food web structure at a local spatial scale in experimental container habitats. *Oikos* 65: 249-255.
- Jennings S, Pinnegar JK, Polunin NVC, Boon TV (2001) Weak cross-species relationships between body size and trophic level belie powerful size-based trophic structuring in fish communities. *J Anim Ecol* 70: 934-944.
- Jones KC, de Voogt P (1999) Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environ Pollut* 100: 209-221.
- Kaehler S, Pakhomov EA (2001) Effects of storage and preservation on the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures of selected marine organisms. *Mar Ecol Prog Ser* 219: 299-04.
- Karpouzi VS, Stergiou KI (2003) The relationships between mouth size and shape and body length for 18 species of marine fishes and their trophic implications. *J Fish Biol* 62: 1353-1365.
- Kelley DF (1987) Food of bass in UK waters. *J Mar Biol Assoc UK* 67: 275-286.
- Kelly JF (2000) Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Can J Zool* 78: 1-27.
- Kennedy M, Fitzmaurice P (1972) The biology of the bass, *Dicentrarchus labrax*, in Irish Waters. *J Mar Biol Assoc UK* 52: 557-597.
- Kiszka J, Van Canneyt O, Macleod K, Walker D, Ridoux V (2007) Distribution, encounter rates and habitat characteristics of toothed cetaceans in the Bay of Biscay and adjacent waters from platform of opportunity data. *ICES J Mar Sci* 64: 1033-1043.
- Kohn MJ (1999) You are what you eat. *Science* 283: 335-336.
- Kojadinovic J, Richard P, Le Corre M, Cosson RP, Bustamante P (2008) Effects of lipid extraction on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in seabird muscle, liver and feathers. *Waterbirds* 31: 169-178.

- Koopman HN, Iverson SJ, Gaskin DE (1996) Stratification and age-related differences in blubber fatty acids of the male harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *J Comp Physiol B* 165: 628-639.
- Kooyman GL, Ponganis PJ (1998) The physiological basis of diving to depth: birds and mammals. *Annu Rev Physiol* 60: 19-32.
- Koslow JA, Boehlert GW, Gordon JDM, Haedrich RL, Lorance P, Parin N (2000) Continental slope and deep-sea fisheries: implications for a fragile ecosystem. *ICES J Mar Sci* 57: 548-557.
- Koutsikopoulos C, Le Cann B (1996) Physical processes and hydrological structures related to the Bay of Biscay anchovy. *Sci Mar* 60: 9-19.
- Koyama J, Nanamori N, Segawa S (2000) Bioaccumulation of waterborne and dietary cadmium by oval squid *Sepioteuthis lessoniana*, and its distribution among organs. *Mar Pollut Bull* 40: 961-967.
- Krahn MM, Herman DP, Matkin CO, Durban JW, Barrett-Lennard L, Burrows DG, Dahlheim ME, Black N, LeDuc RG, Wade PR (2007) Use of chemical tracers in assessing the diet and foraging regions of eastern North Pacific killer whales. *Mar Environ Res* 63: 91-114.
- Labry C, Herbland A, Delmas D, Laborde P, Lazure P, Froidefond JM, Jégou AM, Sautour B (2001) Initiation of winter phytoplankton blooms within the Gironde plume waters in the Bay of Biscay. *Mar Ecol Prog Ser* 212: 117-130.
- Laffaille P, Lefeuvre J-C, Schricke M-T, Feunteun E (2001) Feeding ecology of 0-group sea bass, *Dicentrarchus labrax*, in salt marshes of Mont Saint Michel Bay (France). *Estuaries* 24: 116-125.
- Lahaye V (2006) Les éléments traces chez les petits cétacés des eaux européennes : utilisation du cadmium (Cd) et du mercure (Hg) en tant que traceurs. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle, France.
- Lahaye V, Bustamante P, Spitz J, Dabin W, Das K, Pierce GJ, Caurant F (2005) Long-term dietary segregation of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) in the Bay of Biscay determined using cadmium as an ecological tracer. *Mar Ecol Prog Ser* 305: 275-285.
- Lampert L (2001) Dynamique saisonnière et variabilité pigmentaire des populations phytoplanctoniques dans l'Atlantique Nord (Golfe de Gascogne). Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France.
- Lampert L, Quéguiner B, Labasque T, Pichon A, Lebreton N (2002) Spatial variability of phytoplankton composition and biomass on the eastern continental shelf of the Bay of Biscay (North-East Atlantic Ocean). Evidence for a bloom of *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) in spring 1998. *Cont Shelf Res* 22: 1225-1247.
- Larkin PA (1996) Concepts and issues in marine ecosystem management. *Rev Fish Biol Fisher* 6: 139-164.
- Lassalle G, Lobry J, Le Loc'h F, Bustamante P, Certain G, Delmas D, Dupuy C, Hily C, Labry C, Le Pape O, Marquis E, Petitgas P, Pusineri C, Ridoux V, Spitz J, Niquil N (sous presse) Lower trophic levels and detrital biomass control the Bay of Biscay continental shelf food web: implications for ecosystem management. *Prog Oceanogr*. DOI: 10.1016/j.pocan.2011.09.002.
- Layman CA, Arrington DA, Montana CG, Post DM (2007) Can stable isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure? *Ecology* 88: 42-48.
- Lazure P, Jégou AM (1998) 3D modelling of seasonal evolution of Loire and Gironde plumes on Biscay Bay continental shelf. *Oceanol Acta* 21: 165-177.

- LeBlanc GA (1995) Trophic level differences in the bioconcentration of chemicals: implications in assessing environmental biomagnification. *Environ Sci Technol* 29: 154-160.
- Lefebvre S, Marín Leal JC, Dubois S, Orvain F, Blin JL, Bataillé MP, Ourry A, Galois R (2009) Seasonal dynamics of trophic relationships among co-occurring suspension feeders in two shellfish culture dominated ecosystems. *Estuar Coast Shelf S* 82: 415-425.
- Le Loc'h F (2004) Structure, fonctionnement, évolution des communautés benthiques des fonds meubles exploités du plateau continental Nord Gascogne. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France.
- Le Loc'h F, Hily C, Grall J (2008) Benthic community and food web structure on the continental shelf of the Bay of Biscay (North Eastern Atlantic) revealed by stable isotopes analysis. *J Mar Syst* 72: 17-34.
- Lesage V, Morin Y, Rioux E, Pomerleau C, Ferguson SH, Pelletier E (2010) Stable isotopes and trace elements as indicators of diet and habitat use in cetaceans: predicting errors related to preservation, lipid extraction, and lipid normalization. *Mar Ecol Prog Ser* 419: 249-265.
- Lesage V, O'Hammill M, Kovacs KM (2001) Marine mammals and the community structure of the Estuary and Gulf of St Lawrence, Canada: evidence from stable isotope analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 210: 203-221.
- Libralato S, Christensen V, Pauly D (2006) A method for identifying keystone species in food web models. *Ecol Model* 195: 153-171.
- Lindeman RL (1942) The trophic-dynamic aspect of ecology. *Ecology* 23: 399-418.
- López A, Santos MB, Pierce GJ, Gonzalez AF, Valeiras X, Guerra A (2002) Trends in strandings of cetaceans on the Galician coast, NW Spain, during the 1990s. *J Mar Biol Assoc UK* 82: 513-521.
- López A, Pierce GJ, Santos MB, Gracia J, Guerra A (2003) Fishery by-catches of marine mammals in Galician waters: results from on-board observations and an interview survey of fishermen. *Biol Conserv* 111: 25-40.
- López A, Pierce GJ, Valeiras X, Santos MB, Guerra A (2004) Distribution patterns of small cetaceans in Galician waters. *J Mar Biol Assoc UK* 84 1-13.
- Lorrain A, Argüelles J, Alegre A, Bertrand A, Munaron JM, Richard P, Cherel Y (2011) Sequential isotopic signature along gladius highlights contrasted individual foraging strategies of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *Plos One* 6: e22194. doi:10.1371/journal.pone.0022194.
- Lorrain A, Graham B, Ménard F, Popp B, Bouillon S, Van Breugel P, Cherel Y (2009) Nitrogen and carbon isotope values of individual amino acids: a tool to study foraging ecology of penguins in the Southern Ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 391: 293-306.
- Loyer S, Lampert L, Menesguen A, Cann P, Labasque T (2006) Seasonal evolution of the nutrient pattern on Biscay Bay continental shelf over the years 1999-2000. *Sci Mar* 70: 31-46.
- Lubetkin SC, Simenstad CA (2004) Multi-source mixing models to quantify food web sources and pathways. *J Appl Ecol* 41: 996-1008.
- Mangold K, Bidder AM (1989) L'appareil digestif et la digestion. In: Mangold K (ed) *Traité de zoologie. Anatomie, systématique, biologie. Tome V Céphalopodes*. Masson, Paris, pp 321-373.
- Marquis E (2007) Le microzooplancton dans le réseau trophique planctonique : importance et rôle fonctionnel. Etude sur le plateau continental du Golfe de Gascogne. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle, France.

- Marquis E, Niquil N, Vézina AF, Petitgas P, Dupuy C (2011) Influence of planktonic foodweb structure on a system's capacity to support pelagic production: an inverse analysis approach. *ICES J Mar Sci* 68: 803-812.
- Martínez del Río C, Wolf N, Carleton SA, Gannes LZ (2009) Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biol Rev* 84: 91-111.
- Martinho F, Leitão R, Neto JM, Cabral H, Lagardère F, Pardal MA (2008) Estuarine colonization, population structure and nursery functioning for 0-group sea bass (*Dicentrarchus labrax*), flounder (*Platichthys flesus*) and sole (*Solea solea*) in a mesotidal temperate estuary. *J Appl Ichthyol* 24: 229-237.
- Mason RP, Rolffhus KR, Fitzgerald WF (1995) Methylated and elemental mercury cycling in surface and deep ocean waters of the North Atlantic. *Wat Air Soil Pollut* 80: 665-677.
- Mason RP, Rolffhus KR, Fitzgerald WF (1998) Mercury in the North Atlantic. *Mar Chem* 61: 37-53.
- Matthews B, Mazumder A (2004) A critical evaluation of intrapopulation variation of $\delta^{13}\text{C}$ and isotopic evidence of individual specialization. *Oecologia* 140: 361-371.
- Mauchline J, Gordon JDM (1980) The food and feeding of the deep-sea morid fish *Lepidion eques* (Gunther, 1887) in the Rockall Trough. *J Mar Biol Assoc UK* 60: 1053-1059.
- May RM (1973) Qualitative stability in model ecosystems. *Ecology* 54: 638-641.
- Mazé R (1987) Generation and propagation of non-linear internal waves induced by the tide over a continental slope. *Cont Shelf Res* 7: 1079-1104.
- McClelland JW, Montoya JP (2002) Trophic relationships and the nitrogen isotopic composition of amino acids in plankton. *Ecology* 83: 2173-2180.
- McClelland JM, Valiela I (1998) Changes in food web structure under the influence of increased anthropogenic nitrogen inputs to estuaries. *Mar Ecol Prog Ser* 168: 259-271.
- McClelland JM, Valiela I, Michener RH (1997) Nitrogen-stable isotope signatures in estuarine food webs: a record of increasing urbanization in coastal watersheds. *Limnol Oceanogr* 42: 930-937.
- McCutchan JHJ, Lewis WMJ, Kendall C, McGrath CC (2003) Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos* 102: 378-390.
- McMahon KW, Fogel ML, Elsdon TS, Thorrold SR (2010) Carbon isotope fractionation of amino acids in fish muscle reflects biosynthesis and isotopic routing from dietary protein. *J Anim Ecol* 79: 1132-1141.
- Ménard F, Lorrain A, Potier M, Marsac F (2007) Isotopic evidence of distinct feeding ecologies and movement patterns in two migratory predators (yellowfin tuna and swordfish) of the western Indian Ocean. *Mar Biol* 153: 141-152.
- Meynier L, Pusineri C, Spitz J, Santos MB, Pierce GJ, Ridoux V (2008) Intraspecific dietary variation in the short-beaked common dolphin *Delphinus delphis* in the Bay of Biscay: importance of fat fish. *Mar Ecol Prog Ser* 354: 277-287.
- Michener RH, Kaufman L (2007) Stable isotope ratios as tracers in marine food webs: an update. In: Michener R and Lajtha K (eds) *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Blackwell Publishing Ltd, pp 238-282.
- Millennium Ecosystem Assessment (2005) *Ecosystems and human well-being: general synthesis*. Island Press, Washington, DC, 137 p.
- Miller TW (2000) Tissue-specific response of $\delta^{15}\text{N}$ in adult Pacific herring (*Clupea pallasii*) following an isotopic shift in diet. *Environ Biol Fish* 76: 177-189.
- Minagawa M, Wada E (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochim Cosmochim Acta* 48: 1135-1140.
- Mion JB, Stein RA, Marschall EA (1998) River discharge drives survival of larval walleye. *Ecol Appl* 8: 88-103.

- Miramand P, Bustamante P, Bentley D, Kouéta N (2006) Variation of heavy metal concentrations (Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, V, and Zn) during the life cycle of the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Sci Total Environ* 361: 132-143.
- Mommsen TP (2001) Paradigms of growth in fish. *Comp Biochem Phys B* 129: 207-219.
- Monteiro LR, Costa V, Furness RW, Santos RS (1996) Mercury concentrations in prey fish indicate enhanced bioaccumulation in mesopelagic environments. *Mar Ecol Prog Ser* 141: 21-25.
- Monteiro LR, Lopes HD (1990) Mercury content of swordfish, *Xiphias gladius*, in relation to length, weight, age, and sex. *Mar Pollut Bull* 21: 293-296.
- Montoya JP (2007) Natural abundance of ^{15}N in marine planktonic ecosystems. In: Michener R and Lajtha K (eds) *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Blackwell Publishing Ltd, pp 176-201.
- Morizur Y, Berrow SD, Tregenza NJS, Couperus AS, Pouvrard S (1999) Incidental catches of marine mammals in pelagic trawl fisheries of the northeast Atlantic. *Fish Res* 41: 297-307.
- Muñoz-García A, Williams JB (2005) Basal metabolic rate in carnivores is associated with diet after controlling for phylogeny. *Physiol Bioch Zool* 78: 1039-1056.
- Murry BA, Farrell JM, Teece MA, Smyntek PM (2006) Effect of lipid extraction on the interpretation of fish community trophic relationships determined by stable carbon and nitrogen isotopes. *Can J Aquat Sci* 63: 2167-2172.
- Myers RA, JK Baum, TD Shepherd, SP Powers, Peter C (2007) Cascading effects of the loss of apex predatory sharks from a coastal ocean. *Science* 315: 1846-1850.
- Neff JM (2002) Bioaccumulation in marine organisms. Effect of contaminants from oil well produced water. Elsevier Ltd, 452 p.
- Nelson MM, Mooney BD, Nichols PD, Phleger CF (2001) Lipids of Antarctic Ocean amphipods: food chain interactions and the occurrence of novel biomarkers. *Mar Chem* 73: 53-64.
- Newsome SD, Martínez del Río C, Bearhop S, Phillips DL (2007) A niche for isotopic ecology. *Front Ecol Environ* 5: 429-436.
- Niemi GJ, McDonald ME (2004) Application of ecological indicators. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35: 89-111.
- Niño-Torres CA, Gallo-Reynoso JP, Galván-Magaña F, Escobar-Briones E, Macko SA (2006) Isotopic analysis of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, and $\delta^{34}\text{S}$ “a feeding tale” in teeth of the longbeaked common dolphin, *Delphinus capensis*. *Mar Mamm Sci* 22: 831-846.
- Noren SR, Williams TM (2000) Body size and skeletal muscle myoglobin of cetaceans: adaptations for maximizing dive duration. *Comp Biochem Physiol A* 126: 181-191.
- Northridge S, Morizur Y, Souami Y, Van Canneyt O (2006) PETRACET: Project EC/FISH/2003/09 Final report to the European Commission 1735R07D, June 2006.
- Nøttestad L, Giske J, Holst JC, Huse G (1999) A length-based hypothesis for feeding migrations in pelagic fish. *Can J Fish Aquat Sci* 56: 26-34.
- Ochoa-Acuña H, Sepúlveda MS, Gross TS (2002) Mercury in feathers from Chilean birds: influence of location, feeding strategy, and taxonomic affiliation. *Mar Pollut Bull* 44: 340-349.
- Odum EP (1969) The strategy of ecosystem development. *Science* 164: 262-270.
- OSPAR (2010) Quality Status Report 2010. OSPAR Commission, London, 176 p.
- Pace LP, Cole JJ, Carpenter SR, Kitchell JF (1999) Trophic cascades revealed in diverse ecosystems. *Trends Ecol Evol* 14: 483-488.
- Paine RT (1980) Food webs: linkage, interaction strength and community infrastructure. *J Anim Ecol* 49: 667-685.

- Parnell AC, Inger R, Bearhop S, Jackson AL (2010) Source partitioning using stable isotopes: coping with too much variation. *Plos One* 5: e9672. doi:10.1371/journal.pone.0009672.
- Parry M (2008) Trophic variation with length in two ommastrephid squids, *Ommastrephes bartramii* and *Sthenoteuthis oualaniensis*. *Mar Biol* 153: 249-256.
- Pauly D, Christensen V (1995) Primary production required to sustain global fisheries. *Nature* 374: 255-257.
- Pauly D, Christensen V, Dalsgaard J, Froese R, Torres FJ (1998) Fishing down marine food webs. *Science* 279: 860-863.
- Pawson MG, Pickett GD, Leballeur J, Brown M, Fritsch M (2007) Migrations, fishery interactions, and management units of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Northwest Europe. *ICES J Mar Sci* 64: 332-345.
- Perga ME, Gerdeaux D (2005) "Are fish what they eat" all year round? *Oecologia* 144: 598-606.
- Peters RH (1977) The unpredictable problems of trophodynamics. *Environ Biol Fish* 2: 97-101.
- Peterson BJ (1999) Stable isotopes as tracers of organic matter input and transfer in benthic food webs: a review. *Acta Oecol* 20: 479-487.
- Peterson BJ, Fry B (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu Rev Ecol Syst* 18: 293-320.
- Pethybridge HR, Cossa D, Butler ECV (2010) Mercury in 16 demersal sharks from southeast Australia: biotic and abiotic sources of variation and consumer health implications. *Mar Environ Res* 69: 18-26.
- Phillips DL (2001) Mixing models in analyses of diet using multiple stable isotopes: a critique. *Oecologia* 127: 166-170.
- Phillips DL, Gregg JW (2001) Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia* 127: 171-179.
- Phillips DL, Gregg JW (2003) Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources. *Oecologia* 136: 261-269.
- Phillips DL, Koch PL (2002) Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models. *Oecologia* 130:114-125.
- Phillips DL, Newsome SD, Gregg JW (2005) Combining sources in stable isotope mixing models: alternative methods. *Oecologia* 144: 520-527.
- Phillips KL, Nichols PD, Jackson GD (2002) Lipid and fatty acid composition of the mantle and digestive gland of four Southern Ocean squid species: implications for food-web studies. *Antarct Sci* 14: 212-220.
- Pickett GD, Kelley DF, Pawson MG (2004) The patterns of recruitment of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. from nursery areas in England and Wales and implications for fisheries management. *Fish Res* 68: 329-342.
- Pickett GD, Pawson MG (1994) Sea bass biology, exploitation and conservation. In: Chapman and Hall (ed) *Fish and Fisheries series*. London, 349 p.
- Pierce GJ, Boyle PR, Diack, JSW (1991) Identification of fish otoliths and bones in faeces and digestive tracks of seals. *J Zool London* 224: 320-328.
- Pierce GJ, Caldas M, Cedeira J, Santos MB, Llavona A, Covelo P, Martinez G, Torres J, Sacau M, López A (2010) Trends in cetacean sightings along the Galician coast, north-west Spain, 2003-2007, and inferences about cetacean habitat preferences. *J Mar Biol Assoc UK* 90: 1547-1560.
- Pierce GJ, Diack JSW, Boyle PR (1990) Application of serological methods to identification of fish prey in diets of seals and dolphins. *J Exp Mar Biol Ecol* 137: 123-140.

- Pierce GJ, Stowasser G, Hastie LC, Bustamante P (2008) Geographic, seasonal and ontogenetic variation in cadmium and mercury concentrations in squid (Cephalopoda: Teuthoidea) from UK waters. *Ecotoxicol Environ Saf* 70: 422-432.
- Pikitch EK, Santora C, Babcock EA, Bakan A, Bonfil R, Conover DO, Dayton P, Doukakis P, Fluharty D, Heneman B, Houde ED, Link J, Livingston PA, Mangel M, McAllister MK, Pope J, Sainsbury KJ (2004) Ecosystem-based fishery management. *Science* 305: 346-347.
- Pimm SL (1979) The structure of food webs. *Theor Popul Biol* 16: 144-158.
- Pimm SL (1980) Properties of food webs. *Ecology* 61: 219-225.
- Pimm SL, Kitching RL (1987) The determinants of food-chain lengths. *Oikos* 50: 302-307.
- Pimm SL, Lawton JH (1977) The number of trophic levels in ecological communities. *Nature* 275: 542-544.
- Pimm SL, Lawton JH (1978) On feeding on more than one trophic level. *Nature* 275: 542-544.
- Pinnegar JK, Polunin NVC (1999) Differential fractionation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. *Funct Ecol* 13: 225-231.
- Planque B, Lazure P, Jégou AM (2004) Detecting hydrological landscapes over the Bay of Biscay continental shelf in spring. *Climate Res* 28: 41-52.
- Plounevez S, Champalbert G (1999) Feeding behaviour and trophic environment of *Engraulis encrasicolus* (L.) in the Bay of Biscay. *Estuar Coast Shelf S* 49: 177-191.
- Polis GA, Sears ALW, Huxel GR, Strong DR, Maron J (2000) When is a trophic cascade a trophic cascade? *Trends Ecol Evol* 15: 473-475.
- Polis GA, Strong DR (1996) Food web complexity and community dynamics. *Am Nat* 147: 813-846.
- Polovina JF (1984) Model of a coral reef ecosystem. I. The ECOPATH model and its application to french frigate shoals. *Coral Reefs* 3: 1-11.
- Ponganis PJ (2011) Diving mammals. *Compr Physiol* 1: 517-535.
- Post DM (2002a) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods and assumptions. *Ecology* 83: 703-718.
- Post DM (2002b) The long and short of food-chain length. *Trends Ecol Evol* 17: 269-277.
- Post DM, Layman CA, Arrington DA, Takimoto G, Quattrochi J, Montaña CG (2007) Getting to the fat of the matter: models, methods, and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia* 152: 179-189.
- Post DM, Pace ML, Hairston NGJ (2000) Ecosystem size determines food-chain length in lakes. *Nature* 405: 1047-1049.
- Post DM, Takimoto G (2007) Proximate structural mechanisms for variation in food-chain length. *Oikos* 116: 775-782.
- Power ME (1992) Top-down and bottom-up forces in food webs: do plants have primacy? *Ecology* 73: 733-746.
- Power ME, Tilman D, Estes JA, Menge BA, Bond WA, Mills LS, Daily G, Castilla JC, Lubchenco J, Paine RT (1996) Challenges in the quest for keystones. *Bioscience* 46: 609-620.
- Puillat I, Lazure P, Jégou AM, Lampert L, Miller PI (2004) Hydrographical variability on the French continental shelf in the Bay of Biscay, during the 1990s. *Cont Shelf Res* 24: 1143-1163.
- Puillat I, Lazure P, Jégou AM, Lampert L, Miller PI (2006) Mesoscale hydrological variability induced by northwesterly wind on the French continental shelf of the Bay of Biscay. *Sci Mar* 70S1: 15-26.
- Quevedo M, Svanbäck R, Eklöv P (2009) Intrapopulation niche partitioning in a generalist predator limits food web connectivity. *Ecology* 90: 2263-2274.

- Raab K, Nagelkerke LAJ, Boerée C, Rijnsdorp AD, Temming A, Dickey-Collas M (2011) Anchovy *Engraulis encrasicolus* diet in the North and Baltic Seas. *J Sea Res* 65:131-140.
- Radin NS (1981) Extraction of tissue lipids with a solvent of low toxicity. *Method Enzymol* 72: 5-7.
- Rainbow PS (2002) Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ Pollut* 120: 497-507.
- Reinfelder JR, Fisher NS, Luoma SN, Nichols JW, Wang WX (1998) Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. *Sci Total Environ* 219: 117-135.
- Ridou V, Dabin W (2005) Impact sur les populations de cétacés des pêcheries au chalut pélagique. *Contrat Ifremer N° 03 2511537*, Juillet 2005.
- Riera P, Escaravage C, Leroux C (2009) Trophic ecology of the rocky shore community associated with the *Ascophyllum nodosum* zone (Roscoff, France): a $\delta^{13}\text{C}$ vs $\delta^{15}\text{N}$ investigation. *Estuar Coast Shelf S* 81: 143-148
- Riera P, Richard P (1996) Isotopic determination of food sources of *Crassostrea gigas* along a trophic gradient in the estuarine Bay of Marennes-Oléron. *Estuar Coast Shelf S* 42: 347-360.
- Riera P, Stal LJ, Nieuwenhuize J (2000) Heavy $\delta^{15}\text{N}$ in intertidal benthic algae and invertebrates in the Scheldt Estuary (The Netherlands): effect of river nitrogen inputs. *Estuar Coast Shelf S* 51: 365-372.
- Robbins CT, Felicetti LA, Sponheimer M (2005) The effect of dietary protein quality on nitrogen isotope discrimination in mammals and birds. *Oecologia* 144: 534-540.
- Roberts CM (2002) Deep impact: the rising toll of fishing in the deep sea. *Trends Ecol Evol* 17: 242-245.
- Roe HSJ, Badcock J (1984) The diel migrations and distributions within a mesopelagic community in the North East Atlantic. 5. Vertical migrations and feeding of fish. *Prog Oceanogr* 13: 389-424.
- Rogdakis Y, Ramfos A, Koukou K, Dimitriou E, Katselis G (2010) Feeding habits and trophic level of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Messolonghi-Etoliko lagoons complex (Western Greece). *J Biol Res Thessalon* 13: 13-26.
- Rossi A, Pellegrini D, Belcari P, Barghigiani C (1993) Mercury in *Eledone cirrhosa* from the Northern Tyrrhenian Sea: contents and relations with life cycle. *Mar Pollut Bull* 26: 683-686.
- Sakano H, Fujiwara E, Nohara S, Ueda H (2005) Estimation of nitrogen stable isotope turnover rate of *Oncorhynchus nerka*. *Environ Biol Fish* 72: 13-18. *Can J Zool* 80: 381-387.
- Santos MB, Fernandez R, López A, Martínez JA, Pierce GJ (2007) Variability in the diet of bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, in Galician waters, north-western Spain, 1990-2005. *J Mar Biol Assoc UK* 87: 231-241.
- Santos MB, Learmonth JA, Pierce GJ, Moffat CF, Rogan E, Murphy S, Ridoux V, Meynier L, Lahaye V, Pusineri C, Spitz J (2004a) Dietary studies on small cetaceans in the NE Atlantic using stomach contents and fatty acid analyses, BIOCET. University of Aberdeen, University College, Université de La Rochelle, CRMM, Aberdeen, 106 p.
- Santos MB, Pierce GJ, López A, Martínez JA, Fernández MT, Ieno E, Mente E, Porteiro C, Carrera P, Meixide M (2004b) Variability in the diet of common dolphins (*Delphinus delphis*) in Galician waters 1991-2003 and relationship with prey abundance. *ICES CM* 2004.
- Sarakinos HC, Johnson ML, Vander Zanden MJ (2002) A synthesis of tissue-preservation effects on carbon and nitrogen stable isotope signatures. *Can J Zool* 80: 381-387.

- Sargent JR, Whittle KJ (1981) Lipids and hydrocarbons in the marine food web. In: Longhurst AR (ed) Analysis of marine ecosystems. Academic Press, London, UK, pp 491-533.
- Sautour B, Artigas LF, Delmas D, Herbland A, Laborde P (2000) Grazing impact of micro and mesozooplankton during a spring situation in coastal waters off the Gironde estuary. *J Plankton Res* 22: 531-552.
- Savoie N, Aminot A, Tréguer P, Fontugne M, Naudet N, Kérouel R (2003) Dynamics of particulate organic matter $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ during spring phytoplankton blooms in a macrotidal ecosystem (Bay of Seine, France). *Mar Ecol Prog Ser* 255: 27-41.
- Schell DM, Saupé SM, Haubenstock N (1989) Natural isotope abundances in bowhead whale (*Balaena mysticetus*) baleen: markers of aging and habitat usage. *Ecol Stud* 68: 260-269.
- Schindler DE, Carpenter SR, Cole JJ, Kitchell JFFF, Pace ML (1997) Influence of food web structure on carbon exchange between lakes and the atmosphere. *Science* 277: 248-251.
- Schmidt SN, Olden JD, Solomon CT, Vander Zanden MJ (2007) Quantitative approaches to the analysis of stable isotope food web data. *Ecology* 88: 2793-2802.
- Schoener TW (1989) Food webs from the small to the large. *Ecology* 70: 1559-1589.
- Schwarcz HP (1991) Some theoretical aspects of isotope paleodiet studies. *J Archaeol Sci* 18: 261-275.
- Semmens JM, Pecl GT, Gillanders BM, Waluda CM, Shea EK, Jouffre D, Ichii T, Zumholz K, Katugin ON, Leporati SC, Shaw PW (2007) Approaches to resolving cephalopod movement and migration patterns. *Rev Fish Biol Fisher* 17: 401-423.
- Sever TM, Bayhan B, Taskavak E (2005) A preliminary study on the feeding regime of European pilchard (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792) in Izmir Bay, Turkey, Eastern Aegean Sea. *Naga* 28: 41-48.
- Sherwood GD, Rose GA (2005) Stable isotope analysis of some representative fish and invertebrates of the Newfoundland and Labrador continental shelf food web. *Estuar Coast Shelf S* 63: 537-549.
- Smith RJ, Hobson KA, Koopman HN, Lavigne DM (1996) Distinguishing between populations of fresh- and saltwater harbour seals (*Phoca vitulina*) using stable isotope ratios and fatty acid profiles. *Can J Fish Aquat Sci* 53: 272-279.
- Sotiropoulos MA, Tonn WM, Wassenaar LI (2004) Effects of lipid extraction on stable carbon and nitrogen isotope analyses of fish tissues: potential consequences for food web studies. *Ecol Freshw Fish* 13: 155-160.
- Spitz J (2010) Stratégie alimentaire et énergétique de la prédation chez les mammifères marins. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle, France.
- Spitz J, Richard E, Meynier L, Pusineri C, Ridoux V (2006a) Dietary plasticity of the oceanic striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*, in the neritic waters of the Bay of Biscay. *J of Sea Res* 55: 309-320.
- Spitz J, Rousseau Y, Ridoux V (2006b) Diet overlap between harbour porpoise and bottlenose dolphin: an argument in favour of interference competition for food? *Estuar Coast Shelf S* 70: 259-270.
- Spitz J, Cherel Y, Bertin S, Kiszka J, Dewez A, Ridoux V (2011) Prey preferences among the community of deep-diving odontocetes from the Bay of Biscay, Northeast Atlantic. *Deep-Sea Res PT I* 58: 273-282.
- Sponheimer M, Robinson TF, Cerling TE, Tegland L, Roeder BL, Ayliffe L, Dearing MD, Ehleringer JR (2006) Turnover of stable carbon isotopes in the muscle, liver, and breath CO_2 of alpacas (*Lama pacos*). *Rapid Commun Mass Spectrom* 20: 1395-1399.
- Stearns SC (1992) The evolution of life histories. Oxford, Oxford University Press, 249 p.

- Sterner RW, Bajpai A, Adams T (1997) The enigma of food chain length: absence of theoretical evidence for dynamic constraints. *Ecology* 78: 2258-2262.
- Stowasser G, McAllen R, Pierce GJ, Collins MA, Moffat CF, Priede IG, Pond DW (2009) Trophic position of deep-sea fish - Assessment through fatty acid and stable isotope analyses. *Deep-Sea Res Pt I* 56: 812-826.
- Stowasser G, Pierce GJ, Moffat CF, Collins MA, Forsythe JW (2006) Experimental study on the effect of diet on fatty acid and stable isotope profiles of the squid *Lolliguncula brevis*. *J Exp Mar Biol Ecol* 333: 97-114.
- Sweeting CJ, Barry JT, Barnes C, Polunin NVC, Jennings S (2007a) Effects of body size and environment on diet-tissue $\delta^{15}\text{N}$ fractionation in fishes. *J Exp Mar Biol Ecol* 340: 1-10.
- Sweeting CJ, Barry JT, Polunin NVC, Jennings S (2007b) Effects of body size and environment on diet-tissue $\delta^{13}\text{C}$ fractionation in fishes. *J Exp Mar Biol Ecol* 352: 165-176.
- Sweeting CJ, Jennings S, Polunin NVC (2005) Variance in isotopic signatures as a descriptor of tissue turnover and degree of omnivory. *Funct Ecol* 19: 777-784.
- Tansley AG (1935) The use and abuse of vegetational concepts and terms. *Ecology* 16: 284-307.
- Thiemann GW, Budge SM, Iverson SJ (2004) Determining blubber fatty acid composition: a comparison of *in situ* direct and traditional methods. *Mar Mamm Sci* 20: 284-295.
- Thompson DR, Furness RW, Monteiro LR (1998) Seabirds as biomonitors of mercury inputs to epipelagic and mesopelagic marine food chains. *Sci Total Environ* 213: 299-305.
- Thompson RM, Hemberg M, Starzomski BM, Shurin JB (2007). Trophic levels and trophic tangles: the prevalence of omnivory in real food webs. *Ecology* 88: 612-617.
- Tieszen LL, Boutton TW, Tesdahl KG, Slade NA (1983) Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia* 57: 32-37.
- Tudela S, Palomera I (1997) Trophic ecology of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* in the Catalan Sea (northwest Mediterranean). *Mar Ecol Prog Ser* 160: 121-134.
- Tyack PL, Johnson M, Aguilar Soto N, Sturlese A, Madsen PT (2006) Extreme diving of beaked whales. *J Exp Biol* 209: 4238-4253.
- Vanderklift MA, Ponsard S (2003) Source of variation in consumer-diet $\delta^{15}\text{N}$ enrichment: a meta-analysis. *Oecologia* 136: 169-182.
- Vandermeer J (2006) Omnivory and the stability of food webs. *J Theor Biol* 238: 497-504.
- Vander Zanden MJ, Casselman JM, Rasmussen JB (1999) Stable isotope evidence for the food web consequences of species invasions in lakes. *Nature* 401: 464-467.
- Vander Zanden MJ, Fetzer WW (2007) Global patterns of aquatic food chain length. *Oikos* 116: 1378-1388.
- Vander Zanden MJ, Rasmussen JB (1996) A trophic position model of pelagic food webs: impact on contaminant bioaccumulation in lake trout. *Ecol Monogr* 66: 451-477.
- Vander Zanden MJ, Rasmussen JB (1999) Primary consumer $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology* 80: 1395-1404.
- Vander Zanden MJ, Vadeboncoeur Y (2002) Fishes as integrators of benthic and pelagic food webs in lakes. *Ecology* 83: 2152-2161.
- Van Oevelen D, Soetaert K, Middelburg JJ, Herman PMJ, Moodley L, Hamels I, Moens T, Heip CHR (2006) Carbon flows through a benthic food web: integrating biomass, isotope and tracer data. *J Mar Res* 64: 453-482.
- Van Valen L (1965) Morphological variation and width of ecological niche. *Am Nat* 99: 377-390.

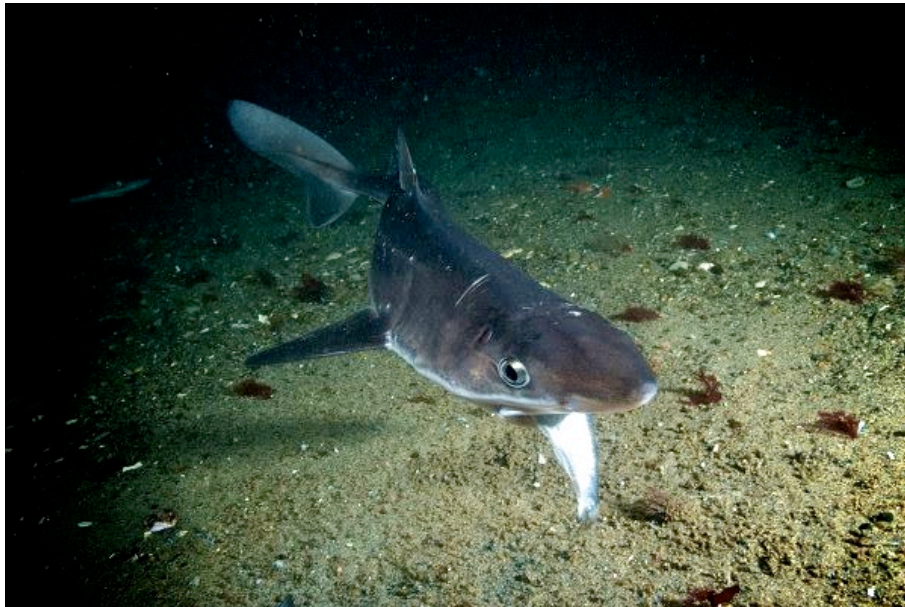
- Vasconcellos M, Mackinson S, Sloman K, Pauly D (1997) The stability of trophic mass-balance models of marine ecosystems: a comparative analysis. *Ecol Model* 100: 125-134.
- Verreault J, Verboven N, Gabrielsen GW, Letcher RJ, Chastel O (2008) Changes in prolactin in a highly organohalogen contaminated Arctic top predator seabird, the glaucous gull. *Gen Comp Endocr* 156: 569-576.
- Vizzini S, Mazzola A (2004) Stable isotope evidence for the environmental impact of a land-based fish farm in the western Mediterranean. *Mar Pollut Bull* 49: 61-70.
- Vizzini S, Mazzola A (2006) The effects of anthropogenic organic matter inputs on stable carbon and nitrogen isotopes in organisms from different trophic levels in a southern Mediterranean coastal area. *Sci Total Environ* 368: 723-731.
- Walker JL, Macko SA (1999) Dietary studies of marine mammals using stable carbon and nitrogen isotopic ratios of teeth. *Mar Mamm Sci* 15: 314-334.
- Wallace BP, Avens L, Braun-McNeill J, McClellan CM (2009) The diet composition of immature loggerheads: insights on trophic niche, growth rates, and fisheries interactions. *J Exp Mar Biol Ecol* 373: 50-57.
- Wallace WG, Lopez GR (1997) Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxification. *Mar Ecol Prog Ser* 147: 149-157.
- Wang WX (2002) Interactions of trace metals and different marine food chains. *Mar Ecol Prog Ser* 243: 295-309.
- West JB, Bowen GJ, Cerlingand TE, Ehleringer JR (2006) Stable isotopes as one of nature's ecological recorders. *Trends Ecol Evol* 21: 408-414.
- Williams RJ, Martinez ND (2004) Limits to trophic levels and omnivory in complex food webs: theory and data. *Am Nat* 163: 458-468.
- Wood JB, O'Dor RK (2000) Do larger cephalopods live longer? Effects of temperature and phylogeny on interspecific comparisons of age and size at maturity. *Mar Biol* 136: 91-99.
- Wu J, Calvert SE, Wong CS (1997) Nitrogen isotope variations in the subarctic Pacific: relationships to nitrate utilization and trophic structure. *Deep-Sea Res PT I* 44: 287-314.
- Yodzis P (1984) Energy flow and the vertical structure of real ecosystems. *Oecologia* 65: 86-88.
- Zauke GP, Savinov VM, Ritterhoff J, Savinova T (1999) Heavy metals in fish from the Barents Sea (summer 1994). *Sci Total Environ* 227: 161-173.

Annexe 1

Effects of ethanol preservation on stable isotopes ratios and mercury concentrations in fish muscle and liver

Chouvelon T, Caurant F, Mèndez-Fernandez P, Churlaud C, Bustamante P

En préparation pour Aquatic Biology



Objectives

To assess potential short- and long-term effects of 70% ethanol preservation, in comparison with freezing at -20°C, for 1) $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analyses in the muscle, and 2) mercury (Hg) concentrations analyses in the muscle and liver tissues of a cartilaginous fish species.

Materials and methods

Sampling and technical preparation

One individual of the picked dogfish *Squalus acanthias* was specifically collected for this study during the EVHOE groundfish surveys conducted by the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), from the continental shelf to the shelf-edge of the Bay of Biscay in autumn 2009. Large pieces of muscle and liver tissues were taken on board and immediately frozen at -20°C. Back to the laboratory, frozen samples of each tissue were divided in 30 subsamples. 6 subsamples were kept frozen at -20°C, and 24 subsamples were placed in 70% ethanol for 1 week (W), 2 W, 3W, 1 month (M), 2 M, 3 M, 6 M, and 1 year (Y), respectively (n = 3 at each time). At each time step (those indicated in Table A1-1), 70% ethanol was evaporated for a couple of hours, and the 3 subsamples of concern were frozen again at -20°C for 24h to be then freeze-dried. They were finally ground into a fine powder and stored in individual plastic vials until further analyses.

Isotopic and Hg analyses

Because they are highly depleted in ^{13}C relative to other tissue components (De Niro and Epstein 1977), lipids were extracted from muscle subsamples using cyclohexane as described in Chauvelon et al. (2011) for isotopic analyses. 0.40 ± 0.05 mg subsamples of lipid-free powder were finally weighed in tin cups for stable isotope analyses (SIA). SIA were performed with an elemental analyser coupled to an Isoprime (Micromass) continuous-flow isotope-ratio mass spectrometer (CF IR-MS). The results are presented in the usual δ notation relative to the deviation from standards (Pee Dee Belemnite for $\delta^{13}\text{C}$ and atmospheric nitrogen for $\delta^{15}\text{N}$), in parts per thousand (‰). Based on replicate measurements of internal laboratory standards, experimental precision is of ± 0.15 and ± 0.20 ‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively.

Total Hg analyses were carried out with an Advanced Mercury Analyser (ALTEC AMA 254) as described in Bustamante et al. (2006). Each sample of muscle and liver was analysed at least twice using undelipidated samples (untreated powder) for each condition. Hg analyses were run according to a thorough quality control program including the analysis of a certified reference material (CRM) TORT-2 (lobster hepatopancreas; National Research Council, Canada). CRM aliquots were treated and analysed in the same conditions as the samples. CRM results were in good agreement with the certified values, with an average recovery rate of 96%. The detection limit was 5 ng.g⁻¹ dry weight (dwt). All Hg concentrations in tissues reported below are expressed in ng.g⁻¹ dwt.

Data treatment

To evaluate the effects of ethanol preservation over time on $\delta^{13}\text{C}$ values, a Kruskal-Wallis (KW) test followed by a multiple comparison test (MPC) with Holm's adjustment method was performed for the statistical difference between each batch of 3 subsamples analysed. The same procedure was applied to compare $\delta^{15}\text{N}$ values, muscle and liver Hg concentrations of the 3 subsamples analysed at each time step. All statistical results are presented in Table A1-1. The significance was always set at $\alpha = 0.05$.

Table A1-1: Muscle $\delta^{13}\text{C}$ values and $\delta^{15}\text{N}$ values, and muscle and liver Hg concentrations (mean \pm SD) in the 3 subsamples analysed at each time step of the experiment. Groups with the same letter indicate that batches of subsamples are not significantly different (Kruskal-Wallis [KW] test followed by multiple comparison test [MPC] with Holm's adjustment method). Number of subsamples = 3 at each time step. Mean values for $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, muscle and liver Hg concentrations for the individual of *Squalus acanthias* experimented, all methods and time steps considered, are given in **bold**.

Parameter	Preservation method	Number of days ^a	Mean \pm SD	Group a b
$\delta^{13}\text{C}$ in the muscle (‰)				KW + MPC tests (Holm's) $\chi^2 = 21.7$, df = 9, p = 0.010
	Frozen	0	-18.2 \pm 0.2	
	70% ethanol 1 week	7	-17.9 \pm 0.2	
	70% ethanol 2 weeks	14	-18.3 \pm 0.1	
	70% ethanol 3 weeks	21	-18.0 \pm 0.2	
	70% ethanol 1 month	28	-18.0 \pm 0.1	
	70% ethanol 2 months	60	-18.1 \pm 0.1	
	70% ethanol 3 months	90	-18.4 \pm 0.2	
	70% ethanol 6 months	182	-18.3 \pm 0.0	
	70% ethanol 1 year	365	-17.9 \pm 0.3	
	Frozen 1 year	365	-17.5 \pm 0.1	
			-18.1 \pm 0.3	
$\delta^{15}\text{N}$ in the muscle (‰)				KW + MPC tests (Holm's) $\chi^2 = 9.8$, df = 9, p = 0.363
	Frozen	0	12.8 \pm 0.1	
	70% ethanol 1 week	7	13.1 \pm 0.3	
	70% ethanol 2 weeks	14	13.0 \pm 0.1	
	70% ethanol 3 weeks	21	13.1 \pm 0.3	
	70% ethanol 1 month	28	13.0 \pm 0.0	
	70% ethanol 2 months	60	13.1 \pm 0.1	
	70% ethanol 3 months	90	13.0 \pm 0.2	
	70% ethanol 6 months	182	12.9 \pm 0.1	
	70% ethanol 1 year	365	13.1 \pm 0.2	
	Frozen 1 year	365	12.9 \pm 0.2	
			13.0 \pm 0.1	
Muscle Hg concentration (ng.g ⁻¹ dwt)				KW + MPC tests (Holm's) $\chi^2 = 15.2$, df = 9, p = 0.085
	Frozen	0	4264 \pm 85	
	70% ethanol 1 week	7	4227 \pm 562	
	70% ethanol 2 weeks	14	3663 \pm 218	
	70% ethanol 3 weeks	21	4321 \pm 372	
	70% ethanol 1 month	28	4084 \pm 162	
	70% ethanol 2 months	60	3909 \pm 274	
	70% ethanol 3 months	90	3517 \pm 361	
	70% ethanol 6 months	182	3900 \pm 186	
	70% ethanol 1 year	365	4312 \pm 661	
	Frozen 1 year	365	3630 \pm 73	
			3983 \pm 303	
Hepatic Hg concentration (ng.g ⁻¹ dwt)				KW + MPC tests (Holm's) $\chi^2 = 14.1$, df = 9, p = 0.120
	Frozen	0	515 \pm 74	
	70% ethanol 1 week	7	638 \pm 56	
	70% ethanol 2 weeks	14	604 \pm 103	
	70% ethanol 3 weeks	21	686 \pm 194	
	70% ethanol 1 month	28	632 \pm 97	
	70% ethanol 2 months	60	698 \pm 111	
	70% ethanol 3 months	90	726 \pm 35	
	70% ethanol 6 months	182	622 \pm 114	
	70% ethanol 1 year	365	645 \pm 39	
	Frozen 1 year	365	474 \pm 61	
			624 \pm 78	

^a Corresponds to the number of days of conservation before analysis, and to the number of days that are reported on Fig. A1-1 and A1-2. Per default, day 0 corresponds to the day experiment starts.

Results

Only $\delta^{13}\text{C}$ values showed some significant differences ($p < 0.05$ in KW and MPC tests) between the different batches of subsamples, but without clear pattern in the time course of the experiment. Even in the case of frozen subsamples, an *a priori* non-affecting method of preservation, the difference was significant between subsamples analysed a year apart (Table A1-1). However, the difference was not significant between one year-frozen subsamples and one year-70% ethanol preserved subsamples (Table A1-1). Moreover, mean values of the 3 subsamples analysed at each time step were always very close to the mean value of -18.1‰ obtained considering all conditions together, taking into account that the experimental precision for $\delta^{13}\text{C}$ measurement was $\pm 0.15\text{‰}$ (Fig. A1-1). No significant difference was revealed for $\delta^{15}\text{N}$ values during all the experiment (Fig. A1-1, Table A1-1), nor for muscle and liver Hg concentrations (Fig. A1-2, Table A1-1).

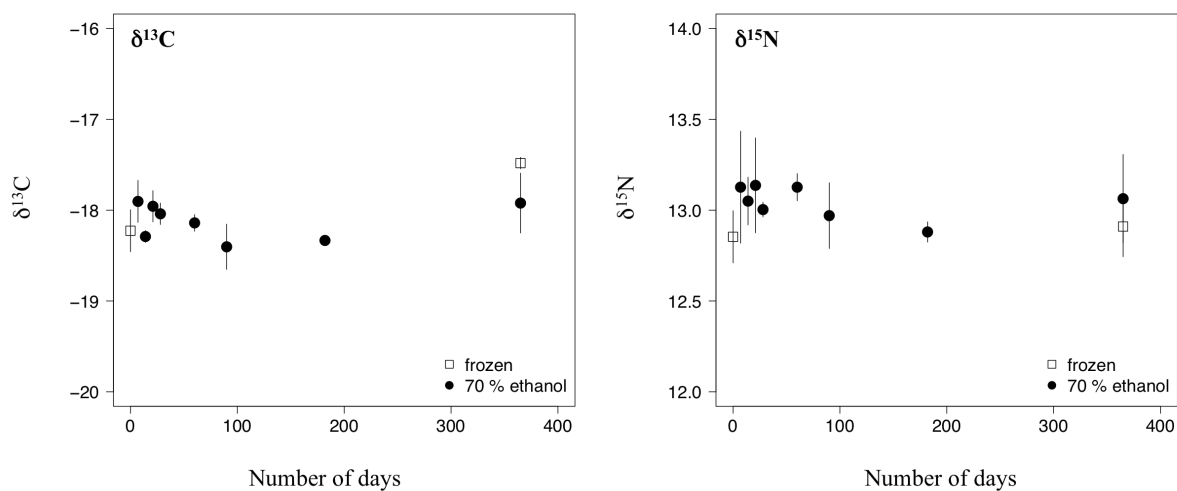


Figure A1-1: Stable isotope values (mean \pm SD in ‰, $n = 3$) in the muscle of *Squalus acanthias*, preserved frozen at -20°C or in 70% ethanol, and analysed throughout one year. The correspondence between each time step and the number of days is indicated in Table A1-1.

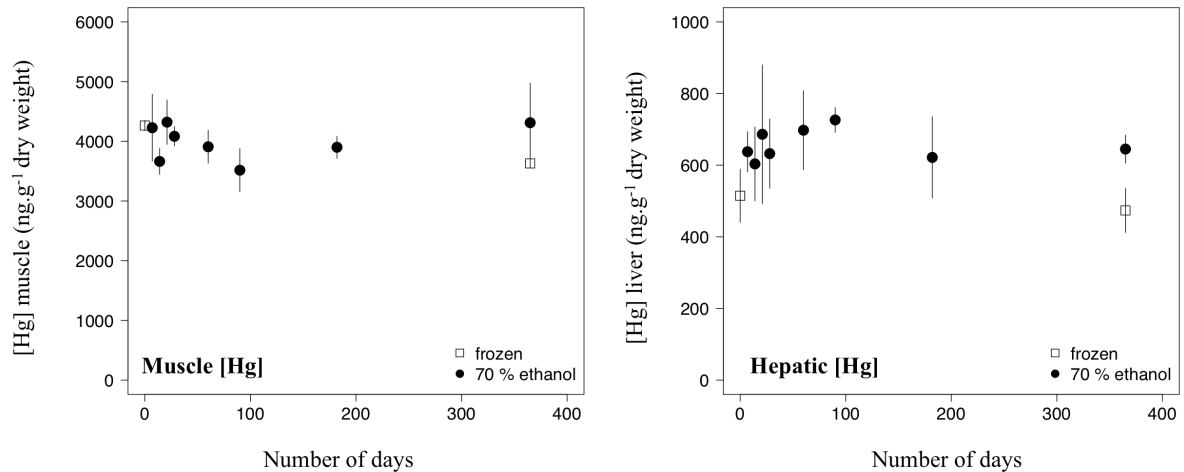


Figure A1-2: Hg concentrations (mean \pm SD in ng.g^{-1} dwt, $n = 3$) in the muscle or liver of *Squalus acanthias*, preserved frozen at -20°C or in 70% ethanol, and analysed throughout one year. The correspondence between each time step and the number of days is indicated in Table A1-1.

References

- Bustamante P, Lahaye V, Durnez C, Churlaud C, Caurant F (2006) Total and organic Hg concentrations in cephalopods from the North Eastern Atlantic waters: influence of geographical origin and feeding ecology. *Sci Total Environ* 368: 585-596.
- Chouvelon T, Spitz J, Cherel Y, Caurant F, Sirmel R, Mèndez-Fernandez P, Bustamante P (2011) Inter-specific and ontogenic differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and Hg and Cd concentrations in cephalopods. *Mar Ecol Prog Ser* 433: 107-120.
- De Niro MJ, Epstein S (1977) Mechanism of carbon fractionation associated with lipid synthesis. *Science* 197: 261-263.

Annexe 2

An efficient delipidation method previous to stable isotope analysis that does not affect $\delta^{15}\text{N}$ values of marine organisms

Chouvelon T, Richard P, Caurant F, Mèndez Fernandez P, Bustamante P

En préparation pour Journal of Experimental Marine Biology and Ecology



Objectives

1) To evaluate the efficiency of cyclohexane in delipiding fatty samples before analyses of $\delta^{13}\text{C}$ values in the muscle of various marine organisms; 2) to evaluate the potential effects of such treatment on $\delta^{15}\text{N}$ values (e.g., Kojadinovic et al. 2008), as generally do other methods of lipid extraction like chloroform-methanol solutions (e.g., Sotirouopoulos et al. 2004, Murry et al. 2006, Post et al. 2007).

Materials and methods

Sampling

For this study, 35 individuals belonging to 25 species and to 3 major marine taxa (i.e., fish, molluscs and crustaceans) were sampled during the EVHOE groundfish surveys conducted by the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), from the continental shelf to the shelf-edge of the Bay of Biscay in autumn 2008. Characteristics of individuals are presented Table A2-1. A piece of muscle was collected on each individual and frozen at -20°C until being processed in the laboratory. Muscle samples were then freeze-dried, ground into a fine powder, and stored in individual plastic vials.

Delipidation procedure

For each individual, an aliquot of approximately 100 mg of muscle fine powder was agitated with 4 ml of cyclohexane for 1h. Next, the sample was centrifuged for 5 min at $4000\times g$, and the supernatant containing lipids was discarded. When necessary (i.e., when the supernatant was not clean), the treatment was repeated until necessary. Then, the sample was dried in an oven at 45°C for 48 h. Finally, for each individual, one subsample of untreated powder and one subsample of lipid-free powder (0.35 ± 0.05 mg each) were weighed in tin cups for stable isotope analyses. These analyses were performed with an elemental analyser coupled to an Isoprime (Micromass) continuous-flow isotope-ratio mass spectrometer (CF IR-MS). The results are presented in Table A2-1 in the usual δ notation relative to the deviation from standards (Pee Dee Belemnite for $\delta^{13}\text{C}$ and atmospheric nitrogen for $\delta^{15}\text{N}$), in parts per thousand (‰). Based on replicate measurements of internal laboratory standards, experimental precision is of ± 0.15 and ± 0.20 ‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively.

Data treatment

As data did not satisfied conditions required for parametric tests (e.g., non normality assessed by Shapiro tests), Wilcoxon tests for paired samples were performed to assess the effect of cyclohexane treatment on stable isotope values. Spearman correlation coefficient tests were also used to analyse the correlation between "undelipidated" and "delipidated" stable isotope values measured in appropriated subsamples. The significance of statistical analyses was always set at $\alpha = 0.05$.

Results

As expected, the cyclohexane treatment significantly affected $\delta^{13}\text{C}$ values of samples (Wilcoxon test, $p < 0.0001$). The Spearman correlation coefficient between "undelipidated $\delta^{13}\text{C}$ values" and "delipidated $\delta^{13}\text{C}$ values" was good ($R^2 = 0.909$), but was clearly affected by 5 individuals corresponding to very fatty fish which displayed a C/N ratio > 4 (Table A2-1, Fig. A2-1). When removing these 5 samples from the statistical analysis, the Spearman correlation coefficient was effectively slightly higher ($R^2 = 0.921$). In this case, the effect of cyclohexane treatment was still significant (Wilcoxon test, $p < 0.0001$), but may be more easily predicted by linear regression (Fig. A2-1). On the contrary, the cyclohexane treatment did not significantly affected $\delta^{15}\text{N}$ values of samples (Wilcoxon test, $p = 0.612$), even considering the 5 fatty samples. The Spearman correlation coefficient between "undelipidated $\delta^{15}\text{N}$ values" and "delipidated $\delta^{15}\text{N}$ values" was very good ($R^2 = 0.977$).

Table A2-1: Characteristics of individuals, muscle values $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ before (undelipidated) and after (delipidated) treatment with cyclohexane. The C/N ratio before treatment is also given. Values of individuals for which C/N ratios > 4 are in **bold**.

Species	Sample	Size (mm) ^a	C/N undelipidated	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)		$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	
				undelipidated	delipidated	undelipidated	delipidated
Actinopterygian fish							
Carangidae							
<i>Trachurus trachurus</i>	1	190	3.8	-17.4	-17.3	12.5	12.8
	2	240	4.9	-19.1	-17.6	13.1	13.1
Clupeidae							
<i>Sardina pilchardus</i>	1	220	4.6	-19.2	-18.1	11.2	11.0
	2	230	4.4	-19.2	-18.6	10.4	10.7
Congridae							
<i>Conger conger</i>	1	1150	3.8	-17.4	-17.1	14.0	14.4
	2	1360	3.7	-15.9	-15.7	15.3	15.5
Engraulidae							
<i>Engraulis encrasicolus</i>	1	70	3.8	-18.1	-17.8	13.1	13.0
	2	90	3.8	-17.7	-17.7	12.8	12.8
Gadidae							
<i>Merlangius merlangus</i>	1	130	3.6	-17.2	-17.1	14.1	13.7
	2	450	3.7	-15.9	-15.9	14.0	14.3
<i>Micromesistius poutassou</i>	1	210	3.7	-19.0	-19.0	9.9	10.0
	2	220	3.7	-18.4	-18.2	11.3	11.7
Gobidae							
<i>Pomatoschistus minutus</i>	1	50	3.8	-18.0	-17.7	13.1	12.6
Merlucciidae							
<i>Merluccius merluccius</i>	1	470	3.7	-17.8	-17.8	13.2	13.0
	2	680	3.7	-17.2	-17.0	14.4	14.7
Scombridae							
<i>Scomber scombrus</i>	1	300	6.3	-22.8	-19.4	10.7	10.7
	2	310	4.8	-19.9	-18.6	10.7	10.6
Sebastidae							
<i>Helicolenus dactylopterus</i>	1	400	3.7	-17.3	-17.2	13.5	13.6
Chondrichthyan fish							
Rajidae							
<i>Leucoraja naevus</i>	1	580	3.0	-16.6	-16.4	11.9	12.1
<i>Raja fullonica</i>	1	910	3.0	-17.1	-16.8	11.8	11.6
Scyliorhinidae							
<i>Scyliorhinus canicula</i>	1	630	3.0	-16.9	-16.7	13.4	13.2
Torpedinidae							
<i>Torpedo marmorata</i>	1	470	2.5	-17.3	-17.0	15.6	15.4
Cephalopod Molluscs							
Loliginidae							
<i>Loligo forbesi</i>	1	90	4.0	-18.7	-18.2	11.8	11.6
	2	405	3.8	-17.2	-17.0	13.3	13.1
Sepiidae							
<i>Sepia officinalis</i>	1	65	3.8	-17.0	-16.6	13.1	12.8
	2	264	3.7	-16.8	-16.5	12.4	12.1
Octopodidae							
<i>Eledone cirrhosa</i>	1	90	3.9	-17.8	-17.5	12.0	11.6
Ommastrephidae							
<i>Todarodes sagittatus</i>	1	305	3.7	-18.0	-17.5	12.5	12.3
Gastropod molluscs							
Buccinidae							
<i>Buccinum humphreysianum</i>	1	34	4.0	-17.9	-17.6	10.0	10.2
<i>Scaphander lignarius</i>	1	55	6.6	-17.9	-17.6	6.2	6.5
Bivalve Molluscs							
Pectinidae							
<i>Aequipecten opercularis</i>	1	61	4.3	-16.5	-16.2	9.3	9.0
<i>Pecten maximus</i>	1	120	3.6	-18.1	-17.5	5.3	5.4
Crustaceans							
Canceridae							
<i>Cancer pagurus</i>	1	200	3.6	-15.4	-15.3	12.4	12.6
Crangonidae							
<i>Crangon crangon</i>	1	50	3.7	-16.4	-16.0	12.0	11.6
Portunidae							
<i>Polybius holsatus</i>	1	41	3.9	-17.0	-16.8	10.7	10.8

^a Total Length (TL) for fish and gastropod molluscs; Dorsal Mantle Length (DML) for cephalopod molluscs; Standard Width (SW) for bivalve molluscs and crustaceans.

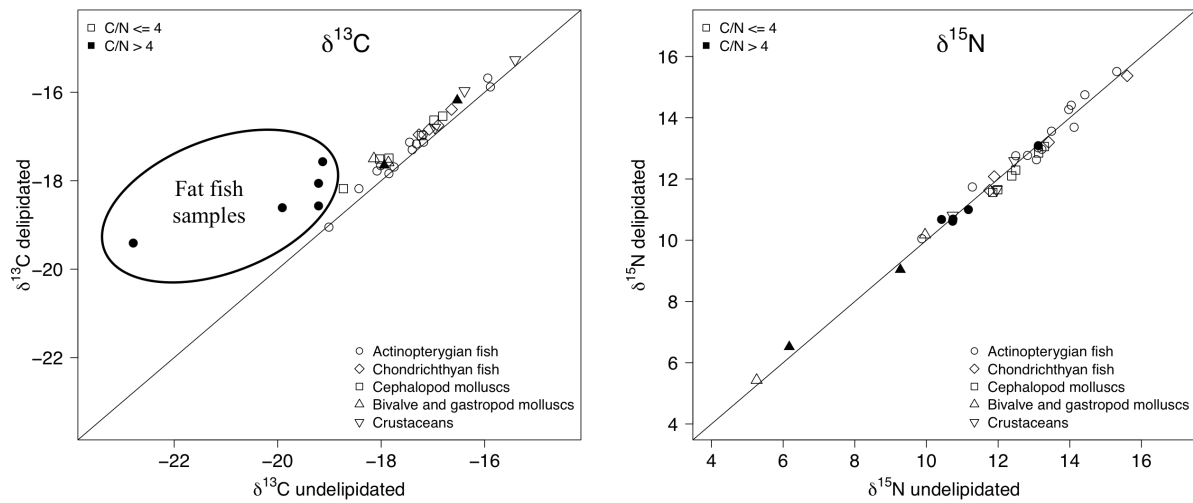


Figure A2-1: Relationships between $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values (in ‰) measured in undelipidated and delipidated muscle samples. Particularly fatty samples affected by the cyclohexane treatment are surrounded (i.e., those with a C/N ratio > 4, in bold in the Table 1). The correspondence line 1:1 is indicated.

References

- Murry BA, Farrell JM, Teece MA, Smyntek PM (2006) Effect of lipid extraction on the interpretation of fish community trophic relationships determined by stable carbon and nitrogen isotopes. *Can J Aquat Sci* 63: 2167-2172.
- Kojadinovic J, Richard P, Le Corre M, Cosson RP, Bustamante P (2008) Effects of lipid extraction on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in seabird muscle, liver and feathers. *Waterbirds* 31: 169-178.
- Post DM, Layman CA, Arrington DA, Takimoto G, Quattrochi J, Montaña CG (2007) Getting to the fat of the matter: models, methods, and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia* 152: 179-189.
- Sotiropoulos MA, Tonn WM, Wassenaar LI (2004) Effects of lipid extraction on stable carbon and nitrogen isotope analyses of fish tissues: potential consequences for food web studies. *Ecol Freshw Fish* 13: 155-160.

Annexe 3

Inter-specific and ontogenic differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and Hg and Cd concentrations in cephalopods

**Chouvelon T, Spitz J, Cherel Y, Caurant F, Sirmel R, Méndez-Fernandez P,
Bustamante P**

Publiée dans Marine Ecology Progress Series





Inter-specific and ontogenic differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and Hg and Cd concentrations in cephalopods

T. Chauvelon¹, J. Spitz¹, Y. Chere¹, F. Caurant¹, R. Sirmel¹, P. Mèndez-Fernandez¹,
P. Bustamante^{1,*}

¹Littoral Environnement et Sociétés, UMR 6250 CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges,
17042 La Rochelle Cedex 01, France

²Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, UPR 1934 du CNRS, BP 14, 79360 Villiers-en-Bois, France

ABSTRACT: Chemical tracers (e.g. stable isotopes or trace metals) are increasingly used to study trophic ecology and feeding habits of marine organisms and various factors can affect their values. The aim of the present study was to provide information on ontogenic effects on stable carbon and nitrogen values ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) and on cadmium (Cd) and mercury (Hg) concentrations in 5 cephalopod species from the Bay of Biscay (North-East Atlantic Ocean). To this end, individuals belonging to 3 species showing the widest range of sizes were analysed for muscle $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and muscle Hg, and digestive gland Cd concentrations. Results showed that stable isotope ratios allowed discrimination of specific feeding strategies during ontogenesis. Segregation between 5 cephalopod species in terms of trophic ecology was also evidenced (different isotopic niches). In contrast, Hg concentrations varied over the same order of magnitude in these 5 cephalopod species, despite higher levels in the benthic octopus *Eledone cirrhosa*. Consistently, Hg concentrations followed the same ontogenic pattern and increased with increasing body size/age of cephalopods. Finally, Cd concentrations varied over 3 orders of magnitude among the 5 species. Despite possible effects of physiology in terms of metal bioaccumulation, Cd concentrations were likely to reflect specific feeding preferences or feeding zones and ontogenic variability within a single species. Thus, ontogenic effects have to be taken into account when stable isotope ratios of carbon and nitrogen or trace metals are used as ecological tracers; the best recommendation being to focus on a given class age.

KEY WORDS: Stable isotopes · Metals · Trace elements · Ontogenesis · Prey · Ecological tracer · Northeastern Atlantic

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

A fundamental requirement to understand the structure and functioning of marine ecosystems is the knowledge of trophodynamics or trophic linkages among species of these ecosystems (Cury et al. 2003). Moreover, the definition of species trophic level is a key aspect of many ecosystem models, providing a valuable indicator to assess trophic structure and ecosystem changes, e.g. due to overfishing (Gascuel et al. 2005).

Until recently, the traditional method for investigating diet and trophic level of organisms was the study of stomach or gut contents. Such a method allows a pre-

cise taxonomic description of the prey consumed and of their size range. However, it also requires a lot of time, it may be skewed by the differential digestion of the different prey, and it only represents the food ingested (and not assimilated) in the short-term (Hobson & Wassenaar 1999, Santos et al. 2001). Therefore, the use of tracers has dramatically increased in trophic ecology in the last decades (e.g. Lahaye et al. 2005, Michener & Kaufman 2007). Such tracers, which are generally chemical parameters, encompass stable isotope ratios of carbon and nitrogen ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$), lipids, or some trace elements (either stable or radioactive). These tracers are investigated in biological tis-

*Corresponding author. E-mail: pbustama@univ-lr.fr

sues of consumers to complement traditional methods of dietary studies (Hobson & Wassenaar 1999).

Stable isotopes of carbon are often used as an indicator of the feeding zone or habitat, since ratios vary little between those of the primary producers of the local food chain or a prey and those of the consumers ($\leq 1\%$) (De Niro & Epstein 1978, Hobson 1999). Moreover, in the marine environment, pelagic and/or oceanic primary producers are generally depleted in ^{13}C compared to those in benthic and/or neritic environments, discriminating the pelagic vs. benthic or inshore vs. offshore contribution to food intake (France 1995, Sherwood & Rose 2005). In contrast, consumers are enriched in ^{15}N relative to their food (between 2.5 and 5%) (De Niro & Epstein 1981, Vanderklift & Ponsard 2003), so stable isotopes of nitrogen are generally used as an indicator of the trophic level (Hobson & Welch 1992).

Trace metals such as cadmium (Cd) and mercury (Hg) are released in the environment from both natural and anthropogenic sources (e.g. zinc ore for Cd, volcanism and waste incineration for Hg). They reach the ocean through river inputs and atmospheric depositions (Cossa & Lassus 1989, Cossa et al. 1990). Trophic transfer is then the main pathway for the intake of both Cd and Hg, and these metals bioaccumulate in higher trophic level consumers (Eisler 1987, Cossa et al. 1990, Koyama et al. 2000, Lahaye et al. 2005). Thus, these non-essential elements may also be potential tracers of the habitat or of the feeding zone of consumers. In the case of Hg, its bioaccumulation is enhanced in biota from mesopelagic environments (Monteiro et al. 1996, Thompson et al. 1998). Seabirds feeding on mesopelagic fish thus exhibit higher Hg concentrations in their feathers than epipelagic feeders (Thompson et al. 1998, Ochoa-Acuña et al. 2002). Furthermore, Hg could represent a potential indicator of the trophic level, given its known biomagnification within food webs (Eisler 1987, Cossa et al. 1990). Cd shows enhanced bioaccumulation in various phyla (i.e. crustaceans, molluscs and vertebrates) from various marine environments (Bargagli et al. 1996, Bustamante et al. 1998, 2004, Zauke et al. 1999). In this way, cephalopods constitute a vector of Cd for their predators such as seabirds and marine mammals (Caurant & Amiard-Triquet 1995, Bustamante et al. 1998, Lahaye et al. 2005). Thus, Cd concentrations in short-beaked common dolphin *Delphinus delphis* identified long-term segregation between oceanic and neritic dolphin populations in the Bay of Biscay (Lahaye et al. 2005).

The signature (stable isotopes) or bioaccumulation (metals) of ecological tracers in a consumer's tissues greatly depends on its diet. The use of these chemical parameters as tracers in predators thus relies on a good knowledge of the factors influencing the values in

prey, such as spatio-temporal variations, the chemical form of metals, or biological factors such as sex, species or taxa, or even those linked to ontogeny (age, growth, dietary shifts) (Vanderklift & Ponsard 2003, Lahaye et al. 2005, Perga & Gerdeaux 2005). In this respect, ontogenic effects have been poorly and especially unequally treated as a function of the potential tracers presented above. While Hg is well-known to bioaccumulate in muscle tissue with size or age in various taxa (Cossa et al. 1990, Rossi et al. 1993), Cd bioaccumulation patterns with age are less well-established and seem to differ between tissues, species, and (Cossa & Lassus 1989, Cronin et al. 1998, Miramand et al. 2006, Pierce et al. 2008). Finally, studies on ontogenic effects on stable isotope ratios in marine organisms are relatively scarce and mainly concern fish (Jennings et al. 2001, Perga & Gerdeaux 2005). The question of ontogenic changes on all these tracers has thus far been poorly treated in cephalopods. Such a consideration is very important as cephalopods are both active predators and prey, and thus constitute an important link within food webs (Piatkowski et al. 2001).

To study the feeding ecology of cephalopods, the use of tracers such as stable isotope ratios is particularly suitable (Cherel & Hobson 2005, Ruiz-Cooley et al. 2006, Parry 2008), notably because prey identification from the gut is often difficult (Jackson et al. 2007). In addition, these voracious predators can accumulate high metal concentrations in their tissues, especially in the digestive gland (Martin & Flegal 1975, Miramand & Bentley 1992). Food is generally considered as a major source for several metals in cephalopods, especially for Cd and Hg (Koyama et al. 2000, Bustamante et al. 2002a, Lacoue-Labarthe et al. 2009). Finally, as prey, cephalopods can transfer these metals to their predators, as described previously in the case of Cd in the Northeast Atlantic Ocean (Caurant & Amiard-Triquet 1995, Bustamante et al. 1998, Lahaye et al. 2005).

In this context, the aim of the present study was to assess the effects of ontogenic changes on (1) stable isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) and (2) Cd and Hg bioaccumulation in several species of cephalopods from a same area, to assess the extent to which these ontogenic changes may affect the use of these tracers as feeding ecology indicators in community or ecosystem-scale studies of cephalopods.

MATERIALS AND METHODS

Study area, sampling strategy and sample preparation. The Bay of Biscay (from 1 to 10° W and from 43 to 48° N) is a very large bay open to the Northeast Atlantic Ocean, with a vast continental shelf in its northern part (60 to 100 nautical miles wide), which is

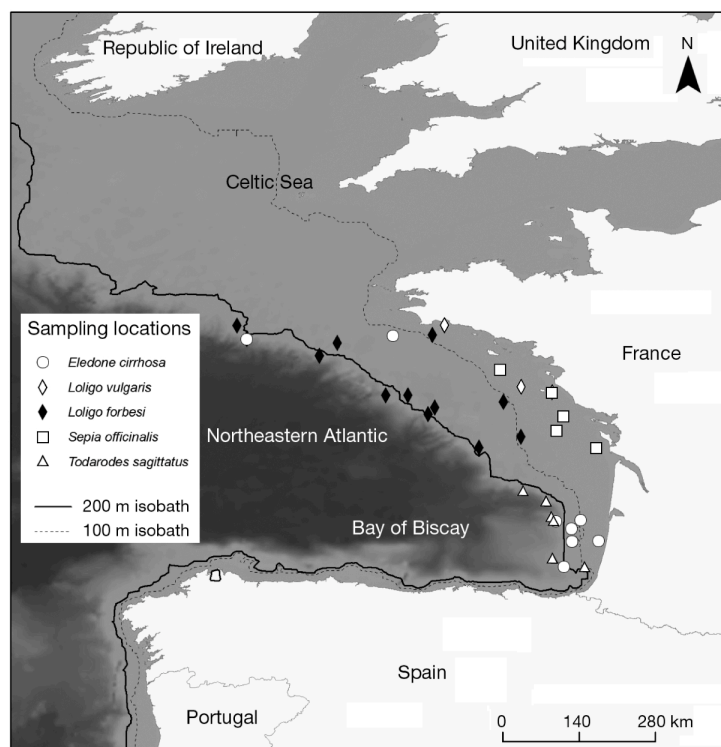


Fig. 1. Study area and sampling locations of cephalopod species (*Eledone cirrhosa*, *Loligo vulgaris*, *L. forbesi*, *Sepia officinalis*, *Todarodes sagittatus*) in the Bay of Biscay

reduced to only a few miles in its southern part (Fig. 1). We focused on 5 species of cephalopods that were caught in various habitats (inshore vs. offshore waters, pelagic vs. benthic or demersal domains): 3 squid species, the veined squid *Loligo forbesi*, the European squid *L. vulgaris*, and the European flying squid *Todarodes sagittatus*; 1 cuttlefish species, the common cuttlefish *Sepia officinalis*; and 1 octopus species, the horned octopus *Eledone cirrhosa*.

Loligo forbesi and *L. vulgaris* are benthopelagic species mainly feeding on fish and to a smaller extent on crustaceans, polychaetes, or other cephalopods (Roper et al. 1984, Guerra & Rocha 1994, Pierce et al. 1994). However, they differ in their distribution: *L. forbesi* is usually found in depths ranging from 100 to 400 m, whereas *L. vulgaris* generally occurs in depths shallower than 250 m (Roper et al. 1984, Lordan et al. 2001a). *Todarodes sagittatus* is a more oceanic species that is generally trawled beyond 200 m depth and may occur as deep as 1000 m. It is also mainly piscivorous (Roper et al. 1984, Lordan et al. 2001a,b). *Sepia officinalis* is a demersal and neritic species inhabiting waters from coastline to about 200 m depth but is most

abundant in the upper 100 m. Its diet is generally composed of small molluscs, crabs, shrimps, other cephalopods and juvenile demersal fish (Roper et al. 1984). Finally, *Eledone cirrhosa* is a benthic species that may occur as deep as 500 m, but mostly occurs between 60 and 150 m, and feeds primarily on crustaceans such as shrimps, crabs, and lobsters (Roper et al. 1984, Lordan et al. 2001a).

Overall, 147 individuals were collected during the EVHOE groundfish surveys conducted by the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) from the continental shelf to the shelf-edge of the Bay of Biscay in the autumns of 2005 to 2008. Specimens were frozen at -20°C on board and then stored at the laboratory until dissection, during which each organism was weighed and measured (dorsal mantle length, DML) and a piece of mantle muscle and the whole digestive gland were removed. Characteristics (DML, weight, sex and average trawling depths) of the individuals are given in Table 1. After dissection, the samples were immediately placed in individual plastic bags, frozen again at -20°C and freeze-dried. Freeze-dried tissues

were ground into a fine powder and stored in individual plastic vials until further analyses.

To assess ontogenic effects on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and metal bioaccumulation in cephalopods, the 3 species presenting the widest size ranges were selected, i.e. *Loligo vulgaris*, *L. forbesi* and *Sepia officinalis*. Indeed, DML and age (or the number of increments on statoliths) are closely related in *Loligo* spp. and *S. officinalis*, despite some inter-individual variability in growth rates depending on hatching season (Rocha & Guerra 1999, Challier et al. 2002). Therefore, in the present study we assumed that several age classes were considered within the 3 species selected for ontogenic analyses. Also, juveniles with no visible distinct gonads were separated from males and females with known sex (immatures and matures considered together) because these species present a strong sexual dimorphism (Roper et al. 1984, Rocha & Guerra 1999). Juveniles, males, and females were compared as a 3 component categorical factor called 'sex'.

Isotopic analyses. Stable isotopes of carbon and nitrogen were analyzed in the mantle muscle, which is the tissue of reference in food web studies inferred

Table 1. *Loligo vulgaris*, *L. forbesi*, *Todarodes sagittatus*, *Sepia officinalis* and *Eledone cirrhosa*. Characteristics of individuals (N = sample size for each species), muscle stable isotope values, muscle Hg, and digestive gland Cd concentrations for 5 species of cephalopods from the Bay of Biscay. Values are means \pm SD with ranges (minimum, maximum) for trawling depths and chemical parameter values, and ranges only for DML and TW. DML: dorsal mantle length; TW: total weight; M: males; F: females; J: juveniles (i.e. small individuals with no visible distinct gonads)

Family	Species	N	Trawling depth (m)	Sex	DML (mm)	TW (g)	Muscle $\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Muscle $\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Muscle Hg (ng g ⁻¹ dry wt)	Digestive gland Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt)
Loliginidae	<i>Loligo vulgaris</i>	28	32 \pm 14 (25, 58)	16 M, 6 F, 6 J	73, 290	13, 562	-16.4 \pm 0.5 (-17.5, -15.6)	14.5 \pm 1.0 (12.1, 15.4)	142 \pm 40 (65, 200)	5.2 \pm 2.6 (2.3, 17.2)
	<i>Loligo forbesi</i>	50	171 \pm 100 (96, 492)	21 M, 9 F, 20 J	39, 490	4, 1585	-17.8 \pm 0.4 (-18.9, -16.5)	12.5 \pm 0.7 (11.3, 14.4)	188 \pm 126 (47, 547)	6.2 \pm 2.8 (1.3, 12.0)
Omma-strephidae	<i>Todarodes sagittatus</i>	17	449 \pm 99 (92, 536)	1 M, 16 F	195, 305	150, 627	-17.7 \pm 0.5 (-18.7, -17.1)	12.2 \pm 0.8 (10.7, 13.4)	248 \pm 68 (139, 394)	18.6 \pm 12.0 (7.7, 45.8)
Sepiidae	<i>Sepia officinalis</i>	30	32 \pm 12 (25, 66)	14 M, 10 F, 6 J	48, 235	14, 1436	-16.4 \pm 0.3 (-17.0, -15.8)	13.2 \pm 0.7 (12.2, 14.8)	201 \pm 72 (83, 380)	9.6 \pm 9.4 (2.5, 44.7)
Octopodidae	<i>Eledone cirrhosa</i>	22	136 \pm 54 (43, 337)	12 M, 8 F, 2 J	64, 123	97, 653	-16.7 \pm 0.5 (-17.8, -16.0)	11.8 \pm 0.3 (11.1, 12.3)	340 \pm 72 (222, 561)	16.3 \pm 9.6 (6.1, 40.0)

from stable isotope analyses (Hobson & Welch 1992, Pinnegar & Polunin 1999). The use of mantle muscle allows comparisons of isotopic signatures between individuals and taxa, minimizing inter-tissue differences in terms of biochemical and physiological properties like protein turnover rate and metabolic routing (Cherel et al. 2009).

Because lipids are highly depleted in ¹³C relative to other tissue components (De Niro & Epstein 1977), they were extracted from muscle samples using cyclohexane. To accomplish this, an aliquot of approximately 100 mg of fine powder was agitated with 4 ml of cyclohexane for 1 h. Next, the sample was centrifuged for 5 min at 4000 \times g, and the supernatant containing lipids was discarded. Then, the sample was dried in an oven at 45°C for 48 h, and 0.35 \pm 0.05 mg subsamples of lipid-free powder were weighed in tin cups for stable isotope analyses. These analyses were performed with an elemental analyser coupled to an Isoprime (Micromass) continuous-flow isotope-ratio mass spectrometer (CF IR-MS). The results are presented in the usual δ notation relative to the deviation from standards (Pee Dee Belemnite for $\delta^{13}\text{C}$ and atmospheric nitrogen for $\delta^{15}\text{N}$), in parts per thousand (‰). Based on replicate measurements of internal laboratory standards, experimental precision is of ± 0.15 and $\pm 0.20\%$ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively.

Metal analyses. Total Hg analyses were conducted on the mantle muscle of all species, while Cd was analysed in the digestive gland. Hg is known to mainly accumulate in its organic form in the muscle tissue of cephalopods (Bustamante et al. 2006), whereas the role of the digestive gland in the storage and detoxification of Hg in cephalopods is not well defined (Bustamante et al. 2006, Pierce et al. 2008, Lacoue-Labarthe et al.

2009). In contrast, the digestive gland is well recognized as the key organ in bioaccumulation and detoxification of Cd in cephalopods (Miramand & Bentley 1992, Bustamante et al. 2002a, Pierce et al. 2008).

Hg analyses were carried out with an Advanced Mercury Analyser (ALTEC AMA 254) as described in Bustamante et al. (2006) on at least 2 homogenized dry muscle tissue subsamples for each individual. Hg analyses were run according to a thorough quality control program including the analysis of a certified reference material (CRM) TORT-2 (lobster hepatopancreas; National Research Council, Canada [NRCC]). CRM aliquots were treated and analysed in the same conditions as the samples. CRM results were in good agreement with the certified values, with an average recovery rate of 97%. The detection limit was 5 ng g⁻¹ dry weight (dry wt). All Hg concentrations in tissues reported below are expressed in ng g⁻¹ dry wt.

Cd analyses were performed by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy as described in Hédouin et al. (2009) for 2 subsamples of each digestive gland. Blanks and CRM samples were treated and analysed in the same way as the cephalopod samples. The CRMs were dogfish liver DOLT-3 (NRCC) and lobster hepatopancreas TORT-2 (NRCC). CRM results were in good agreement with the certified values with an average recovery rate of 92 and 98% for DOLT-3 and TORT-2, respectively. The detection limit was 0.15 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt. All Cd concentrations given below are expressed in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt.

Data treatment. We first analyzed the relationships between the potential tracers (muscle $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values, muscle Hg concentrations, and digestive gland Cd concentrations), with regard to cephalopod trawling depths and DML using a principal compo-

ment analysis (PCA). The PCA was based on the correlation matrix and normalised data for each variable (i. e. centred and divided by the standard deviation). Then, all data submitted to statistical tests (or residuals in the case of analysis of variance, ANOVA) were checked for normality (Shapiro-Wilks test) and for homogeneity of variances (Bartlett's test). When these conditions were fulfilled, parametric tests were used in the subsequent analyses; otherwise, non-parametric analogues were used. Thus, a Kruskal-Wallis (KW) test followed by a multiple comparison test with Holm's adjustment method was performed to test inter-specific differences in muscle $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values. For each of the 3 species selected for ontogenic analyses (*Loligo vulgaris*, *L. forbesi* and *Sepia officinalis*), the Pearson or Spearman correlation coefficient test was used to analyze the correlation between $\delta^{15}\text{N}$ values and DML, between log-transformed muscle Hg concentrations and DML or $\delta^{15}\text{N}$ values, and between log-transformed digestive gland Cd concentrations and DML or $\delta^{15}\text{N}$ values. On scatterplots of statistically significant relationships, a smoother LOWESS (locally weighted polynomial regression) was added to help interpretation of correlation coefficients. Finally, 1-way ANOVAs were performed to test between-sex differences in $\delta^{15}\text{N}$ values, muscle Hg concentrations, and digestive gland Cd concentrations in the same 3 species (ANOVA or KW test, followed by Tukey's HSD test in the case of ANOVA or a multiple comparison test with Holm's adjustment method in the case of KW). The level of significance for statistical analyses was always set at $\alpha = 0.05$. All statistical analyses were performed using the free software R (R Development Core Team 2010).

RESULTS

Inter-specific differences

The first 2 principal components accounted for 68 % of the total variation present in the dataset (39 and 29% for axis 1 and 2, respectively). Depth and stable isotope values were the variables that contributed most to the first axis, whereas muscle Hg concentrations and DML contributed most to the second axis (i.e. contribution of the variable $\geq 25\%$; Fig. 2). Principal component 1 indicated that increased digestive gland Cd concentrations were associated with important trawling depths but with low $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values (Fig. 2). Nevertheless, Cd concentrations in the digestive gland contributed more to the formation of the third axis, not represented here (contribution of 39%). Principal component 2 showed that increased muscle Hg concentrations are highly correlated with DML (Fig. 2). Finally,

when individuals were grouped by species or by sex, it emerged that species were more segregated by principal component 1 (i.e. by muscle $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and to a lesser extent digestive gland Cd concentrations), while juveniles strongly differed from adults in their muscle Hg concentrations on principal component 2 (males and females generally not segregated) (Fig. 2).

Regarding inter-specific differences in carbon and nitrogen measurements in particular (Fig. 3), the 5 species of cephalopods from the Bay of Biscay differed significantly by both their average $\delta^{13}\text{C}$ ($p_{\text{KW}} < 0.001$) and $\delta^{15}\text{N}$ values ($p_{\text{KW}} < 0.001$). Post hoc multiple comparison test showed that *Loligo forbesi* and *Todarodes sagittatus* had significantly lower $\delta^{13}\text{C}$ values ($p < 0.05$) than *L. vulgaris*, *Sepia officinalis* and *Eledone cirrhosa* (Table 1, Fig. 3). As for nitrogen, *T. sagittatus* and *L. forbesi* (more oceanic species) did not differ significantly ($p > 0.05$), whereas *L. vulgaris*, *S. officinalis* and *E. cirrhosa* (neritic species) presented significantly different $\delta^{15}\text{N}$ values ($p < 0.05$) (Table 1, Fig. 3).

Ontogenic effects in *Loligo vulgaris*, *L. forbesi* and *Sepia officinalis*

Ontogenic effects on stable isotope ratios

As a positive correlation between $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values was evidenced by the PCA (Fig. 2), correlation coefficient tests between stable isotope values and DML were only performed on $\delta^{15}\text{N}$ values to avoid redundant analyses and figures.

In *Loligo vulgaris*, the correlation coefficient was low between $\delta^{15}\text{N}$ values and DML ($R^2_{\text{Spearman}} = 0.233$, $p = 0.010$), reflecting the non-linear relationship existing between both variables (Fig. 4a). Indeed, $\delta^{15}\text{N}$ values were very similar for individuals larger than approximately 100 mm DML, corresponding to adult individuals that could be sexed, and strongly differed from juvenile ones (Table 2).

In *Loligo forbesi*, there was a positive correlation between $\delta^{15}\text{N}$ values and DML ($R^2_{\text{Pearson}} = 0.439$, $p < 0.001$), but variability between similar-sized individuals was high (Fig. 4b). There was no significant difference in $\delta^{15}\text{N}$ values between juveniles and females, but both were significantly different from males (Table 2). This contributed to the increase in $\delta^{15}\text{N}$ values with increasing size, as males are considerably larger than females in this species (Fig. 4b).

In *Sepia officinalis*, there was also a positive relationship between $\delta^{15}\text{N}$ values and DML, but the correlation coefficient was lower ($R^2_{\text{Pearson}} = 0.273$, $p = 0.003$); $\delta^{15}\text{N}$ values varied greatly between similar-sized individuals at all stages (Fig. 4c).

Ontogenic effects on metal bioaccumulation

In the 3 species, log-transformed Hg concentrations in the muscle were strongly and positively correlated with DML ($R^2_{\text{Spearman}} = 0.600$, $R^2_{\text{Pearson}} = 0.836$, and $R^2_{\text{Pearson}} = 0.596$, in *Loligo vulgaris*, *L. forbesi* and

Sepia officinalis, respectively; all $p < 0.001$) (Fig. 5). Hg concentrations in the muscle and $\delta^{15}\text{N}$ values were also correlated ($R^2_{\text{Spearman}} = 0.361$, $R^2_{\text{Spearman}} = 0.404$ in *L. vulgaris* and *L. forbesi*, respectively, both $p < 0.001$; $R^2_{\text{Pearson}} = 0.182$ in *S. officinalis*, $p = 0.019$) (Fig. 5).

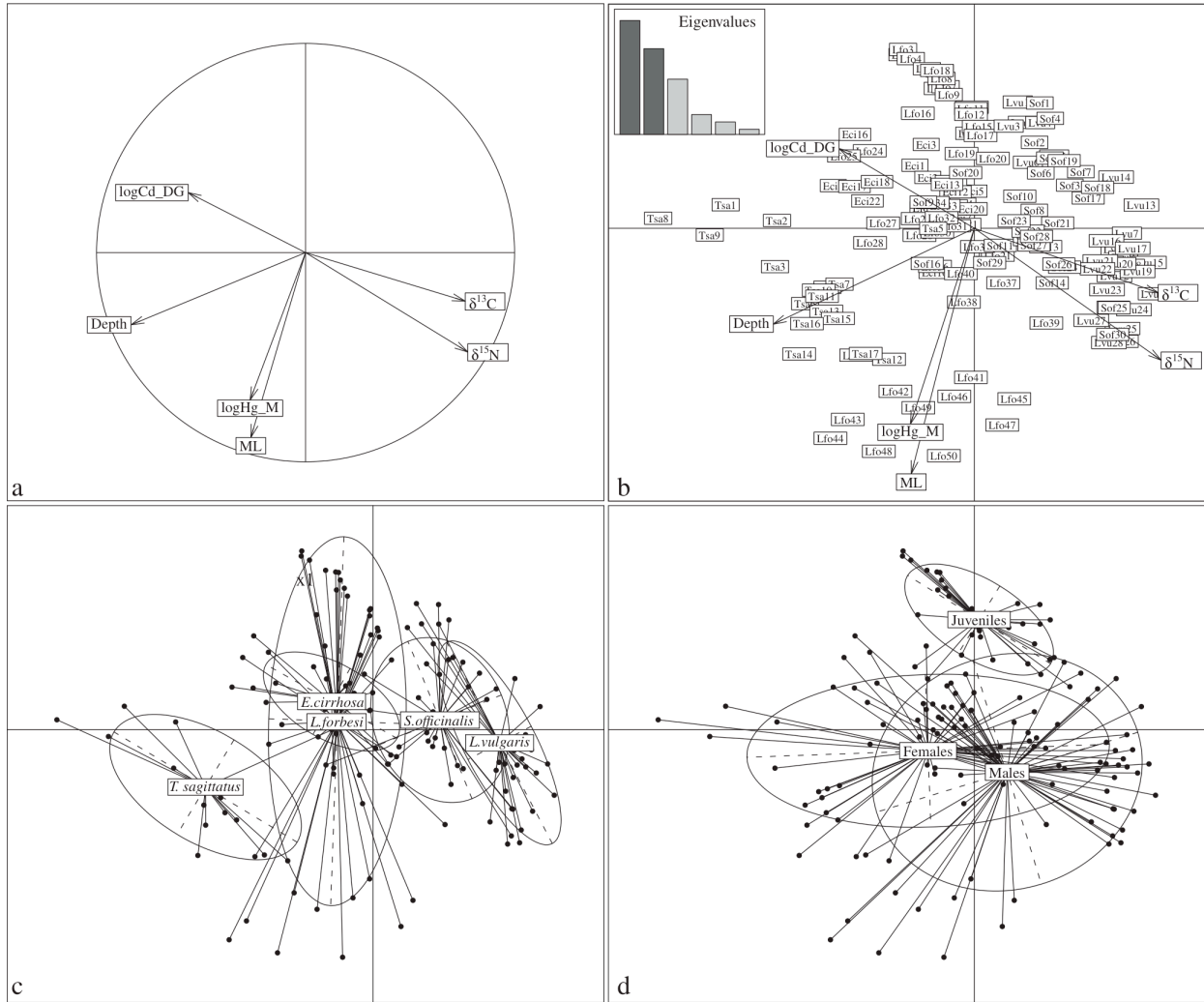


Fig. 2. *Eledone cirrhosa*, *Loligo vulgaris*, *L. forbesi*, *Sepia officinalis* and *Todarodes sagittatus*. Projection of variables (Cd_DG: Cd in digestive gland; Hg_M: Hg in muscle; ML: mantle length) and individuals on the first 2 components resulting from the principal component analysis (PCA). (a) Correlation biplot showing the distribution of the variables. The length of the line for a variable shows how well it is represented by the 2-dimensional approximation, and reflects its contribution to the first 2 principal components. Horizontal axis: principal component 1 (eigenvalue = 2.3, that is 39% of the variability explained by axis 1); vertical axis: principal component 2 (eigenvalue = 1.8, that is 29% of the variability explained by axis 2). Variables pointing in the same direction display a high positive correlation. Variables pointing in the opposite direction have a high negative correlation. Variables with an angle of 90° have a small correlation close to 0. (b) Projection of individuals on the correlation biplot, and histogram of eigenvalues of the different components resulting from the PCA. The black shaded bars refer to the first 2 components with higher eigenvalues, represented on the correlation biplot. The grey shaded bars refer to the other components. Eigenvalues = 2.3, 1.8, 1.1, 0.4, 0.3, 0.1 for the components resulting from the PCA, from 1 to 6 respectively. (c) Grouping of individuals by species. (d) Grouping of individuals by sex (juveniles: small individuals with no visible distinct gonads)

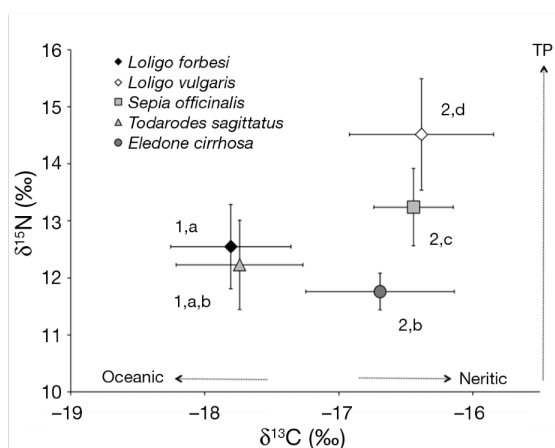


Fig. 3. *Loligo vulgaris*, *L. forbesi*, *Sepia officinalis*, *Todarodes sagittatus* and *Eledone cirrhosa*. Muscle $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values (‰) of 5 species of cephalopods from the Bay of Biscay. Species not sharing the same numbers ($\delta^{13}\text{C}$) and letters ($\delta^{15}\text{N}$) are significantly different ($\delta^{13}\text{C}$: Kruskal-Wallis $\chi^2 = 97.5$, $df = 4$, $p < 0.001$; $\delta^{15}\text{N}$: Kruskal-Wallis $\chi^2 = 80.9$, $df = 4$, $p < 0.001$). Values are means \pm SD. TP = Trophic position

In the 3 species, adults significantly differed from juveniles in their muscle Hg concentrations (Table 2). Among adults, average Hg concentrations were significantly different between males and females for *Loligo vulgaris* and *L. forbesi* but not for *Sepia officinalis* (Table 2).

Regarding Cd, there was a significant negative correlation between log-transformed concentrations and DML on the one hand ($R^2_{\text{Spearman}} = 0.416$, $p < 0.001$), and between log-transformed Cd concentrations and $\delta^{15}\text{N}$ values on the other hand ($R^2_{\text{Pearson}} = 0.253$, $p < 0.001$), in *Loligo forbesi* only (Fig. 6). In fact, males (comprising larger individuals with the highest $\delta^{15}\text{N}$ values) significantly differed from juveniles and females (Table 2, Fig. 6). No significant correlation was found between log-transformed digestive gland Cd concentrations and DML or $\delta^{15}\text{N}$ values, neither were differences found between sexes in *L. vulgaris* and *Sepia officinalis* (Fig. 6, Table 2).

DISCUSSION

Inter-specific differences in trophic ecology and metal bioaccumulation

From a community point of view, isotopic signatures (carbon and nitrogen combined) were the chemical parameters that best segregated 5 cephalopod species from the Bay of Biscay (Figs. 2 & 3). Four distinct iso-

topic niches (as described by Newsome et al. 2007) emerged, with *Loligo forbesi* and *Todarodes sagittatus* sharing the same isotopic niche (Fig. 3). The different isotopic niches suggest clear segregations in terms of trophic ecology, and these results agree with what is currently known about the spatial distribution and feeding habits of the 5 species. Indeed, *L. forbesi* and

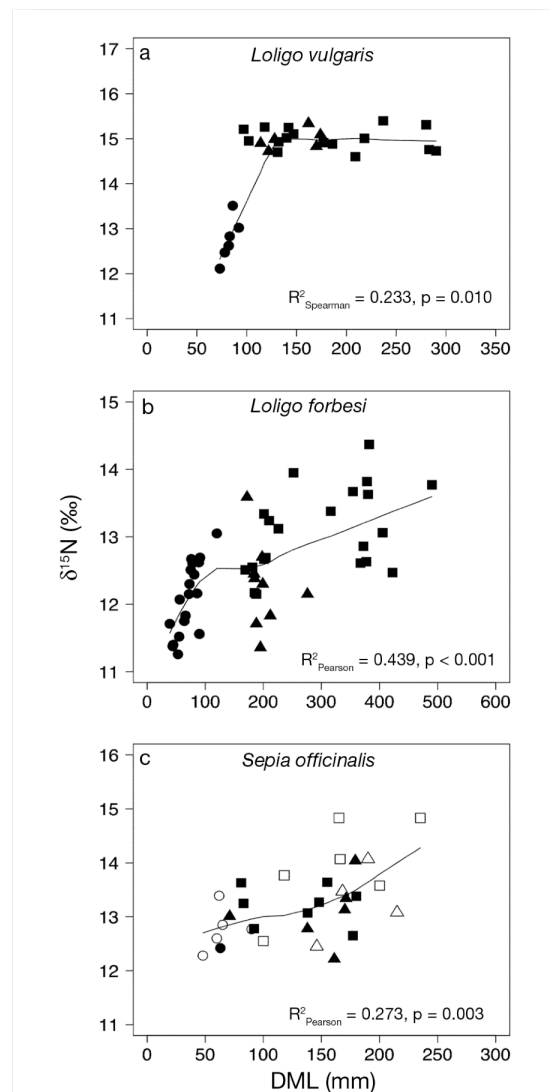


Fig. 4. *Loligo vulgaris*, *L. forbesi* and *Sepia officinalis*. Relationships between muscle $\delta^{15}\text{N}$ values and dorsal mantle length (DML) in (a) *Loligo vulgaris*, (b) *L. forbesi*, and (c) *Sepia officinalis*; individuals are separated by sex and by year. Squares = males; triangles = females; circles = juveniles; black = 2008; white = 2006. Smoothing lines (robust, locally weighted scatterplot smoothing system based on the LOWESS algorithm with the software R) represent the fitted non-linear trend of the values when the correlation coefficient test is significant

Table 2. *Loligo vulgaris*, *L. forbesi* and *Sepia officinalis*. Muscle $\delta^{15}\text{N}$ values, muscle Hg, and digestive gland Cd concentrations in individuals separated by sex (juveniles: small individuals with no visible distinct gonads). Groups with the same letter indicate that sexes are not significantly different (post hoc Tukey's test in the case of ANOVA, multiple comparison test [MPC] with Holm's adjustment method in the case of Kruskal-Wallis [KW]). N = sample size

Species	Sex	N	Mean \pm SD	Range	Test and characteristics	Group
Muscle $\delta^{15}\text{N}$ (‰)						
<i>Loligo vulgaris</i>	Juveniles	6	12.8 \pm 0.5	12.1, 13.5	1-way ANOVA (+ Tukey's test) $F = 130.7$, $df = 2$ $p < 0.001$	a
	Females	6	15.0 \pm 0.2	14.7, 15.3		b
	Males	16	15.0 \pm 0.2	14.6, 15.4		b
<i>Loligo forbesi</i>	Juveniles	20	12.1 \pm 0.5	11.3, 13.1	1-way ANOVA (+ Tukey's test) $F = 14.8$, $df = 2$ $p < 0.001$	a
	Females	9	12.3 \pm 0.6	11.4, 13.6		a
	Males	21	13.1 \pm 0.6	12.2, 14.4		b
<i>Sepia officinalis</i>	Juveniles	6	12.7 \pm 0.4	12.3, 13.4	1-way ANOVA (+ Tukey's test) $F = 3.6$, $df = 2$ $p = 0.041$	a
	Females	10	13.2 \pm 0.6	12.2, 14.1		a, b
	Males	14	13.5 \pm 0.7	12.6, 14.8		b
Muscle Hg (ng g⁻¹ dry wt)						
<i>Loligo vulgaris</i>	Juveniles	6	83 \pm 18	65, 113	KW + MPC tests (Holm's) $\chi^2 = 12.2$, $df = 2$ $p = 0.002$	a
	Females	6	161 \pm 14	136, 173		b
	Males	16	156 \pm 31	81, 200		c
<i>Loligo forbesi</i>	Juveniles	20	84 \pm 20	47, 142	KW + MPC tests (Holm's) $\chi^2 = 34.7$, $df = 2$ $p < 0.001$	a
	Females	9	199 \pm 68	99, 302		b
	Males	21	282 \pm 128	109, 547		c
<i>Sepia officinalis</i>	Juveniles	6	124 \pm 34	83, 169	1-way ANOVA (+ Tukey's test) $F = 6.7$, $df = 2$ $p = 0.004$	a
	Females	10	238 \pm 82	126, 380		b
	Males	14	209 \pm 52	108, 290		b
Digestive gland Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt)						
<i>Loligo vulgaris</i>	Juveniles	6	4.4 \pm 1.0	3.5, 6.0	KW + MPC tests (Holm's) $\chi^2 = 1.3$, $df = 2$ $p = 0.530$	a
	Females	6	4.8 \pm 1.2	2.3, 5.9		a
	Males	16	5.6 \pm 3.3	3.3, 17.2		a
<i>Loligo forbesi</i>	Juveniles	20	8.0 \pm 2.1	4.9, 12.0	KW + MPC tests (Holm's) $\chi^2 = 26.7$, $df = 2$ $p < 0.001$	a
	Females	9	7.4 \pm 3.2	1.7, 11.0		a
	Males	21	4.0 \pm 1.3	1.3, 6.7		b
<i>Sepia officinalis</i>	Juveniles	6	7.0 \pm 1.7	5.5, 9.8	KW + MPC tests (Holm's) $\chi^2 = 0.8$, $df = 2$ $p = 0.670$	a
	Females	10	13.0 \pm 13.9	2.5, 44.7		a
	Males	14	8.4 \pm 7.0	3.3, 30.1		a

T. sagittatus generally show a more offshore distribution that fit well with their low $\delta^{13}\text{C}$ values relative to *L. vulgaris* and *Sepia officinalis* (Roper et al. 1984, Lordan et al. 2001a). The enriched $\delta^{13}\text{C}$ values of *Eledone cirrhosa* may be explained by the benthic habitat of this octopus, where baseline $\delta^{13}\text{C}$ values are higher than in pelagic ecosystems (France 1995). Muscle $\delta^{15}\text{N}$ values increased with the probability of a species to feed more on fish than on pelagic or benthic crustaceans in the neritic species, with *L. vulgaris* > *S. officinalis* > *E. cirrhosa* (Roper et al. 1984, Pierce et al. 1994, Pinczon du Sel et al. 2000, Neves et al. 2009). This is in accordance with $\delta^{15}\text{N}$ values of the potential prey available for the Bay of Biscay. Small pelagic crustaceans such as the euphausiid *Meganyctiphanes norvegica* or those constituting zooplankton (e.g. other euphausiids, copepods, mysids) present considerably lower $\delta^{15}\text{N}$ values than small pelagic fish in the Bay of Biscay (between 2 and 5‰ difference in average) (authors' unpubl. data). Moreover, while benthic crustaceans should present

higher $\delta^{15}\text{N}$ values due to their scavenger behaviour, they actually also exhibit lower average $\delta^{15}\text{N}$ values (about 1‰) compared to those of small pelagic or demersal coastal fish such as Gobiidae, Callyonimidae, Ammodytidae or Atherinidae in the Bay of Biscay (Le Loc'h et al. 2008, authors' unpubl. data). *Loligo vulgaris*, and to lesser extent *S. officinalis*, consume those kind of fish (Pierce et al. 1994, Pinczon du Sel et al. 2000), and thus exhibit higher $\delta^{15}\text{N}$ values than the benthic crustacean feeder *E. cirrhosa* (Roper et al. 1984).

Concerning metals, average Hg concentrations in the muscle tissue varied over the same order of magnitude in the 5 species (Table 1) and did not contribute significantly to the segregation of the species in the PCA (Fig. 2). In contrast to Hg, average Cd concentrations in the digestive gland varied over different orders of magnitude between species (Table 1). Cd concentrations tend to increase with the proportion of benthic crustaceans compared to fish in the diet of the neritic

species, with *Eledone cirrhosa* > *Sepia officinalis* > *Loligo vulgaris* (Fig. 2, Table 1). Indeed, food is the major source of Cd intake by cephalopods (Koyama et al. 2000, Bustamante et al. 2002a), and benthic invertebrates generally exhibit higher Cd concentrations relative to fish (Cossa & Lassus 1989, Cabrera et al. 1994). In the species more associated with the oceanic do-

main, the higher Cd concentrations in *Todarodes sagittatus* compared to *L. forbesi* may be related to physiological features more than to diet or habitat, as both species had a similar isotopic niche (Fig. 3). As discussed above, both squids are mainly piscivorous and present an offshore distribution (Pierce et al. 1994, Lordan et al. 2001a,b), but their digestive gland cells

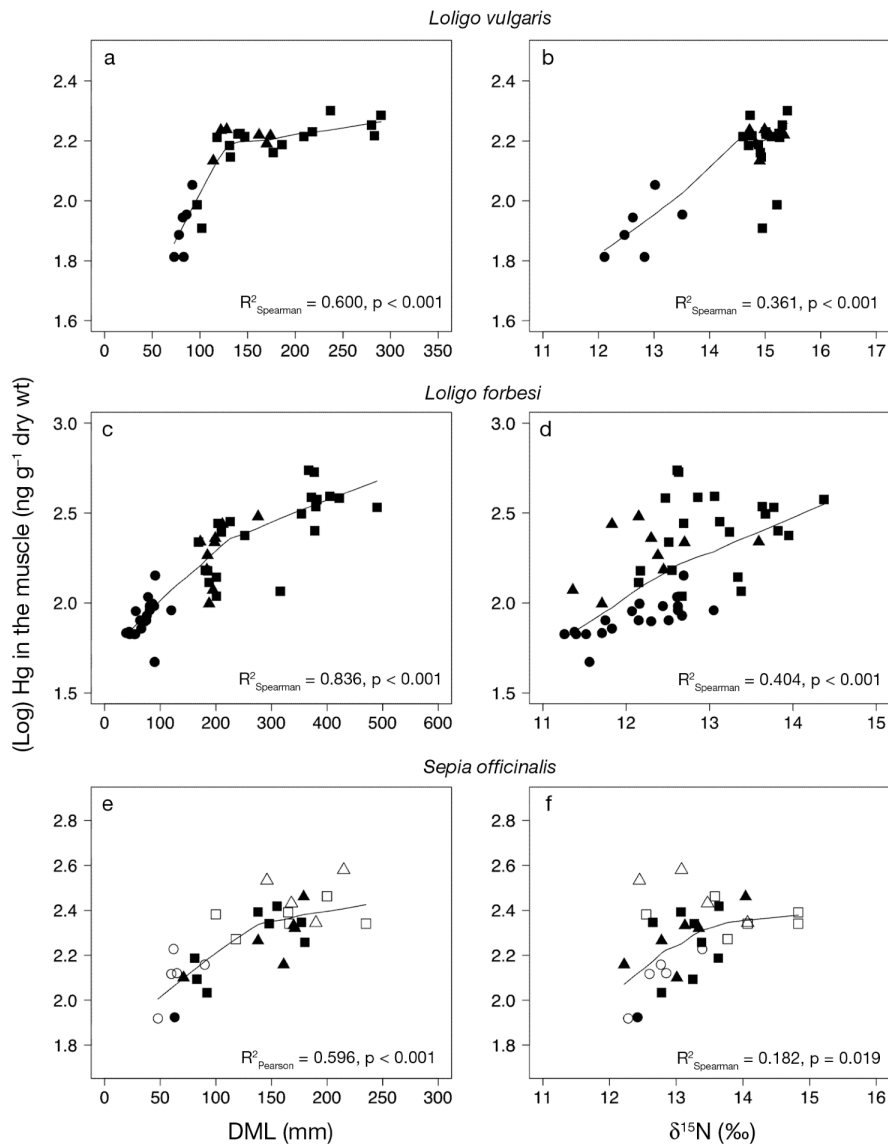


Fig. 5. *Loligo vulgaris*, *L. forbesi* and *Sepia officinalis*. Relationships between log-transformed muscle Hg concentrations and both dorsal mantle length (DML) (left panels) and $\delta^{15}\text{N}$ values (right panels) in (a,b) *Loligo vulgaris*, (c,d) *L. forbesi*, and (e,f) *Sepia officinalis*; individuals are separated by sex and by year. Squares = males; triangles = females; circles = juveniles; black = 2008; white = 2006. Smoothing lines (robust, locally weighted scatterplot smoothing system based on the LOWESS algorithm with the software R) represent the fitted non-linear trend of the values when the correlation coefficient test is significant

strongly differ in terms of structure. The digestive gland cells of *T. sagittatus* contain a 'boule' structure typical of many cephalopod species that are non-existent in Loliginidae (Boucaud-Camou & Yim 1980, Boucher-Rodoni & Boucaud-Camou 1987). 'Boules' may contribute to storage of larger amounts of Cd in *T. sagittatus* (Bustamante et al. 2002b). Therefore, the influence of such a physiological difference cannot be excluded for the species that inhabit the coastal domain; *E. cirrhosa* and *S. officinalis* have 'boule' structures, while they are absent in *L. vulgaris* (Table 1).

Ontogenic changes as an important source of intra-specific variations

In cephalopod species that presented the widest size ranges, the analysis of the relationship between $\delta^{15}\text{N}$ values and DML allowed us to distinguish different feeding profiles during ontogenesis (Zimmer et al. 2007, Parry 2008). $\delta^{15}\text{N}$ values in *Loligo vulgaris* increased drastically between juvenile and adult stages and then remained relatively constant (females and males not differing) (Fig. 4, Table 2). In contrast, in *L. forbesi*, only larger males (>300 mm DML) showed significantly higher $\delta^{15}\text{N}$ values (Fig. 4). This may be due to a difference in prey composition or prey size range in those larger individuals that may have greater energy needs (Pierce et al. 1994, Rocha et al. 1994). Nevertheless, the variability in $\delta^{15}\text{N}$ values over life stages for males, females, and juveniles strongly suggest that this species has an important dietary plasticity during ontogenesis (Fig. 4). As previously commented, *L. vulgaris* likely remains in coastal waters throughout its life cycle, whereas *L. forbesi* is a more oceanic species that has relatively long offshore displacements throughout its life cycle (Rocha & Guerra 1999). These different ontogenic patterns between both *Loligo* species are confirmed by the analyses of their isotopic signatures (Figs. 3 & 4). While *L. vulgaris* may always feed on the same prey species in the coastal food web (i.e. mainly small pelagic coastal fish), *L. forbesi* may feed on different food webs with different baseline isotopic signatures during ontogenesis (e.g. coastal vs. upper slope or oceanic food web). This could contribute to the greater trophic plasticity of *L. forbesi* in comparison with *L. vulgaris*. Furthermore, the contribution of crustaceans is slightly higher in the diet of *L. forbesi* than in those of *L. vulgaris* (Guerra & Rocha 1994, Pierce et al. 1994). Finally, $\delta^{15}\text{N}$ values recorded for juveniles, males, and females in *Sepia officinalis* suggest that this species also displays a strong dietary plasticity at all stages of its life cycle (Fig. 4, Table 2). Thus, isotopic signatures were in agreement with the stomach content data that re-

flected the general opportunistic behaviour and flexible diet of *S. officinalis* (Pinczon du Sel et al. 2000, Neves et al. 2009).

Ontogenic effects were also found for Hg in the mantle muscle. Hg concentrations varied greatly within each species, with concentrations up to 10 times greater in the individuals showing the highest values compared to those displaying the lowest ones (e.g. in *Loligo forbesi*, Table 1). Hg levels increased with DML in the 3 species, and correlations between Hg concentrations and $\delta^{15}\text{N}$ values were considerably lower than those with DML (Fig. 5). This result highlights the ability for Hg to bioaccumulate with age in the muscle of cephalopods (Rossi et al. 1993, Pierce et al. 2008). However, the relationship between muscle Hg levels and $\delta^{15}\text{N}$ values in *L. vulgaris*, in particular, also reflected the trophic switch between juveniles and adults (Figs. 4 & 5) since food intake is the major source of Hg in cephalopods (Lacoue-Labarthe et al. 2009). Hg speciation has not been determined in this study, but it is likely that bioaccumulated Hg was the organic form methyl-Hg, which represents the most important form of Hg in cephalopod muscle (Bustamante et al. 2006, Raimundo et al. 2010). The role of the digestive gland in the storage and detoxification of Hg is still controversial (Bustamante et al. 2006, 2008, Pierce et al. 2008, Lacoue-Labarthe et al. 2009). A preferential redistribution of methyl-Hg from the digestive gland to the muscle is expected (Bustamante et al. 2006), where it may bind with sulphhydryl groups of muscular proteins (Bloom 1992, Bustamante et al. 2006) and accumulate during ontogenesis.

Finally, the bioaccumulation patterns of Cd in the digestive gland during ontogenesis differed between *Loligo vulgaris*, *L. forbesi* and *Sepia officinalis* (Fig. 6, Table 2). While no clear pattern of digestive gland Cd concentrations with DML or $\delta^{15}\text{N}$ values was revealed in *L. vulgaris*; Cd concentrations in the digestive gland of *L. forbesi* significantly decreased with DML and to lesser extent with $\delta^{15}\text{N}$ values (Fig. 6). Such a decrease in Cd concentrations with increasing body size was already observed for *L. forbesi* sampled around the United Kingdom (Pierce et al. 2008). These authors explained the observed decrease as a consequence of a dietary shift with increasing body size, strengthened by a dilution of the metal in the digestive gland due to the very fast growth of this squid. The dilution hypothesis seems to be confirmed in the present study for *L. forbesi*. Indeed, the decrease in Cd concentrations is linked to larger males presenting the lowest Cd concentrations and also the lowest $\delta^{15}\text{N}$ values (Figs. 4 & 6, Table 2). By contrast with *L. forbesi*, Cd concentrations in the digestive gland of *S. officinalis* from the Bay of Biscay did not show clear relationships with DML nor with $\delta^{15}\text{N}$ values or sex (Fig 6, Table 2). Thus, our

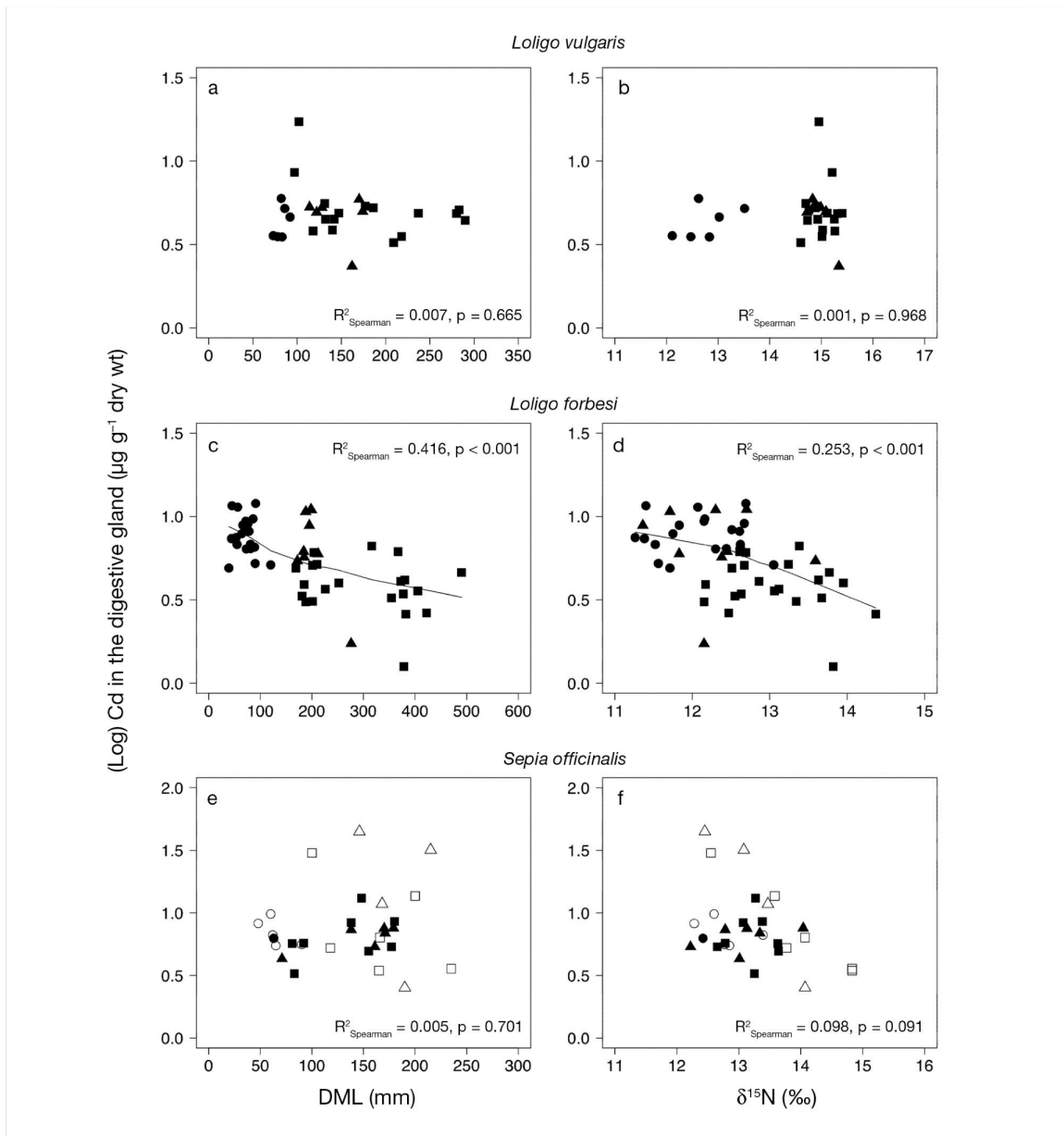


Fig. 6. *Loligo vulgaris*, *L. forbesi* and *Sepia officinalis*. Relationships between log-transformed digestive gland Cd concentrations and both dorsal mantle length (DML) (left panels) and $\delta^{15}\text{N}$ values (right panels) in (a,b) *Loligo vulgaris*, (c,d) *L. forbesi*, and (e,f) *Sepia officinalis*; individuals are separated by sex and by year. Squares = males; triangles = females; circles = juveniles; black = 2008; white = 2006. Smoothing lines (robust, locally weighted scatterplot smoothing system based on the LOWESS algorithm with the software R) represent the fitted non-linear trend of the values when the correlation coefficient test is significant

results for *S. officinalis* do not match those from Miramand et al. (2006) who found a clear increase of Cd concentrations with size in the digestive gland of the cuttlefish from the English Channel. Such an increase was explained by the very long biological half-life of Cd in cuttlefish following its assimilation from food (Bustamante et al. 2002a). The strong retention capac-

ity of Cd in the digestive gland of *S. officinalis* is probably related to its cells containing the typical 'boule' structures (Boucaud-Camou & Yim 1980, Boucher-Rodoni & Boucaud-Camou 1987), as commented above for *T. sagittatus*. Nevertheless, in our study, values of Cd levels varied greatly between individuals of *S. officinalis* (ranging from 2.5 to $44.7 \mu\text{g g}^{-1}$ dry wt).

In the absence of clear relationships of Cd concentrations with DML and $\delta^{15}\text{N}$ values, we can only speculate in explaining this variability. Migration patterns of *S. officinalis* for reproduction may explain such a difference between individuals that come from different sites with different degrees of contamination of potential prey. Further investigations of the possible geographical influence on Cd concentrations should be carried out.

Implication for the use of stable isotopes, Hg and Cd as ecological tracers

Stable isotopes of carbon and nitrogen appear to offer great possibilities for describing the trophic ecology of species at the community scale (resource partitioning, trophic segregation), as well as changes of dietary habits during ontogenesis (Cherel & Hobson 2005, Zimmer et al. 2007, Parry 2008, Cherel et al. 2009, present study). Also, if information derived from isotopic signatures often need to be validated by available data on diet (e.g. from stomach contents analyses), the stable isotope approach presents the advantage of reflecting a longer-term average diet compared to the stomach contents method (Ruiz-Cooley et al. 2006). Nevertheless, there is a dramatic lack of information on specific differences in metabolic turn-over and isotopic fractionation in cephalopods, and such information could greatly improve our understanding and interpretation of isotopic data for inter-specific differences in trophic ecology.

Inter-specific comparisons (i.e. same order of magnitude in muscle Hg concentrations) as well as intra-specific ones (i.e. bioaccumulation with age in the muscle for all species) revealed that muscular Hg does not represent a good tracer of the feeding zone or habitat at the scale of the Bay of Biscay. Individuals from about the same size or age class must be considered for comparison (e.g. inter-specific or geographical comparisons). The same precaution should probably be taken to use this trace element as an indicator of the trophic level, as Hg (and particularly methyl-Hg) biomagnifies along food chains (Eisler 1987, Cossa et al. 1990).

Finally, despite direct ontogenic effects related to growth in some species (i.e. dilution effect), digestive gland Cd concentrations in cephalopods are likely to reflect (1) diet preferences between species (i.e. species mainly feeding on benthic crustaceans vs. pelagic fish prey) despite possible individual specialization during ontogenesis and (2) differences in the physiology of metal accumulation between species (Bustamante et al. 2002b). Also, in cases where cephalopods would be considered as prey in diet studies of their consumers such as marine mammals or seabirds, only a

limited size range of individuals (potential size range consumed) should be considered (Lahaye et al. 2005), and ontogenic effects should not cause any bias.

Acknowledgements. This work was supported through the PhD grant of T.C. from the Conseil Régional de Poitou-Charentes. Authors are very grateful to J. P. Léauté, R. Bellail and J. C. Mahé from IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) for facilitating the sampling during EVHOE cruises. They also thank P. Richard and G. Guillou (UMR LIENSs) for running stable isotope measurements, C. Churlaud and M. Kalombo from the Centre Commun d'Analyses (Fédération de Recherche en Environnement pour le Développement Durable FR 3097 CNRS-IFREMER-Université de La Rochelle) for running part of the metal analyses, and C. Pignon-Mussaud from the Cellule Géomatique (UMR LIENSs) for providing the map of sampling locations. Finally, the authors are grateful to the 4 anonymous reviewers who helped improve the manuscript.

LITERATURE CITED

- ▶ Bargagli R, Nelli L, Ancora S, Focardi S (1996) Elevated cadmium accumulation in marine organisms from Terra Nova Bay (Antarctica). *Polar Biol* 16:513–520
- ▶ Bloom NS (1992) On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue. *Can J Fish Aquat Sci* 49:1010–1017
- ▶ Boucaud-Camou E, Yim M (1980) Fine structure and function of the digestive cell of *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). *J Zool* 191:89–105
- ▶ Boucher-Rodoni R, Boucaud-Camou E (1987) Fine structure and absorption of ferritin in the digestive organs of *Loligo vulgaris* and *L. forbesi* (Cephalopoda, Teuthoidea). *J Morphol* 193:173–184
- ▶ Bustamante P, Caurant F, Fowler SW, Miramand P (1998) Cephalopods as a vector for the transfer of cadmium to top marine predators in the north-east Atlantic Ocean. *Sci Total Environ* 220:71–80
- ▶ Bustamante P, Teyssié JL, Fowler SW, Cotret O, Danis B, Miramand P, Warnau M (2002a) Biokinetics of zinc and cadmium accumulation and depuration at different stages in the life cycle of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Mar Ecol Prog Ser* 231:167–177
- ▶ Bustamante P, Cosson RP, Gallien I, Caurant F, Miramand P (2002b) Cadmium detoxification processes in the digestive gland of cephalopods in relation to accumulated cadmium concentrations. *Mar Environ Res* 53:227–241
- ▶ Bustamante P, Morales CF, Mikkelsen B, Dam M, Caurant F (2004) Trace element bioaccumulation in grey seals *Halichoerus grypus* from the Faroe Islands. *Mar Ecol Prog Ser* 267:291–301
- ▶ Bustamante P, Lahaye V, Durnez C, Churlaud C, Caurant F (2006) Total and organic Hg concentrations in cephalopods from the North East Atlantic waters: influence of geographical origin and feeding ecology. *Sci Total Environ* 368:585–596
- ▶ Bustamante P, Gonzalez A, Rocha F, Miramand P, Guerra A (2008) Metal and metalloid concentrations in the giant squid *Architeuthis dux* from Iberian waters. *Mar Environ Res* 66:278–287
- ▶ Cabrera C, Lorenzo ML, Gallego C, López MC, Lillo E (1994) Cadmium contamination levels in seafood determined by electrothermal atomic absorption spectrometry after microwave dissolution. *J Agric Food Chem* 42:126–128

- Caurant F, Amiard-Triquet C (1995) Cadmium contamination in pilot whales *Globicephala melas*: source and potential hazard to the species. *Mar Pollut Bull* 30:207–210
- Challier L, Royer J, Robin JP (2002) Variability in age-at-recruitment and early growth in English Channel *Sepia officinalis* described with statolith analysis. *Aquat Living Resour* 15:303–311
- Cherel Y, Hobson KA (2005) Stable isotopes, beaks and predators: a new tool to study the trophic ecology of cephalopods, including giant and colossal squids. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 272:1601–1607
- Cherel Y, Fontaine C, Jackson GD, Jackson CH, Richard P (2009) Tissue, ontogenic and sex-related differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the oceanic squid *Todarodes filippovae* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Mar Biol* 156: 699–708
- Cossa D, Lassus P (1989) Le cadmium en milieu marin. *Biogéochimie et écotoxicologie. Rapports Scientifiques et Techniques de l'IFREMER* 16, Issy-les-Moulineaux
- Cossa D, Thibaud Y, Roméo M, Gnassia-Barelli M (1990) Le mercure en milieu marin. *Biogéochimie et écotoxicologie. Rapports Scientifiques et Techniques de l'IFREMER* 19, Brest
- Cronin M, Davies IM, Newton A, Pirie JM, Topping G, Swan S (1998) Trace metal concentrations in deep sea fish from the North Atlantic. *Mar Environ Res* 45:225–238
- Cury P, Shannon L, Shin YJ (2003) The functioning of marine ecosystems: a fisheries perspective. In: Sinclair M, Valdimarsson G (eds) *Responsible fisheries in the marine ecosystem*. CAB International, Wallingford, p 103–123
- De Niro MJ, Epstein S (1977) Mechanism of carbon fractionation associated with lipid synthesis. *Science* 197:261–263
- De Niro MJ, Epstein S (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 42:495–506
- De Niro MJ, Epstein S (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 45:341–351
- Eisler R (1987) Mercury hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *US Fish and Wildlife Service Biological Report* 85 (1.10)
- France RL (1995) Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: food web implications. *Mar Ecol Prog Ser* 124:307–312
- Gascuel D, Bozec YM, Chassot E, Colomb A, Laurans M (2005) The trophic spectrum: theory and application as an ecosystem indicator. *ICES J Mar Sci* 62:443–452
- Guerra A, Rocha F (1994) The life history of *Loligo vulgaris* and *Loligo forbesi* (Cephalopoda: Loliginidae) in Galician waters (NW Spain). *Fish Res* 21:43–69
- Hédouin L, Bustamante P, Churlaud C, Pringault O, Fichez R, Warnau M (2009) Trends in concentrations of selected metalloid and metals in two bivalves from the coral reefs in the SW lagoon of New Caledonia. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:372–381
- Hobson KA (1999) Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120:314–326
- Hobson KA, Wassenaar LI (1999) Stable isotope ecology: an introduction. *Oecologia* 120:312–313
- Hobson KA, Welch HE (1992) Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 84:9–18
- Jackson GD, Bustamante P, Cherel Y, Fulton A and others (2007) Applying new tools to cephalopod trophic dynamics and ecology: perspectives from the Southern Ocean Cephalopod Workshop, 2–3 February 2006. *Rev Fish Biol Fish* 17:79–99
- Jennings S, Pinnegar JK, Polunin NVC, Boon TW (2001) Weak cross-species relationships between body size and trophic level belie powerful size-based trophic structuring in fish communities. *J Anim Ecol* 70:934–944
- Koyama J, Nanamori N, Segawa S (2000) Bioaccumulation of waterborne and dietary cadmium by oval squid *Sepioteuthis lessoniana*, and its distribution among organs. *Mar Pollut Bull* 40:961–967
- Lacoue-Labarthe T, Waranu M, Oberhänsli F, Teyssié JL, Bustamante P (2009) Bioaccumulation of inorganic Hg by the juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* exposed to ^{203}Hg radiolabelled seawater and food. *Aquat Biol* 6:91–98
- Lahaye V, Bustamante P, Spitz J, Dabin W, Das K, Pierce GJ, Caurant F (2005) Long-term dietary segregation of common dolphins *Delphinus delphis* in the Bay of Biscay, determined using cadmium as an ecological tracer. *Mar Ecol Prog Ser* 305:275–285
- Le Loc'h F, Hily C, Grall J (2008) Benthic community and food web structure on the continental shelf of the Bay of Biscay (North Eastern Atlantic) revealed by stable isotopes analysis. *J Mar Syst* 72:17–34
- Lordan C, Warnes S, Cross TF, Burnell M (2001a) The distribution and abundance of cephalopod species caught during demersal trawl surveys west of Ireland and in the Celtic Sea. *Ir Fish Investig Ser B(Mar)* 8:1–26
- Lordan C, Collins MA, Key LN, Browne ED (2001b) The biology of the ommastrephid squid, *Todarodes sagittatus*, in the north-east Atlantic. *J Mar Biol Assoc UK* 81:299–306
- Martin JH, Flegal AR (1975) High copper concentrations in squid livers in association with elevated levels of silver, cadmium, and zinc. *Mar Biol* 30:51–55
- Michener RH, Kaufman L (2007) Stable isotope ratios as tracers in marine food webs: an update. In: Michener RH, Lajtha K (eds) *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Blackwell Scientific, Oxford, p 238–282
- Miramand P, Bentley D (1992) Concentration and distribution of heavy metals in tissues of two cephalopods, *Eledone cirrhosa* and *Sepia officinalis*, from the French coast of the English Channel. *Mar Biol* 114:407–414
- Miramand P, Bustamante P, Bentley D, Kouéta N (2006) Variation of heavy metal concentrations (Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, V, and Zn) during the life cycle of the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Sci Total Environ* 361:132–143
- Monteiro LR, Costa V, Furness RW, Santos RS (1996) Mercury concentrations in prey fish indicate enhanced bioaccumulation in mesopelagic environments. *Mar Ecol Prog Ser* 141:21–25
- Neves A, Sequeira V, Vieira AR, Paiva R, Gordo LS (2009) Feeding habits of the cuttlefish *Sepia officinalis* during its life cycle in the Sado estuary (Portugal). *Hydrobiologia* 636:479–488
- Newsome SD, Martinez del Rio C, Bearhop S, Phillips DL (2007) A niche for isotopic ecology. *Front Ecol Environ* 5: 429–436
- Ochoa-Acuña H, Sepúlveda MS, Gross TS (2002) Mercury in feathers from Chilean birds: influence of location, feeding strategy, and taxonomic affiliation. *Mar Pollut Bull* 44: 340–349
- Parry M (2008) Trophic variation with length in two ommastrephid squids, *Ommastrephes bartramii* and *Sthenoteuthis oualaniensis*. *Mar Biol* 153:249–256
- Perga ME, Gerdeaux D (2005) 'Are fish what they eat' all year round? *Oecologia* 144:598–606
- Piatkowski U, Pierce GJ, Morais da Cunha M (2001) Impact of cephalopods in the food chain and their interaction with the environment and fisheries: an overview. *Fish Res* 52: 5–10

- ▶ Pierce GJ, Boyle PR, Hastie LC, Santos MB (1994) Diets of squid *Loligo forbesi* and *Loligo vulgaris* in the northeast Atlantic. *Fish Res* 21:149–163
- ▶ Pierce GJ, Stowasser G, Hastie LC, Bustamante P (2008) Geographic, seasonal and ontogenetic variation in cadmium and mercury concentrations in squid (Cephalopoda: Teuthoidea) from UK waters. *Ecotoxicol Environ Saf* 70: 422–432
- Pinczon du Sel G, Blanc A, Daguzan J (2000) The diet of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda) during its life cycle in the Northern Bay of Biscay (France). *Aquat Sci* 61:167–178
- ▶ Pinnegar JK, Polunin NVC (1999) Differential fractionation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. *Funct Ecol* 13:225–231
- R Development Core Team (2010) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, www.R-project.org
- ▶ Raimundo J, Vale C, Canário J, Branco V, Moura I (2010) Relations between mercury, methyl-mercury and selenium in tissues of *Octopus vulgaris* from the Portuguese Coast. *Environ Pollut* 158:2094–2100
- ▶ Rocha F, Guerra A (1999) Age and growth of two sympatric squid *Loligo vulgaris* and *Loligo forbesi*, in Galician waters (north-west Spain). *J Mar Biol Assoc UK* 79: 697–707
- Rocha F, Castro BG, Gil MS, Guerra A (1994) The diets of *Loligo vulgaris* and *L. forbesi* (Cephalopoda: Loliginidae) in northwestern Spanish Atlantic waters. *Sarsia* 79: 119–126
- Roper CFE, Sweeney MJ, Nauen CE (1984) FAO species catalogue. Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fish Synop 125(3). FAO, Rome
- ▶ Rossi A, Pellegrini D, Belcari P, Barghigiani C (1993) Mercury in *Eledone cirrhosa* from the Northern Tyrrhenian Sea: contents and relations with life cycle. *Mar Pollut Bull* 26: 683–686
- ▶ Ruiz-Cooley RI, Markaida U, Gendron D, Aguinaga S (2006) Stable isotopes in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) beaks to estimate its trophic position: comparison between stomach contents and stable isotopes. *J Mar Biol Assoc UK* 86: 437–445
- ▶ Santos MB, Clarke MR, Pierce GJ (2001) Assessing the importance of cephalopods in the diets of marine mammals and other top predators: problems and solutions. *Fish Res* 52: 121–139
- ▶ Sherwood GD, Rose GA (2005) Stable isotope analysis of some representative fish and invertebrates of the Newfoundland and Labrador continental shelf food web. *Estuar Coast Shelf Sci* 63:537–549
- ▶ Thompson DR, Furness RW, Monteiro LR (1998) Seabirds as biomonitors of mercury inputs to epipelagic and mesopelagic marine food chains. *Sci Total Environ* 213:299–305
- ▶ Vanderklift MA, Ponsard S (2003) Sources of variation in consumer-diet $\delta^{15}\text{N}$ enrichments: a meta-analysis. *Oecologia* 136:169–182
- ▶ Zauke GP, Savinov VM, Ritterhoff J, Savinova T (1999) Heavy metals in fish from the Barents Sea (summer 1994). *Sci Total Environ* 227:161–173
- ▶ Zimmer I, Piatkowski U, Brey T (2007) The trophic link between squid and the emperor penguin *Aptenodytes forsteri* at Pointe Géologie, Antarctica. *Mar Biol* 152: 1187–1195

Editorial responsibility: Inna Sokolova,
Charlotte, North Carolina, USA

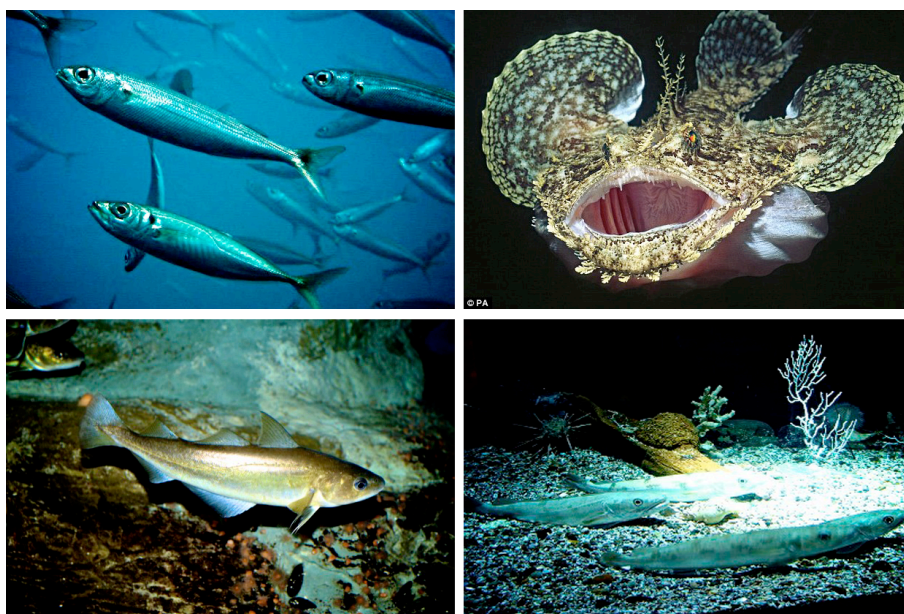
Submitted: November 22, 2010; Accepted: April 4, 2011
Proofs received from author(s): June 20, 2011

Annexe 4

Stable isotope ratios in fish reveal different feeding strategies and muscle Hg bioaccumulation patterns during ontogenesis

Chouvelon T, Cherel Y, Caurant F, Simon-Bouhet B, Mèndez Fernandez P, Bustamante P

En préparation pour Journal of Sea Research



Objectives

To assess 1) ontogenic feeding strategies and 2) related Hg accumulation patterns in the muscle of 4 different species of fish of economical and/or ecological importance in the Bay of Biscay: the whiting *Merlangius merlangus*, the European hake *Merluccius merluccius*, the Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* and the anglerfish *Lophius piscatorius*.

Materials and methods

Selected species

For this study, 4 species of fish were selected following taxonomic, habitat (i.e., coastal vs. upper slope area) and vertical distribution in the water column (i.e., pelagic vs. benthopelagic to benthic) criteria: the whiting *Merlangius merlangus*, the European hake *Merluccius merluccius*, the Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* and the anglerfish *Lophius piscatorius* (Table A4-1).

M. merlangus is a benthopelagic species usually found in shallow waters between 30 and 100 m depth (Quéro 2003, Trenkel et al. 2009, Palomares and Pauly 2010). Juveniles consume small crustaceans such as the decapod *Crangon* sp. or mysids (Moore and Moore 1976, Pedersen 1999). Then, the prey size and the proportion of fish in the diet increase with increasing predator length (Moore and Moore 1976, Hislop et al. 1991, Greenstreet et al. 1998, Pedersen 1999). Thus, in the North-eastern Atlantic, adults of *M. merlangus* mainly consume other benthopelagic fish such as the Norway pout *Trisopterus esmarkii*, or pelagic fish such as the sandeel *Ammodytes marinus*, the sprat *Sprattus sprattus* and the herring *Clupea harengus* (Hislop et al. 1991, Greenstreet et al. 1998).

M. merluccius is a benthopelagic species also, but it is found on the continental shelf and shelf-edge areas, more frequently between 70 and 400 m depth (Quéro 2003, Trenkel et al. 2009, Palomares and Pauly 2010). In the Bay of Biscay and adjacent Celtic Sea in particular, small individuals exclusively feed on crustaceans, mainly euphausiids. When reaching about 23 cm length, individuals shift towards a fully piscivorous diet and fish prey length is then correlated with predator length (Mahe et al. 2007). The diet of adults is thus mainly composed of small pelagic fish such as the horse mackerel *T. trachurus*, the anchovy *Engraulis encrasicolus* and the pilchard *Sardina pilchardus*, or the herring *Clupea harengus* in the northern part of the area (Guichet et al. 1995, Mahe et al. 2007). Nevertheless, the

benthopelagic blue whiting *Micromesistius poutassou* from the shelf-edge also represents an important prey in the diet of the largest individuals of *M. merluccius* (Guichet et al. 1995, Mahe et al. 2007).

Concerning *T. trachurus*, it is a pelagic species usually found between coastline and 200 m depth, sometimes deeper (Quéro 2003, Trenkel et al. 2009, Palomares and Pauly 2010). To the best of our knowledge, very few published data on its diet are available in the North-eastern Atlantic for this species. One study reported stomach contents data from individuals around Britain (Macer 1977). Otherwise, recent published data only concern individuals from the North-western Iberian Peninsula (i.e., Cantabrian Sea and Portugal; Olaso et al. 1999, Cabral et al. 2002). Overall, *T. trachurus* is generally considered as a pelagic plankton feeder (Macer 1977), mainly feeding on crustaceans such as copepods and euphausiids (Olaso et al. 1999, Cabral et al. 2002), with a very low proportion of fish consumed, and with prey size increasing with predator size (Cabral et al. 2002). However, in larger individuals (> 30 cm) from Portugal in particular, the diet may be also composed of small fish such as gobiids or small individuals (< 10 cm) of *E. encrasicolus*, *Gadiculus argenteus* and *M. poutassou* from the shelf-edge (Olaso et al. 1999).

Finally, *L. piscatorius* is a benthopelagic to benthic species that may be found in coastal waters down to depths of 1000 m (Quéro 2003, Trenkel et al. 2009, Palomares and Pauly 2010). For this species also, available data on its diet in the area of concern (i.e., Bay of Biscay in particular and North-eastern Atlantic in general) are very scarce. From these few data, it appears that *L. piscatorius* feed on a wide range of prey species, mainly benthopelagic fish such as *Trisopterus* sp., or even pelagic fish such as the sandeel *A. marinus* (Crozier 1985, Le Loc'h 2004, Laurenson and Priede 2005). However, cephalopods may also represent a large proportion of its diet (Velasco et al. 2001, Le Loc'h 2004), as well as large crustaceans such as lobster *Nephrops* sp. (Crozier 1985). To the best of our knowledge, specific ontogenic shifts in the diet are not documented for *L. piscatorius* (i.e., no published data available).

Sampling

Overall, 285 individuals of covering a large size range for each of the 4 selected species were collected during the EVHOE groundfish surveys conducted by the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), from the continental shelf to the shelf-

edge of the Bay of Biscay only in autumns 2006 to 2009 (Fig. A4-1). In this way, potential seasonal variations in fish diet could not interfere with the present analysis of ontogenic feeding strategies, as all individuals were collected in autumn. On board, each organism was measured (total length, TL) and a piece of dorsal white muscle was removed. The samples were immediately placed in individual plastic bags and frozen at -20°C. Back to the laboratory, samples were freeze-dried. Freeze-dried muscle tissues were finally ground into a fine powder and stored in individual plastic vials until further analyses.

Characteristics of the individuals and of species (number of individuals, TL, general distribution, depth layers of sampling, and years of sampling) are given in Table 1. As both major river plumes of the Bay of Biscay may influence isotopic signatures of the more coastal species (Chouvelon et al. under review), latitudinal zones of sampling were separated: north area ($\geq 46^\circ\text{N}$, *a priori* influence of the Loire river plume) vs. south area of the Bay of Biscay ($< 46^\circ\text{N}$, *a priori* influence of the Gironde river plume). Similarly, isotopic signatures are largely influenced by the habitat of individuals (i.e., neritic vs. oceanic domain) in this type of marine open environment (e.g., Sherwood and Rose 2005, Chouvelon et al. under review). To correct for this spatial variation that may bias interpretation isotopic signatures and of $\delta^{15}\text{N}$ in particular (*a priori* proxy of trophic position), individual depth layers of sampling (i.e., depth under the research vessel at the end of trawling) were considered following the stratification used in the EVHOE surveys: 1: < 30 m; 2: 31-80 m; 3: 81-120 m; 4: 121-160 m; 5: 161-200 m; 6: 201-400 m; 7: 401-600 m. Finally, as inter-annual variations in isotopic signatures may also occur within a species, even considering like-sized individuals (Chouvelon et al. under review), the potential effect of the year of sampling was also taken into account to analyse ontogenic feeding strategies and muscle Hg accumulation patterns of the different species.

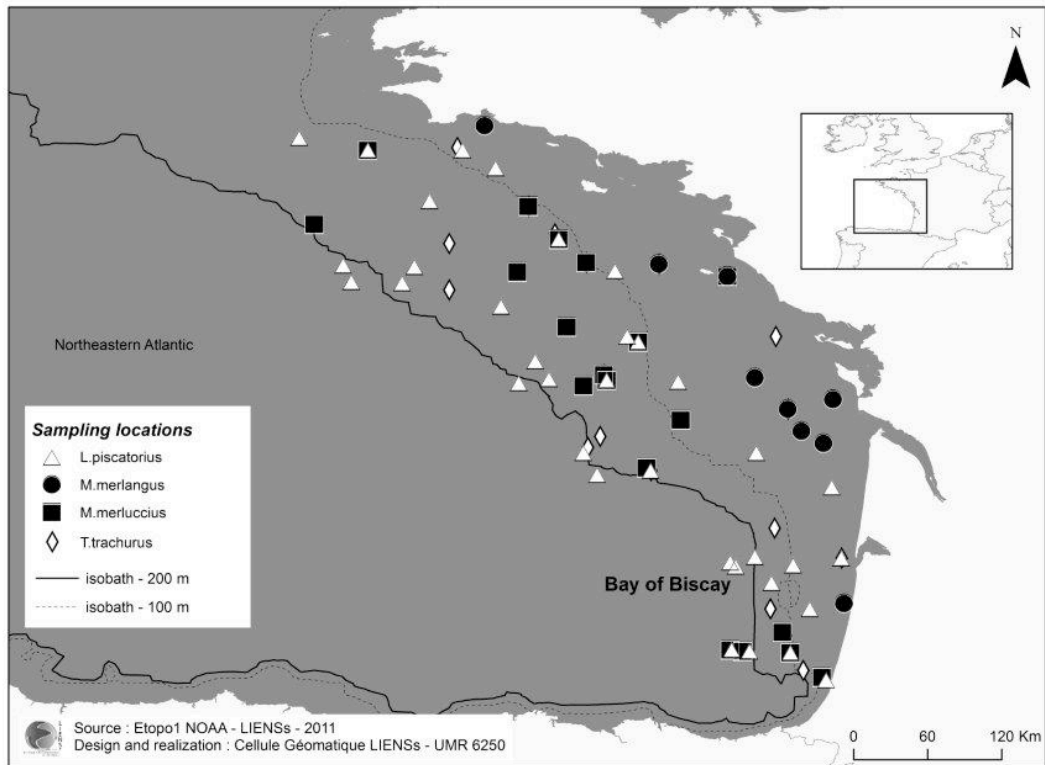


Figure A4-1: Map of sampling locations in the Bay of Biscay.

Isotopic and mercury analyses

Because they are highly depleted in ^{13}C relative to other tissue components (De Niro and Epstein 1977), lipids were extracted from muscle subsamples using cyclohexane as described in Chauvelon et al. (2011) for isotopic analyses. 0.40 ± 0.05 mg subsamples of lipid-free powder were finally weighed in tin cups for SIA. SIA were performed with an elemental analyser coupled to an Isoprime (Micromass) continuous-flow isotope-ratio mass spectrometer (CF IR-MS). The results are presented in the usual δ notation relative to the deviation from standards (Pee Dee Belemnite for $\delta^{13}\text{C}$ and atmospheric nitrogen for $\delta^{15}\text{N}$), in parts per thousand (‰). Based on replicate measurements of internal laboratory standards, experimental precision is of ± 0.15 and ± 0.20 ‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively.

Total Hg analyses were carried out with an Advanced Mercury Analyser (ALTEC AMA 254) as described in Bustamante et al. (2006) on at least 2 homogenized dry muscle tissue subsamples (untreated powder) for each individual. Hg analyses were run according to a

thorough quality control program including the analysis of a certified reference material (CRM) TORT-2 (lobster hepatopancreas; National Research Council, Canada). CRM aliquots were treated and analysed in the same conditions as the samples. CRM results were in good agreement with the certified values, with an average recovery rate of 95%. The detection limit was 5 ng.g⁻¹ dry weight (dwt). All Hg concentrations in tissues reported below are expressed in ng.g⁻¹ dwt.

Data treatment

A first overview of individual $\delta^{13}\text{C}$ values, $\delta^{15}\text{N}$ values and muscle Hg concentrations obtained for the 4 species analysed evidenced the heterogeneity of values for each parameter measured within each species (Fig. A4-2). Also, a covariation between $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values was revealed (Fig. A4-2), as it is generally the case in marine ecosystems (Kelly 2000). Thus, in further statistical analyses to describe ontogenic feeding strategies and Hg accumulation patterns during ontogenesis, only $\delta^{15}\text{N}$ values (*a priori* proxy of trophic position) were kept to avoid redundant analyses and figures.

To identify size-related trends in explaining $\delta^{15}\text{N}$ values variability within each species, Gaussian Generalized Additive Models (GAMs) were fitted to individual $\delta^{15}\text{N}$ values (Zuur et al. 2007) using the mgcv package in R (R Development Core Team 2010). GAMs are non-parametric generalizations of multiple linear regressions. As commented above, in addition to the size effect for $\delta^{15}\text{N}$ values variability, effects of spatial and temporal variations were also taken into account. In these GAMs, the total length of individuals was thus considered as a continuous explanatory variable, while the latitudinal zone, the depth layer and the year of sampling of individuals were treated as categorical explanatory variables in the model. Interaction effects between variables were tested when possible. The general form of the model performed for each species was then:

$$\delta^{15}\text{N values} = s(\text{TL}) + \text{Latitudinal zone} + \text{Depth layer} + \text{Year of sampling}.$$

Then, to identify ontogenic patterns in muscle Hg accumulation, 2 GAMs were fitted to individual log-transformed Hg concentrations for each species, to identify size-related or diet-related trends in explaining Hg concentrations variability, and always taking into account potential effects of spatial and temporal variations. Indeed, as size and $\delta^{15}\text{N}$ values of

individuals covaried within each species following the results of the previous GAMs, both parameters could not be included in a same model (Zuur et al. 2007).

In the first GAM for Hg concentrations, the total length of individuals was thus considered as a continuous explanatory variable, while the latitudinal zone, the depth layer and the year of sampling of individuals were still treated as categorical explanatory variables. This time again, interaction effects between variables were tested when possible. The general form of the model performed for each species was thus:

$$\text{Log [Hg]} = s(\text{TL}) + \text{Latitudinal zone} + \text{Depth layer} + \text{Year of sampling.}$$

In the second GAM for Hg concentrations, the $\delta^{15}\text{N}$ value of individuals was considered as the continuous explanatory variable, and the general form of the model performed for each species to was thus:

$$\text{Log [Hg]} = s(\delta^{15}\text{N}) + \text{Latitudinal zone} + \text{Depth layer} + \text{Year of sampling.}$$

For each GAM performed within a species, a selection of the 'best' model was based upon the Akaike Information Criterion AIC. Indeed, the smaller AIC is, the simplest is the model and the more it explains variability in the data modelled (Zuur et al. 2007). Finally, the assumption of Gaussian error distributions was checked through the residuals of each model.

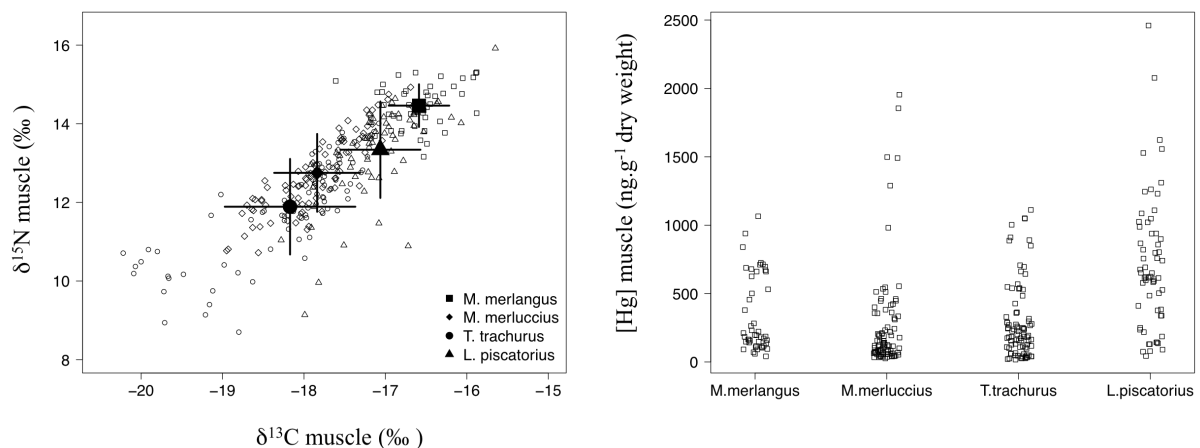


Figure A4-2: First overview of the heterogeneity in individual stable isotopic signatures and muscle Hg concentrations within each of the 4 fish species analysed : the whiting *Merlangius merlangus*, the European hake *Merluccius merluccius*, the Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* and the anglerfish *Lophius piscatorius*. For isotopic signatures, the mean (\pm standard deviation) is also given for each species.

Table A4-1: Characteristics of individuals (N=sample size for each species), muscle $\delta^{15}\text{N}$ values and muscle Hg concentrations for 4 species of fish from the Bay of Biscay. Values are minimum and maximum.

Order and Family	Species	General distribution ^a	DL ^b sampled	Years sampled	N	Total length (mm) (min ; max)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰) (min ; max)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰) (min ; max)	[Hg] (ng.g ⁻¹ dwt) (min ; max)
Gadiform									
Gadidae	<i>Merlangius merlangus</i>	coastal/shelf benthopelagic	1, 2	2008, 2009	47	80 - 480	-17.6 ; -15.9	13.2 ; 15.3	41 ; 1065
Merlucciidae	<i>Merluccius merluccius</i>	shelf/upper slope benthopelagic	1, 2, 3, 4, 5, 7	2008, 2009	90	65 - 720	-18.9 ; -16.7	10.7 ; 14.9	26 ; 1954
Perciform									
Carangidae	<i>Trachurus trachurus</i>	coastal/shelf pelagic	2, 3, 4, 5	2006, 2007, 2008, 2009	87	80 - 410	-20.2 ; -17.1	8.7 ; 14.0	17 ; 1112
Lophiiform									
Lophiidae	<i>Lophius piscatorius</i>	shelf/upper slope benthopelagic/benthic	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	2008, 2009	61	80 - 1020	-18.3 ; -15.6	9.1 ; 15.9	43 ; 2460

^a Affiliation is defined in Materials and Methods.

^b Depth Layer of sampling (i.e., depth under the research vessel at the end of trawling): 1: < 30 m); 2: 31-80 m; 3: 81-120 m; 4: 121-160 m; 5: 161-200 m; 6: 201-400 m; 7: 401-600 m.

Results

Patterns of $\delta^{15}\text{N}$ values with size

Considering the model with the better statistical value for each species, here called the "best model", the total deviance explained in $\delta^{15}\text{N}$ values variability was relatively high, being of 52, 63, 76 and 78% for *M. merlangus*, *L. piscatorius*, *T. trachurus* and *M. merluccius*, respectively (Table A4-2). The effect of total length was highly significant for all species (all $p < 0.0001$). A significant effect of the latitudinal zone and of the depth layer of sampling was only found for *T. trachurus* and *M. merluccius* (Table A4-2). Indeed, in those species, individuals sampled in the south of the Bay of Biscay presented significant lower $\delta^{15}\text{N}$ values than individuals sampled in the north ($p = 0.0001$ and $p < 0.0001$ for *T. trachurus* and *M. merluccius*, respectively). Also, individuals of *T. trachurus* sampled in depth layers 3, 4 and 5 presented significant lower $\delta^{15}\text{N}$ values than individuals sampled in the depth layer 2 (i.e., reference depth layer in the model for this species; $p = 0.0467$, $p = 0.0005$ and $p = 0.0004$ for depth layers 3, 4 and 5 respectively). In *M. merluccius*, only individuals sampled in the depth layer 4 presented slightly significant lower $\delta^{15}\text{N}$ values than individuals sampled in the depth layer 1 (i.e., reference depth layer in the model for this species; $p = 0.0441$). Finally, a significant effect of the year of sampling was only found for *T. trachurus* (Table A4-2). In this case, only individuals sampled in 2007 presented significant higher $\delta^{15}\text{N}$ values than those from 2006 (i.e., reference year in the model for this species; $p = 0.0003$).

Overall, relationships between muscle $\delta^{15}\text{N}$ values and total fish length showed an increase of $\delta^{15}\text{N}$ values with increasing size for all species analysed (Fig. A4-3). GAMs smoothers analyse this relationship once potential effects of all other explanatory variables in the "best" model have been taken into account (i.e., latitudinal zone, and/or depth layer, and/or year of sampling of individuals). Thus, GAMs help in refining the different ontogenic strategies between species. In this way, both Gadiforms (i.e., *M. merlangus* and *M. merluccius*) presented a regular increase of $\delta^{15}\text{N}$ values with size of individuals (Fig. A4-3). On the contrary, both other species *T. trachurus* and *L. piscatorius* displayed a steep increase of $\delta^{15}\text{N}$ values until a certain size (i.e., about 150 mm long for *T. trachurus*, 300-350 mm long for *L. piscatorius*). Then, $\delta^{15}\text{N}$ values were less variable in larger individuals (Fig. A4-3).

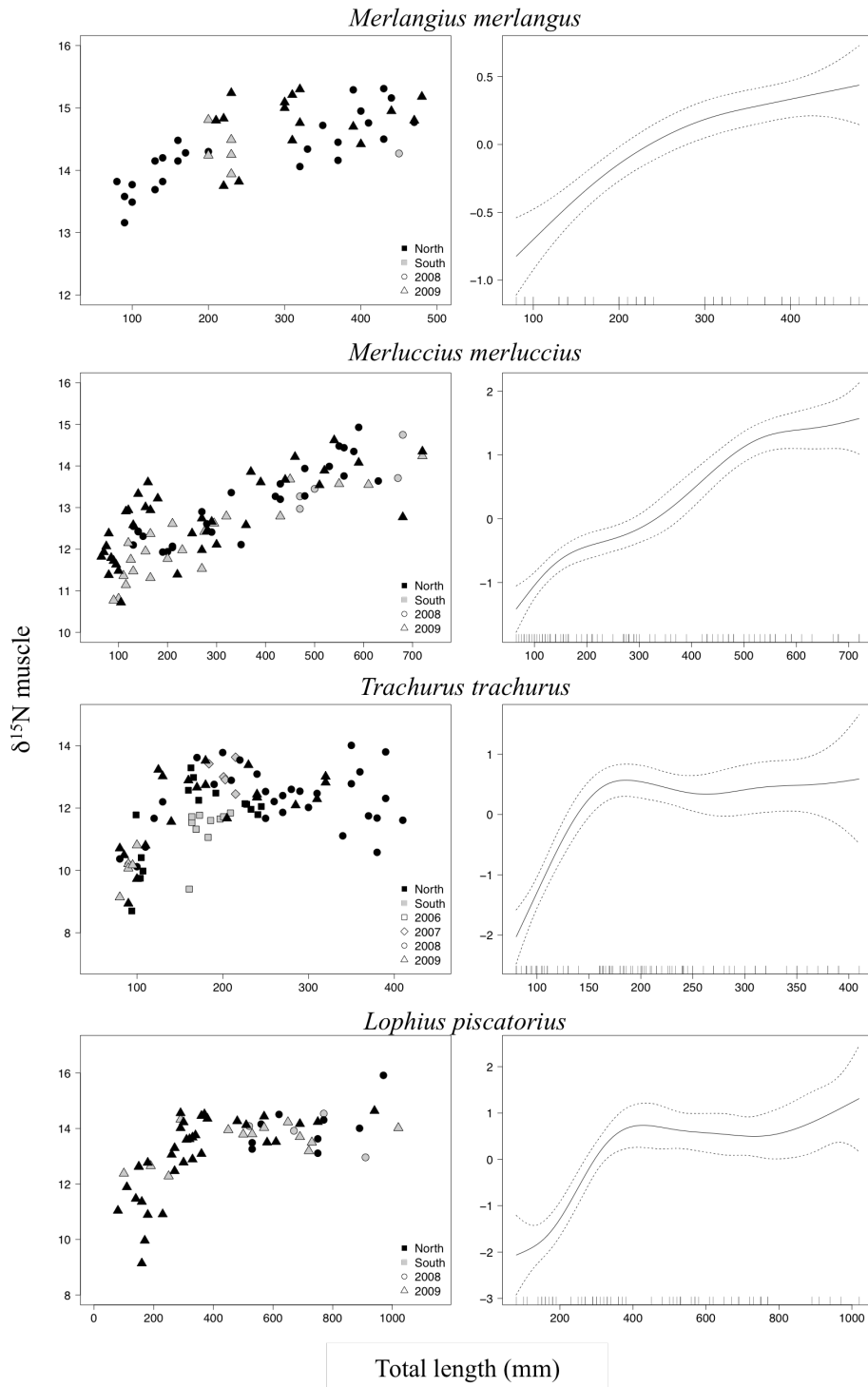


Figure A4-3: Relationship between $\delta^{15}\text{N}$ values (in ‰) in the muscle and total length (in mm) of the 4 species of fish analysed. The classic data plot is presented, as well as the result the GAM model fitted to individual $\delta^{15}\text{N}$ values for each species to identify size-related, spatial and annual trends in explaining $\delta^{15}\text{N}$ values variability within each species. In fact, the smoother illustrates the partial effect of total length once the effects of all other explanatory variables (i.e., latitudinal zone, depth layer, and year of sampling of individuals) included in the model have been taken into account. The y-axis shows the contribution of the smoother to the predictor function in the model (in arbitrary units). Dashed lines represent 95% confidence intervals. Finally, whiskers on the x-axis indicate data presence.

Patterns of muscle Hg accumulation with size or $\delta^{15}\text{N}$ values

Within each species, the total deviance explained in muscle (log-transformed) Hg concentrations variability was always higher in "best models" run with total fish length than those with $\delta^{15}\text{N}$ values (Table A4-2). Indeed, total deviance explained ranged between 85 and 93% when log-transformed Hg concentrations were modelled as a function of size, whereas the deviance explained ranged between 58 and 81% when log-transformed Hg concentrations were modelled as a function of $\delta^{15}\text{N}$ values (Table A4-2). AIC were also considerably lower when log-transformed Hg concentrations were modelled as a function of size, indicating simplest and more efficient models for explaining muscle Hg concentrations variability.

Thus, considering the "best models" with total fish length as the continuous explanatory variable, the effect of size was highly significant for all species (all $p < 0.0001$). A significant effect of the latitudinal zone of sampling was only found for *M. merluccius* (Table A4-2). In this case, individuals sampled in the south of the Bay of Biscay presented significant higher Hg concentrations than those sampled in the north of the area ($p < 0.0001$). A significant effect of the year of sampling was only found for *T. trachurus* (Table A4-2). In this species, individuals sampled in the years 2008 and 2009 displayed significant lower Hg concentrations than individuals sampled in the year 2006 (i.e., reference year in the model for this species; $p < 0.0001$ and $p = 0.0015$ for the years 2008 and 2009, respectively). Despite those exceptions, for the relationships between muscle Hg concentrations and total length of individuals, both classic plots and GAM smoothers revealed a continuous accumulation of mercury with increasing size. However, some slight differences in the shape of GAM smoothers appeared between species. Indeed, *M. merluccius* presented the more linear relationship (Fig. A4-4). The 3 other species displayed a two-phased kinetic of Hg accumulation in the muscle during ontogenesis (Fig. A4-4).

Concerning the "best models" using $\delta^{15}\text{N}$ values as the continuous explanatory variable instead of total length to explain muscle Hg concentrations variability, the effect of $\delta^{15}\text{N}$ values was also significant for all species (Table A4-2, Fig. A4-5). Nevertheless, in those models, other explanatory variables included were more frequently significant. Indeed, a significant effect of the depth layer of sampling was found for all species (all $p < 0.0001$). A significant effect of the latitudinal zone of sampling was found for *M. merluccius* only. Finally, a significant effect of the year of sampling was found for *M. merlangus* and *L. piscatorius* (Table A4-2).

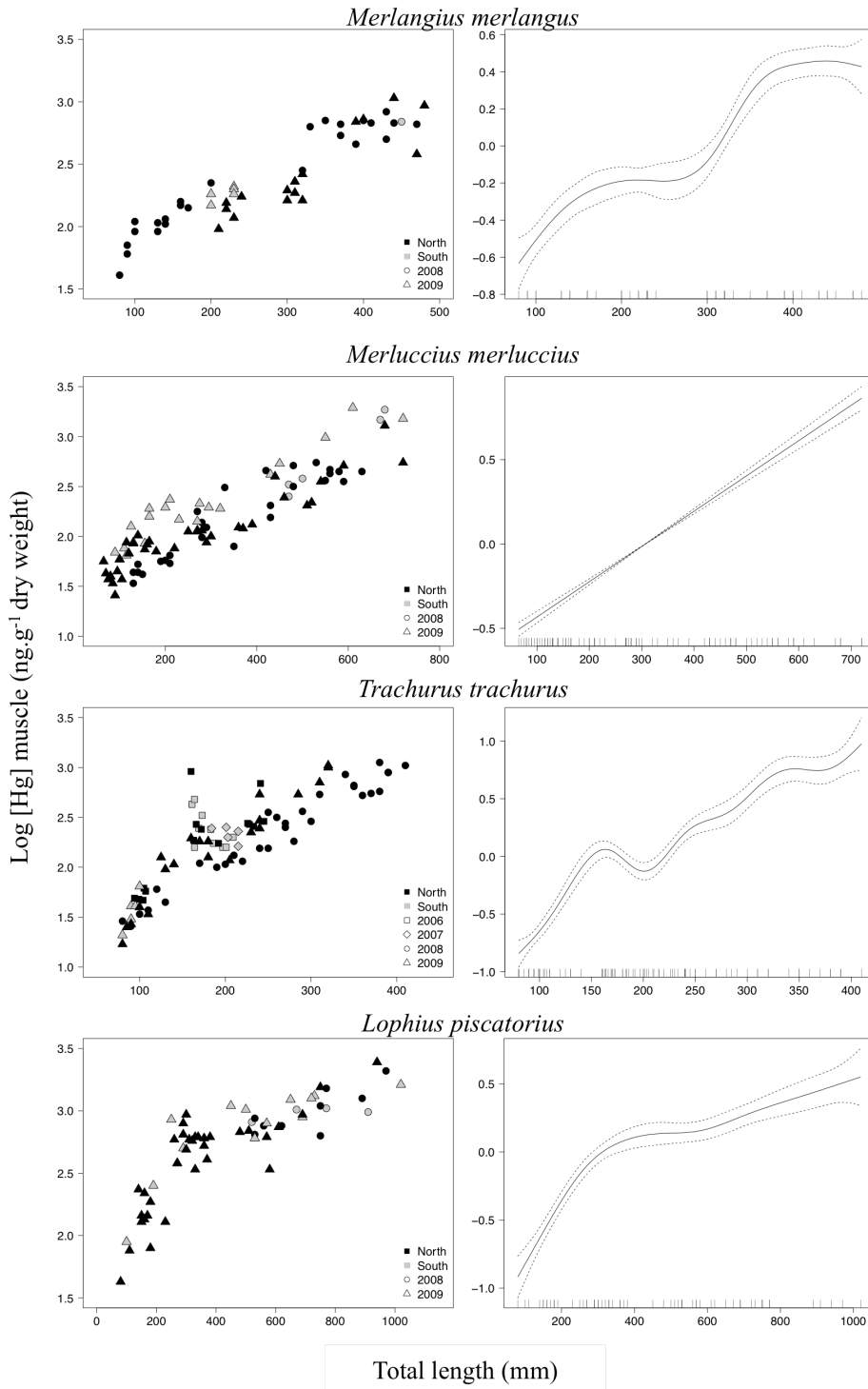


Figure A4-4: Relationship between log-transformed muscle Hg concentrations (in ng.g^{-1} dwt) and total length (in mm) of the 4 species of fish analysed. The classic data plot is presented, as well as the result the GAM model fitted to individual log-transformed Hg concentrations for each species to identify size-related, spatial and annual trends in explaining Hg concentrations variability within each species. In fact, the smoother illustrates the partial effect of total length once the effects of all other explanatory variables (i.e., latitudinal zone, depth layer, and year of sampling of individuals) included in the model have been taken into account. The y-axis shows the contribution of the smoother to the predictor function in the model (in arbitrary units). Dashed lines represent 95% confidence intervals. Finally, whiskers on the x-axis indicate data presence.

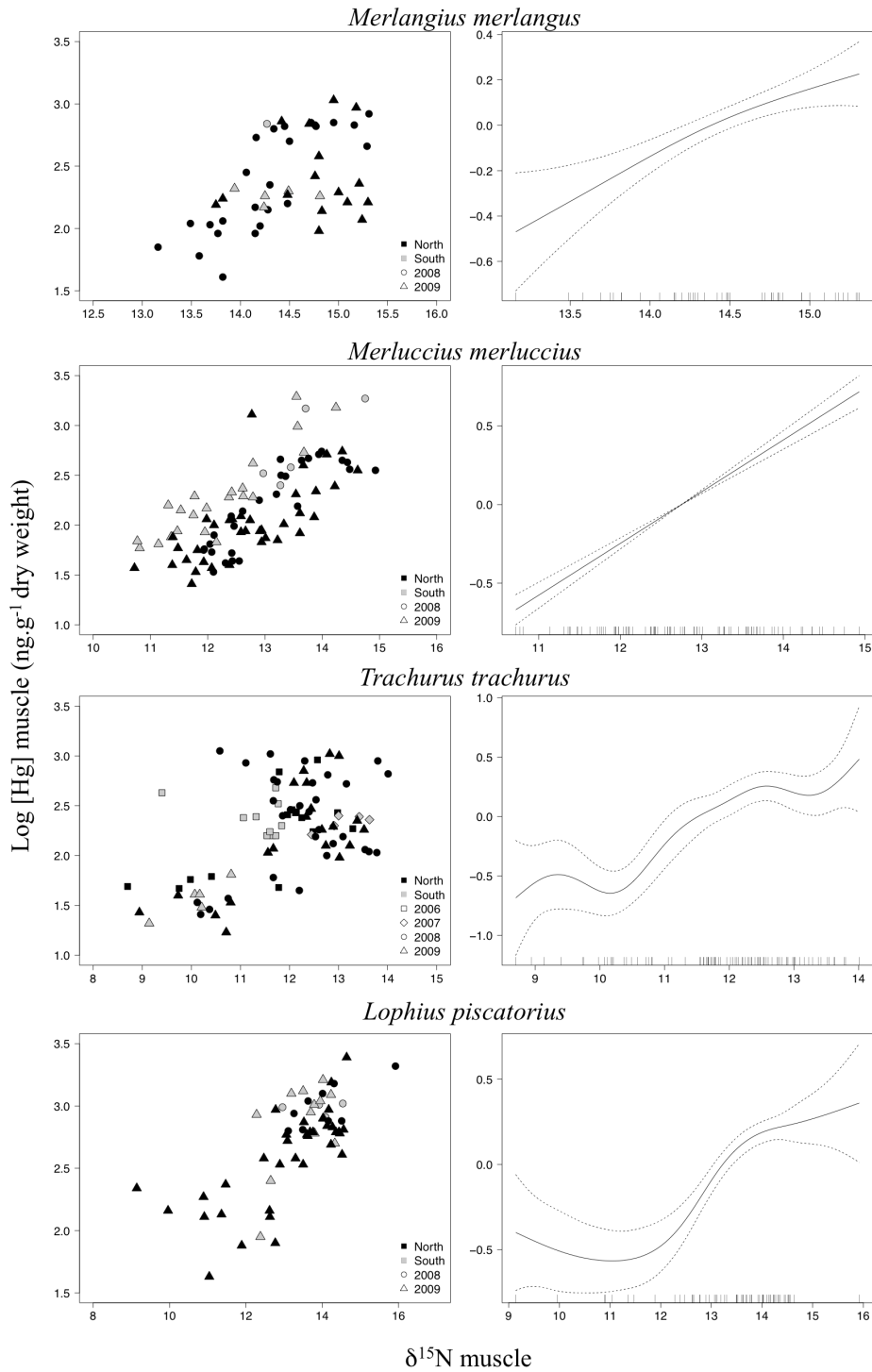


Figure A4-5: Relationship between log-transformed muscle Hg concentrations (in ng.g^{-1} dwt) and $\delta^{15}\text{N}$ values (in ‰) of the 4 species of fish analysed. The classic data plot is presented, as well as the result the GAM model fitted to individual log-transformed Hg concentrations for each species to identify $\delta^{15}\text{N}$ -related, spatial and annual trends in explaining Hg concentrations variability within each species. In fact, the smoother illustrates the partial effect of $\delta^{15}\text{N}$ values once the effects of all other explanatory variables (i.e., latitudinal zone, depth layer, and year of sampling of individuals) included in the model have been taken into account. The y-axis shows the contribution of the smoother to the predictor function in the model (in arbitrary units). Dashed lines represent 95% confidence intervals. Finally, whiskers on the x-axis indicate data presence.

Table A4-2: Detailed results for "best models" (i.e., smallest Akaike Information Criterion AIC) selected to explain $\delta^{15}\text{N}$ values or (log-transformed) Hg concentrations variability in the muscle of the 4 species of fish analysed. Explanatory variables kept (i.e. latitudinal zone, and/or depth layer, and/or year of sampling of individuals), AIC value and deviance explained by each "best model" are indicated (i.e., "best model" characteristics). The p-value associated to each variable is also given, indicating the degree of significance for the effect of a variable in each "best model".

Species	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		log [Hg] (ng.g ⁻¹ dwt)			
	$\delta^{15}\text{N}$ as a function of size		log [Hg] as a function of size		log [Hg] as a function of $\delta^{15}\text{N}$	
	variables	p-value	variables	p-value	variables	p-value
<i>Merlangius merlangus</i>	$\delta^{15}\text{N} = s(\text{TL})$ AIC = 49 Deviance explained = 52%		log [Hg] = s(TL) AIC = -59 Deviance explained = 91%		log [Hg] = s($\delta^{15}\text{N}$) + DL + Y AIC = 4 Deviance explained = 62%	
	s(TL)	< 0.0001	s(TL)	< 0.0001	s($\delta^{15}\text{N}$)	0.0004
					DL	< 0.0001
					Y	0.0005
<i>Merluccius merluccius</i>	$\delta^{15}\text{N} = s(\text{TL}) + \text{LZ} + \text{DL}$ AIC = 141 Deviance explained = 78%		log [Hg] = s(TL) + LZ AIC = -83 Deviance explained = 89%		log [Hg] = s($\delta^{15}\text{N}$) + LZ + DL AIC = -23 Deviance explained = 81%	
	s(TL)	< 0.0001	s(TL)	< 0.0001	s($\delta^{15}\text{N}$)	< 0.0001
	LZ	< 0.0001	LZ	< 0.0001	LZ	< 0.0001
	DL	0.0121			DL	< 0.0001
<i>Trachurus trachurus</i>	$\delta^{15}\text{N} = s(\text{TL}) + \text{LZ} + \text{DL} + \text{Y}$ AIC = 183 Deviance explained = 76%		log [Hg] = s(TL) + Y AIC = -91 Deviance explained = 93%		log [Hg] = s($\delta^{15}\text{N}$) + DL AIC = 61 Deviance explained = 58%	
	s(TL)	< 0.0001	s(TL)	< 0.0001	s($\delta^{15}\text{N}$)	< 0.0001
	LZ	0.0001	Y	< 0.0001	DL	< 0.0001
	DL	0.0001				
	Y	0.002				
<i>Lophius piscatorius</i>	$\delta^{15}\text{N} = s(\text{TL})$ AIC = 151 Deviance explained = 63%		log [Hg] = s(TL) AIC = -49 Deviance explained = 85%		log [Hg] = s($\delta^{15}\text{N}$) + DL + Y AIC = -20 Deviance explained = 81%	
	s(TL)	< 0.0001	s(TL)	< 0.0001	s($\delta^{15}\text{N}$)	< 0.0001
					DL	< 0.0001
					Y	0.0016

TL = Total Length ; LZ = Latitudinal zone ; DL = Depth Layer ; Y = Year.

References

- Bustamante P, Lahaye V, Durnez C, Churlaud C, Caurant F (2006) Total and organic Hg concentrations in cephalopods from the North Eastern Atlantic waters: influence of geographical origin and feeding ecology. *Sci Total Environ* 368: 585-596.
- Cabral HN, Murta AG (2002) The diet of blue whiting, hake, horse mackerel and mackerel of Portugal. *J Appl Ichthyol* 18: 14-23.
- Chouvelon T, Spitz J, Caurant F, Mèndez-Fernandez P, Chappuis A, Laugier F, Le Goff E, Bustamante P (under review) Spatio-temporal variations in stable isotopic signatures revisit the use of $\delta^{15}\text{N}$ in mesoscale studies of marine food webs. The case of an open ecosystem: the Bay of Biscay (North-East Atlantic). *Prog Oceanogr*.
- Chouvelon T, Spitz J, Cherel Y, Caurant F, Sirmel R, Mèndez-Fernandez P, Bustamante P (2011) Inter-specific and ontogenic differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and Hg and Cd concentrations in cephalopods. *Mar Ecol Prog Ser* 433: 107-120.
- Crozier WW (1985) Observations on the food and feeding of the anglerfish, *Lophius piscatorius* L., in the northern Irish Sea. *J Fish Biol* 27: 655-665.
- Greenstreet SPR, McMillan JA, Armstrong E (1998) Seasonal variation in the importance of pelagic fish in the diet of piscivorous fish in the Moray Firth, NE Scotland: a response to variation in prey abundance? *ICES J Mar Sci* 55: 121-133.
- Guichet R (1995) The diet of European hake (*Merluccius merluccius*) in the northern part of the Bay of Biscay. *ICES J Mar Sci* 52: 21-31.
- Hislop JRG, Robb AP, Bell MA, Armstrong DW (1991) The diet and food consumption of whiting (*Merlangius merlangus*) in the North Sea. *ICES J Mar Sci* 48: 139-156.
- Kelly JF (2000) Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Can J Zool* 78: 1-27.
- Laurenson CH, Priede IG (2005) The diet and trophic ecology of anglerfish *Lophius piscatorius* at the Shetland Islands, UK. *J Mar Biol Assoc UK* 85: 419-424.
- Le Loc'h F (2004) Structure, fonctionnement, évolution des communautés benthiques des fonds meubles exploités du plateau continental Nord Gascogne. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France.
- Macer CT (1977) Some aspects of the biology of the horse mackerel *Trachurus trachurus* (L.) in waters around Britain. *J Fish Biol* 10: 51-62.
- Mahe K, Amara R, Bryckaert T, Kacher M, Brylinski JM (2007) Ontogenetic and spatial variation in the diet of hake (*Merluccius merluccius*) in the Bay of Biscay and the Celtic Sea. *ICES J Mar Sci* 64: 1210-1219.
- Moore JW, Moore IA (1976) The basis of food selection in some estuarine fishes. Eels, *Anguilla anguilla* (L.), whiting, *Merlangius merlangus* (L.), sprat, *Sprattus sprattus* (L.) and stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (L.). *J Fish Biol* 9: 375-390.
- Olaso I, Cenderero O, Abaunza P (1999) The diet of horse mackerel, *Trachurus trachurus* (Linnaeus, 1758), in the Cantabrian Sea (north Spain). *J Appl Ichthyol* 15: 193-198.
- Palomares MLD, Pauly D (eds) (2010) SeaLifeBase, World Wide Web electronic publication, www.sealifebase.org, version (12/2010).
- Pedersen J (1999) Diet comparison between pelagic and demersal whiting in the North Sea. *J Fish Biol* 55: 1096-1113.
- Quéro JC (2003) Guide des Poissons de l'Atlantique Européen. Les guides du naturaliste. Delachaux and Niestlé (eds), Paris, France.
- R Development Core Team (2010) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, www.R-project.org.

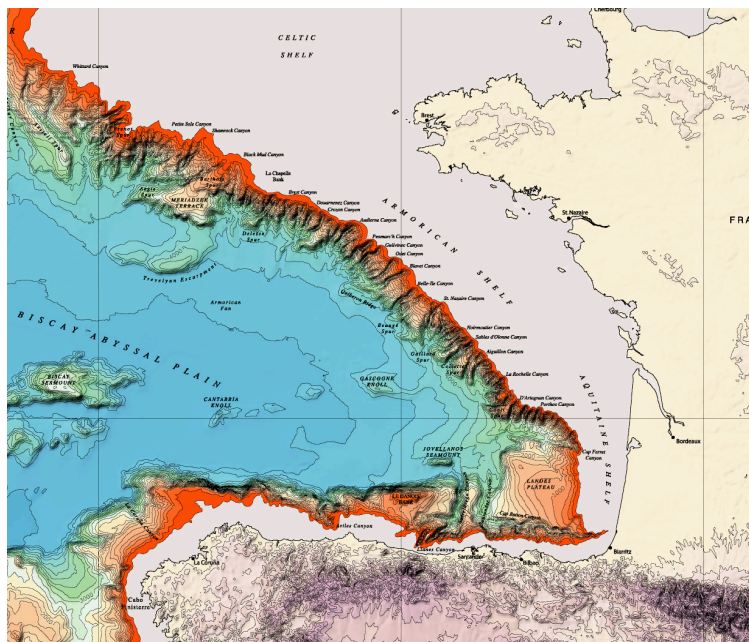
- Sherwood GD, Rose GA (2005) Stable isotope analysis of some representative fish and invertebrates of the Newfoundland and Labrador continental shelf food web. *Estuar Coast Shelf S* 63: 537-549.
- Trenkel VM, Berthel  O, Lorance P, Bertrand J, Brind'Amour A, Cochard ML, Coppin F, Léauté JP, Mahé JC, Morin J, Rochet MJ, Salaun M, Souplet A, V rin Y (2009) Atlas des grands invertébrés et poissons observés par les campagnes scientifiques. Bilan 2008. Ifremer, Nantes, EMH: 09-003, 100 pp.
- Velasco F, Olaso I, Sánchez F (2001) The role of cephalopods as forage for the demersal fish community in the southern Bay of Biscay. *Fish Res* 52: 65-77.
- Zuur AF, Ieno EN, Smith GM (2007) *Analysing Ecological Data*. Springer, New York.

Annexe 5

Spatio-temporal variations in stable isotopic signatures revisit the use of $\delta^{15}\text{N}$ in mesoscale studies of marine food webs. The case of an open ecosystem: the Bay of Biscay (North-East Atlantic)

Chouvelon T, Spitz J, Caurant F, Mèndez-Fernandez P, Chappuis A, Laugier F,
Le Goff E, Bustamante P

Acceptée dans Progress in Oceanography



Abstract

Most of recent framework directives and environmental policies argue for the development and the use of indicators – notably trophodynamic indicators – that should be able to follow ecosystems' evolution in space and time, particularly under anthropogenic perturbations. In the last decades, the use of stable carbon and nitrogen isotopes ratios has increased exponentially, particularly in studies of marine ecosystems' trophic structure and functioning. This method is principally based on the assumption that the isotopic composition of a consumer directly reflects that of its food. Nevertheless, few studies have attempted to define the limits of this tool, before using it and giving ecological conclusions from isotopic analysis. This study aimed at assessing the importance of considering spatio-temporal variations in isotopic signatures of consumers when using $\delta^{13}\text{C}$ and especially $\delta^{15}\text{N}$ values in open ecosystems with complex food webs, using the Bay of Biscay (North-East Atlantic) as a case study. To this end, more than 140 species from this marine ecosystem were analysed for their isotopic signatures in the muscle tissue. They were sampled from coastal to oceanic and deep-sea areas and at different latitudes, to evaluate spatial variations of isotopic signatures. Selected species were also sampled over several years and at two seasons to account for inter-annual and seasonal variations. In the Bay of Biscay temperate ecosystem, subject to both coastal and oceanic influences – two main river inputs and upwelling areas –, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values significantly decreased from inshore to offshore species, and to a lesser extent from benthic to pelagic organisms. River discharges appeared to be the first factor influencing $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in consumers. From the important spatial variations detected in $\delta^{15}\text{N}$ values in particular, we suggest that in such contrasted ecosystem, nitrogen isotopic ratios may be revisited as an indicator of the feeding area also. Moreover, we demonstrate that several baselines should be used when calculating trophic levels from $\delta^{15}\text{N}$ values. From temporal variations detected, we recommend to concentrate on a short time scale for sampling of most of organisms.

Keywords

Nitrogen, carbon, trophic indicators, sources of variations, terrigenous influence, temperate ecosystem.

Introduction

Maintaining both a sustainable exploitation of natural marine resources and a good environmental status of marine ecosystems is a challenge for human societies. This pre-requires a good knowledge of the ecosystems' structure and functioning. Such approaches guide the most recent framework directives and environmental policies for the management of marine ecosystems and their fisheries (Garcia et al. 2003, OSPAR 2010). These directives notably rely on the development of indicators that are easy to implement, and powerful enough to quickly detect changes in the environment. In this way, many authors have recently argued for the development of trophic indicators (Gascuel et al. 2005, Cury et al. 2005, Pauly and Watson 2005), such as the trophic level of catches which previously led to the famous "fishing down marine food webs" process description (Pauly et al. 1998, Pauly and Palomares 2005).

Biological components and trophic linkages between organisms effectively take a central place in the understanding of marine ecosystems' structure and functioning (Curry et al. 2003). In the last decades, analysis of carbon and nitrogen stable isotopes ratios in consumers' tissues ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) have proved to be a powerful tool to describe the trophic ecology and trophic relationships within marine organisms at the ecosystem scale. Indeed, this method represents an alternative or complementary tool to the traditional methods of dietary studies (e.g., analysis of guts or stomach contents) (Hobson et al. 2002, Michener and Kaufman 2007). The use of these ecological tracers is principally based on the fact that 1) primary producers of an ecosystem generally present different isotopic compositions, due to the different nutrients fixed and the biochemical cycle they use for photosynthesis (Peterson and Fry 1987, France 1995); 2) the enrichment in ^{13}C and ^{15}N between a source or a prey and its consumer (also called Trophic Enrichment Factor, TEF) is relatively predictable, being less important in ^{13}C ($\leq 1\%$) than in ^{15}N (3.4 ‰ in average) (De Niro and Epstein 1978, 1981, Minagawa and Wada 1984, Post 2002, Michener and Kaufman 2007). Hence, $\delta^{13}\text{C}$ values are generally used as a tracer of the habitat or the feeding zone of organisms (Hobson 1999, France 1995). $\delta^{15}\text{N}$ values are mainly used as an indicator of the trophic position of organisms, and have been widely used to calculate the absolute trophic level of organisms in various ecosystems (Hobson et Welch 1992, Lesage et al. 2001, Le Loc'h et al. 2008). Moreover, the use of these chemical parameters by ecologists has been considerably facilitated by technological progress, the possibility to analyse a lot cheaper (consideration of large data sets), or the development of models (e.g., mixing models) to better interpret field

data (Martínez del Rio et al. 2009). Hence, many field studies using stable isotope ratios have recently flourished, but very few attempted to first establish whether the assumptions researchers make when using this tool are warranted, as requested by Gannes et al. in 1997 (and more recently by Martínez del Rio et al. 2009), and while it is an essential consideration when focusing on a specific ecosystem.

Indeed, there is still a huge lack of experimental studies to support the many assumptions needed to fully interpret stable isotopic field data (Gannes et al. 1997, Martínez del Rio et al. 2009), as well as studies devoted to describe the mechanisms which are at the origin of the isotopic signature variations of consumers in the field. For instance, many biotic and abiotic factors can affect the isotopic composition of primary producers, or can affect TEF values between sources and consumers. These factors can involve large and small variability in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values measured in consumers. Consequently, this variability can induce some misinterpretations or confusions in the assessment of the feeding zone, the food partitioning in a consumer's diet or the calculation of trophic levels. This problem increases in intensity at ecosystem scale and especially for open systems, notably because such ecosystems often support a high diversity of organisms and highly mobile species, and are under diverse influences (e.g., river plumes, oceanic streams, upwelling). Thus, the boundaries of ecosystem and associated food webs remain very difficult to define (Vander Zanden and Fetzer 2007) while the stable isotopic approach deserves to be developed in such cases as well (i.e., need to develop indicators to follow ecosystems' evolution in space and time).

In this general context, the first objective of this study was therefore to determine the spatio-temporal variations of stable isotopic signatures in various representative taxa of an open marine ecosystem, using the Bay of Biscay (North-East Atlantic) as a case study. Particularly, this study focused on potential differences between neritic/coastal *vs.* oceanic/deep-sea organisms, and, between benthic *vs.* pelagic organisms, then on potential inter-annual and seasonal differences. Considering the existence of such spatio-temporal variations, the second objective of this study was to assess implications and stating recommendations for the use $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ as ecological tracers in field mesoscale studies of marine food webs, especially in contrasted and temperate open ecosystems.

Materials and methods

Study area and sampling

The Bay of Biscay is a very large bay opened on the North-East Atlantic Ocean, located from 1 to 10°W and from 43 to 48°N (Fig. A5-1). Along the French coast, the continental shelf covers over 220 000 km², extends more than 200 km offshore in the north of the Bay and only 10 km in the south. Two main rivers plumes (i.e., Loire and Gironde) influence its hydrological structure (Planque et al. 2004, Puillat et al. 2004). The Bay of Biscay also present a vast oceanic domain and a continental slope indented by numerous canyons (Koutsikopoulos and Le Cann 1996). Overall, the Bay of Biscay supports a rich fauna including many protected species (e.g., marine mammals, seabirds, sharks) and is subjected to numerous anthropogenic activities such as important fisheries (Lorance et al. 2009, OSPAR 2010).

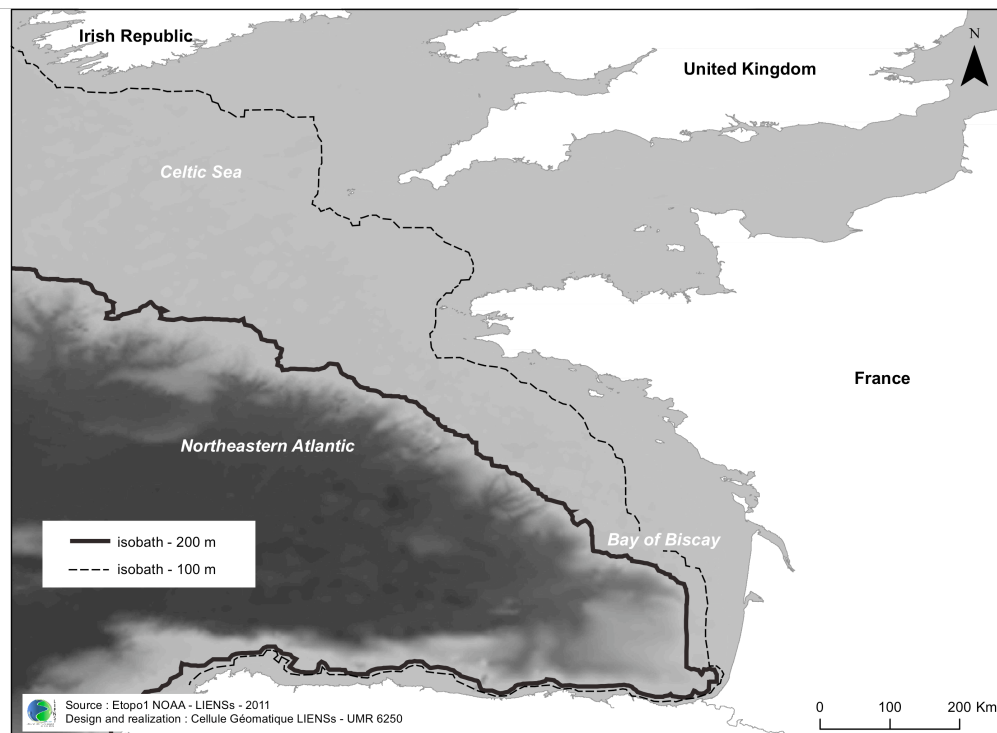


Figure A5-1: Map of the study area.

In this study, more than 1820 individuals have been sampled, belonging to 142 species and covering a wide range of representative taxa of the North East Atlantic food webs components, and including marine mammals, both cartilaginous and bony fish, molluscs, crustaceans (Table A5-1). Almost all organisms were collected during the EVHOE groundfish surveys conducted by the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), from the continental shelf to the shelf-edge of the French part of the Bay of Biscay in autumns 2001 to 2010. During these surveys, bottom and pelagic trawls were also performed in the canyons indenting the continental slope to specifically collect oceanic and deep-sea organisms. Species selected for seasonal variations in isotopic signatures (i.e., European pilchard and anchovy, see below) were also collected during PELGAS cruises conducted by IFREMER, from the continental shelf to the shelf-edge of the Bay of Biscay in springs 2008 to 2010. Mammal samples came from stranded animals along the French Atlantic coast, recovered and examined by members of the French Stranding Network between 2000 and 2009.

As many species switch their diet with increasing size and ontogenesis (Hjelm et al. 2000, Karpouzi and Stergiou 2003, Chouvelon et al. 2011), the different species have to be compared at an equivalent stage of their life history (Jennings et al. 2001). Thus, only adult individuals were sampled for most of the species analysed. When both juveniles and adults or several size classes were available, they were treated separately (see Table A5-1). Finally, for some rare species, only juveniles were available and so sampled (these exceptions are indicated in Table A5-1).

Each individual was measured and a piece of muscle (except mesozooplankton, analysed as a whole) was taken for isotopic analysis. Indeed, muscle is the reference tissue in food web studies inferred from stable isotope analyses (Hobson and Welch 1992, Pinnegar and Polunin 1999). It allows comparisons of isotopic signatures between individuals and taxa, minimizing inter-tissue differences in terms of biochemical and physiological properties like protein turnover rate and metabolic routing (Cherel et al. 2009). After collection, samples were immediately placed in individual plastic bags, frozen at -20°C and freeze-dried. Freeze-dried tissues were finally grounded into a fine powder and stored in individual plastic vials until further analyses.

Table A5-1: Characteristics of species – distribution, average trawling depth, number of individuals (N), size of individuals – and stable carbon and nitrogen isotope values (Mean \pm Standard Deviation) in the muscle (except mesozooplankton, analysed as a whole) of the Bay of Biscay's food webs components. For all species, values correspond to autumn trawls (except marine mammals collected throughout the year; also, individuals of European pilchard and anchovy trawled in spring for seasonal variations analysis are not included here). Each row of the table corresponds to a dot Fig. A5-2. Species are classified by taxa, then by distribution on both horizontal and vertical axis, finally by increasing $\delta^{15}\text{N}$ values (see detailed grouping strategy in Materials and Methods).

Taxa and Species	HAD ^a	VAD ^a	Depth (m) ^b		N	Size (cm or mm) ^c		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
			Mean	Mean		Mean \pm SD	(min- max)	Mean \pm SD	Mean \pm SD
MARINE MAMMALS									
<i>Phocoena phocoena</i>	S / US	bp	NA		10	153 \pm 20	(134 - 196)	-17.0 \pm 0.4	13.0 \pm 0.7
<i>Globicephala melas</i>	S / US	bp	NA		16	448 \pm 73	(328 - 578)	-16.3 \pm 0.8	13.2 \pm 1.7
<i>Tursiops truncatus</i>	S / US	bp	NA		7	256 \pm 38	(211 - 315)	-16.0 \pm 0.7	14.5 \pm 0.8
<i>Stenella coeruleoalba</i>	S / US	p	NA		11	185 \pm 31	(130 - 219)	-17.5 \pm 0.3	11.2 \pm 0.9
<i>Delphinus delphis</i>	S / US	p	NA		26	200 \pm 11	(183 - 230)	-17.4 \pm 0.5	12.1 \pm 0.6
<i>Balaenoptera physalus</i>	US / DS	p	NA		4	1785 \pm 204	(1510 - 1950)	-18.2 \pm 0.3	9.5 \pm 1.3
<i>Kogia breviceps</i>	US / DS	p	NA		6	225 \pm 47	(167 - 288)	-16.7 \pm 0.3	11.1 \pm 0.3
<i>Physeter macrocephalus</i>	US / DS	p	NA		3	1063 \pm 27	(1045 - 1095)	-16.5 \pm 0.0	11.1 \pm 1.0
<i>Mesoplodon bidens</i>	US / DS	p	NA		5	389 \pm 51	(316 - 457)	-17.4 \pm 0.8	12.2 \pm 0.2
<i>Ziphius cavirostris</i>	US / DS	p	NA		11	521 \pm 76	(387 - 600)	-16.2 \pm 0.2	12.5 \pm 0.5
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	US / DS	p	NA		7	576 \pm 91	(455 - 690)	-18.3 \pm 0.8	12.8 \pm 0.8
FISH									
Chondrichthyans									
<i>Leucoraja naevus</i>	C / S	b	126		10	604 \pm 28	(560 - 640)	-16.3 \pm 0.3	12.3 \pm 0.5
<i>Raja clavata</i>	C / S	b	128		11	735 \pm 111	(570 - 940)	-16.1 \pm 0.4	12.3 \pm 0.4
<i>Raja microocellata</i>	C / S	b	21		5	694 \pm 99	(590 - 810)	-14.6 \pm 0.2	14.5 \pm 0.3
<i>Torpedo marmorata</i>	C / S	b	33		3	383 \pm 81	(310 - 470)	-16.4 \pm 0.5	14.8 \pm 0.5
<i>Mustelus asterias</i>	C / S	bp	112		11	874 \pm 91	(740 - 1100)	-15.9 \pm 0.5	13.0 \pm 0.6
<i>Mustelus mustelus</i>	C / S	bp	108		4	935 \pm 163	(790 - 1150)	-16.1 \pm 0.4	13.0 \pm 0.3
<i>Scyliorhinus canicula</i>	C / S	bp	126		10	579 \pm 31	(530 - 630)	-16.7 \pm 0.2	13.1 \pm 0.3
<i>Galeus melastomus</i>	S / US	bp	289		12	606 \pm 75	(500 - 720)	-17.2 \pm 0.2	12.1 \pm 0.6
<i>Chimaera monstrosa</i>	S / US	bp	669		17	592 \pm 165	(340 - 810)	-16.5 \pm 0.2	12.7 \pm 0.7
<i>Etmopterus spinax</i>	S / US	bp	492		10	422 \pm 25	(383 - 450)	-17.2 \pm 0.1	12.8 \pm 0.2
<i>Deania profundorum</i>	US / DS	bp	1033		4	445 \pm 87	(320 - 520)	-18.1 \pm 0.1	11.0 \pm 0.1
<i>Hydrolagus mirabilis</i>	US / DS	bp	1116		5	420 \pm 12	(410 - 440)	-16.9 \pm 0.2	11.1 \pm 0.3
<i>Centroselachus crepidater</i>	US / DS	bp	1147		5	678 \pm 36	(650 - 740)	-17.5 \pm 0.2	11.6 \pm 0.3
<i>Deania calcea</i>	US / DS	bp	1033		10	934 \pm 63	(840 - 1020)	-17.1 \pm 0.3	12.2 \pm 0.5
Large Actinopterygians									
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	C / S	bp	163		5	532 \pm 44	(500 - 610)	-17.4 \pm 0.2	12.6 \pm 1.3
<i>Chelidonichthys lucerna</i>	C / S	bp	137		5	554 \pm 63	(470 - 630)	-16.8 \pm 0.6	13.2 \pm 0.5
<i>Labrus bergylta</i>	C / S	bp	20		3	507 \pm 25	(480 - 530)	-17.5 \pm 0.0	13.5 \pm 0.1
<i>Zeus faber</i>	C / S	bp	116		5	550 \pm 19	(530 - 580)	-16.8 \pm 0.1	14.0 \pm 0.3
<i>Dicentrarchus labrax</i> (>400 mm TL)	C / S	bp	98		5	668 \pm 24	(640 - 700)	-16.9 \pm 0.5	14.1 \pm 0.5
<i>Merlangius merlangus</i> (>350 mm TL)	C / S	bp	55		15	423 \pm 36	(370 - 480)	-16.2 \pm 0.3	14.8 \pm 0.4
<i>Conger conger</i>	C / S	bp	67		5	1278 \pm 88	(1150 - 1360)	-16.2 \pm 0.6	15.3 \pm 0.7
<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	S / US	b	127		5	432 \pm 24	(410 - 470)	-17.5 \pm 0.2	12.2 \pm 0.2
<i>Malacocephalus laevis</i>	S / US	bp	337		5	386 \pm 21	(370 - 420)	-17.8 \pm 0.3	12.0 \pm 0.4
<i>Molva macrophtalma</i>	S / US	bp	492		5	646 \pm 50	(600 - 730)	-17.6 \pm 0.2	12.9 \pm 0.2
<i>Caelorhynchus caelorhynchus</i>	S / US	bp	461		5	278 \pm 19	(250 - 300)	-17.4 \pm 0.3	13.0 \pm 0.5
<i>Helicolenus dactylopterus</i>	S / US	bp	492		5	370 \pm 22	(340 - 400)	-17.3 \pm 0.1	13.2 \pm 0.3
<i>Trachyrincus scabrus</i>	S / US	bp	536		5	408 \pm 35	(360 - 450)	-17.5 \pm 0.1	13.4 \pm 0.1
<i>Phycis blennoides</i>	S / US	bp	259		5	510 \pm 66	(440 - 580)	-17.0 \pm 0.3	13.5 \pm 0.1
<i>Merluccius merluccius</i> (350 - 550 mm TL)	S / US	bp	140		21	466 \pm 56	(360 - 550)	-17.4 \pm 0.3	13.6 \pm 0.5
<i>Scorpaena scrofa</i>	S / US	bp	128		4	400 \pm 45	(350 - 460)	-17.5 \pm 0.2	13.6 \pm 0.5
<i>Lophius piscatorius</i> (400 - 700 mm TL)	S / US	bp	193		18	570 \pm 72	(450 - 690)	-16.9 \pm 0.3	13.9 \pm 0.3
<i>Lophius piscatorius</i> (>700 mm TL)	S / US	bp	313		12	831 \pm 107	(720 - 1020)	-17.1 \pm 0.6	14.0 \pm 0.8
<i>Lophius budegassa</i>	S / US	bp	136		5	746 \pm 88	(650 - 890)	-17.2 \pm 0.1	14.0 \pm 0.3
<i>Merluccius merluccius</i> (>550 mm TL)	S / US	bp	127		12	632 \pm 59	(560 - 720)	-17.2 \pm 0.3	14.0 \pm 0.6
<i>Molva molva</i>	S / US	bp	203		4	812 \pm 112	(680 - 910)	-17.5 \pm 0.3	14.5 \pm 0.3
<i>Alepocephalus bairdii</i>	US / DS	bp	1209		5	684 \pm 65	(610 - 770)	-18.3 \pm 0.1	10.4 \pm 0.3
<i>Beryx decadactylus</i>	US / DS	bp	509		6	348 \pm 58	(300 - 460)	-18.5 \pm 0.2	11.0 \pm 0.9

<i>Coryphaenoides rupestris</i>	US / DS	bp	1142	4	690 ± 60	(620 - 740)	-18.4 ± 0.7	11.6 ± 0.5
<i>Alepocephalus rostratus</i>	US / DS	bp	1109	11	522 ± 72	(370 - 600)	-18.2 ± 0.3	12.0 ± 0.6
<i>Mora moro</i>	US / DS	bp	1089	5	568 ± 32	(530 - 610)	-17.6 ± 0.3	12.4 ± 0.3
<i>Lepidion eques</i>	US / DS	bp	1177	5	362 ± 16	(340 - 380)	-17.8 ± 0.2	12.6 ± 0.1
<i>Hoplostethus atlanticus</i>	US / DS	bp	1153	5	514 ± 21	(490 - 540)	-17.7 ± 0.4	14.0 ± 0.5
<i>Trachyscorpia cristulata</i>	US / DS	bp	1125	10	401 ± 86	(280 - 510)	-17.3 ± 0.4	14.2 ± 0.7
<i>Aphanopus carbo</i>	US / DS	p	1033	5	996 ± 55	(920 - 1070)	-18.1 ± 0.1	12.5 ± 0.3
Small Actinopterygians								
<i>Solea solea (< 200 mm TL)</i>	C / S	b	27	7	160 ± 33	(110 - 190)	-16.2 ± 0.4	12.0 ± 0.7
<i>Microchirus variegatus</i>	C / S	b	47	5	162 ± 8	(150 - 170)	-17.3 ± 0.0	12.2 ± 0.1
<i>Solea solea (> 200 mm TL)</i>	C / S	b	53	27	316 ± 59	(220 - 460)	-15.7 ± 0.6	13.2 ± 0.7
<i>Dicologlossa cuneata</i>	C / S	b	60	5	188 ± 16	(170 - 210)	-16.7 ± 0.3	13.3 ± 0.6
<i>Boops boops</i>	C / S	bp	99	5	262 ± 24	(230 - 290)	-18.0 ± 0.6	11.8 ± 1.1
<i>Cepola macrophthalmala</i>	C / S	bp	109	5	554 ± 18	(530 - 570)	-18.2 ± 0.3	12.0 ± 0.3
<i>Echiichthys vipera</i>	C / S	bp	47	5	108 ± 8	(100 - 120)	-17.5 ± 0.2	12.3 ± 0.2
<i>Spondyliosoma cantharus (<200 mm TL)</i>	C / S	bp	30	5	142 ± 37	(100 - 190)	-16.6 ± 0.8	12.3 ± 0.3
<i>Argentina sphyraena</i>	C / S	bp	99	10	188 ± 13	(170 - 210)	-17.4 ± 0.2	12.3 ± 0.4
<i>Callionymus lyra</i>	C / S	bp	109	5	222 ± 16	(210 - 250)	-16.6 ± 0.3	12.5 ± 0.3
<i>Pomatoschistus minutus</i>	C / S	bp	60	5	56 ± 5	(50 - 60)	-17.5 ± 0.1	12.7 ± 0.3
<i>Lesueurigobius friesii</i>	C / S	bp	60	5	76 ± 5	(70 - 80)	-17.3 ± 0.3	12.8 ± 0.1
<i>Trachinus draco</i>	C / S	bp	40	10	237 ± 20	(200 - 270)	-16.7 ± 0.8	13.0 ± 1.3
<i>Aspitrigla cuculus</i>	C / S	bp	129	10	257 ± 12	(240 - 280)	-17.2 ± 0.3	13.1 ± 0.6
<i>Trisopterus minutus</i>	C / S	bp	114	65	181 ± 19	(145 - 235)	-17.1 ± 0.4	13.1 ± 0.6
<i>Eutrigla gurnardus</i>	C / S	bp	114	18	311 ± 62	(230 - 440)	-16.9 ± 0.3	13.1 ± 0.5
<i>Dicentrarchus punctatus</i>	C / S	bp	36	4	357 ± 15	(340 - 370)	-16.7 ± 0.0	13.9 ± 0.6
<i>Trisopterus luscus</i>	C / S	bp	63	14	180 ± 30	(145 - 235)	-16.6 ± 0.3	14.1 ± 0.2
<i>Dicentrarchus labrax (≤ 400 mm TL)</i>	C / S	bp	29	6	373 ± 23	(340 - 400)	-15.8 ± 0.2	14.2 ± 0.5
<i>Merlangius merlangus (≤ 350 mm TL)</i>	C / S	bp	36	32	211 ± 82	(80 - 350)	-16.8 ± 0.3	14.3 ± 0.6
<i>Spondyliosoma cantharus (>200 mm TL)</i>	C / S	bp	44	7	254 ± 34	(220 - 310)	-16.5 ± 0.6	15.1 ± 0.5
<i>Engraulis encrasicolus</i>	C / S	p	70	46	128 ± 15	(100 - 160)	-18.2 ± 0.7	10.7 ± 1.5
<i>Scomber scombrus (>200 mm TL)</i>	C / S	p	149	10	296 ± 12	(280 - 310)	-18.6 ± 0.3	11.2 ± 0.7
<i>Sardina pilchardus (>150 mm TL)</i>	C / S	p	110	78	205 ± 19	(167 - 241)	-18.0 ± 0.5	11.2 ± 0.7
<i>Scomber japonicus</i>	C / S	p	43	5	338 ± 19	(320 - 370)	-17.5 ± 0.3	11.7 ± 0.5
<i>Sardina pilchardus (<150 mm TL)</i>	C / S	p	76	25	115 ± 12	(100 - 140)	-18.2 ± 0.7	11.8 ± 0.8
<i>Trachurus trachurus (<200 mm TL)</i>	C / S	p	101	67	151 ± 40	(40 - 80)	-18.3 ± 0.9	11.8 ± 1.3
<i>Scomber scombrus (<200 mm TL)</i>	C / S	p	136	5	164 ± 5	(160 - 170)	-18.7 ± 0.4	11.8 ± 0.4
<i>Sprattus sprattus</i>	C / S	p	38	32	99 ± 21	(65 - 135)	-17.8 ± 0.3	12.2 ± 0.5
<i>Ammodytes tobianus</i>	C / S	p	58	5	290 ± 16	(270 - 310)	-17.1 ± 0.2	12.2 ± 0.2
<i>Trachurus trachurus (>200 mm TL)</i>	C / S	p	105	45	275 ± 62	(205 - 410)	-17.7 ± 0.3	12.4 ± 0.7
<i>Hyperoplus lanceolatus</i>	C / S	p	58	5	340 ± 14	(320 - 350)	-16.4 ± 0.3	14.3 ± 0.3
<i>Atherina presbyter</i>	C / S	p	25	5	110 ± 10	(100 - 120)	-16.5 ± 0.2	14.8 ± 0.4
<i>Bathysolea profundicola</i>	S / US	b	333	5	192 ± 13	(180 - 210)	-17.2 ± 0.2	12.7 ± 0.5
<i>Argentina silus</i>	S / US	bp	492	5	352 ± 27	(330 - 390)	-18.1 ± 0.2	10.5 ± 0.5
<i>Micromesistius poutassou (<300 mm TL)</i>	S / US	bp	224	78	182 ± 38	(116 - 255)	-18.2 ± 0.5	11.1 ± 0.7
<i>Gadiculus argenteus</i>	S / US	bp	47	5	110 ± 7	(100 - 120)	-18.4 ± 0.1	11.2 ± 0.2
<i>Micromesistius poutassou (>300 mm TL)</i>	S / US	bp	246	5	320 ± 7	(310 - 330)	-17.6 ± 0.4	11.9 ± 0.8
<i>Merluccius merluccius (≤ 350 mm TL)</i>	S / US	bp	118	57	180 ± 80	(65 - 350)	-18.1 ± 0.4	12.2 ± 0.7
<i>Polymetme thaecoryla</i>	US / DS	bp	506	5	134 ± 7	(125 - 145)	-18.9 ± 0.1	11.6 ± 0.2
<i>Bathypterois dubius</i>	US / DS	bp	1147	5	162 ± 4	(160 - 170)	-18.4 ± 0.2	13.2 ± 0.3
<i>Nezumia aequalis</i>	US / DS	bp	1033	5	286 ± 9	(280 - 300)	-17.2 ± 0.2	13.3 ± 0.2
<i>Xenodermichthys copei</i>	US / DS	p	1129	6	142 ± 13	(130 - 160)	-19.1 ± 0.2	9.2 ± 0.4
<i>Benthoosema glaciale</i>	US / DS	p	800	5	39 ± 2	(35 - 40)	-18.7 ± 0.2	9.5 ± 0.6
<i>Ceratoscopelus maderensis</i>	US / DS	p	1316	5	67 ± 4	(60 - 70)	-19.2 ± 0.2	9.5 ± 0.1
<i>Bathylagus greyae</i>	US / DS	p	1980	5	125 ± 6	(120 - 135)	-19.5 ± 0.5	9.8 ± 0.2
<i>Myctophum punctatum</i>	US / DS	p	1316	5	71 ± 6	(65 - 80)	-19.5 ± 0.2	9.9 ± 0.4
<i>Serrivomer beanii</i>	US / DS	p	NA	5	724 ± 34	(670 - 760)	-18.8 ± 0.2	10.0 ± 0.5
<i>Arctozenus risso</i>	US / DS	p	1316	5	167 ± 11	(150 - 180)	-19.1 ± 0.1	10.0 ± 0.5
<i>Argyropelecus olfersii</i>	US / DS	p	1316	5	79 ± 4	(75 - 85)	-18.9 ± 0.1	10.1 ± 0.3
<i>Lampanyctus crocodilus</i>	US / DS	p	2250	5	115 ± 7	(105 - 125)	-18.5 ± 0.1	10.6 ± 0.5
<i>Notoscopelus kroeyeri</i>	US / DS	p	496	4	120 ± 9	(110 - 130)	-18.8 ± 0.1	10.7 ± 0.1
<i>Stomias boa</i>	US / DS	p	1033	5	278 ± 25	(260 - 320)	-18.3 ± 0.1	11.6 ± 0.4
<i>Notacanthus bonaparte</i>	US / DS	bp	1010	5	326 ± 73	(260 - 450)	-17.3 ± 0.6	12.1 ± 1.0
<i>Normichthys operosa</i>	US / DS	bp	2250	5	141 ± 9	(130 - 155)	-17.9 ± 0.3	13.1 ± 0.1
CEPHALOPOD MOLLUSCS								
<i>Octopus vulgaris</i>	C / S	b	39	5	129 ± 40	(78 - 180)	-16.9 ± 0.6	11.1 ± 0.4
<i>Eledone cirrhosa</i>	C / S	b	144	42	85 ± 27	(27 - 145)	-16.8 ± 0.6	11.6 ± 0.6
<i>Sepia orbignyana</i>	C / S	bp	122	10	79 ± 15	(46 - 100)	-17.5 ± 0.3	10.8 ± 0.7
<i>Sepia elegans</i>	C / S	bp	100	25	43 ± 16	(22 - 73)	-17.2 ± 0.3	11.7 ± 0.6
<i>Sepietta neglecta</i>	C / S	bp	99	17	25 ± 6	(14 - 36)	-17.1 ± 0.5	12.1 ± 0.5
<i>Alloteuthis spp</i>	C / S	bp	127	13	43 ± 12	(26 - 63)	-17.7 ± 0.2	12.3 ± 0.3

<i>Sepia officinalis</i> (< 90 mm ML)	C / S	bp	28	11	68 ± 11	(48 - 83)	-16.5 ± 0.4	12.6 ± 0.8
<i>Sepia officinalis</i> (≥ 90 mm ML)	C / S	bp	35	42	167 ± 52	(90 - 264)	-16.7 ± 0.5	12.7 ± 1.2
<i>Loligo vulgaris</i> (< 100 mm ML)	C / S	bp	47	16	77 ± 11	(54 - 97)	-17.4 ± 0.5	12.8 ± 1.0
<i>Loligo vulgaris</i> (> 100 mm ML)	C / S	bp	31	47	183 ± 50	(102 - 302)	-16.6 ± 0.6	13.9 ± 1.3
<i>Sepiolo atlantica</i>	C / S	bp	21	8	16 ± 2	(13 - 18)	-16.3 ± 0.4	15.1 ± 0.7
<i>Bathypolypus sponsalis</i>	S / US	b	514	16	54 ± 13	(35 - 78)	-17.7 ± 0.2	10.7 ± 0.5
<i>Octopus salutii</i>	S / US	b	227	8	75 ± 21	(33 - 105)	-17.5 ± 0.5	11.3 ± 0.5
<i>Rossia macrosoma</i>	S / US	bp	278	7	34 ± 13	(22 - 50)	-17.3 ± 0.3	10.6 ± 0.6
<i>Illex coindetii</i>	S / US	bp	256	32	158 ± 33	(107 - 225)	-18.2 ± 0.3	11.6 ± 0.6
<i>Loligo forbesi</i> (<170 mm ML)	S / US	bp	113	24	83 ± 34	(39 - 169)	-17.8 ± 0.4	12.2 ± 0.6
<i>Todaropsis eblanae</i>	S / US	bp	171	19	113 ± 39	(59 - 186)	-18.1 ± 0.4	12.3 ± 0.9
<i>Loligo forbesi</i> (>170 mm ML)	S / US	bp	195	38	290 ± 99	(172 - 490)	-17.5 ± 0.7	13.0 ± 1.0
<i>Todarodes sagittatus</i>	S / US	p	403	36	253 ± 39	(191 - 405)	-17.9 ± 0.4	11.9 ± 0.7
<i>Opisthoteuthis agassizii</i>	US / DS	b	1081	3	310 ± 73	(240 - 385)	-18.4 ± 0.4	11.1 ± 0.1
<i>Teuthowenia megalops</i>	US / DS	p	1939	4	134 ± 12	(118 - 147)	-18.6 ± 0.4	8.8 ± 0.4
<i>Galiteuthis armata</i>	US / DS	p	1844	3	252 ± 91	(147 - 308)	-18.5 ± 0.3	10.1 ± 0.8
<i>Ancistrocheirus lesueurii</i> (juveniles)	US / DS	p	1627	3	33 ± 15	(21 - 49)	-19.6 ± 0.2	11.6 ± 0.6
<i>Histioteuthis bonnellii</i> (juveniles)	US / DS	p	1525	6	38 ± 17	(27 - 73)	-19.2 ± 0.2	11.7 ± 0.2
<i>Histioteuthis reversa</i>	US / DS	p	2076	7	54 ± 22	(30 - 87)	-19.2 ± 0.2	12.2 ± 0.4
OTHER INVERTEBRATES								
Bivalve Molluscs								
<i>Aequipecten opercularis</i>	C / S	b (SF ^d)	29	5	61 ± 1	(59 - 63)	-16.3 ± 0.2	9.0 ± 0.1
<i>Pecten maximus</i>	C / S	b (SF ^d)	40	8	115 ± 9	(100 - 130)	-15.5 ± 0.2	9.4 ± 0.4
<i>P. maximus</i>	S / US	b (SF ^d)	171	3	113 ± 6	(110 - 120)	-17.9 ± 0.5	5.4 ± 0.3
Gastropod Molluscs								
<i>Buccinum undatum</i>	C / S	b	29	5	76 ± 4	(71 - 80)	-14.8 ± 0.2	11.1 ± 0.3
<i>Scaphander lignarius</i>	C / S	b	63	5	39 ± 15	(25 - 56)	-14.9 ± 0.2	11.4 ± 0.5
<i>S. lignarius</i>	S / US	b	150	8	42 ± 6	(36 - 55)	-17.3 ± 0.6	7.3 ± 0.8
<i>Buccinum humphreysianum</i>	S / US	b	511	5	35 ± 3	(33 - 40)	-17.4 ± 0.2	10.0 ± 0.4
Crustaceans								
<i>Mesozooplankton</i> (200-2000 µm)	C / S	p	36	4	NA	NA	-21.1 ± 0.6	6.6 ± 1.3
<i>Mesozooplankton</i> (200-2000 µm)	S / US	p	329	4	NA	NA	-21.5 ± 0.3	6.4 ± 0.5
<i>Alpheus glaber</i>	C / S	b	60	5	43 ± 1	(42 - 44)	-16.5 ± 0.5	9.7 ± 0.3
<i>Munida intermedia</i>	C / S	b	47	5	58 ± 12	(43 - 74)	-17.4 ± 0.3	9.7 ± 0.3
<i>Plesionika heterocarpus</i>	C / S	b	221	5	82 ± 1	(79 - 83)	-17.1 ± 0.1	10.0 ± 0.4
<i>Nephrops norvegicus</i>	C / S	b	60	5	147 ± 11	(135 - 164)	-15.9 ± 0.2	11.3 ± 0.2
<i>Polybius holsatus</i>	C / S	b	60	5	42 ± 3	(40 - 47)	-16.5 ± 0.4	11.3 ± 0.7
<i>Goneplax rhomboides</i>	C / S	b	60	5	34 ± 2	(32 - 38)	-16.4 ± 0.1	11.3 ± 0.3
<i>Liocarcinus depurator</i>	C / S	b	60	5	48 ± 2	(46 - 50)	-16.2 ± 0.3	11.7 ± 0.7
<i>Cancer pagurus</i>	C / S	b	155	11	197 ± 9	(180 - 210)	-15.8 ± 0.4	12.1 ± 0.6
<i>Crangon crangon</i>	C / S	b	40	5	53 ± 4	(50 - 59)	-15.6 ± 0.4	12.1 ± 0.3
<i>Crangon allmanni</i>	C / S	b	60	5	54 ± 5	(48 - 59)	-15.9 ± 0.2	12.2 ± 0.3
<i>Systemaspis debilis</i>	US / DS	p	1860	5	56 ± 2	(54 - 60)	-18.5 ± 0.2	8.0 ± 0.2
<i>Meganocytiphanes norvegica</i>	US / DS	p	1873	5x3 ^c	8 ± 0	(7 - 8)	-19.8 ± 0.2	8.3 ± 0.2
<i>Sergia robusta</i>	US / DS	p	1316	5	75 ± 5	(67 - 79)	-18.9 ± 0.2	8.8 ± 0.2
<i>Ephyrina hoskynii</i>	US / DS	p	1860	5	98 ± 3	(94 - 100)	-17.7 ± 0.2	9.5 ± 0.3
<i>Gnathophausia ingens</i>	US / DS	p	2250	5	130 ± 12	(115 - 149)	-18.4 ± 0.3	11.9 ± 0.5

^a HAD and VAD = Horizontal and Vertical Axis of the Distribution. See affiliation in Material and Methods; distribution is assumed to be the habitat and/or the feeding area of species. C/S = Coastal/Shelf; S/US = Shelf/Upper Slope; US/DS = Upper Slope/Deep sea; b = benthic; bp = benthopelagic; p = pelagic.

^b Corresponds to the depth under the research vessel at the end of trawling.

^c Sizes given in cm for marine mammals, in mm for all other taxa; Total Length (TL) for most fish, gastropod molluscs and "shrimp type" crustaceans; Dorsal Mantle Length (DML) for most cephalopod molluscs; Standard Width (SW) for bivalve molluscs and "crab type" crustaceans. Exceptions are described below.

- *Trachyrincus scabrus*, *Polymetme thaeocoryla*, *Bathypterois dubius*, *Nezumia aequalis*, *Xenodermichthys copei*, *Benthoosema glaciale*, *Ceratospopolus maderensis*, *Bathylagus greyae*, *Myctophum punctatum*, *Arctozenus risso*, *Argyrolepecus olfersii*, *Lampanyctus crocodilus*, *Notoscopelus kroeyeri*, *Stomias boa*, *Notacanthus bonaparte*, *Normichthys operosa*: Standard Length (SL) instead of Total Length.

- *Chimaera monstrosa*, *Hydrolagus mirabilis* and *Coryphaenoides rupestris*: Pre-Anal Fin Length (PAFL) instead of Total Length.

- *Opisthoteuthis agassizii*: Total Length (TL) instead of Mantle Length.
 - *Meganyctiphanes norvegica*: Cephalothorax Length (CL) instead of Total Length.
- ^d SF = suspension feeder
- ^e Corresponds to 5 pools of 3 individuals (muscle tissue only).
- NA = Not Available

Samples preparation and isotopic analysis

Lipids being highly depleted in ^{13}C relative to other tissue components (De Niro and Epstein 1977), they were extracted from muscle samples using cyclohexane, as described by Chouvelon et al. (2011). 0.40 ± 0.05 mg subsamples of lipid-free powder were finally weighed in tin cups for stable isotope analyses. Isotopic analyses were performed with an elemental analyser coupled to an Isoprime (Micromass) continuous-flow isotope-ratio mass spectrometer (CF IR-MS). The results are presented in the usual δ notation relative to the deviation from standards (Pee Dee Belemnite for $\delta^{13}\text{C}$ and atmospheric nitrogen for $\delta^{15}\text{N}$), in parts per thousand (‰). Based on replicate measurements of internal laboratory standards, experimental precision is of ± 0.15 and ± 0.20 ‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively.

Data treatment

Major groups of species (see Table A5-1) were firstly defined following taxonomic criteria (e.g., Actinopterygian vs. Chondrichthyan fish, or Bivalve vs. Gastropod vs. Cephalopod molluscs). Such taxonomic groups limited variations due to physiological and metabolic differences that can considerably impact isotopic fractionation between different types of consumers (McCutchan et al. 2003, Vanderklift and Ponsard 2003, Caut et al. 2009). Moreover, this grouping limited variations linked to excessive morphological differences that directly impact general feeding habits (Karpouzi and Stergiou 2003). In this way, Actynopterygians that showed a wide range of individual lengths were secondly separated in 2 groups, "large Actynopterygians" (56 ± 20 cm length in average), and "small Actynopterygians" (20 ± 9 cm length in average).

The spatial distribution (that we assume to correspond to the habitat and/or the feeding zone) of the studied species was defined following the published literature (Lorance et al. 2000, Quéro 2003, Palomares and Pauly 2010), published diet data in the area (Spitz et al. 2006ab, 2011), or derived from shipboard and aerial surveys in the area (Trenkel et al. 2009, CRMM unpublished data). This spatial distribution was determined both on the vertical axis (i.e., pelagic, benthopelagic or benthic) and on the horizontal axis (i.e., from the coastline to the oceanic area: coastal/shelf, shelf/upper slope, upper slope/deep-sea/oceanic) for each species. These classifications were in accordance with the depth and the area organisms were actually trawled in the Bay of Biscay during surveys (Table A5-1). Furthermore, they enable

assessing spatial variations in stable isotopic signatures (all species taken into account) on both horizontal and vertical axis of the distribution (Figs. A5-2 and A5-3).

To evaluate the inshore-offshore gradient (horizontal axis) on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in particular, General Linear Models (GLMs) were used, modelling the relationship between $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values separately with the average trawling depth of species (i.e., the depth under the research vessel when trawling).

To assess spatial variations of isotopic signatures due to potential influence of river inputs (Loire influence vs. Gironde influence, see Fig. A5-1), 10 species of fish and 7 species of cephalopods (inshore and offshore species) were selected. They were trawled in both northern part (continental shelf influenced by the Loire river inputs) and southern part of the Bay of Biscay (continental shelf influenced by the Gironde river inputs) (Fig. A5-1). These selected species were analysed for their difference in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values as a function of the sampling zone (i.e., north vs. south), using a Student t-test or a Mann-Whitney-Wilcoxon test (depending on the satisfaction of the data to conditions required – normality and homogeneity of variances – for parametric statistics) (Table A5-2).

To assess inter-annual variations of isotopic signatures, 4 species of fish and 4 species of cephalopods were sampled each year in autumns 2005 or 2006 to 2010 (depending on species). Within each species, a narrow range of sizes was taken into account for comparison between years, to avoid potential distortion due to ontogenic effects (see comment above, and Tables A5-3 and A5-4). Also, when a difference between individuals trawled in the north of the Bay and those trawled in the south was previously revealed in some species, zones were separated when they were both sampled in a year. As $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values are generally correlated in marine ecosystems (Kelly 2000), only $\delta^{15}\text{N}$ values (*a priori* proxy of trophic position) were tested for statistical difference between years, using a one-way analysis of variance ANOVA followed by a Tukey HSD multiple comparison test, or a Kruskal-Wallis (KW) followed by a multiple comparison test with Holm adjustment method (depending on the satisfaction of the data to conditions required – normality and homogeneity of variances – for parametric statistics).

Finally, seasonal variations of isotopic signatures were tested in 2 species of small pelagic fish, European pilchard *Sardina pilchardus* and European anchovy *Engraulis encrasicolus*, sampled in autumns and springs 2008 to 2010. As for inter-annual variations, a narrow range of sizes and the relatively same range of sizes was taken into account for comparison between

seasons and years, to avoid potential distortion due to ontogenic effects (*S. pilchardus*: 199 ± 16 mm Total Length; *E. encrasicolus*: 138 ± 24 mm Total Length). Again, only $\delta^{15}\text{N}$ values were tested for statistical difference between seasons within each year, using a Student t-test or a Mann-Whitney-Wilcoxon test (depending on the satisfaction of the data to conditions required – normality and homogeneity of variances – for parametric statistics).

Results

Spatial isotopic variations

Inshore - offshore gradient

At the ecosystem scale (all species combined), isotopic signatures evidenced a gradient from coastal and neritic habitats to oceanic and deep-sea habitats: $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values decreased from inshore to offshore organisms (Fig. A5-2). GLMs revealed a significant effect ($p < 0.0001$) of average trawling depth of species on average $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of species. Nevertheless, the Pearson correlation coefficient associated with GLMs was higher for $\delta^{13}\text{C}$ values than for $\delta^{15}\text{N}$ values ($R^2_{\text{Pearson}} = 0.36$ and $R^2_{\text{Pearson}} = 0.11$, respectively).

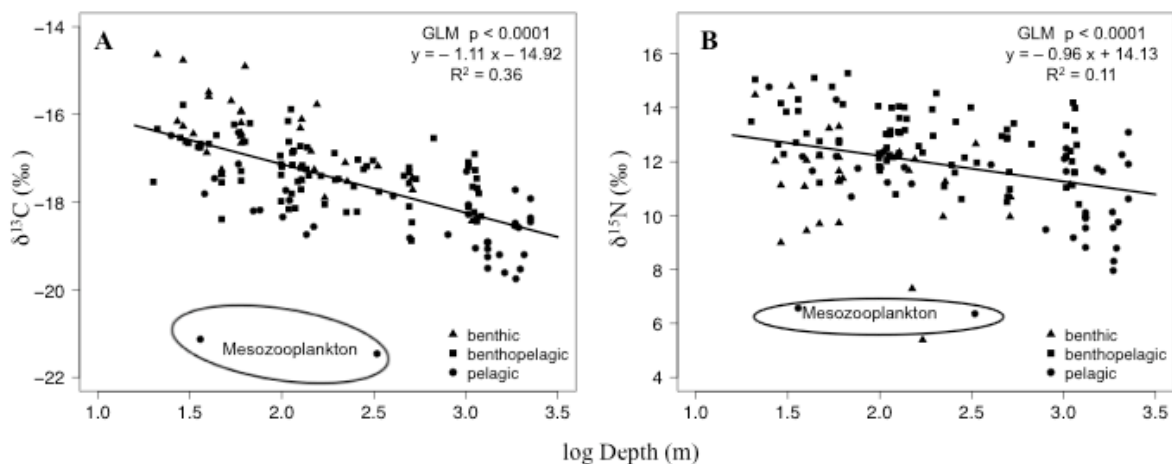


Figure A5-2: Relationships (GLMs) between $\delta^{13}\text{C}$ (A) and $\delta^{15}\text{N}$ (B) values of species and depth of trawling (log-transformed values). Depth corresponds to the depth under the research vessel at the end of trawling. Marine mammals are not included, due to lack of depth associated with sampling (stranded animals).

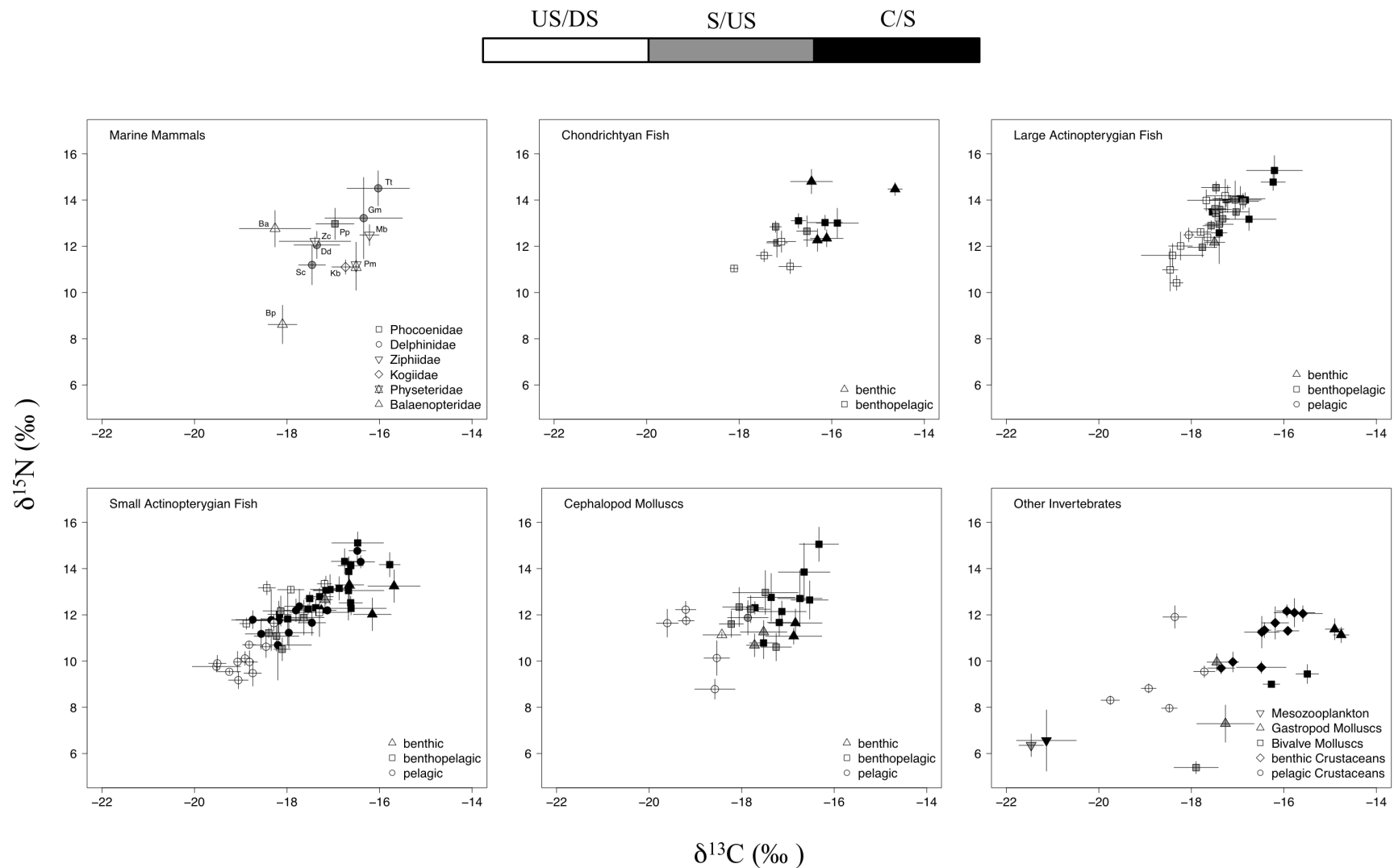


Figure A5-3: $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values (‰) for various taxa from the Bay of Biscay. Values are means \pm 1 Standard Deviation. Marine mammals: Bp = *Balaenoptera physalus*; Ba = *Balaenoptera acutorostrata*; Zc = *Ziphius cavirostris*; Mb = *Mesoplodon bidens*; Kb = *Kogia breviceps*; Pm = *Physeter macrocephalus*; Gm = *Globicephala melas*; Dd = *Delphinus delphis*; Sc = *Stenella coeruleoalba*; Tt = *Tursiops truncatus*; Pp = *Phocoena phocoena*. The same scale has been applied for all taxa, to facilitate the reading and comparisons between taxa. C/S = Coastal/Shelf; S/US = Shelf/Upper Slope; US/DS = Upper Slope/Deep sea (see details in Materials and Methods).

At a finer scale and when considering the major groups of species defined, the decrease in both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values from inshore to offshore organisms was consistent and accentuated, particularly for $\delta^{15}\text{N}$ values (Fig. A5-3). Moreover, the spread of signatures was the narrowest in higher trophic level consumers (i.e., large Actinopterygian fish, Chondrichthyan fish and marine mammals), intermediate in lower to medium trophic level consumers (i.e., small Actinopterygian fish and Cephalopod molluscs), and the widest in the lower trophic levels (i.e., other invertebrates) (Fig A5-3).

Finally, at the species scale, very small coastal cephalopods or small coastal pelagic fish (lower to medium trophic level consumers) were particularly enriched in ^{15}N relative to some higher trophic level consumers from the same coastal/shelf habitat (e.g., *Sepiolo atlantica*, *Hyperoplus lanceolatus*, *Atherina presbyter*, *Merlangus merlangius* < 35 cm) (Table A5-1). Individuals of *Pecten maximus* (Bivalve mollusc) and *Scaphander lignarius* (Gastropod mollusc) trawled in the coastal/shelf habitat were also enriched in both ^{13}C (2.4‰ in both species) and ^{15}N (4‰ difference in both species) relative to individuals of the same species trawled in the shelf/upper slope habitat (Table A5-1).

North - south difference

There was a significant difference in both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values between individuals trawled in the north of the Bay and those trawled in the south for the 4 most coastal species only (i.e., *Sepia officinalis* and *Loligo vulgaris* for cephalopods, *Trachinus draco* and *Trachurus trachurus* for fish; Mann-Whitney-Wilcoxon or Student t-tests, $p < 0.05$) (Table A5-2). These significant differences were almost always in favour of enriched $\delta^{13}\text{C}$ (0.5 ‰ in average) and $\delta^{15}\text{N}$ values (1.2 ‰ in average) for individuals trawled in the north (Table A5-2). The only exception was *T. minutus*, whose individuals trawled in the north were 0.5 ‰ depleted in ^{15}N in average relative to individuals trawled in the south, and however, standard deviations associated with average $\delta^{15}\text{N}$ values were relatively high (i.e., $12.8 \pm 0.7\text{‰}$ vs. $13.3 \pm 0.4\text{‰}$ in north and south respectively). Furthermore, $\delta^{15}\text{N}$ values were more frequently significantly different than $\delta^{13}\text{C}$ values between individuals trawled in the south of the Bay and those trawled in the north (case of 8 species vs. 5 species out of 17 species analysed) (Table A5-2).

Table A5-2: Muscle $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values (‰) of species and individuals analysed for north - south difference in the Bay of Biscay, and results of the statistical tests performed. Within each species, a narrow range of sizes was taken into account for comparison (see table), to avoid potential distortion due to ontogenic effects (diet shift). N = number of individuals.

Habitat	Species	Depth (m) ^a Mean (Range)	N		Size (mm) ^b Mean \pm SD		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)			$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		
			North	South	North	South	North	South	p-value	North	South	p-value
CEPHALOPODS												
Benthic to benthopelagic species												
coastal	<i>Sepia officinalis</i>	35 (21 - 134)	28	16	158 \pm 48	171 \pm 66	-16.5 \pm 0.5	-16.9 \pm 0.4	0.002	13.4 \pm 0.7	11.6 \pm 0.9	< 0.001
↓	<i>Sepia elegans</i>	100 (40 - 152)	8	17	61 \pm 11	34 \pm 10	-17.1 \pm 0.2	-17.2 \pm 0.3	0.360	12.1 \pm 0.5	11.5 \pm 0.5	0.012
	<i>Eledone cirrhosa</i>	146 (43 - 650)	18	18	89 \pm 25	94 \pm 17	-16.7 \pm 0.5	-16.7 \pm 0.6	0.982	11.8 \pm 0.7	11.6 \pm 0.3	0.263
oceanic	<i>Bathypolypus sponsalis</i>	514 (459 - 650)	8	8	52 \pm 12	55 \pm 14	-17.7 \pm 0.1	-17.8 \pm 0.2	0.467	10.5 \pm 0.5	10.8 \pm 0.4	0.282
Benthopelagic to pelagic species												
coastal	<i>Loligo vulgaris</i>	33 (24 - 58)	32	23	159 \pm 63	182 \pm 51	-16.4 \pm 0.5	-17.2 \pm 0.4	< 0.001	14.6 \pm 0.7	12.5 \pm 0.8	< 0.001
↓	<i>Alloteuthis sp</i>	126 (122 - 130)	8	8	35 \pm 13	43 \pm 14	-17.6 \pm 0.1	-17.8 \pm 0.1	0.038	12.2 \pm 0.1	12.4 \pm 0.3	0.180
oceanic	<i>Todarodes sagittatus</i>	394 (92 - 536)	8	23	245 \pm 30	250 \pm 20	-17.8 \pm 0.2	-17.9 \pm 0.5	0.619	11.9 \pm 0.3	12.0 \pm 0.9	0.672
FISH												
Benthic to benthopelagic species												
coastal	<i>Trachinus draco</i>	40 (33 - 47)	5	5	238 \pm 29	236 \pm 9	-16.1 \pm 0.2	-17.2 \pm 0.7	0.025	14.2 \pm 0.4	11.9 \pm 0.5	< 0.001
	<i>Trisopterus minutus</i>	114 (31 - 148)	34	25	175 \pm 15	179 \pm 11	-17.2 \pm 0.3	-16.9 \pm 0.5	0.054	12.8 \pm 0.7	13.3 \pm 0.4	0.003
↓	<i>Eutrigla gurnardus</i>	114 (101 - 122)	11	7	313 \pm 55	309 \pm 76	-16.8 \pm 0.4	-16.9 \pm 0.3	0.751	13.4 \pm 0.4	12.8 \pm 0.5	0.025
	<i>Scyliorhinus canicula</i>	126 (122 - 130)	5	5	588 \pm 34	570 \pm 29	-16.7 \pm 0.2	-16.7 \pm 0.1	0.600	12.9 \pm 0.3	13.3 \pm 0.2	0.124
oceanic	<i>Lophius piscatorius</i>	193 (44 - 485)	10	8	568 \pm 61	572 \pm 88	-16.9 \pm 0.4	-16.8 \pm 0.2	0.626	13.9 \pm 0.4	13.9 \pm 0.2	0.969
Benthopelagic to pelagic species												
coastal	<i>Trachurus trachurus</i>	99 (39 - 147)	39	25	197 \pm 29	191 \pm 18	-17.7 \pm 0.4	-18.0 \pm 0.3	0.004	12.8 \pm 0.6	11.8 \pm 0.9	< 0.001
	<i>Argentina sphyraena</i>	99 (47 - 150)	5	5	198 \pm 8	178 \pm 8	-17.3 \pm 0.1	-17.5 \pm 0.2	0.148	12.3 \pm 0.4	12.3 \pm 0.3	0.923
↓	<i>Sardina pilchardus</i>	111 (33 - 166)	40	30	206 \pm 18	212 \pm 14	-18.0 \pm 0.5	-18.1 \pm 0.5	0.411	11.2 \pm 0.6	11.0 \pm 0.7	0.037
	<i>Scomber scombrus</i>	149 (147 - 150)	5	5	302 \pm 8	290 \pm 12	-18.7 \pm 0.4	-18.4 \pm 0.1	0.202	11.1 \pm 0.9	11.3 \pm 0.4	0.309
oceanic	<i>Micromesistius poutassou</i>	221 (107 - 650)	57	20	184 \pm 36	169 \pm 34	-18.2 \pm 0.5	-18.2 \pm 0.4	0.599	11.0 \pm 0.6	11.3 \pm 0.7	0.150

^a Corresponds to the depth under the research vessel at the end of trawling.

^b Mantle Length (ML) for cephalopods, Total Length (TL) for fish.

Pelagic - benthic difference

Excluding very small coastal ^{15}N -enriched species mentioned above, small pelagic fish (e.g., *Engraulis encrasicolus*, *Sardina pilchardus*, *Scomber scombrus* or *Trachurus trachurus* from neritic waters; *Xenodermichthys copei*, *Myctophum punctatum* or *Serrivomer beanii* from oceanic waters) generally displayed lower $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values than small benthic or benthopelagic fish from the same areas (e.g., *Dicologlossa cuneata*, *Callionymus lyra*, *Lesueurigobius friesii* or *Trisopterus minutus* from neritic waters; *Polymetme thaeocoryla*, *Bathypterois dubius* or *Nezumia aequalis* from oceanic waters) (Table A5-1).

Moreover, in lower trophic level invertebrates, the benthic surface deposit feeder *Scaphander lignarius* was enriched in ^{13}C and ^{15}N relative to the suspension feeder *Pecten maximus* and to the pelagic mesozooplankton in both coastal/shelf and shelf/upper slope habitats (Table A5-1). For instance, there was a 2‰ difference between $\delta^{15}\text{N}$ values of *Scaphander lignarius* and *Pecten maximus* in both environments (Table A5-1).

Temporal isotopic variations

Inter-annual variations

There were some significant differences of $\delta^{15}\text{N}$ values from one year to another in both cephalopods and fish analysed in this aim, but these differences between some years did not follow any clear or consistent pattern for all species (Tables A5-3 and A5-4): i.e., all species did not display $\delta^{15}\text{N}$ values increasing or decreasing with years, or a consistent cycle of variations of these $\delta^{15}\text{N}$ values (Tables A5-3 and A5-4). When averaging all years sampled for each species, the coastal squid *L. vulgaris* displayed the highest $\delta^{15}\text{N}$ values, while the more oceanic squids *I. coindetti* and *T. sagittatus* presented lower $\delta^{15}\text{N}$ values (Table A5-3). In fish, the coastal and benthopelagic *T. minutus* displayed the highest $\delta^{15}\text{N}$ values, in comparison to the pelagic species *T. trachurus* and *S. pilchardus* presenting lower $\delta^{15}\text{N}$ values, while the more oceanic *M. poutassou* finally presented the lowest values (Table A5-4).

Table A5-3: Muscle $\delta^{15}\text{N}$ values (‰) of cephalopod species and individuals analysed for inter-annual variations of isotopic signatures in the Bay of Biscay, and results of the statistical tests performed. Within each species, a narrow range of sizes was taken into account for comparison (see table), to avoid potential distortion due to ontogenic effects (diet shift). Groups (same letter) indicate that years are not significantly different (post hoc Tukey test in the case of ANOVA, multiple comparison tests with Holm adjustment method in the case of Kruskal-Wallis). Average $\delta^{15}\text{N}$ values over years, per species and/or per location, are given in bold. N = number of individuals.

Species	Zone	Year	N	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		Test and characteristics	Groups (post-hoc tests)		
				Mean \pm SD (min-max)			a	b	c
<i>Loligo vulgaris</i>	North BB ^a	2008	11	15.0 \pm 0.3 (14.6 - 15.4)		t-test ; t = 3.4 ; df = 3.9 p = 0.023			
		2009	4	14.2 \pm 0.4 (13.7 - 14.6)					
					14.6				
	South BB	2006	5	12.2 \pm 0.2 (12.0 - 12.5)		KW $\chi^2 = 2.7$; df = 3 p = 0.448			
		2008	3	12.8 \pm 0.2 (12.6 - 13.1)					
		2009	5	12.7 \pm 0.8 (11.8 - 13.5)					
		2010	6	12.7 \pm 1.0 (11.4 - 14.2)					
				12.6					
<i>Eledone cirrhosa</i>	Whole BB	2006	5	11.0 \pm 0.5 (10.2 - 11.4)		1-way ANOVA F = 17.2 ; df = 3 p < 0.001			
		2008	22	11.8 \pm 0.3 (11.1 - 12.3)					
		2009	3	12.8 \pm 0.5 (12.3 - 13.1)					
		2010	5	11.5 \pm 0.4 (11.2 - 12.1)					
				11.8					
<i>Illex coinditii</i>	Whole BB	2005	5	12.2 \pm 0.8 (11.1 - 13.1)		1-way ANOVA F = 5.6 ; df = 3 p = 0.005			
		2008	9	11.5 \pm 0.2 (11.2 - 12.0)					
		2009	7	11.5 \pm 0.4 (10.8 - 12.0)					
		2010	5	11.1 \pm 0.3 (10.8 - 11.4)					
				11.6					
<i>Todarodes sagittatus</i>	Whole BB	2006	6	12.4 \pm 0.2 (12.2 - 12.7)		KW $\chi^2 = 19.0$; df = 4 p < 0.001			
		2007	7	12.6 \pm 0.9 (10.7 - 13.4)					
		2008	6	11.5 \pm 0.2 (11.2 - 11.8)					
		2009	7	11.9 \pm 0.4 (11.3 - 12.4)					
		2010	4	10.7 \pm 0.4 (10.3 - 11.1)					
				11.8					

^a BB = Bay of Biscay.

Table A5-4: Muscle $\delta^{15}\text{N}$ values (‰) of fish species and individuals analysed for inter-annual variations of isotopic signatures in the Bay of Biscay, and results of the statistical tests performed. Within each species, a narrow range of sizes was taken into account for comparison, to avoid potential distortion due to ontogenic effects (diet shift). Groups (same letter) indicate that years are not significantly different (post hoc Tukey test in the case of ANOVA, multiple comparison test with Holm adjustment method in the case of Kruskal-Wallis). Average $\delta^{15}\text{N}$ values over years, per species and/or per location, are given in bold. N = number of individuals.

Species	Zone	Year	N	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		Test and characteristics	Groups (post-hoc tests)		
				Mean \pm SD (min-max)			a	b	
<i>Trisopterus minutus</i>	North BB ^a	2006	10	12.6 \pm 0.5 (11.9 - 13.4)		KW $\chi^2 = 8.6$; df = 4 p = 0.072			
		2007	5	12.4 \pm 0.3 (11.9 - 12.9)					
		2008	5	12.5 \pm 0.3 (12.2 - 12.9)					
		2009	4	13.9 \pm 0.2 (13.6 - 14.0)					
		2010	10	13.0 \pm 0.9 (11.9 - 14.2)					
					12.9				
		South BB	2006	10	13.1 \pm 0.3 (12.5 - 13.6)		1-way ANOVA F = 10.1 ; df = 3 p < 0.001		
	2007		5	13.9 \pm 0.2 (13.8 - 14.3)					
	2008		5	13.3 \pm 0.2 (13.1 - 13.7)					
	2010		5	13.0 \pm 0.4 (12.5 - 13.5)					
				13.3					
<i>Trachurus trachurus</i>	North BB	2006	10	12.4 \pm 0.5 (11.8 - 13.3)		1-way ANOVA F = 5.8 ; df = 4 p = 0.001			
		2007	9	13.2 \pm 0.4 (12.7 - 13.9)					
		2008	6	13.3 \pm 0.4 (12.8 - 13.8)					
		2009	9	12.7 \pm 0.6 (11.7 - 13.5)					
		2010	5	12.5 \pm 0.5 (11.8 - 13.2)					
					12.8				
		South BB	2006	10	11.4 \pm 0.7 (9.4 - 11.8)		KW $\chi^2 = 11.3$; df = 2 p = 0.004		
	2007		5	13.1 \pm 0.5 (12.4 - 13.6)					
	2010		10	11.7 \pm 0.5 (11.0 - 12.6)					
					12.1				
<i>Sardina pilchardus</i>	North BB	2006	3	11.5 \pm 0.4 (11.1 - 11.7)		1-way ANOVA F = 0.6 ; df = 4 p = 0.678			
		2007	14	11.2 \pm 0.7 (9.8 - 12.0)					
		2008	5	11.2 \pm 0.7 (10.4 - 12.2)					
		2009	11	11.4 \pm 0.4 (10.9 - 12.2)					
		2010	7	11.1 \pm 0.5 (10.5 - 11.9)					
					11.3				
		South BB	2006	20	11.1 \pm 0.9 (9.9 - 13.1)		KW $\chi^2 = 0.3$; df = 2 p = 0.856		
	2008		5	10.9 \pm 0.3 (10.6 - 11.4)					
	2009		5	11.0 \pm 0.3 (10.7 - 11.3)					
					11.0				
<i>Micromesistius poutassou</i>	Whole BB	2006	29	10.9 \pm 0.6 (9.3 - 12.0)		KW $\chi^2 = 15.4$; df = 2 p = 0.004			
		2007	15	11.4 \pm 0.8 (9.5 - 12.5)					
		2008	15	11.4 \pm 0.5 (10.0 - 11.9)					
		2009	5	10.6 \pm 0.7 (9.3 - 11.2)					
		2010	13	11.0 \pm 0.5 (10.2 - 12.2)					
									11.1

^a BB = Bay of Biscay.

Seasonal variations

In the European pilchard *Sardina pilchardus*, there was no significant difference in $\delta^{15}\text{N}$ values between individuals trawled in spring and those trawled in autumn, for the 3 years analysed in this aim (Student t-tests, $p > 0.05$, Fig. A5-4 A). In the European anchovy *Engraulis encrasicolus*, there was only a significant difference in $\delta^{15}\text{N}$ values between individuals trawled in spring and those trawled in autumn for the year 2008 (Student t-test, $p < 0.001$, Fig. A5-4 B). However, the variability in $\delta^{15}\text{N}$ values was generally higher in individuals trawled in autumn compared to those trawled in spring, particularly in anchovy (Fig. A5-4).

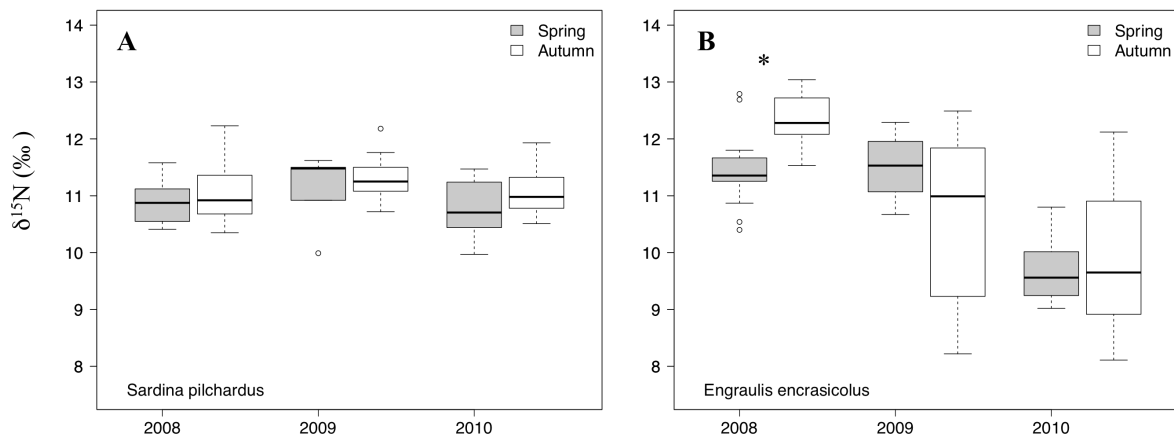


Figure A5-4: Boxplots of muscle $\delta^{15}\text{N}$ values (‰) as a function of the season and year of sampling in fish species analysed for seasonal variations in isotopic signatures in the Bay of Biscay. **A)** European pilchard *Sardina pilchardus*. **B)** European anchovy *Engraulis encrasicolus*. Between 5 and 21 individuals have been analysed for each season within each year. The same scale has been applied for both species, to facilitate the reading and comparisons between them. * Indicates the only one significant difference between spring and autumn individuals (Student t-test, $p < 0.05$).

Discussion

In open marine systems, the complexity of prey/predator fluxes increases with the possibility to define clear food web and ecosystem boundaries (Polis and Strong 1996, Vander Zanden and Fetzer 2007). Moreover, temperate systems such as the Bay of Biscay are often characterised by a mosaic of ecosystems supporting a high biodiversity able to feed on different sources. All of this may lead to higher difficulties in using ecological tracers such as stable isotopic ratios to study a global ecosystem's structure and functioning at mesoscale, in

comparison to "simpler" ecosystems (e.g., polar ecosystems), i.e., ecosystems subject to less variability in terms of sources, diet preferences of predators, or anthropogenic influences.

The knowledge of spatio-temporal variations driving stable isotopic signatures of organisms is thus essential to increase the robustness of the isotopic tool for studying such contrasted ecosystems. Using a wide range of taxa and species, our study principally highlights the potential of this tool in distinguishing the feeding zone of organisms from $\delta^{13}\text{C}$ values, as well as from $\delta^{15}\text{N}$ values (i.e., consistent inshore-offshore gradient) at the ecosystem scale. Moreover, the ^{15}N -enrichment of very small coastal species in particular implies a careful use of $\delta^{15}\text{N}$ values in trophic levels' calculation (see below). As for temporal variations, they did not appear to influence inter-specific comparisons of isotopic signatures at the ecosystem scale, despite evident intra-specific variations. These temporal variations were thus minor in comparison to spatial variations and their consequences for the use of stable isotope ratios in mesoscale and marine open ecosystem studies.

Spatial mesoscale drivers of isotopic signatures

At the ecosystem scale and on the horizontal axis of the distribution, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of species varied greatly, decreasing considerably from inshore to offshore organisms (Figs. A5-2 and A5-3). At the species scale, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of coastal species also varied with latitude, individuals trawled in the north displaying significantly higher $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values than individuals trawled in the south (Table A5-2). Furthermore, differences in $\delta^{15}\text{N}$ values between the different habitats (inshore vs. offshore, north vs. south) were likely to be more important than for $\delta^{13}\text{C}$ values. If this information is slightly distorted when considering all organisms analysed together (i.e., all trophic levels within a habitat, see Fig. A5-2), due to the fact that the TEF between sources and a consumer is more important in nitrogen (3.4‰ in average; Post 2002) than in carbon ($\leq 1\text{‰}$), large variations in $\delta^{15}\text{N}$ values are highlighted when considering *a priori* similar trophic level species or single species (Fig. A5-3, Table A5-2).

Rather than variations in trophic structure and feeding habits between the different environments, such spatial differences in $\delta^{15}\text{N}$ values in particular may be more linked to processes occurring at the dissolved inorganic nitrogen level (DIN), as described by Sherwood and Rose (2005). Also, many processes can enrich $\delta^{15}\text{N}$ values of the available

DIN pool in particular (see review by Sherwood and Rose 2005, and references therein), and the following general conclusions can be drawn: 1) when DIN demand is higher than the supply in nutrients, primary producers may face with $\delta^{15}\text{N}$ -enriched nitrogen source (e.g., "recycled" or enriched-ammonium, especially if it comes from higher trophic levels), which is then reflected in the local food chain. Alternatively, during upwelling events in areas subject to this, the physical supply of "new" nutrients overwhelms the biological uptake rate, favouring $\delta^{15}\text{N}$ -depleted nitrogen sources for producers of this environment. Moreover, high primary production during spring on the continental shelf reduces nutrient quantities, thus favouring $\delta^{15}\text{N}$ -enrichment of the available DIN. Even short in time, this effect may be lasting for benthic consumers in particular, due to the sinking of particles to the bottom; 2) rivers may be a vector of $\delta^{15}\text{N}$ -enriched organic matter into coastal waters as well, linked to $\delta^{15}\text{N}$ -enriched anthropogenic inputs derived from human waste for example (Fry 1988, Hansson et al. 1997, McClelland et al. 1997, Vizzini and Mazzola 2006).

In the particular case of the Bay of Biscay, it may be difficult to assess whether one mechanism or the other is more important. Both processes can be implied and the prevalence of one or the other can change temporally. Indeed, this ecosystem is characterised by contrasted hydrological landscapes, with regions under upwelling influence, regions largely under rivers plume influence, and intermediate areas (Koustikopoulos and Le Cann 1996). Nevertheless, these landscapes greatly vary in their spatial extent seasonally and from one year to another. This is primarily due to the amount of river runoff, and rivers plumes (i.e., Loire and Gironde) that also vary considerably in time according to the river regime (Planque et al. 2004, Puillat et al. 2004, 2006). Available nutrients for primary production are thus highly dependent of these temporal variations as well (Herbland et al. 1998, Lunven et al. 2005), while they can strongly affect $\delta^{15}\text{N}$ values of primary producers, as commented above.

Our results are consistent with a prevalence of river discharges influence on $\delta^{13}\text{C}$, and especially $\delta^{15}\text{N}$ values (McClelland et al. 1997, Vizzini and Mazzola 2006), followed by the potential influence of slope currents or upwellings, because: 1) very small coastal cephalopods or small coastal pelagic fish species are particularly enriched in ^{13}C and ^{15}N relatively to their known predators in the area (e.g., small cetaceans; Spitz et al. 2006ab, Meynier et al. 2008); 2) only the more coastal species are affected by a significant difference in both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values when comparing north and south; 3) the pattern is consistent in almost all those coastal species (i.e., there is an enrichment of individuals trawled in the north

of the Bay, under Loire influence, compared with individuals trawled in the south, under Gironde influence).

Finally, in open ecosystems such as the Bay of Biscay, the pelagic-benthic difference appears as the third factor influencing $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in consumers. Indeed, on the vertical axis of the distribution in a given area, there was some clear evidence of enrichment in ^{13}C and ^{15}N of species depending more on the benthic environment, in comparison to those depending almost exclusively on the pelagic environment (Table A5-1). In marine coastal environments, benthic algae are effectively enriched by 5 ‰ in average relative to phytoplankton (France 1995). This is due to the differential carbon fixation and greater diffusion resistance by benthic algae, which present larger boundary layers in thickness and occur in lower turbulence lentic system, finally resulting in more positive $\delta^{13}\text{C}$ values in these algae (see France 1995, and associated references). The potential sinking of $\delta^{15}\text{N}$ -enriched particles to the bottom (see explanation above, and review by Sherwood and Rose 2005) can also explain the higher $\delta^{15}\text{N}$ values displayed by benthic organisms, as well as their potential scavenger behaviour (e.g., necrophagous crustaceans).

However, this benthic-pelagic difference was only detectable in lower trophic level species, i.e., benthic invertebrates' feeder fish vs. zooplankton feeder fish, or sub-surface deposit feeder/grazing gastropod molluscs and benthic crustaceans vs. suspension feeder bivalve molluscs and pelagic mesozooplankton (Table A5-2, Fig. A5-3). This may be due to the higher difficulty to correctly define the trophic environment of higher trophic level consumers. Indeed, they are probably more mobile on the vertical axis of the distribution when foraging, and represent a greater mixture of sources than lower trophic level species.

Temporal mesoscale drivers of isotopic signatures

As rivers plumes (i.e., Loire and Gironde in the French part of the Bay of Biscay) seem to largely influence isotopic signatures from a spatial standpoint, one potential source of temporal variations in consumers' isotopic signatures should be the temporal variations of rivers plumes in the Bay of Biscay (Puillat et al. 2004, 2006). Indeed, the hydrological mesoscale variability (often associated with river discharges) has biological consequences, notably in terms of fish spawning areas, or eggs and larvae survival (Mion et al. 1998, Bellier et al. 2007).

However, species collected over several years did not follow a consistent pattern in the variations of $\delta^{15}\text{N}$ values over years. Such a consistent pattern would have suggested a possible change in the baseline over years. Also, if coastal fish species tended to be more affected (e.g., *Trisopterus minutus*, *Trachurus trachurus*) than the less coastal species (e.g., *Sardina pilchardus*, *Micromesistius poutassou*) for inter-annual variations of isotopic signatures (Table A5-4), this was not the case in cephalopods (Table A5-3). In fact, there was no clear trend in cephalopods, or, on the contrary, only a slight trend to decrease between 2005/2006 and 2010 in the more oceanic species *Illex coindetii* and *Todarodes sagittatus*. Furthermore, if the absolute trophic position of a species could change over years, the average and relative trophic position of species in the whole food web, and its affiliation to one or another habitat on both horizontal and vertical axis of the distribution was not impacted. Indeed, annual variations did not affect the discrimination of species' isotopic niche (as defined by Newsome et al. 2007) when all years of sampling were averaged within each species (Tables A5-3 and A5-4).

Thus, rather than an isotopic change in the baseline, inter-annual variations of the species' isotopic signatures may be more linked to an adjustment of the species facing variations in the food supply, to avoid competition with other species (Lefebvre et al. 2009). Seasonal and inter-annual variations in pilchard and anchovy, both zooplankton feeders, also favour this theory. Indeed, if no significant difference between seasons was revealed in general, the spread of signatures in individuals sampled in autumn was often larger than for individuals sampled in spring, particularly in anchovy (Fig. A5-4 B). When a type of food is very abundant (e.g., some mesozooplankton species following phytoplankton blooms in spring), individuals and/or species may tend to feed on and share the same overabundant prey.

Another hypothesis to such inter-individual and temporal variations at the species scale is the high mobility of these fish and cephalopod species (Nottestad et al. 1999, Semmens et al. 2007): thus, we can not exclude the feeding of some individuals and/or part of the population in different areas presenting different baseline signatures in $\delta^{15}\text{N}$ in the Bay of Biscay (see comment above, i.e., neritic vs. oceanic domain), particularly in autumn when food supply is less abundant in neritic waters (no blooms). For like-sized individuals, such an inter-individual difference in $\delta^{15}\text{N}$ values is effectively intriguing (more than 4‰ difference between individuals from autumns 2009 and 2010) (Fig. A5-4 B). Factors explaining this phenomenon in details, at the individual and species scales, remain to be explored in the Bay

of Biscay (e.g., different life history traits, prey preferences, prey distribution and spatio-temporal variations of this distribution, etc.).

Implications and recommendations for further studies

This mesoscale study of spatio-temporal variations of isotopic signatures from various representative taxa of a complex open marine ecosystem revealed that spatial variations (principally due to river discharges influence) are more important than temporal variations (inter-annual and seasonal, at the species scale) in terms of implications for further studies on structure and functioning of this type of marine system.

First, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values proved to be powerful indicators of the feeding zone on the horizontal axis of the distribution (i.e., evident inshore - offshore discrimination). This finding is of course to nuance for the more mobile species, such as marine mammals species. Indeed, for instance, some mammal species (e.g., *Globicephala melas*, *Kogia breviceps*, *Physeter macrocephalus*, *Ziphius cavirostris*) presented relatively high $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values, that we did not expect (Table A5-1, Fig. A5-3). Those species are yet known to be deep diving foraging species mostly feeding on oceanic/ deep-sea cephalopods (Spitz et al. 2011). Thus, isotopic signatures could suggest some incursions on the continental shelf by some of those species, foraging occasionally on more coastal and/or demersal species, as also demonstrated by the analysis of their stomach contents in the Bay of Biscay (Spitz et al. 2011). Secondly, to a lesser extent because only evidenced in lower trophic level species, both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values also distinguished between pelagic and benthic trophic environments.

All these results highlight the difficulty to assess the feeding zone and diet of higher trophic level consumers (as well as highly mobile species) through stable isotopic signatures only, and the necessity to combine them with other approaches and/or published data on species. At temperate latitudes, higher trophic level consumers effectively represent a greater mixture of sources (Chassot et al. 2008), and integrate all variations that may already affect lower trophic level consumers. This is well illustrated by the spread of both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values that becomes considerably narrow with increasing trophic level consumers (Fig. A5-3 A, B, C vs. E, D, F).

Finally, the principal implication of the spatial variations revealed by this study is that $\delta^{15}\text{N}$ values may be revisited as an indicator of the feeding area also as previously suggested by

Hansson et al. (1997), Sherwood and Rose (2005), or Ménard et al. (2007) for other areas. This is especially important when considering the horizontal axis of the distribution. Up to now, $\delta^{15}\text{N}$ values are almost always only used as an indicator of the trophic position and as a basis for absolute trophic levels' calculation (Hobson et Welch 1992, Lesage et al. 2001, Le Loc'h et al. 2008). Much more important is precisely what it implies when using $\delta^{15}\text{N}$ values to calculate absolute trophic levels from a single baseline for a whole ecosystem. For instance, if the trophic levels of the sperm whale *Physeter macrocephalus* ($\delta^{13}\text{C}$: $-16.5 \pm 0.0\text{‰}$; $\delta^{15}\text{N}$: $11.1 \pm 1.0\text{‰}$) and of the Atlantic bobtail squid *Sepioloatlantica* ($\delta^{13}\text{C}$: $-16.3 \pm 0.4\text{‰}$; $\delta^{15}\text{N}$: $15.1 \pm 0.7\text{‰}$) were calculated from the same $\delta^{15}\text{N}$ baseline, with a TEF of 3.4 ‰ per trophic level, we should conclude that the Atlantic bobtail squid is more than one trophic level higher relative to the sperm whale in the Bay of Biscay, what is total nonsense. This involves that in such open and contrasted marine ecosystems, it is crucial to consider several baselines and to use an appropriate baseline for the different environments defined (on the horizontal axis of the distribution in particular). Several authors have also argued for the use of primary consumers instead of primary producers and/or Particulate Organic Matter as baselines (Cabana and Rasmussen 1996, Vander Zanden and Rasmussen 1999, Post 2002). Indeed, primary consumers - and especially sessile species - appear more appropriate to reflect spatial variations on the relatively long-term, contrary to primary producers that are temporally highly variable (due to fluctuations in nutrients available in particular). The knowledge and the consideration of such spatial variations in $\delta^{15}\text{N}$ values on the horizontal axis of the distribution in particular has also important consequences in using stable isotopic ratios and/or derived trophic levels to correctly study, for instance, the transfer of contaminants in foods webs (Hobson et al. 2002, Dehn et al. 2006).

Conclusions

From the Bay of Biscay case study, spatial variations of isotopic signatures highlighted that $\delta^{15}\text{N}$ values vary with and clearly reflect the feeding area of organisms, which is usually expected from $\delta^{13}\text{C}$ values only. Thus, the calculation of trophic levels through $\delta^{15}\text{N}$ values in such contrasted ecosystem should absolutely respect the following conditions: 1) the different environments of the ecosystem must be separated, on the horizontal axis of the distribution in particular (i.e., coastal/shelf vs. shelf/upper slope vs. upper slope/deep sea/oceanic); 2) a different baseline – representative of each environment – must be taken into account.

However, in higher trophic level and highly mobile consumers, information derived from stable analysis should be combined with information derived from other approaches, to fully elucidate the trophic ecology of those organisms. As for temporal variations, they suggested that for studying such ecosystem from the isotopic tool, the sampling of species should be performed in a short time scale (e.g., one year at one season). Nonetheless, for rare species, the use of individuals sampled over several years may be possible to get an average value for those species.

Acknowledgments

This work was supported through the PhD grant of T. Chauvelon from the Conseil Régional de Poitou-Charentes. Authors are very grateful to J.P. Léauté, R. Bellail and J.C. Mahé from IFREMER for facilitating the sampling during the EVHOE cruises, to C. Dupuy (LIENSs) and F. Mornet (IFREMER) for their valuable assistance of seasonal sample collection, and to members of the French Stranding Network and the whole staff of CRMM for providing the marine mammal samples. They also thank P. Richard and G. Guillou (UMR LIENSs) for assistance in stable isotope analysis, and C. Pignon-Mussaud and P. Brunello from the Cellule Géomatique (UMR LIENSs) for providing the map of the study area. Finally, they are grateful to Y. Cherel (CEBC, UPR 1934 CNRS) and V. Ridoux (LIENSs and SOCMOM, UMS 3419 CNRS-ULR) for their helpful advices and comments on the work. Part of the work was supported by the European project REPRODUCE (EratNet-Marifish, WP7).

References

- Bellier E, Planque B, Petitgas P (2007) Historical fluctuations in spawning location of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and sardine (*Sardina pilchardus*) in the Bay of Biscay during 1967-73 and 2000-2004. *Fish Oceanogr* 16: 1-15.
- Cabana G, Rasmussen JB (1996) Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. *P Natl Acad Sci USA* 93: 10844-10847.
- Caut S, Angulo E, Courchamp F (2009) Variation in discrimination factors ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction. *J Appl Ecol* 46: 443-453.
- Chassot E, Rouyer T, Trenkel VM, Gascuel D (2008) Investigating trophic-level variability in Celtic Sea fish predators. *J Fish Biol* 73: 763-781.
- Cherel Y, Fontaine C, Jackson GD, Jackson CH, Richard P (2009) Tissue, ontogenic and sex-related differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the oceanic squid *Todarodes filippovae* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Mar Biol* 156: 699-708.

- Chouvelon T, Spitz J, Cherel Y, Caurant F, Sirmel R, Mèndez-Fernandez P, Bustamante P (2011) Species and ontogenic-related differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and Hg and Cd concentrations of cephalopods. *Mar Ecol Progr Ser* 433: 107-120.
- Cury PM, Shannon LJ, Roux JP, Daskalov GM, Jarre A, Moloney CL, Pauly D (2005) Trophodynamic indicators for an ecosystem approach to fisheries. *ICES J Mar Sci* 62: 430-442.
- Cury P, Shannon L, Shin YJ (2003) The functioning of marine ecosystems: a fisheries perspective. In: Sinclair M, Valdimarsson G (eds) *Responsible fisheries in the marine ecosystem*. CAB International, Walingford, pp 103-123.
- Dehn LA, Follmann EH, Thomas DL, Sheffield GG, Rosa C, Duffy LK, O'Hara TM (2006) Trophic relationships in an Arctic food web and implications for trace metal transfer. *Sci Total Environ* 362: 103-123.
- De Niro MJ, Epstein S (1977) Mechanism of carbon fractionation associated with lipid synthesis. *Science* 197: 261-263.
- De Niro MJ, Epstein S (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 42: 495-506.
- De Niro MJ, Epstein S (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 45: 341-351.
- France RL (1995) Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: food web implications. *Mar Ecol Prog Ser* 124: 307-312.
- Fry B (1988) Food web structure on Georges Bank from stable C, N, and S isotopic compositions. *Limnol Oceanogr* 33: 1182-1190.
- Gannes LZ, O'Brien DM, Martínez del Río C (1997) Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology* 78: 1271-1276.
- García SM, Zerbi A, Do Chi T, Lasserre G (2003) *The ecosystem approach to fisheries. Issues, terminology, principles, institutional foundations, implementation and outlook*. FAO, Rome, Italy.
- Gascuel D, Bozec YM, Chassot E, Colomb A, Laurans M (2005) The trophic spectrum: theory and application as an ecosystem indicator. *ICES J Mar Sci* 62: 443-452.
- Hansson S, Hobbie JE, Elmgren R, Larsson U, Fry B, Johansson S (1997) The stable nitrogen isotope ratio as a marker of food-web interactions and fish migration. *Ecology* 78: 2249-2257.
- Herbland A, Delmas D, Laborde P, Sautour B, Artigas F (1998) Phytoplankton spring bloom of the Gironde plume waters in the Bay of Biscay: early phosphorus limitation and food web consequences. *Oceanol Acta* 21: 279-291.
- Hjelm J, Persson L, Christensen B (2000) Growth, morphological variation and ontogenetic niche shifts in perch (*Perca fluviatilis*) in relation to resource availability. *Oecologia* 122: 190-199.
- Hobson KA (1999) Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120: 314-326.
- Hobson KA, Welch HE (1992) Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 84: 9-18.
- Hobson KA, Fisk A, Karnovsky N, Holst M, Gagnon JM, Fortier M (2002) A stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) model for the North Water food web: implications for evaluating trophodynamics and the flow of energy and contaminants. *Deep-Sea Res PT II* 49: 5131-5150.
- Jennings S, Pinnegar JK, Polunin NVC, Boon TV (2001) Weak cross-species relationships between body size and trophic level belie powerful size-based trophic structuring in fish communities. *J Anim Ecol* 70: 934-944.

- Karpouzi VS, Stergiou KI (2003) The relationships between mouth size and shape and body length for 18 species of marine fishes and their trophic implications. *J Fish Biol* 62: 1353-1365.
- Kelly JF (2000) Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Can J Zool* 78: 1-27.
- Koutsikopoulos C, Le Cann B (1996) Physical processes and hydrological structures related to the Bay of Biscay anchovy. *Sci Mar* 60: 9-19.
- Lefebvre S, Marín Leal JC, Dubois S, Orvain F, Blin JL, Bataillé MP, Ourry A, Galois R (2009) Seasonal dynamics of trophic relationships among co-occurring suspension feeders in two shellfish culture dominated ecosystems. *Estuar Coast Shelf S* 82: 415-425.
- Le Loc'h F, Hily C, Grall J (2008) Benthic community and food web structure on the continental shelf of the Bay of Biscay (North Eastern Atlantic) revealed by stable isotopes analysis. *J Mar Syst* 72: 17-34.
- Lesage V, O'Hammill M, Kovacs KM (2001) Marine mammals and the community structure of the Estuary and Gulf of St Lawrence, Canada: evidence from stable isotope analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 210: 203-221.
- Lorance P, Bertrand JA, Brind'Amour A, Rochet MJ, Trenkel VM (2009) Assessment of impacts from human activities on ecosystem components in the Bay of Biscay in the early 1990s. *Aquat Living Resour* 22: 409-431.
- Lorance P, Latrouite D, Séret B (2000) Observations of Chondrichthyan fishes (sharks, rays and chimaeras) in the Bay of Biscay (North-Eastern Atlantic) from submersibles. *Proc. 3rd Europ Elasm Assoc Meet, Boulogne sur Mer, France*, pp. 29-45.
- Lunven M, Guillaud JF, Youéno A, Crassous MP, Berric R, Le Gall E, Kérouel R, Labry C, Aminot A (2005) Nutrient and phytoplankton distribution in the Loire River plume (Bay of Biscay, France) resolved by a new Fine Scale Sampler. *Estuar Coast Shelf S* 65: 94-108.
- Martínez del Rio C, Wolf N, Carleton SA, Gannes LZ (2009) Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biol Rev* 84: 91-111.
- McClelland JM, Valiela I, Michener RH (1997) Nitrogen-stable isotope signatures in estuarine food webs: a record of increasing urbanization in coastal watersheds. *Limnol Oceanogr* 42: 930-937.
- McCutchan JHJ, Lewis WMJ, Kendall C, McGrath CC (2003) Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos* 102: 378-390.
- Ménard F, Lorrain A, Potier M, Marsac F (2007) Isotopic evidence of distinct feeding ecologies and movement patterns in two migratory predators (yellowfin tuna and swordfish) of the western Indian Ocean. *Mar Biol* 153: 141-152.
- Meynier L, Pusineri C, Spitz J, Santos MB, Pierce GJ, Ridoux V (2008) Intraspecific dietary variation in the short-beaked common dolphin *Delphinus delphis* in the Bay of Biscay: importance of fat fish. *Mar Ecol Prog Ser* 354: 277-287.
- Michener RH, Kaufman L (2007) Stable isotope ratios as tracers in marine food webs: an update. In: Michener R and Lajtha K (eds) *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Blackwell Publishing Ltd, pp 238-282.
- Minagawa M, Wada E (1984) Stepwise enrichment of ¹⁵N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochim Cosmochim Acta* 48: 1135-1140.
- Mion JB, Stein RA, Marschall EA (1998) River discharge drives survival of larval walleye. *Ecol Appl* 8: 88-103.
- Newsome SD, Martínez del Rio C, Bearhop S, Phillips DL (2007) A niche for isotopic ecology. *Front Ecol Environ* 5: 429-436.

- Nøttestad L, Giske J, Holst JC, Huse G (1999) A length-based hypothesis for feeding migrations in pelagic fish. *Can J Fish Aquat Sci* 56: 26-34.
- OSPAR (2010) Quality Status Report 2010. OSPAR Commission, London, 176 p.
- Palomares MLD, Pauly D (eds) (2010) SeaLifeBase, World Wide Web electronic publication, www.sealifebase.org, version (12/2010).
- Pauly D, Christensen V, Dalsgaard J, Froese R, Torres FJ (1998) Fishing down marine food webs. *Science* 279: 860-863.
- Pauly D, Palomares ML (2005) Fishing down marine food web: it is far more pervasive than we thought. *B Mar Sci* 76: 197-211.
- Pauly D, Watson R (2005) Background and interpretation of the 'Marine Trophic Index' as a measure of biodiversity. *Philos T Roy Soc B* 360: 415-423.
- Peterson CH, Lubchenco J (1997) Marine ecosystem services. In: Daily GC (ed), *Nature's services. Societal dependence on natural ecosystems*. Island Press, Washington (USA), pp 177-194.
- Pinnegar JK, Polunin NVC (1999) Differential fractionation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. *Funct Ecol* 13: 225-231.
- Planque B, Lazure P, Jégou AM (2004) Detecting hydrological landscapes over the Bay of Biscay continental shelf in spring. *Climate Res* 28: 41-52.
- Polis GA, Strong DR (1996) Food web complexity and community dynamics. *Am Nat* 147: 813-846.
- Post DM (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods and assumptions. *Ecology* 83: 703-718.
- Puillat I, Lazure P, Jégou AM, Lampert L, Miller PI (2004) Hydrographical variability on the French continental shelf in the Bay of Biscay, during the 1990s. *Cont Shelf Res* 24: 1143-1163.
- Puillat I, Lazure P, Jégou AM, Lampert L, Miller PI (2006) Mesoscale hydrological variability induced by northwesterly wind on the French continental shelf of the Bay of Biscay. *Sci Mar* 70S1: 15-26.
- Quéro JC (2003) Guide des Poissons de l'Atlantique Européen, Les guides du naturaliste. Delachaux and Niestlé (eds), Paris, France.
- Semmens JM, Pecl GT, Gillanders BM, Waluda CM, Shea EK, Jouffre D, Ichii T, Zumholz K, Katugin ON, Leporati SC, Shaw PW (2007) Approaches to resolving cephalopod movement and migration patterns. *Rev Fish Biol Fisher* 17: 401-423.
- Sherwood GD, Rose GA (2005) Stable isotope analysis of some representative fish and invertebrates of the Newfoundland and Labrador continental shelf food web. *Estuar Coast Shelf S* 63: 537-549.
- Spitz J, Richard E, Meynier L, Pusineri C, Ridoux V (2006a) Dietary plasticity of the oceanic striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*, in the neritic waters of the Bay of Biscay. *J of Sea Res* 55: 309-320.
- Spitz J, Rousseau Y, Ridoux V (2006b) Diet overlap between harbour porpoise and bottlenose dolphin: an argument in favour of interference competition for food? *Estuar Coast Shelf S* 70: 259-270.
- Spitz J, Cherel Y, Bertin S, Kiszka J, Dewez A, Ridoux V (2011) Prey preferences among the community of deep-diving odontocetes from the Bay of Biscay, Northeast Atlantic. *Deep-Sea Res PT I* 58: 273-282.
- Trenkel VM, Berthélé O, Lorance P, Bertrand J, Brind'Amour A, Cochard ML, Coppin F, Léauté JP, Mahé JC, Morin J, Rochet MJ, Salaun M, Souplet A, Vérin Y (2009) Atlas des grands invertébrés et poissons observés par les campagnes scientifiques. Bilan 2008. Ifremer, Nantes, EMH: 09-003, 100 p.

- Vanderklift MA, Ponsard S (2003) Source of variation in consumer-diet $\delta^{15}\text{N}$ enrichment: a meta-analysis. *Oecologia* 136: 169-182.
- Vander Zanden MJ, Fetzer WW (2007) Global patterns of aquatic food chain length. *Oikos* 116: 1378-1388.
- Vander Zanden MJ, Rasmussen JB (1999) Primary consumer $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology* 80: 1395-1404.
- Vizzini S, Mazzola A (2006) The effects of anthropogenic organic matter inputs on stable carbon and nitrogen isotopes in organisms from different trophic levels in a southern Mediterranean coastal area. *Sci Total Environ* 368: 723-731.

Annexe 6

Trophic ecology of European sardine *Sardina pilchardus* and anchovy *Engraulis encrasicolus* in the Bay of Biscay (North-East Atlantic) inferred from $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotopic signatures

Chappuis A, **Chouvelon T**, Bustamante P, Lefebvre S, Mornet F, Guillou G,
Dupuy C

En préparation pour Marine Ecology Progress Series



Introduction

The Bay of Biscay is a very important fishing ground, notably for Spanish and French commercial fisheries, due to a high diversity and abundance of marine species (Certain et al. 2008, Spitz and Quéro 2008, Trenkel et al. 2009). Many species are particularly targeted, such as the European hake (*Merluccius merluccius*), the common sole (*Solea solea*), the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*), or the anglerfish (*Lophius* sp.) (Dardignac 1988). European sardine (*Sardina pilchardus*) and anchovy (*Engraulis encrasicolus*) fisheries are also very lucrative (Uriarte et al. 1996, Coiffec et al. 2006, Villalobos 2008). However, no quota exists in this region for sardine yet, despite a known decrease in the number of catch (OSPAR 2010). On the other hand, a decrease in anchovy's stock during years 2000 caused the closing of its fishery in 2005. The moratorium ended in 2010, and finally led to the instauration of quotas (ICES 2010ab). Nonetheless, in order to prevent adult and juvenile sardines and anchovies from an irreversible decline, a continuous watch of these small pelagic fish is necessary. Indeed, sardines and anchovies are economically, but also ecologically important, as they are key prey species for a great number of predators such as the common dolphin (*Delphinus delphis*) or the northern gannet (*Morus bassanus*) for example (Silva 1999, Certain et al. 2011).

The understanding of recruitment processes is the cornerstone of a sustainable fishery management, even though it is facing a strong lack of knowledge. One of the aspects that could influence recruitment is the diet of these adult fish. In consequence, it is necessary to comprehend the connexion between resources (mesozooplankton, i.e., zooplankton between 0.2 and 20 mm) and planktivorous fish (here, sardines and anchovies) that feed on varied planktonic species, mostly mesozooplankton (James 1988, Plounevez and Champalbert 1999, Cunha et al. 2005, Van der Lingen et al. 2006, Raab et al. 2011) and more specifically copepods (Tudela and Palomera 1997, Plounevez and Champalbert 1999, Sever et al. 2005, Raab et al. 2011). Nevertheless, all the trophic links within plankton and between plankton and nekton are not clearly established yet. For years, pelagic food webs were considered as relatively simple and direct systems. In fact, it was stated that oceanic primary production was mainly realised by diatoms and dinoflagellates, which were then consumed by zooplankton, consumed itself by higher-level metazoan (Fenchel 1988). However, it has now been shown that these autotrophic organisms only represented less than 10% of this production, leaving 60 to nearly 90% of it to pico and nanophytoplankton (Pomeroy 1974, Azam et al. 1983, Platt et al. 1983, Conley and Turner 1985, Dam and Lopes 2003, Jeong et al. 2010). This complexity

is also increased by peculiar behaviours such as mixotrophy and omnivory, which are very common within micro and mesozooplankton compartments (Pomeroy 1974, Fry 1988, Jones 2000, Dam and Lopes 2003, Jeong et al. 2010). Moreover, omnivory is also frequent within planktivorous fish, such as sardine or anchovy (James 1988, Bode et al. 2004, Cunha et al. 2005).

One of the problems in the study of trophic links lies in the difficulty to observe direct interactions between organisms due to the environment (open water) and the small size of plankton. This latter fact induces another difficulty when studying stomach contents of planktivorous fish, as zooplankton and phytoplankton organisms are sometimes difficult to identify because of their size (James 1988). These time-consuming analyses also underestimate some prey species, due to differential digestion rates in fish digestive tracts (Gannon 1976). Therefore, the application of stable isotope techniques offers the possibility of investigation of the trophic organisation in a pelagic food web. In fact, differences in the natural isotope abundance (e.g., carbon and nitrogen stable isotopes) between a prey and its consumer reflect trophic relationships (Owens 1987, Wada et al. 1987), as heavy isotopes accumulate in large organisms and in tissues with low turnover rate (e.g., white muscle) (Tieszen et al. 1983, Minagawa and Wada 1984, Hesslein et al. 1993, Fry and Quiñones 1994). Specifically, stable isotope ratios of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) and carbon ($\delta^{13}\text{C}$) are used as indicators of trophic level and feeding grounds of consumers, respectively (De Niro and Epstein 1978, 1981, Minagawa and Wada 1984, Peterson and Fry 1987, Hobson 1999).

In order to better understand the links between plankton-eating fish (i.e., sardines and anchovies) and mesozooplankton in the Bay of Biscay, and to highlight potential preferential feeding grounds, this study combines analyses of stable isotopes of fish and prey samples (i.e., planktonic species analysed separately) and mixing models, that are a useful tool to assess the proportional contribution of sources in a predator's diet (Phillips 2001, Parnell et al. 2010).

Materials and methods

Data collection and sample preparation

Mesozooplankton and fish samples were collected in spring 2010 during PELGAS survey, conducted by Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) on the

continental shelf to the shelf-edge of the Bay of Biscay. Plankton was collected during the night at stations located over the continental shelf (Sh) and nearby ocean by vertical trawls of 200 μm mesh-size WP₂ net, from 100 m depth (or bottom depth for near shore stations) to the surface.

For this study, 13 stations were selected, along 5 transects, from the north to the south of the Bay of Biscay and from the coastline (C) to the slope (Sl) (Fig. A6-1). For each station, two mesozooplankton samples were made: one undetermined assemblage kept entire (at -20°C), and one for further taxonomic identification and sorting for subsequent stable isotope analysis (stored in 70% ethanol, final concentration). Mesozooplankton was identified until genus and species when it was possible.

Adult sardines and anchovies were collected during the day around transects, using pelagic trawls when shoals were detected with on-board acoustic instruments. Fish were immediately stored frozen at -20°C until further analyses.

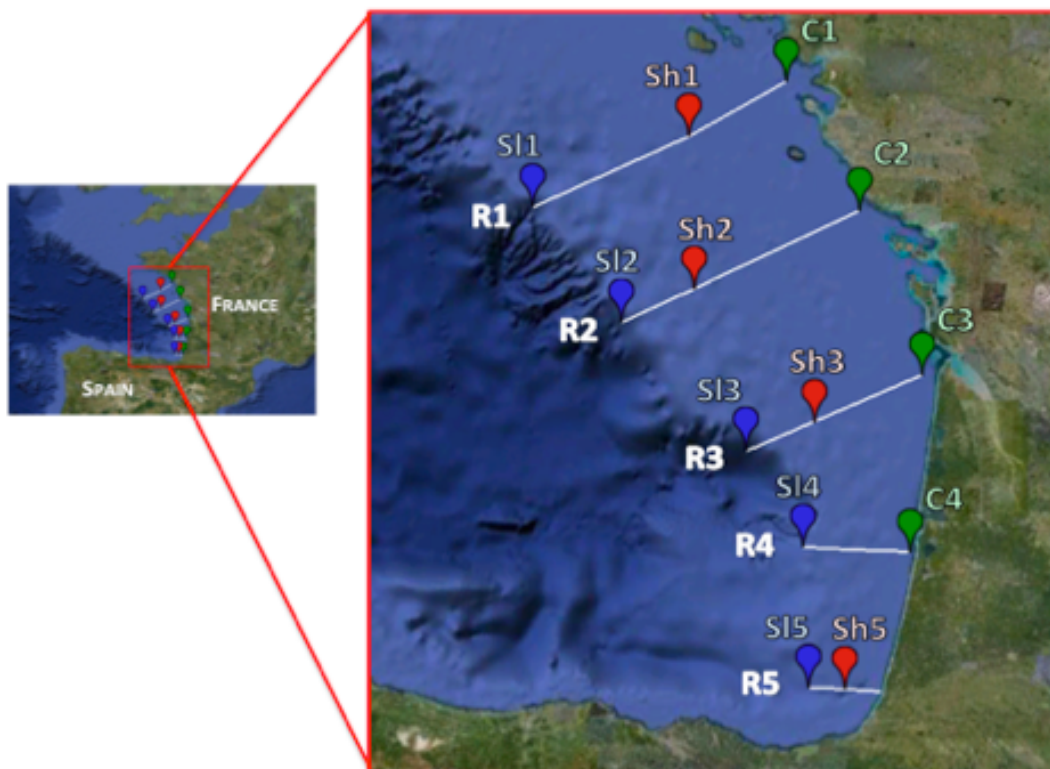


Figure A6-1: Transects from the coastline to the slope in the Bay of Biscay (PELGAS 2010) and the 13 stations chosen for this study. C: Coastal; Sh: Shelf; Sl: Slope.

For each station, mesozooplankton whose relative abundance was more than 5%, was identified under a Leica M3Z stereo microscope (x65 to x160 magnification) to the genus and to the species whenever possible. In order to compare isotopic values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ from the north to the south, *Calanus helgolandicus* was taken into account for each slope station, even for one station where it was not dominant (e.g., station S12).

20 to 350 individuals (depending on the specie' size) belonging to each dominant species were taken out from ethanol and carefully washed with distilled water in order to remove eventually dead organic matter and phytoplankton. Each individual was also measured with the graduated ocular of the binocular magnifying glass.

Both sorted organisms and undetermined assemblages were then individually stored frozen (-80°C , 48h) before being freeze-dried (24h). Undetermined assemblages were finely grounded with a planetary ball mill (Retsch PM 200), but not the sorted organisms, to avoid important lost of matter. Each sample (powder for undetermined assemblages and pool of organisms for sorted species) was then packed in 2 tin capsules for stable isotope analysis, in order to assess any kind of variation in sample's $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values. Plankton samples were not acidified to remove carbonates because of the too small amount of matter available, and because a similar study did not find any significant changes in the relative abundance of ^{13}C and ^{15}N before and after acidification (Bode et al. 2004).

40 sardines and 34 anchovies of similar size class (standard length of 15.5 to 16.5 cm for sardine and 11.5 to 14.5 cm for anchovy) were dissected to obtain portions of dorsal white muscle (Pinnegar and Polunin 1999). Samples were then washed with distilled water and individually stored frozen at -20°C in plastic bags, prior to a 72h freeze-drying period. White muscles were then grounded manually or with a planetary ball mill (Retsch PM 200). They were then treated with cyclohexane in order to remove naturally ^{13}C -depleted lipids (De Niro and Epstein 1977). Lipid-free samples were dried in an oven at 45°C for 48h and then packed in tin capsules.

Stable isotope analysis

Natural abundance of ^{13}C and ^{15}N in plankton and fish was determined with a Continuous Flow Isotope Ratio Mass Spectrometer coupled to an elemental analyser (EA IR-MS and

Isoprime Micromass, UK). Results are expressed as isotope ratios $\delta X(\text{‰})$ according to the formula:

$$\delta X = [(R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}}) - 1] \times 10^3$$

where $X = {}^{13}\text{C}$ or ${}^{15}\text{N}$ and $R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ or ${}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$ (Peterson and Fry 1987). Standards for $\delta {}^{13}\text{C}$ and $\delta {}^{15}\text{N}$ are carbon in the Pee Dee Belemnite and atmospheric N_2 , respectively. Precision for $\delta {}^{15}\text{N}$ and $\delta {}^{13}\text{C}$ was better than 0,2‰. Differences in $\delta {}^{13}\text{C}$ and $\delta {}^{15}\text{N}$ between the two tin capsules were below the analytical error of the EA IR-MS for each sample. Thus, for each one, the mean value of the two capsules will be used in further analyses.

Data analysis

All analyses were conducted with the R software (R Development Team 2011). Normality of fish $\delta {}^{13}\text{C}$ and $\delta {}^{15}\text{N}$ was tested using Shapiro-Wilk's test prior to analyses. Student's (parametric) or Wilcoxon's (non-parametric) tests were then used to compare mean $\delta {}^{13}\text{C}$ and $\delta {}^{15}\text{N}$ between northern and southern fish (separation at 46°N, i.e., transects R1 and R2 for plankton are considered in the northern area, while transects R3 to R5 are considered in the southern area; Fig. A6-1). To account for the many potential prey items in sardine and anchovy diets, the wide variability in sources' $\delta {}^{13}\text{C}$ and $\delta {}^{15}\text{N}$ and uncertainty in discrimination factors, a Bayesian isotopic mixing model was used. It is available as an open source R package: SIAR (Stable Isotope Analyses in R; Parnell et al. 2010). This program uses Markov Chain Monte Carlo (MCMC) and Dirichlet prior distribution to fit a Bayesian model of an animal dietary habit, based on its $\delta {}^{13}\text{C}$ and $\delta {}^{15}\text{N}$. MCMC was run for 500,000 iterations, discarding the first 50,000 ones to avoid poor starting values and keeping every 15 iterations to reduce the sample autocorrelation. Prior to running SIAR, mesozooplanktonic organisms that sardines and anchovies might consume were grouped according to their size and their geographical situations. As Trophic Enrichment Factors (TEFs) were unknown for those planktonic fish in particular, the widely used $1 \pm 0.5 \text{‰}$ and $3.4 \pm 1 \text{‰}$ TEFs for fish were selected for $\delta {}^{13}\text{C}$ and $\delta {}^{15}\text{N}$, respectively (Post 2002, Sweeting et al. 2007ab for fish muscle). The standard deviation chosen for each source was 0.2‰ (i.e., analytical error of the CF IR-MS). After running the first models, all prey groups that represented less than 5% of estimated contribution in sardine or anchovy's diets were discarded in order to improve the results.

Table A6-1: Characteristics of the different species analysed in this study (sampling locations, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values).

Species	Stations where species were dominant (zooplankton) of trawled (fish)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)		$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	
		min	max	min	max
ARTHROPODA					
Copepoda					
<i>Acartia</i> sp.	C2, C3, C4, S14, Sh5, S15	-21.90	-19.80	6.46	9.12
<i>Calanus helgolandicus</i>	Sh1, S11, Sh2, S13, S14, S15	-23.94	-20.98	7.10	8.85
<i>Calanus</i> sp.	C1, Sh1, S11, S12, Sh3, S13, S14, Sh5	-23.33	-19.19	5.27	8.59
<i>Centropages</i> sp.	S11	—	-19.91	—	6.02
<i>Oithona</i> sp.	S11, S13	-22.23	-20.87	4.20	4.48
<i>Pleuromamma</i> sp.	S12	—	-18.90	—	6.00
<i>Temora longicornis</i>	C1, Sh1, C2, C3, C4, Sh5	-19.85	-18.48	5.96	7.95
Undetermined Harpacticoids	C1, C3	-21.52	-20.37	7.37	8.39
Copepod nauplii	C1	—	-19.73	—	7.33
Cladocera					
<i>Evadne / Podon</i> sp.	Sh3	—	-18.26	—	7.27
CHORDATA					
Clupeidae					
<i>Sardina pilchardus</i>	—	-18.43	-17.18	9.97	12.22
<i>Engraulis encrasicolus</i>	—	-19.29	-17.88	8.83	11.12

Results

Taxonomic assemblages

Taxonomic assemblages observed during this study underlined that oceanic stations are characterised by the large copepod *Calanus helgolandicus*, whereas *Temora longicornis* characterises coastal stations. Shelf stations usually displayed a mixing of coastal and oceanic species. Most of identified dominant species are quite common, and can be found in the north as well as in the south (Table A6-1). Finally, some genus or species, like *Acartia* sp., seem to live in coastal but also in oceanic zones, notably in the south of the Bay of Biscay.

Intra-station variability of mesozooplankton $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values

For clarity reasons, Fig. A6-2 compares the mean $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values between dominant species and undetermined assemblages only for six stations. However, some similar patterns can be observed for other stations of this study. Undetermined mesozooplanktonic

assemblages tend to display lower $\delta^{15}\text{N}$ values than dominant species for a same station (e.g., SI4: 5.46‰ vs. $6.88 \pm 0.97\%$) (Fig. A6-2). Even though $\delta^{13}\text{C}$ values are less variable, they can however exhibit a slight difference between undetermined and determined assemblages (e.g., SI3: -21.54% vs. $-23.16 \pm 0.78\%$). Moreover, in this latter case, standard deviations for the mean $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values are quite important, notably for nitrogen (e.g., SI3: 1.41‰).

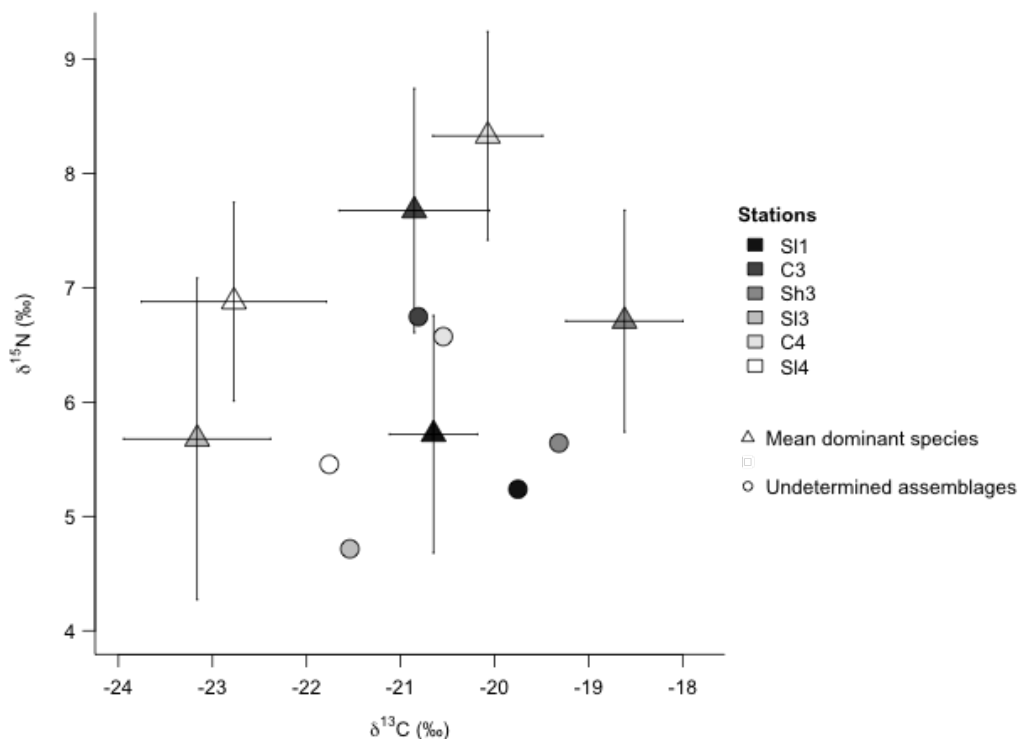


Figure A6-2: Carbon and nitrogen isotope differences between mean $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in dominant species of each station and corresponding undetermined mesozooplanktonic assemblages.

Indeed, within each station, isotope values of dominant species can be really different, independently of the location (north or south, coast or slope) (Fig. A6-3). Thus, for offshore station SI1, the lowest $\delta^{15}\text{N}$ value corresponds to *Oithona* sp. (4.48‰) and the highest to *C. helgolandicus* (7.10‰). Intermediate values are displayed by *Calanus* sp. and *Centropages* sp. (5.27‰ and 6.02‰, respectively). A same pattern can be noticed for offshore station SI3, with the lowest $\delta^{15}\text{N}$ for *Oithona* sp. (4.20‰) and the highest for *C. helgolandicus* (7.33‰). Intermediate value also belongs to *Calanus* sp. (5.51‰).

$\delta^{15}\text{N}$ values for coastal station C1 spread from 7.33‰ to 8.59‰ (*Calanus* sp. and Copepod nauplii, respectively). For the shelf station Sh5, these values start at 6.35‰ (*T. longicornis*) and end at 7.56‰ (*Acartia* sp.). $\delta^{13}\text{C}$ is generally less variable, the highest magnitude belonging to station Sh5, with values comprised between -18.60‰ (*T. longicornis*) and -21.47‰ (*Calanus* sp.)

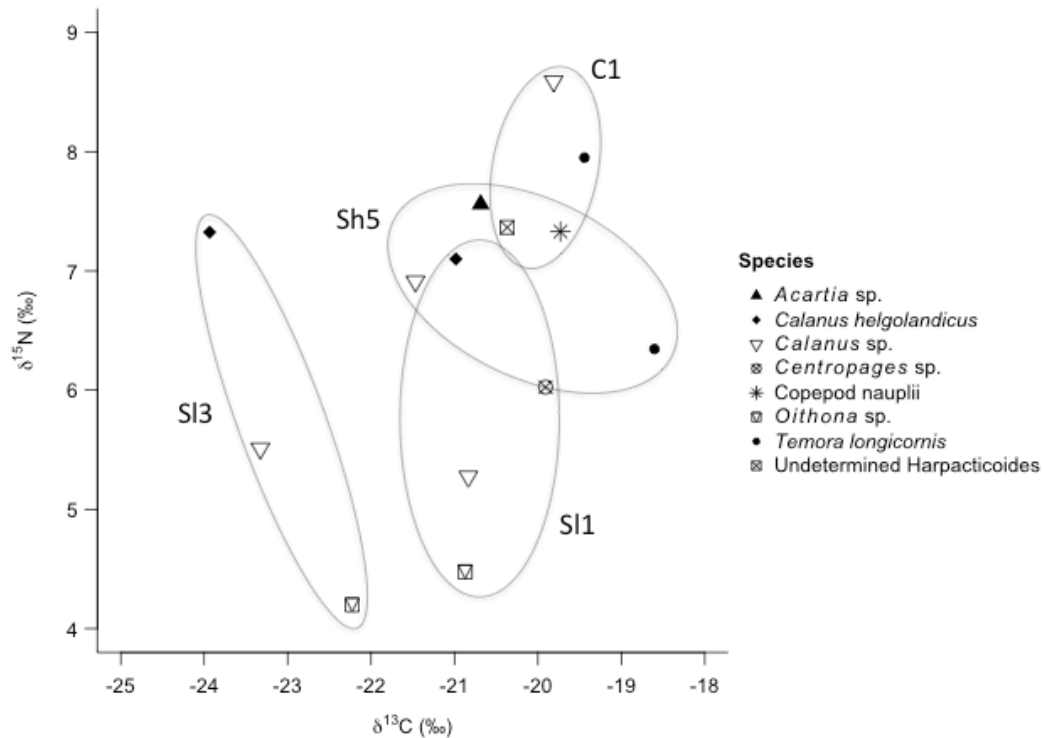


Figure A6-3: Intra-station $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ variability, depending on considered species.

Intra-specific variability of mesozooplankton $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values

Fig. A6-4 illustrates, with two species present in north and south or on slope and coastal areas, the variability that can exist in isotope values between north and south on the one hand (with *C. helgolandicus* sampled in offshore stations), and between coast and slope on the other hand (with *Acartia* sp. sampled along transect 4). $\delta^{15}\text{N}$ values of *C. helgolandicus* display a low variation between north and south, the smallest value belonging to station S11 (north) (7.10‰) and the highest one for station S14 (south) (7.90‰). However, $\delta^{13}\text{C}$ values for this species show a higher variation from the north to the south. The smallest value

appears for station S13 (south) (-23.94‰) and the highest for S12 (north) (-19.49‰). Thus, mean $\delta^{13}\text{C}$ for northern stations is -20.24‰, against -23.79‰ for southern ones (or a 3.55‰ variation).

$\delta^{13}\text{C}$ values of *Acartia* sp. do not vary a lot from the coast to the slope along transect 4 (-20.57‰ for C4, against -21.54‰ for S14), even if a slightly lower value can be noticed for offshore station (S14). As for $\delta^{15}\text{N}$ values, they have a more important variation range, from 6.76‰ for S14 (slope), to 9.12‰ for C4 (coast). Thus, coastal station (C4) displays the highest $\delta^{15}\text{N}$.

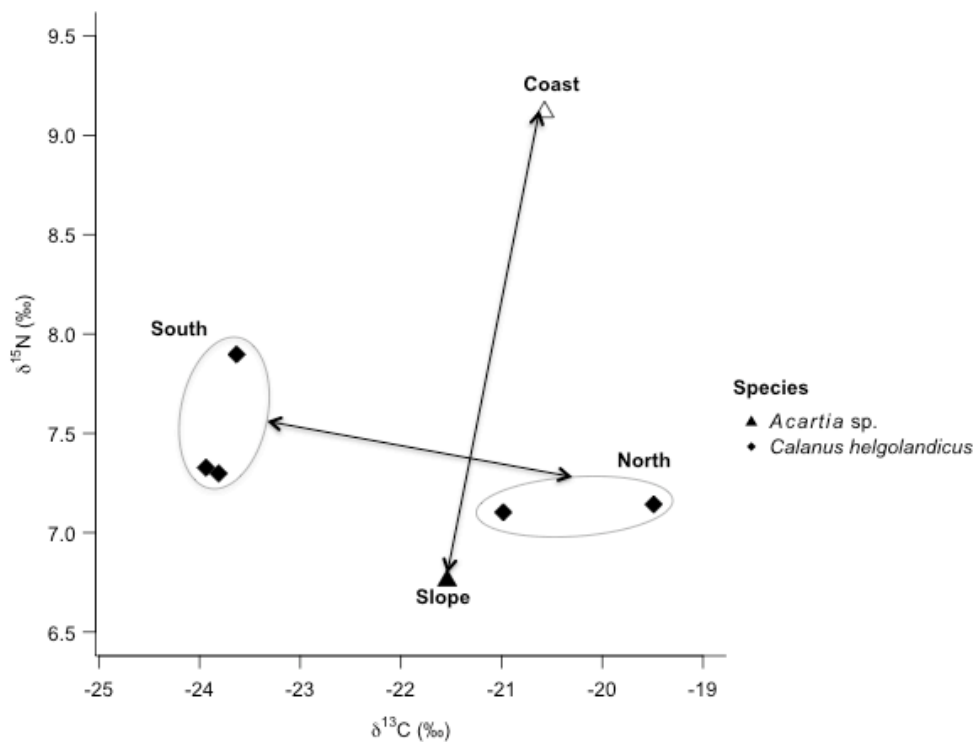


Figure A6-4: North-south and coast-slope $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ variability in *C. helgolandicus* and *Acartia* sp.

Variability of sardine and anchovy $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values

$\delta^{15}\text{N}$ values of anchovies caught in the north are not significantly different to those of anchovies caught in the south (Fig. A6-5; Student t-test, $p = 0.19$). The same statement can be made for $\delta^{13}\text{C}$ (Wilcoxon test, $p = 0.23$). No significant difference can be observed in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values between northern and southern sardines (Student t-tests, $p = 0.09$ and

$p = 0.37$, respectively). As a consequence, no distinction will be made between northern and southern individuals for both species. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values were respectively $-18.39 \pm 0.35\text{‰}$ and $9.78 \pm 0.61\text{‰}$ for anchovy and $-17.84 \pm 0.33\text{‰}$ and $10.89 \pm 0.53\text{‰}$ for sardine. These values are significantly different between the two species (Student t-test and Wilcoxon test for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values respectively, both $p < 0.001$).

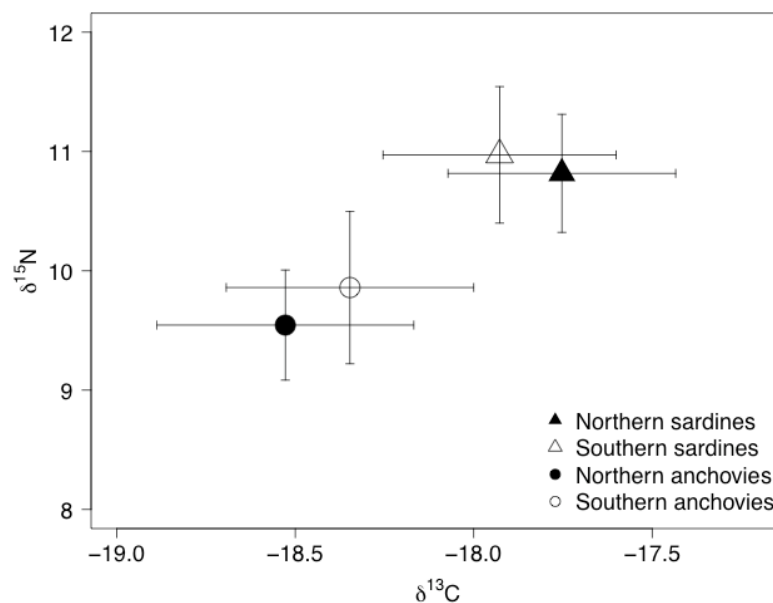


Figure A6-5: $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values (mean \pm SD, in ‰) for sardines *S. pilchardus* and anchovies *E. encrasicolus*, depending on their sampling location.

Prey-predator relationships

In order to operate the mixing models in an optimal way, 12 groups of mesozooplankton species have been made, depending on the relative size of the individuals (i.e., small, medium and large) and on their spatial localisation (i.e. coastal-shelf-slope and north-south) (Table A6-2). Indeed, grouping organisms according to their taxa only is useless because of the great intra-specific variability of isotope values, notably depending on the geographic area. Grouping organisms according to their isotope values is also non-appropriate because that way the spatial discrimination is lost. These two methods also mean setting together organisms that could be different ecologically (e.g., large and small mesozooplankton may have different diets, even though they belong to the same taxa or show the same isotope value). Hence, from previous results, it is important to keep spatial and size discriminations (i.e., coast-slope, north-south and small-large organisms).

Table A6-2: Mesozooplanktonic prey groups used in mixing models.

Group	Zone	Relative size of organisms	Area	Organisms and associated stations
1	Slope	Large	North	<i>C. helgolandicus</i> (S11), <i>Pleuromamma</i> sp. (S12)
2	Slope	Large	South	<i>C. helgolandicus</i> (S13, S14, S15)
3	Slope	Small	North	<i>Calanus</i> sp. (S11, S12), <i>Centropages</i> sp. (S11), <i>Oithona</i> sp. (S11)
4	Slope	Small	South	<i>Acartia</i> sp. (S14, S15), <i>Calanus</i> sp. (S13, S14), <i>Oithona</i> sp. (S13)
5	Coast	Medium	North	<i>Calanus</i> sp. (C1), <i>T. longicornis</i> (C1, C2)
6	Coast	Medium	South	<i>T. longicornis</i> (C3, C4)
7	Coast	Small	North	<i>Acartia</i> sp. (C2), undetermined Harpacticoids (C1), Copepod nauplii (C1)
8	Coast	Small	South	<i>Acartia</i> sp. (C3, C4), <i>Oithona</i> sp. (C3)
9	Shelf	Large	North	<i>C. helgolandicus</i> (Sh1, Sh2)
10	Shelf	Large	South	—
11	Shelf	Small / Medium	North	<i>Calanus</i> sp. (Sh1), <i>T. longicornis</i> (Sh1)
12	Shelf	Small/ Medium	South	<i>Acartia</i> sp. (Sh5), <i>Calanus</i> sp. (Sh3, Sh5), <i>Evadne /Podon</i> sp. (Sh3), <i>T. longicornis</i> (Sh5)

Mesozooplankton-Sardines

Results of the model were gradually improved by suppressing prey groups that had the lowest contribution to *S. pilchardus* diet. Thus, it appears that this predator preferentially consumes two mesozooplankton groups (Fig.A6-6). These groups correspond to medium-sized copepods (e.g., *Calanus* sp. and *T. longicornis*) from the shelf (group 11) - with an estimated contribution of 47% - and from the coast (group 5) - with an estimated contribution of 27% -, in the north of the Bay of Biscay.

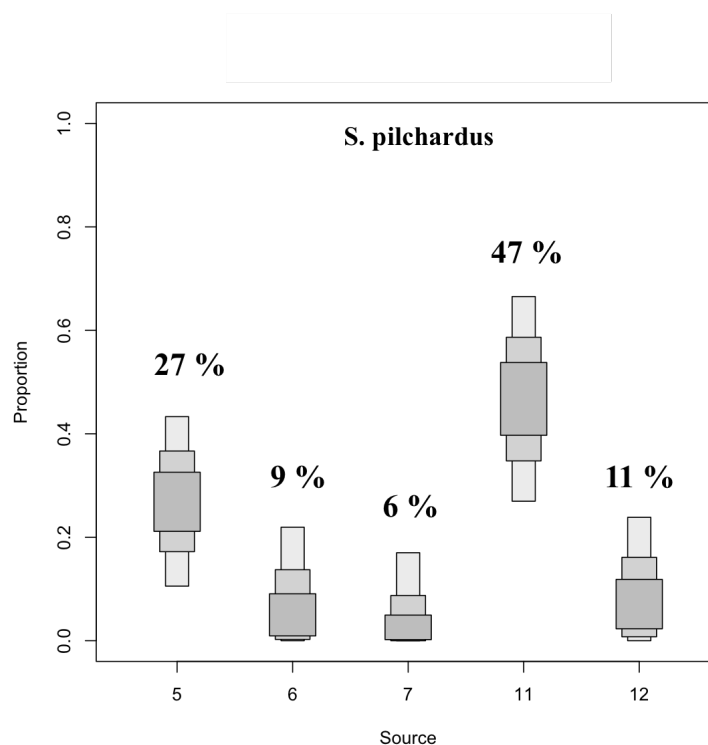


Figure A6-6: Estimated prey contributions in the diet of sardine *Sardina pilchardus*. Groups' composition is indicated Table A6-2.

Mesozooplankton-Anchovies

In the case of anchovies, six mesozooplankton groups – mainly characterised by *Calanus* sp. and/or *T. longicornis* – are selected by SIAR. However, two prey groups seem to stand out the others (Fig. A6-7): groups 3 and 5 (northern small-sized copepods from the slope and medium-sized copepods from the coast, respectively). Their estimated contributions in anchovy's diet are respectively 24 and 20%. Groups 11 and 12 (small/medium-sized

copepods from the northern and southern shelf, respectively) arrive in the second place but are not well discriminated, with an estimated contribution of 15 and 16%, respectively. This is close to the 14% estimated contribution of the southern medium-sized copepods from the coast (group 6). The group 1 shows the lowest contribution with 11% (Fig. A6-7).

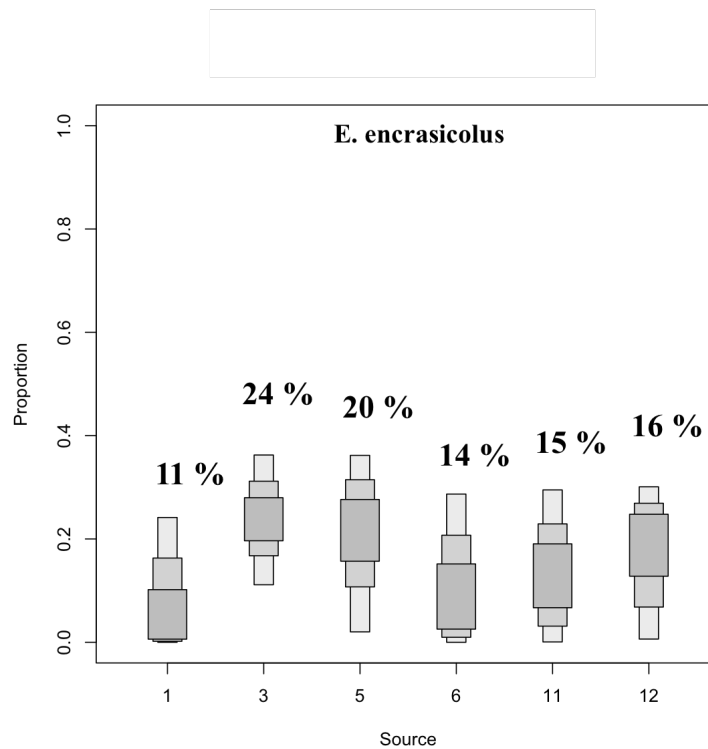


Figure A6-7: Estimated prey contributions in the diet of anchovy *Engraulis encrasicolus*. Groups' composition is indicated Table A6-2.

Discussion

In the french part of Bay of Biscay, published data on the diet of sardine and anchovy and small pelagic planktivorous species in general are very scarce. This may be due to the difficulty of analysing their diet by traditional methods, which may be also time-consuming (e.g., stomach contents analysis). For the first time, this study analysed the trophic ecology of both species through stable isotopes analysis in this area, analysing also the variability of isotopic signatures that may occur in mesozooplanktonic prey (interspecific and spatial variations in particular) to better interpret isotopic signatures of fish, and to run more efficient mixing models.

Species or genus vs. assemblages of mesozooplankton

This study shows how important it is to work on identified mesozooplanktonic species or genus, rather than on unidentified mesozooplanktonic assemblages, when conducting advanced investigations on the pelagic food webs with stable isotopes. Indeed, as it is possible to find a high quantity of phytoplankton (e.g., *Ceratium* sp.) or detrital organic matter, especially in coastal areas, isotopic signatures of mesozooplankton assemblages ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values) cannot reflect the real values. Moreover, autotrophic organisms can agglomerate and fill in planktonic nets, hence keeping smaller organisms than wished (e.g., nauplii, cladoceran) (e.g., Lefèvre 1946). Now, it has been established that principal energy fluxes in the pelagic compartment generally occurred from the smallest to the biggest organisms (Fenchel 1988, Hansen et al. 1994). Thus, the smallest an organism is, the lowest its trophic level. As it exists a nitrogen enrichment factor of about 2.5 to 3.4‰ between a prey and its predator (De Niro and Epstein 1981, Minagawa and Wada 1984, Vanderklift and Ponsard 2003), small organisms will have lower $\delta^{15}\text{N}$ values than larger ones, for a same geographic area. Besides, phytoplankton is depleted in ^{15}N compared to primary and secondary consumers for a given region. Therefore, as highlighted by Fig. A6-2, isotope values of mesozooplanktonic assemblages appear to be inaccurate, notably displaying slightly reduced $\delta^{15}\text{N}$ values than “true mesozooplankton” signature for each corresponding station.

Furthermore, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of distinct mesozooplanktonic species can be really different for a given station (Fig. A6-3). Thus, a 3.13‰ difference in $\delta^{15}\text{N}$ between the smallest organism (*Oithona* sp.) and the largest (*C. helgolandicus*) can be noticed in station S13 (slope, transect 3). It is nearly one trophic level if we consider the widely used trophic enrichment factor of 3.4‰ between a prey and its consumer (e.g., De Niro and Epstein 1981, Minagawa and Wada 1984). However, this value has been set following studies that mainly focused on vertebrate's body parts and/or tissues. Now crustaceans seem to have generally lower ^{15}N fractionation values than vertebrates (around 2‰ vs. 2.5 to more than 3‰) (Vanderklift and Ponsard 2003). Moreover, animals feeding on algae or invertebrate would have even lower and much more variable $\delta^{15}\text{N}$, close to 1.5 or 2‰ (Vander Zanden and Rasmussen 2001, McCutchan et al. 2003). As *Oithona* sp. and *C. helgolandicus* belong to crustaceans that may feed on algae and/or detritic matter, the 3.13‰ difference in $\delta^{15}\text{N}$ between these two zooplanktonic species in station S13 would in fact correspond to more than one trophic level. These heterogeneous $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values for different mesozooplanktonic

species within the same station point out a great inter-taxonomic variability in zooplankton fractionation or diets. This latter has already been detected many times within planktonic organisms and seems particularly influenced by biological conditions and individual size (Paffenhöfer and Knowles 1980, Kleppel et al. 1988, Fessenden 1994, Hansen et al. 1994, Batten et al. 2001, Halvorsen et al. 2001). It can also be linked to omnivory, which is a usual copepod's behaviour (e.g., Conley and Turner 1985, Dam and Lopes 2003). Nevertheless, this great inter-specific variability is not reflected by undetermined assemblages, despite its importance in consumer's dietary studies with stable isotopes. Consequently, working on undetermined assemblage should be avoided – whenever possible – when studying pelagic trophic relationships.

Spatial variability of mesozooplankton signature

When working on such a great spatial scale as the Bay of Biscay, the geographic area where the organisms came from must also be carefully considered. Indeed, species caught from coastal zones seem to display higher $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values than offshore ones. This is illustrated with *Acartia* sp. found in two stations of the same transect (Fig. A6-4). Despite the short length (around 64 km) between the coastal station (C4) and the offshore one (S14), a 2.36‰ range can be observed for $\delta^{15}\text{N}$. Such a gap can be imputed to a different diet of *Acartia* sp. or to nitrogen inputs from the land. In fact, oceanic food webs generally present lower $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values than neritic food webs (Fry 1988, Kelly 2000). According to Fry (1988), coastal zones are actually facing strong nitrogen inputs from the continent that are enriched in ^{15}N . He also stated that consumers' $\delta^{15}\text{N}$ result from a mixing of various sources, isotopically distinct, that would bias the trophic level estimations if no distinction between the habitats were made. As $\delta^{15}\text{N}$ seems to be higher in coastal copepods than in oceanic ones, nitrogen could, as well as carbon, be used as a chemical marker for tracing the origin of organic matter. Though, one should stay careful when considering offshore systems because denitrification process could modify the isotope composition of available nitrate to phytoplankton (Fry 1988). Thus, it is necessary to take into account this coast-offshore pattern when grouping together mesozooplanktonic organisms for food web studies (Chouvelon et al. under review).

Latitudinal variations in copepod isotope values also seem to exist, notably for ^{13}C (Fig. A6-4). Indeed, a 3.55‰ difference in $\delta^{13}\text{C}$ can be noticed for *C. helgolandicus* between north and

south stations. This result confirms the use of carbon as a tracer of food web's primary producers (Hobson and Welch 1992, Peterson 1999). Accordingly, another distinction must be made when grouping organisms, distinguishing northern and southern areas.

Signature of small fishes

The spatial pattern is not found for sardines (*S. pilchardus*) and anchovies (*E. encrasicolus*) analysed in this study. Actually, within the same species, no significant difference in isotope values could be detected between northern and southern fish (Fig. 5). This could be due to important mobility of *S. pilchardus* and *E. encrasicolus* shown in the Bay of Biscay, which would homogenize their isotope values. This statement contradicts the results obtained by Bode et al. (2004) for sardines of the north-western shelf of the Iberian Peninsula, where adults seem to experience low mobility between areas. However, in this last area, the continental shelf is only 25 to 30 km wide in average (Fraga 1981), whereas it can reach nearly 200 km in the northern part of the Bay of Biscay. On the other hand, our results could be explained by the fact that sampling was realised during the breeding period for both species (May-June). Spawning grounds are essentially located in the south of the Bay of Biscay, at least for anchovy, and seasonal migrations have also been reported for sardine (ICES 2010b). Thus, population dispersion could occur during this time and fish captured in a site may not live there the rest of the year. Moreover, the different values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ within both species seem to indicate the existence of preferential feeding grounds.

Diet and feeding area of small fishes

Mixing models has emphasized the existence of preferential feeding grounds, showing that sardines mostly consume coastal and shelf medium-sized copepods (e.g., *Calanus* sp., *Temora longicornis*) (Fig. A6-6). Even though trophic enrichment factors could be irregular from a species to another (Vanderklift and Ponsard 2003), chosen standard deviations in mixing models are wide enough to reduce the risk of misleading results and misinterpretations. To our knowledge, few studies on the gut contents of *S. pilchardus* were conducted in the Bay of Biscay, probably due to method limitations as commented above. Nevertheless, Sever et al. (2005) found morphologically and ecologically similar copepod species in Mediterranean sardine's stomachs (e.g., *Calanoida* sp., *Temora stylifera*).

Relatively high $\delta^{15}\text{N}$ value clearly states that *S. pilchardus* essentially feeds on zooplankton to meet its energetic demand. Phytoplankton and microzooplankton (20-200 μm) would only be secondary – maybe accidental – dietary items, as stated in some papers (e.g., Van der Lingen 1998, Bode et al. 2004, Cunha et al. 2005).

The significant differences between sardines and anchovies isotope values (Fig. A6-5) might indicate that these latter do not feed on the same prey species or in the same areas. Significantly lower $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in anchovy may be related to the consumption of low trophic level organisms, or to an offshore feeding habit. Mixing models pointed out a northern feeding ground for *E. encrasicolus*, spreading out from the coast to the slope in that case.

Similarly to sardine, anchovy seems to prey on medium-sized copepods (Fig. A6-7), generally neglecting the largest ones from the slope (i.e., *C. helgolandicus*). This is consistent with stomach content analyses available in literature for anchovy (e.g., Plounevez and Champalbert 1999, Raab et al. 2011). Mixing model results are yet less clear than for sardine, due to a small contribution of the southern copepods in the anchovy's diet. *E. encrasicolus* can feed all along the year, even during breeding period. Hatching areas are mainly located in the south of the Bay of Biscay for this species, while they are not well established for sardine that could use northern as well as southern areas (Bernal et al. 2007, ICES 2010a). Thus, a small part of the anchovy isotope values could come from feeding during laying in the south. However, mixing models seem to underline the existence of a preferential northern feeding zone for anchovy, before the spring migration to the south for reproduction (ICES 2010a).

Thus, there could be a strong competition for resources between *S. pilchardus* and *E. encrasicolus*, as they both feed in the northern part of the Bay of Biscay and on the same kind of prey. However, mixing modelling reveal relative specialisation of sardine on some mesozooplanktonic prey (e.g., on prey group 11). On the contrary, anchovy shows a relative trophic plasticity on this type of prey, and a greater flexibility in terms of feeding zones (no prey group contributing to more than 25 % in average). One hypothesis is that in order to reduce this negative effect, anchovy further exploits shelf and offshore regions, whereas sardine has a more coastal behaviour. This could also explain the difference in isotope values observed between both species. In addition, a temporal segregation could also be set up, with diurnal or nocturnal hunting (e.g., Tudela and Palomera 1997, Tudela et al. 2002).

Conclusion and perspectives

Despite the limits of this approach, it has been pointed out the interest of working on identified mesozooplanktonic species for that kind of study. Indeed, this brings a precision level that was not previously reached with the classic undetermined assemblages, where an extremely important diversity of organisms (e.g., autotrophs, heterotrophs, mixotrophs) with various feeding behaviours (e.g., carnivores, omnivores, etc.) can be found. It has also been underlined the importance of well discriminating the areas – notably coastal and offshore – as isotope values can change greatly according to these factors. An approach of *S. pilchardus* and *E. encrasicolus* feeding behaviours has also been made, highlighting a privileged feeding ground located in the north of the Bay of Biscay for both species that preferentially looked for medium-sized copepods. However, the trophic plasticity (in terms of type of prey and foraging areas) would be higher in anchovy, suggesting some trophic segregation between both fish species.

In order to reduce uncertainties of this kind of study, it would be useful to examine the microzooplanktonic compartment to better characterize the pelagic food web's base, and to employ other complementary methods such as fatty acid analysis.

Acknowledgements

This work was supported through the PhD grant of T. Chauvelon from the Conseil Régional de Poitou-Charentes and by the European project REPRODUCE (EratNet-Marifish, WP7). Authors are very grateful to J. Massé and P. Petitgas from IFREMER for facilitating the sampling during the PELGAS survey. Many thanks to M. Huret and P. Bourriau for their help during sample collection. Authors also thank P. Richard (UMR LIENSs) for assistance in stable isotope analysis.

References

- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar Ecol Progr Ser* 10: 257-263.
- Bernal M, Stratoudakis Y, Coombs S, Angelico MM, de Lanzós AL, Porteiro C, Sagarminaga Y, Santos M, Uriarte A, Cunha E, Valdés L, Borchers D (2007) Sardine spawning off

- the European Atlantic coast: characterization of and spatio-temporal variability in spawning habitat. *Progr Oceanogr* 74: 210-227.
- Batten SD, Fileman ES, Halvorsen E (2001) The contribution of microzooplankton to the diet of mesozooplankton in an upwelling filament off the north west coast of Spain. *Progr Oceanogr* 51: 385-398.
- Bode A, Álvarez-Ossorio MT (2004) Taxonomic versus trophic structure of mesozooplankton: a seasonal study of species succession and stable carbon and nitrogen isotopes in a coastal upwelling ecosystem. *ICES J Mar Sci* 61: 563-571.
- Bode A, Álvarez-Ossorio MT, Carrera P, Lorenzo J (2004) Reconstruction of trophic pathways between plankton and the North Iberian sardine (*Sardina pilchardus*) using stable isotopes. *Sci Mar* 68: 165-178.
- Bode A, Álvarez-Ossorio MT, González N, Lorenzo J, Rodríguez C, Varela M, Varela MM (2005a) Seasonal variability of plankton blooms in the Ria de Ferrol (NW Spain): II. Plankton abundance, composition and biomass. *Estuar Coast Shelf S* 63: 285-300.
- Bode A, González N, Rodríguez C, Varela M, Varela MM (2005b) Seasonal variability of plankton blooms in the Ria de Ferrol (NW Spain): I. Nutrient concentrations and nitrogen uptake rates. *Estuar Coast Shelf S* 63: 269-284.
- Certain G, Ridoux V, Van Canneyt O, Bretagnolle V (2008) Delphinid spatial distribution and abundance estimates over the shelf of the Bay of Biscay. *ICES J Mar Sci* 65: 656-666.
- Certain G, Masse J, Van Canneyt O, Petitgas P, Doremus G, Santos M, Ridoux V (2011) Investigating the coupling between small pelagic fish and marine top predators using data collected from ecosystem-based surveys. *Mar Ecol Progr Ser* 422: 23-39.
- Chouvelon T, Spitz J, Caurant F, Mèndez-Fernandez P, Chappuis A, Laugier F, Le Goff E, Bustamante P (under review in *Prog Oceanogr*) Spatio-temporal variations in stable isotopic signatures revisit the use of $\delta^{15}\text{N}$ in meso-scale studies of marine food webs. The case of an open ecosystem: the Bay of Biscay (North-East Atlantic).
- Coiffec G, Duhamel E, Biseau A, Danzart M (2006) Analyse des petits pélagiques, sardine et anchois, dans le Golfe de Gascogne. Ifremer, Lorient, 81 p.
- Conley WJ, Turner JT (1985) Omnivory by the coastal marine copepods *Centropages hamatus* and *Labidocera aestiva*. *Mar Ecol Progr Ser* 21: 113-120.
- Cunha ME, Garrido S, Pissarra J (2005) The use of stomach fullness and colour indices to assess *Sardina pilchardus* feeding. *J Mar Biol Assoc UK* 85: 425-431.
- Dalerum F, Angerbjörn A (2005) Resolving temporal variation in vertebrate diets using naturally occurring stable isotopes. *Oecologia* 144: 647-658.
- Dam HG, Lopes RM (2003) Omnivory in the calanoid copepod *Temora longicornis*: feeding, egg production and egg hatching rates. *J Exp Mar Biol Ecol* 292: 119-137.
- Dardignac J (1988) Les pêcheries du Golfe de Gascogne, bilan des connaissances. *Rapp Sci Tech Ifremer* No. 9.
- De Niro MJ, Epstein S (1977) Mechanism of carbon fractionation associated with lipid synthesis. *Science* 197: 261-263.
- De Niro MJ, Epstein S (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 42: 495-506.
- De Niro MJ, Epstein S (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 45: 341-351.
- Fenchel T (1988) Marine Plankton Food Chains. *Annu Rev Ecol Syst* 19: 19-38.
- Fessenden L (1994) Copepod predation on phagotrophic ciliates in Oregon coastal waters. *Mar Ecol Progr Ser* 107: 103-111.
- Fraga F (1981) Upwelling of the Galician coast, Northwest Spain. In: Richards F (eds) *Coastal Upwelling*. American Geophysical Union Washington, DC, pp 176-182.

- Fry B (1988) Food web structure on Georges Bank from stable C, N, and S isotopic compositions. *Limnol Oceanogr* 33: 1182-1190.
- Fry B, Quiñones R (1994) Biomass spectra and stable isotope indicators of trophic level in zooplankton of the northwest Atlantic. *Mar Ecol Progr Ser* 112: 201-204.
- Gannon JE (1976) The effects of differential digestion rates of zooplankton by alewife, *Alosa pseudoharengus*, on determinations of selective feeding. *Trans Am Fish Soc* 105: 89-95.
- Halvorsen E, Hirst AG, Batten SD, Tande KS, Lampitt RS (2001) Diet and community grazing by copepods in an upwelled filament off the NW coast of Spain. *Prog Oceanogr* 51: 399-421.
- Hansen B, Bjornsen PK, Hansen PJ (1994) The size ratio between planktonic predators and their prey. *Limnol Oceanogr* 39: 395-403.
- Hesslein RH, Hallard KA, Ramlal P (1993) Replacement of sulfur, carbon, and nitrogen in tissue of growing broad whitefish (*Coregonus nasus*) in response to a change in diet traced by $\delta^{34}\text{S}$, $\delta^{13}\text{C}$, and $\delta^{15}\text{N}$. *Can J Fish Aquat Sci* 50: 2071-2076.
- Hobson KA (1999) Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120: 314-326.
- Hobson KA, Welch HE (1992) Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis. *Mar Ecol Progr Ser* 84: 9-18.
- ICES (2010a) Report of the Working Group on Anchovy and Sardine (WGANSAs). ICES WGANSAs Report 2010, ICES, 289 p.
- ICES (2010b) Life-cycle spatial patterns of small pelagic fish in the Northeast Atlantic. ICES Cooperative Research Report, ICES, 94 p.
- James AG (1988) Are clupeid microphagists herbivorous or omnivorous? A review of the diets of some commercially important clupeids. *S Afr J Marine Sci* 7: 161-177.
- Jeong H, Yoo Y, Kim J, Seong K, Kang N, Kim T (2010) Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. *Ocean Sci J* 45: 65-91.
- Jones RI (2000) Mixotrophy in planktonic protists: an overview. *Freshwater Biol* 45: 219-226.
- Kelly JF (2000) Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Can J Zool* 78: 1-27.
- Kleppel GS, Frazel D, Pieper RE, Holliday DV (1988) Natural diets of zooplankton off southern California. *Mar Ecol Progr Ser* 49: 231-241.
- Lefèvre M (1946) Sur les méthodes de pêche qualitative et quantitative du plancton. *B Fr Pêche Piscic* 142: 21-29.
- McCutchan JHJ, Lewis WMJ, Kendall C, McGrath CC (2003) Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos* 102: 378-390.
- Minagawa M, Wada E (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochim Cosmochim Acta* 48: 1135-1140.
- OSPAR (2010) Quality Status Report 2010. OSPAR Commission, London, 176 p.
- Owens NJP (1987) Natural variations in ^{15}N in the marine environment. *Adv Mar Biol* 24: 389-451.
- Paffenhöfer GA, Knowles SC (1980) Omnivorousness in marine planktonic copepods. *J Plankton Res* 2: 355-365.
- Parnell AC, Inger R, Bearhop S, Jackson AL (2010) Source partitioning using stable isotopes: coping with too much variation. *Plos One* 5: e9672. doi:10.1371/journal.pone.0009672.
- Peterson BJ (1999) Stable isotopes as tracers of organic matter input and transfer in benthic food webs: a review. *Acta Oecol* 20: 479-487.

- Peterson BJ, Fry B (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu Rev Ecol Syst* 18: 293-320.
- Phillips DL (2001) Mixing models in analyses of diet using multiple stable isotopes: a critique. *Oecologia* 127: 166-170.
- Pinnegar JK, Polunin NVC (1999) Differential fractionation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. *Funct Ecol* 13: 225-231.
- Platt T, Rao DVS, Irwin B (1983) Photosynthesis of picoplankton in the oligotrophic ocean. *Nature* 301: 702-704.
- Plounevez S, Champalbert G (1999) Feeding behaviour and trophic environment of *Engraulis encrasicolus*(L.) in the Bay of Biscay. *Estuar Coast Shelf S* 49: 177-191.
- Pomeroy LR (1974) The ocean's food web, a changing paradigm. *BioScience* 24: 499-504.
- Post DM (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods and assumptions. *Ecology* 83: 703-718.
- R Development Core Team (2011) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, www.R-project.org.
- Raab K, Nagelkerke LAJ, Boerée C, Rijnsdorp AD, Temming A, Dickey-Collas M (2011) Anchovy *Engraulis encrasicolus* diet in the North and Baltic Seas. *J Sea Res* 65: 131-140.
- Sever TM, Bayhan B, Taskavak E (2005) A preliminary study on the feeding regime of European pilchard (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792) in Izmir Bay, Turkey, Eastern Aegean Sea. *Naga* 28: 41-48.
- Silva MA (1999) Diet of common dolphins, *Delphinus delphis*, off the Portuguese continental coast. *J Mar Biol Assoc UK* 79: 531-540.
- Spitz J, Quéro JC (2008) Observations ichtyologiques de la faune bathypélagique du canyon du Cap Ferret. *Ann Soc Sci nat Charente-Marit* 9: 811-814.
- Sweeting CJ, Barry JT, Barnes C, Polunin NVC, Jennings S (2007a) Effects of body size and environment on diet-tissue $\delta^{15}\text{N}$ fractionation in fishes. *J Exp Mar Biol Ecol* 340: 1-10.
- Sweeting CJ, Barry JT, Polunin NVC, Jennings S (2007b) Effects of body size and environment on diet-tissue $\delta^{13}\text{C}$ fractionation in fishes. *J Exp Mar Biol Ecol* 352: 165-176.
- Tieszen LL, Boutton TW, Tesdahl KG, Slade NA (1983) Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia* 57: 32-37.
- Trenkel VM, Berthelé O, Lorance P, Bertrand J, Brind'Amour A, Cochard ML, Coppin F, Léauté JP, Mahé JC, Morin J, Rochet MJ, Salaun M, Souplet A, Vérin Y (2009) Atlas des grands invertébrés et poissons observés par les campagnes scientifiques. Bilan 2008. Ifremer, Nantes, EMH: 09-003, 100 p.
- Tudela S, Palomera I (1997) Trophic ecology of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* in the Catalan Sea (northwest Mediterranean). *Mar Ecol Prog Ser* 160: 121-134.
- Tudela S, Palomera I, Quílez G (2002) Feeding of anchovy *Engraulis encrasicolus* larvae in the north-west Mediterranean. *J Mar Biol Assoc UK* 82: 349-350.
- Uriarte A, Prouzet P, Villamor B (1996) Bay of Biscay and Ibero Atlantic anchovy populations and their fisheries. *Sci Mar* 60: 237-255.
- Valdés L, Moral M (1998) Time-series analysis of copepod diversity and species richness in the southern Bay of Biscay off Santander, Spain, in relation to environmental conditions. *ICES J Mar Sci* 55: 783-792.
- Vanderklift MA, Ponsard S (2003) Source of variation in consumer-diet $\delta^{15}\text{N}$ enrichment: a meta-analysis. *Oecologia* 136: 169-182.

- Van der Lingen C, Hutchings L, Field J (2006) Comparative trophodynamics of anchovy *Engraulis encrasicolus* and sardine *Sardinops sagax* in the southern Benguela: are species alternations between small pelagic fish trophodynamically mediated? *Afr J Marine Sci* 28: 465-477.
- Vander Zanden MJ, Rasmussen JB (2001) Variation in $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ trophic fractionation: implications for aquatic food web studies. *Limnol Oceanogr* 46: 2061-2066.
- Villalobos H (2008) Évolution de l'écosystème pélagique du Golfe de Gascogne pendant la période 1990-2003. Conséquences sur la capturabilité des espèces. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France.
- Wada E, Terazaki M, Kabaya Y, Nemoto T (1987) ^{15}N and ^{13}C abundances in the Antarctic Ocean with emphasis on the biogeochemical structure of the food web. *Deep-Sea Res* 34: 829-841.

Annexe 7

Feeding ecology and prey choice by adult sea bass, *Dicentrarchus labrax*, in the north-eastern Atlantic

Spitz J, **Chouvelon T**, Cardinaud M, Kostecki C, Lorange P

Soumise à Marine Ecology Progress Series



Abstract

The knowledge of predators' foraging ecology is an essential step for the understanding of trophic interactions in marine food webs, and the identification of some management measures. The aim of this study was to describe quantitatively for the first time the diet of adult sea bass in the north-eastern Atlantic by stomach content and stable isotope analyses. Our results revealed that sea bass feed preferentially on small pelagic fish; 80% of the ingested biomass relies on four species only: mackerel (*Scomber scombrus*), scads (*Trachurus* spp.), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and sardine (*Sardina pilchardus*). The Chesson's index of prey selectivity and a Bayesian isotopic mixing model confirmed that adult sea bass has a foraging strategy targeted on small pelagic fish. These results suggest that sea bass selects high-energy density preys to supply its metabolic needs induced by its active foraging strategy based on prey pursuit. At ecosystem-level, the same preys and feeding grounds are used by common dolphin and sea bass, and this probably explain the high rate of common dolphin by-catch observed in the pelagic trawl fishery for sea bass in the Bay of Biscay.

Keywords

Stomach content, stable isotope, SIAR, prey selection, marine top predator.

Introduction

Trophic interactions are often complex within marine food webs. For instance, marine top predators influence the structure of prey community (Heithaus et al. 2008), and conversely, variability in prey availability influence the population dynamics of predators (Trites and Donnelly 2003). Thus, important changes occurring on the abundance of one species, either a prey or a predator, induced generally cascading trophic effects affecting different trophic levels of an ecosystem (Pace et al. 1999). Environmental and human pressures impact on the distribution and abundance of marine species (Cheung et al. 2009). Effects on biodiversity, ecosystems' stability and sustainability of fisheries have been documented (Brander 2007, Pereira et al. 2010). Therefore, the understanding of trophic interactions in marine food web, and by consequences the identification of pertinent management measures appeared to be strongly linking to the knowledge of predators' foraging ecology.

Marine top predators display various foraging strategies resulting from different evolutionary pressures such as interspecific competition. At extremes, some predators are opportunistic and consume their preys without selection (i.e., proportionately to prey availability in the environment) whereas others are very specialized and consume a very narrow range of prey type (Begon et al. 2006). Specialized predators may be both more sensitive to change in the availability of their prey and may have a higher pressure on dynamic of specific prey species than opportunistic predators.

In the Bay of Biscay, the continental shelf extends more than 200 km offshore in the north and only 10 km in the south. The Bay of Biscay supports a diverse marine fauna (e.g., Quérou et al. 2003, Kiszka et al. 2007, Certain et al. 2008) and has been extensively exploited by numerous fisheries for long (Lorance et al. 2009). The high trophic-level predator community is mainly composed of several species of small cetaceans and seabirds but only few species of large fish (Lassalle et al. in press), contrary to oceanic (tropical) ecosystems where large fish such as tuna and sharks play a more prominent role (Kitchell et al. 1999). Thus, on the continental shelf of the Bay of Biscay, adults of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) appear to be one of the major large fish predators.

European sea bass occurs from estuaries to open waters up to 100 m depth. It inhabits mainly in coastal waters but is known to migrate offshore and in deeper waters during the winter (Pickett and Pawson 1994). The biology and ecology of sea bass and especially juvenile stages have been extensively studied in estuarine and coastal areas, with a particular interest

for nursery areas (Aprahamian and Barr 1985, Cabral and Costa 2001, Martinho et al. 2008). However, the ecology of the adult stage received little attention in particular in open waters.

Sea bass is generally described as an opportunistic predator (Pickett and Pawson 1994), but little is known on the diet of adults, which has not been subject of qualitative studies. The aim of this study is to investigate for the first time the food of adult sea bass on the continental shelf of the Bay of Biscay by combining two techniques: analyses of stomach contents and isotopic signatures. The prey selection is also explored by two independent approaches: an index of selectivity of feeding based on prey abundance both in diet and in environment, and a Bayesian isotopic mixing model.

Materials and methods

Collection and preparation of samples

The stomach contents of 404 sea bass were collected on the continental shelf of the Bay of Biscay in autumns and winters 2005, 2006 and 2008. The fish were caught during the EVHOE surveys conducted by the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) and from commercial fishing trawlers. The size of sampled sea bass ranged from 31 to 79 cm with a mean of 48 ± 7.5 cm (Fig. A7-1). The stomachs were ligatured and individually stored deep-frozen (-20°C) in polythene bags until further analyses. For stable isotope analysis, pieces of muscle were sampled on adult sea bass and on different forage species sampled in the same conditions in 2008 during the EVHOE survey (Table A7-1). After collection, samples were immediately placed in individual polythene bags, deep-frozen at -20°C and freeze-dried. Freeze-dried tissues were finally grounded into a fine powder and stored in individual polythene vials until further analyses.

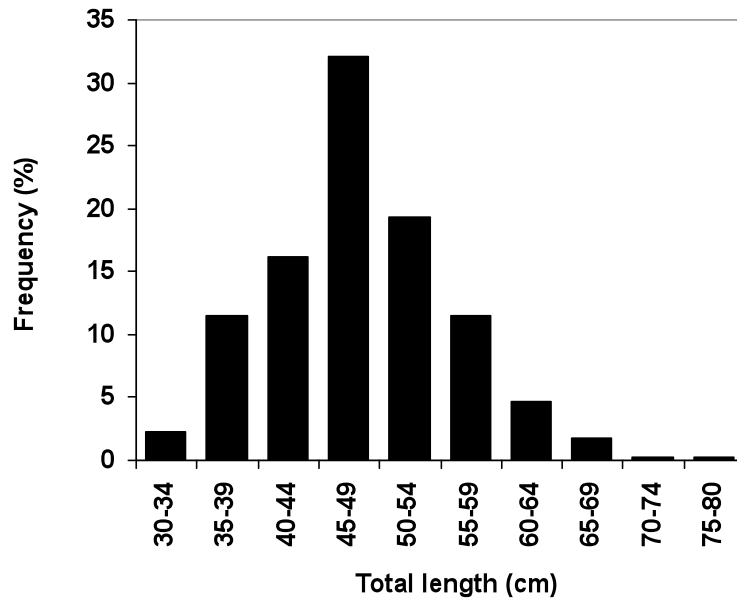


Figure A7-1: Length distribution of sampled sea bass.

Stomach content analysis

Stomach content analysis described the diet in terms of prey occurrence, relative abundance, calculated mass and size distribution following a standard procedure for marine top predators (Pierce and Boyle 1991, Pusineri et al. 2005, Spitz et al. 2006). The stomach content was washed through a 0.2 mm mesh sieve. The diagnostic parts were recovered and stored dry for fish bones and otoliths or in 70% ethanol for cephalopod beaks, crustacean remains as well as any remain with flesh attached. The items found were identified to the lowest taxonomic level by using published guides (Lagardère 1971, Clarke 1986, Härkönen 1986) and our reference collection of specimens caught in the Bay of Biscay and adjacent Atlantic areas. The total number of food items was estimated as the highest number given either by paired structures (e.g., otoliths, operculum, hyomandibular, dentary and premaxillary for fishes, upper and lower beaks for cephalopods and eyes for crustaceans) or impaired structures (e.g., parasphenoid for fishes, gladii for cephalopods, and, carapace and telson for crustaceans). Diagnostic hard parts such as beaks, otoliths and carapaces were measured by using a digital vernier calliper (± 0.02 mm) following standards (Clarke 1986, Härkönen 1986). Individual prey body length and body mass were back-calculated by using relationships that either came from the literature (Clarke 1986, Härkönen 1986) or were fitted from measurements performed on specimens of our reference collection. Body size

distribution per prey species was defined as that of all of individuals of each prey species, irrespective of the predator size. These prey size distributions were constructed both in number and biomass per size class, since these two variables convey different information about the importance of prey species to the diet.

The occurrence of a prey species is the number of stomachs in which this species was observed. The relative abundance is the number of individuals of the species found throughout the sample. The biomass is calculated as the product of the average body mass and the number of individuals of the same in each stomach, summed throughout the entire stomach set. These three indices can be expressed by their percentage frequency with, respectively, percentage of occurrence (%O), percentage by number (%N) and percentage by biomass (%M):

$$\%O_i = n_i / N * 100$$

where n_i is the number of stomachs where the prey i was found and N the total number of stomachs ;

$$\%N_i = x_i / X * 100$$

where x_i is the number of prey i found and X the total number prey ;

$$\%M_i = (\sum_j x_{i,j} * \bar{Y}_{i,j} / \sum_i \sum_j x_{i,j} * \bar{Y}_{i,j}) * 100$$

where $x_{i,j}$ is the number of prey i found in the sample j and the average individual body mass of prey i in sample j .

Selectivity index

The local prey selectivity was tested with the Chesson's index of prey selection (Chesson 1978, Pinnegar et al. 2003, Spitz et al. 2010a). For each of 13 scientific trawl hauls where 5 full stomachs of sea bass were at least sampled, the index was calculated as:

$$\alpha_{i(1 \rightarrow m)} = \frac{r_i / p_i}{\sum r_i / p_i}$$

where α_i is the prey-selection index for forage species type i ; r_i is the percentage by number of species i in the diet of sea bass; p_i percentage by number of forage species type i in haul and m is the total number of forage species types. Chesson's index close to $1/m$ represent feeding at random whereas values greater and smaller than $1/m$ correspond to positive selection (further referred to as selection) and negative selection (further referred to as avoidance) of forage species type i . Here in order to have the same total number of prey for each trawl hauls, percentage by number of preys were summed in 4 forage species types according to their habitat and ecology. The groups were denoted pelagic fish, demersal and benthic fish, coastal fish and cephalopods. No quantitative data were available for crustaceans from scientific survey. Thus, Chesson's index ranges from 0 to 1, with $\alpha = 0.25$ denotes random-feeding, $\alpha = 0$ representing complete avoidance and $\alpha = 1$ exclusive feeding.

Stable isotope analysis

Muscle is the reference tissue in food web studies inferred from stable isotope analyses (Hobson and Welch 1992, Chouvelon et al. 2011). It allows comparisons of isotopic signatures between individuals and taxa, minimizing inter-tissue differences in terms of biochemical and physiological properties like protein turnover rate and metabolic routing (Cherel et al. 2009). Lipids being highly depleted in ^{13}C relative to other tissue components (De Niro and Epstein 1977), they were extracted from muscle samples using cyclohexane (Chouvelon et al. 2011). Subsamples (0.40 ± 0.05 mg) of lipid-free powder were finally weighed in tin cups for stable isotope analyses. Isotopic analyses were performed with an elemental analyser coupled to an Isoprime (Micromass) continuous-flow isotope-ratio mass spectrometer (CF IR-MS). The results are presented in the usual δ notation relative to the deviation from standards (Pee Dee Belemnite for $\delta^{13}\text{C}$ and atmospheric nitrogen for $\delta^{15}\text{N}$), in parts per thousand (‰). The experimental precision based on replicate measurements of internal laboratory standards is $\pm 0.15\text{‰}$ and $\pm 0.20\text{‰}$ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively. Statistical differences between sea bass and each forage species were investigated using a Kruskal-Wallis test followed by a multiple comparison test with Holm adjustment method.

Isotopic mixing model

A Bayesian isotopic mixing model was applied with the package SIAR (Stable Isotope Analysis in R; Parnell et al. 2010) to estimate the proportional contribution of preys (sources) to the isotopic signature of adult sea bass (mixture). Here in order to use mixing model with accuracy, preys were first grouped in 5 forage species types according to their habitat and ecology. The groups were denoted pelagic fish, demersal and benthic fish, coastal fish, cephalopods and crustaceans (Table A7-1). Secondly, we used trophic enrichment factors (TEFs) for fish muscle tissue from the literature: $3.4 \pm 1.0\%$ for $\delta^{15}\text{N}$ and $1.0 \pm 0.5\%$ for $\delta^{13}\text{C}$ (Post 2002, Sweeting et al. 2007ab).

Table A7-1: Carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) stable isotope values in the muscle of adult sea bass and forage species on the continental shelf of the Bay of Biscay. N = number of individual for each species; x = mean value; sd = standard deviation; p-value = significance of the statistical difference between signature of sea bass and signatures of each forage species. The mean values of forage species type correspond to the data point with confidence intervals in Fig. A7-3A.

Species	N	Size (mm) x ± sd	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)		$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	
			x ± sd	p-value	x ± sd	p-value
PREDATOR						
<i>Dicentrarchus labrax</i>	5	668 ± 24	-16.9±0.5	-	14.1±0.5	-
PELAGIC FISH						
<i>Engraulis encrasicolus</i>	7	126 ± 4	-17.6±0.3	< 0.001	12.0±0.4	< 0.001
<i>Sprattus sprattus</i>	9	103 ± 10	-17.8±0.2	0.053	11.9±0.3	< 0.001
<i>Sardina pilchardus</i>	10	192 ± 48	-17.7±0.4	< 0.001	11.3±0.8	< 0.001
<i>Trachurus trachurus</i>	10	170 ± 85	-19.0±0.9	< 0.001	11.4±0.9	< 0.001
<i>Scomber scombrus</i>	10	257 ± 63	-18.7±0.4	< 0.001	11.3±0.7	< 0.001
<i>Micromesistius poutassou</i>	9	220 ± 14	-18.1±0.3	< 0.001	11.4±0.3	< 0.001
DEMERSAL AND BENTHIC FISH						
<i>Argentina sphyraena</i>	6	187 ± 10	-17.4±0.2	1.000	12.5±0.3	0.039
<i>Callionymus lyra</i>	5	222 ± 16	-16.6±0.3	1.000	12.5±0.3	0.842
<i>Trisopterus minutus</i>	8	201 ± 20	-17.2±0.4	1.000	13.0±0.5	0.253
<i>Trisopterus luscus</i>	5	184 ± 23	-16.4±0.1	1.000	14.1±0.2	1.000
<i>Merluccius merluccius</i>	11	186 ± 54	-18.3±0.2	< 0.001	12.3±0.3	< 0.001
<i>Pomatoschistus minutus</i>	5	56 ± 5	-17.5±0.1	< 0.001	12.7±0.3	0.070
<i>Solea solea</i>	5	178 ± 13	-16.3±0.3	1.000	11.7±0.4	< 0.001
<i>Microchirus variegatus</i>	5	162 ± 8	-17.3±0.0	1.000	12.2±0.1	< 0.001
<i>Dicologlossa cuneata</i>	4	190 ± 18	-16.6±0.4	1.000	13.4±0.7	1.000
COASTAL FISH						
<i>Spondyliosoma cantharus</i>	5	142 ± 37	-16.6±0.8	1.000	12.3±0.3	0.001
<i>Trachinus draco</i>	10	237 ± 20	-16.7±0.8	1.000	13.1±1.3	0.368
<i>Merlangius merlangus</i>	10	116 ± 27	-16.7±0.3	1.000	13.8±0.3	1.000
<i>Hyperoplus lanceolatus</i>	5	340 ± 14	-16.4±0.3	1.000	14.3±0.3	1.000
<i>Atherina presbyter</i>	5	110 ± 10	-16.5±0.2	1.000	14.8±0.4	1.000
CEPHALOPODS						
<i>Sepia orbignyana</i>	5	73 ± 18	-17.7±0.2	1.000	10.6±0.3	< 0.001
<i>Sepia elegans</i>	9	39 ± 16	-17.3±0.2	1.000	11.4±0.7	< 0.001
<i>Sepia officinalis</i>	5	78 ± 11	-16.2±0.1	1.000	13.0±0.5	0.967
<i>Alloteuthis</i> spp.	7	39 ± 13	-17.7±0.2	0.990	12.4±0.4	0.022
CRUSTACEANS						
<i>Liocarcinus depurator</i>	5	48 ± 2	-16.2±0.3	0.648	11.7±0.7	< 0.001
<i>Polybius henslowii</i>	5	42 ± 3	-16.5±0.4	1.000	11.3±0.7	< 0.001
<i>Crangon crangon</i>	5	54 ± 4	-15.6±0.4	0.029	12.1±0.3	0.044
<i>Crangon allmanni</i>	5	54 ± 5	-15.9±0.2	0.003	12.2±0.3	0.093

Results

Diet composition and local prey selectivity

Identifiable material was retrieved from 280 out of 404 stomachs. A total of 770 prey individuals were found. They accounted for a total estimated biomass around of 16 kg. Fish, cephalopods, crustaceans, tubeworms and bivalves were identified and represented a species richness of at least 40 (respectively 24, 3, 11, 1 and 1 species). Fish dominated the diet (Table A7-2) both by number (87%) and mass (95%). Crustaceans reached 9% in relative abundance but accounted for a low fraction of the diet in reconstructed mass (3%). Cephalopods accounted for a low fraction of the diet either by number or by mass. Tubeworms and bivalves were negligible in the diet.

The diet of adult sea bass on the shelf of the Bay of Biscay comprised mainly a combination of pelagic fish (Table A7-2). Four fish species made up 77.8% of the biomass. Despite a low relative abundance (5.6%), mackerel (*Scomber scombrus*) was the most important prey in term of ingested biomass with 40.1%, followed by scads (*Trachurus trachurus* or/and *T. mediterraneus*) 20.1%, anchovy (*Engraulis encrasicolus*) 10.2% and sardine (*Sardina pilchardus*) 7.4%. The other 36 prey species accounted for less than 2% of the diet either in number or biomass with the exception of sprat, *Sprattus sprattus* (2.5% in number) poor cod and codling, *Trisopterus* spp. (2.3% in weight) and blue whiting, *Micromesistius poutassou* (3.3 % in weight).

The overall prey size distribution ranged from 4 to 335 mm (Fig. A7-2). The distribution by number displayed a mode at 70–120 mm; this mode resulted from the high relative abundance of the smaller fish, mainly anchovy, scads, sardine and dragonets (*Callionymus* spp.). In contrast, the distribution by mass showed two modes at 80–120 and 200–300 mm; this second mode mostly resulting from the importance by mass of large fish such as mackerel and larger individuals of scads or sardine. Overall, 77% of all prey individuals were smaller than 120 mm and 7% were larger than 220 mm body length. Conversely, prey individuals smaller than 120 mm represented only 34% of the reconstructed biomass, whereas those over 220 mm accounted for 41% of the biomass.

The evaluation of the local prey selectivity given by the Chesson's index revealed that sea bass positively selected pelagic fish whereas demersal or benthic fish were relatively randomly preyed upon and others prey types were avoided (Table A7-3).

Table A7-2: Prey found in stomach contents of adult sea bass on the continental shelf of the Bay of Biscay, north-eastern Atlantic. N = number of each prey; n = number of measurement; M = total mass of each prey in gram; x = mean value; sd = standard deviation.

Species	Occurrence	Abundance	Body length (mm)		Body mass (g)		Biomass
	O%	N%	x ± sd	range	x ± sd	range	M%
PELAGIC FISH							
Clupeidae							
<i>Sardina pilchardus</i>	11.2	7.6	115 ± 33	69-231	20.9 ± 28.7	3.5-130.8	7.4
<i>Sprattus sprattus</i>	1.7	2.5	101 ± 10	84-126	8.17 ± 2.6	4.3-16.7	1.0
Unid. Clupeidae	0.8	0.3	-	-	8.5	-	0.1
Engraulidae							
<i>Engraulis encrasicolus</i>	14.0	32.0	94 ± 14	62-266	6.8 ± 3.0	2.3-109.0	10.2
Carangidae							
<i>Trachurus trachurus</i>	26.0	18.9	109 ± 44	52-295	22.7 ± 34.1	2.8-228.8	20.1
Scombridae							
<i>Scomber scombrus</i>	11.6	5.6	237 ± 37	172-336	152.9 ± 71.6	35.4-300.7	40.1
DEMERSAL AND BENTHIC FISH							
Argentiniidae							
<i>Argentina</i> spp.	1.2	0.6	177 ± 23	137-197	39.2 ± 14.4	15.3-53.4	1.0
Callionymidae							
<i>Callionymus</i> spp.	8.7	8.4	76 ± 23	32-170	3.6 ± 5.1	0.2-33.6	1.4
Gobiidae							
Unid. Gobiidae	4.5	1.8	55 ± 10	35-77	2.52 ± 1.70	0.4-5.3	0.2
Merlucciidae							
<i>Merluccius merluccius</i>	2.1	1.3	143 ± 24	102-190	21.8 ± 10.6	9.0-46.0	1.3
Gadidae							
<i>Trisopterus</i> spp.	2.9	1.8	136 ± 32	85-192	27.3 ± 15.2	5.4-60.5	2.3
<i>Merlangius merlangus</i>	0.4	0.1	292.0	-	234.8	-	1.5
<i>Micromesistius poutassou</i>	3.7	1.3	200 ± 50	119-268	56.1 ± 37.4	11.1-131.4	3.3
Unid. Gadidae	0.4	0.1	-	-	51.2	-	0.3
Soleidae							
Unid. Soleidae	0.4	0.1	173.0	-	45.0	-	0.3
COASTAL FISH							
Ammodytidae							
Unid. Ammodytidae	2.1	1.7	160 ± 19	125-189	11.7 ± 3.4	4.8-17.2	0.9
Atherinidae							
<i>Atherina presbyter</i>	0.8	0.3	53 ± 11	42-64	1.0 ± 0.6	0.4-1.6	0.0
Sparidae							
<i>Pagellus</i> sp.	0.4	0.1	101.0	-	16.3	-	0.1
<i>Spondyllosoma cantharus</i>	0.6	0.4	138 ± 10	128-156	37.6 ± 9.3	29.1-54.6	0.7
Unid. Sparidae	0.4	0.1	122 ± 7	115-130	25.6 ± 4.8	20.7-30.4	0.2
Syngnatidae							
Unid. Syngnatidae	0.8	0.3	189 ± 9	183-195	0.6 ± 0.1	0.6-0.6	0.0
Trachinidae							
<i>Trachinus draco</i>	0.4	0.1	200	-	50	-	0.3
Sciaenidae							
<i>Argyrosomus regius</i>	0.4	0.1	150.0	-	250.0	-	1.6
OTHER FISH							
Unid. Fish	1.7	0.6	-	-	-	-	-
Larva	0.4	1.0	27 ± 8	11-36	-	-	0.0

Table A7-2: (continued)

Species	Occurrence		Body length (mm)		Body mass (g)		Biomass
	O%	N%	x ± sd	range	x ± sd	range	M%
CEPHALOPODS							
Loliginidae							
<i>Alloteuthis</i> spp.	3.3	1.3	49 ± 23	26-104	3 ± 3.2	1.1-11.6	0.2
Sepiidae							
<i>Sepia</i> spp.	5.4	1.8	22 ± 52	42-110	28.5 ± 37.7	2.1-93.0	2.4
Sepiolidae							
Unid. Sepiolidae	0.8	0.3	20	-	2	-	0.0
CRUSTACEANS							
Brachyura							
<i>Atelecyclus undecimdentatus</i>	0.4	0.1	-	-	-	-	-
<i>Corystes cassivelaunus</i>	0.8	0.4	23 ± 3	21-25	3.7 ± 0.4	3.3-4.1	0.1
<i>Macropodia</i> spp.	1.2	1.7	6 ± 1	4-8	-	-	-
<i>Pisidia longicornis</i>	0.8	0.3	-	-	-	-	-
<i>Liocarcinus</i> spp.	3.7	1.7	29 ± 14	11-50	9.6 ± 9.1	0.2-23.2	0.8
<i>Necora puber</i>	0.8	0.3	31 ± 6	27-36	12.6 ± 0.5	12.2-12.9	0.2
<i>Polybius henslowi</i>	2.1	1.1	45 ± 4	37-50	18 ± 5.5	8.6-23.1	0.9
Unid. Brachyura	2.5	1.3	24 ± 11	8-33	4 ± 0.8	3.0-5.0	0.2
Others crustaceans							
Unid. Gammaridae	2.5	0.8	10	-	-	-	-
Unid. Natantia*	23.6	-	6	-	-	-	0.7
Unid. Crustaceans	3.3	1.1	-	-	-	-	-
OTHERS PREY							
Tubeworm Annelida	0.8	0.4	111 ± 47	62-155	2.7 ± 1.5	1.6-4.3	0.1
Unid. Bivalves	0.8	0.3	-	-	-	-	-

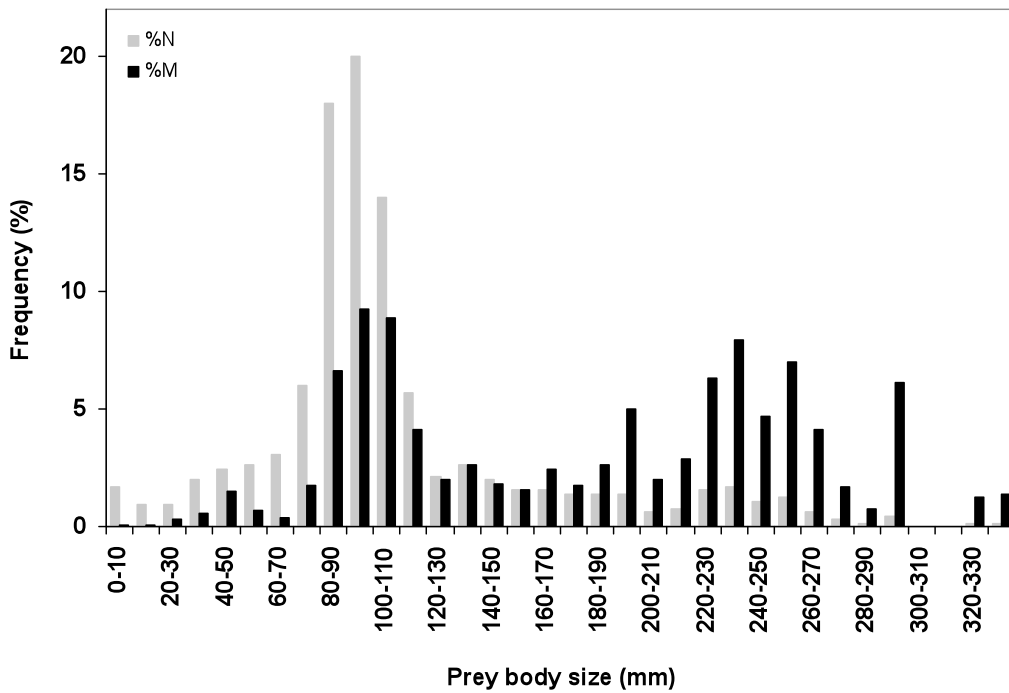


Figure A7-2: Overall prey-size distributions of sea bass expressed as percent number (%N, black bars) and percent mass (%M, white bars).

Table A7-3: Chesson’s index ($\alpha \pm$ standard deviation) and diagnostic of prey selection from 13 survey hauls where stomach of sea bass were sampled.

Prey type	$\alpha \pm$ sd	Selection
Pelagic fish	0.51±0.4	Selectivity
Demersal and benthic fish	0.25±0.35	Random-feeding
Coastal fish	0.16±0.34	Avoidance
Cephalopods	0.08±0.25	Avoidance

Stable isotope signatures and mixing model

The mean value of $\delta^{15}\text{N}$ for adult sea bass muscle was 14.1 ± 0.5 and the mean value of $\delta^{13}\text{C}$ was -16.9 ± 0.5 (Fig. A7-3 A). The stable isotope signatures of coastal fish were close to those of sea bass. Cephalopods, demersal and benthic fish exhibited lower values of $\delta^{15}\text{N}$ but same values of $\delta^{13}\text{C}$ than sea bass. Crustaceans showed lower values of $\delta^{15}\text{N}$ and higher values of $\delta^{13}\text{C}$. Only almost all pelagic fish species have significant lower stable isotope signatures of both $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$.

Consequently, mixing model estimated the dietary contribution for pelagic fish was strong and reached $45 \pm 17\%$ (Fig. A7-3 B). The contribution of cephalopods ranked second with $21 \pm 13\%$. The mixing model suggested other forage species were less important in the diet of adult sea bass ($< 15\%$).

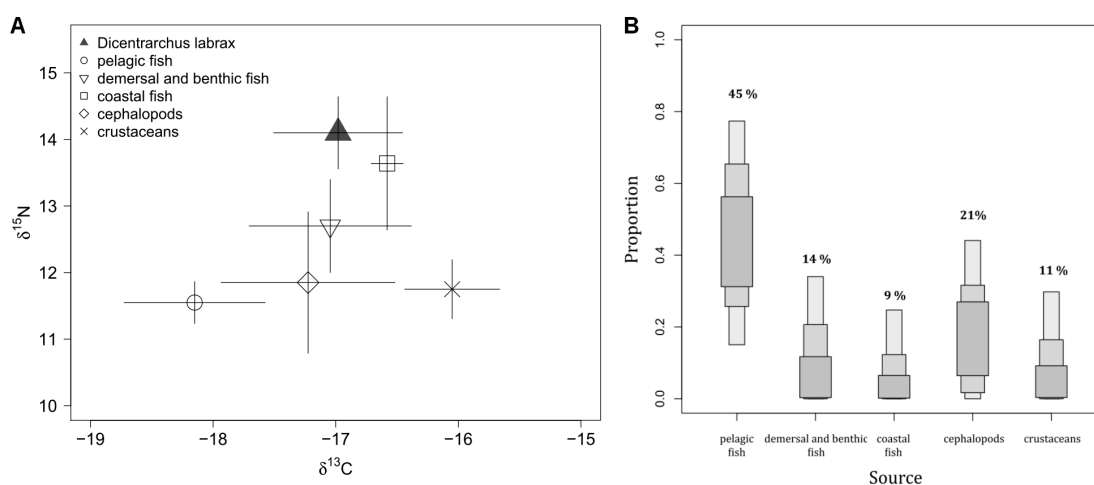


Figure A7-3: A) Carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotope signatures in muscle of adult sea bass (black triangle) and forage species on the shelf of the Bay of Biscay; data are mean (‰) \pm standard deviation. **B)** Results of SIAR mixing model, showing the mean proportion (%) of each source, and 50%, 75% and 95% confidence intervals (dark grey, grey and light grey boxes, respectively) of the probably sources proportion in diet of adult sea bass on the shelf of the Bay of Biscay.

Discussion

Feeding ecology of adult sea bass

The present work is the first major quantitative study on the diet of adult sea bass in north-eastern Atlantic outside estuarine and coastal waters. Our results suggest adult sea bass is mainly piscivorous and feeds preferentially on small pelagic fish, mainly mackerel, sardine, anchovy and scads. This prey choice is supported both by the Chesson's index of prey selection and the isotopic signatures. Furthermore, $\delta^{13}\text{C}$ signature of adult sea bass is more characteristic of the open waters of the continental shelf rather than of the coastal waters in the Bay of Biscay (Chouvelon et al. 2011). Species living in estuarine and coastal habitats exhibit higher $\delta^{13}\text{C}$ signature due to the differential carbon fixation between benthic algae in coastal areas and offshore phytoplankton (France 1995). Thus, sampled sea bass appeared to exploit durably the offshore area of continental shelf at least during several weeks to few months according to the turnover of muscle (Buchheister and Latour 2010).

Several limitations are inherent to stomach content and stable isotope analyses. Stomach content analysis is based on the recovering and the identification of undigested remains. The representativeness of diet described by stomach content analysis can be undermined by the difficulty of controlling the sampling design and the differential digestion of ingested prey (Pierce et Boyle 1991, Tollit et al. 1997). However, it has been the best and most widely used method to evaluate the prey composition of top marine predator. Stable isotope analysis has also some limitations, in particular because prey compositions could lead to the same isotopic signature in the predator tissues (Bearhop et al. 2004). Here, the combination of the two methods provides reliable and consistent results and show that adult sea bass select small pelagic fish. Furthermore, this prey choice is confirmed at fine scale by the Chesson's index of prey selection. Indeed, this index is generally used for a two-prey system: the global dietary composition of a predator and an evaluation of prey availability, provided by a survey in the distribution area of the studied predator (Pinnegar et al. 2003, Spitz et al. 2010a). Here, the originality is the haul was used as sampling unit; hence the Chesson' index provides a test of the instantaneous prey choice in comparing the prey ingested to the local abundance of forage species (i.e., the instantaneous field of prey really available during the foraging of sea bass).

Comparison with previous studies

The food and feeding of juvenile sea bass has been extensively studied in estuaries and coastal areas (e.g., Aprahamian and Barr 1985, Cabral and Costa 2001, Laffaille et al. 2001, Riley et al. 2011) but to our knowledge, little data on adult feeding is available. Sea bass has been described as a demersal predator feeding on planktonic crustaceans during its juvenile stage. Then, its diet appears to include a diverse epibenthic fauna and some fish for the largest individuals. Even so, sea bass is generally described as opportunistic feeder at each life stage, i.e., its diet would reflect the prey availability in its foraging area (Pickett and Pawson 1994) and prey diversity would be larger for adults than for juveniles (Rogdakis et al. 2010).

Our quantitative analysis of adult feeding runs counter this generally accepted view. Here, almost, 80% of the ingested biomass comprised only four pelagic fish although more than 40 species were found in stomachs including fish, cephalopods, crustaceans, tubeworms and bivalves. Hence, studies rested only on prey occurrence or prey abundance induced generally a false picture of the diet of a top marine predators. Therefore, our results complete previous knowledge and reveal a shift between an opportunistic feeding on pelagic and benthic invertebrates in juvenile sea bass and a piscivorous diet relying on energetic pelagic fish in adults.

Considerations on metabolism of sea bass

Food must supply energy and nutrients to vital functions and physiological or physical activities. Hence, differences in predator-specific requirements induce differences in the diet quality within predators. In marine mammals for instance, sirenians graze on aquatic plants, a low-quality food which reflects a life strategy with a low energy consumption (Berta et al. 2008) and at the opposite, common dolphins (*Delphinus delphis*) fulfil their high energy requirements with a diet mainly composed by high-quality food (Spitz et al. 2010b). Thus, specific energy requirements should be sustained by a food selection based on prey quality. Here, we suggested that sea bass select actively some small pelagic fish, mainly mackerel, anchovy, sardine and scads. These forage species are highly energetic with an energy density superior to 6 kJ.g^{-1} (Spitz et al. 2010b). Moreover, these small pelagic fish are rich in fatty acid and notably oleic and linoleic acids (Zlatanos and Laskaridis 2007), these lipids are known to increase cardiac and swimming performance in sea bass (Chatelier et al. 2006).

Now, sea bass is an active predator, which has developed a foraging strategy resting on the pursuit of their prey (Pickett and Pawson 1994); such strategy appears to be energetically costly. Hence, sea bass would adapt the quality of its diet in feeding on high-energy fish in order to supply its high-energy needs. Comparatively, large hake, the other large piscivorous fish in the Bay of Biscay, feed mostly on demersal preys of low or medium energy content (Mahe et al. 2007).

Sea bass-common dolphin interactions

Our findings on foraging ecology of adult sea bass could have implications on the management of a protected top predator, the common dolphin (*Delphinus delphis*). Indeed, the selective feeding of sea bass on small pelagic fish could also explain the operational fishery interaction with the common dolphin. Although several fish species are targeted by pelagic trawl fisheries in the Bay of Biscay, cetacean by-catch occurs almost exclusively in the sea bass fishery (Morizur et al. 1999, Northridge et al. 2006). Like that of sea bass, the diet of common dolphin in the Bay of Biscay is dominated by pelagic fish (Table A7-4; Meynier et al. 2008). The similar diet and the by-catch of dolphin in the pelagic fishery for sea bass may suggest simultaneous foraging of both species. Therefore, some behavioural interaction could occur such as the cooperative feeding between dolphin species and tunas in oceanic areas (Clua and Grosvalet 2001). Precise foraging strategies of common dolphin and adult sea bass are still to be described and this hypothesis would require further studies using probably acoustics and video in order to better understand the interaction. However, we suggest the by-catch risk of common dolphin in pelagic fisheries is closely linked to the foraging strategies of these two predator species. The better understanding of ecological or behavioural processes occurring between sea bass and common dolphin would allow the identification of strategies to minimise the dolphin by-catch.

Table A7-4: Main prey (> 2%M) found in stomach contents of adult sea bass and common dolphin on the continental shelf of the Bay of Biscay, north-eastern Atlantic.

Species	Biomass M%	
	Sea Bass (This study)	Common dolphin (Meynier et al. 2008)
PELAGIC FISH		
Clupeidae		
<i>Sardina pilchardus</i>	7.4	36.2
<i>Sprattus sprattus</i>	1.0	4.2
Engraulidae		
<i>Engraulis encrasicolus</i>	10.2	12.4
Carangidae		
<i>Trachurus trachurus</i>	20.1	19.2
Scombridae		
<i>Scomber scombrus</i>	40.1	6.6
DEMERSAL AND BENTHIC FISH		
Merluccidae		
<i>Merluccius merluccius</i>	1.3	2.2
Gadidae		
<i>Trisopterus</i> spp.	2.3	3.9
<i>Merlangius merlangus</i>	1.5	2.2
<i>Micromesistius poutassou</i>	3.3	6.0
CEPHALOPODS		
Loliginidae		
<i>Loligo</i> spp.	0.0	2.5
Sepiidae		
<i>Sepia</i> spp.	2.4	<0.1

Acknowledgements

The work was part of a larger research programme on the forage species-top predators interactions in the Bay of Biscay and adjacent Atlantic areas. We are particularly grateful to J.C. Mahé, R. Bellail, J.C. Poulard, and J.P. Leauté (IFREMER), and the crew of the R/V “Thalassa” for their support during EVHOE surveys, and also to the crews of professional pelagic trawlers, which allowed extending our sampling design. Many thanks go to G. Gautier[†], W. Dabin and H. Peltier for their help on sampling or stomach content analysis and to G. Guillou for its help on stable isotope analysis. EVHOE surveys are funded by the European Union in application of the Council Regulation (EC) N°199/2008 of 25 February 2008. This research has been supported by the European project REPRODUCE (ERAC-CT-2006-025989, FP7).

References

- Aprahamian MW, Barr CD (1985) The growth, abundance and diet of 0-group sea bass, *Dicentrarchus labrax*, from the Severn Estuary. *J Mar Biol Assoc UK* 65:169-180.
- Bearhop S, Adams CE, Waldron S, Fuller RA, MacLeod H (2004) Determining trophic niche width: a novel approach using stable isotope analysis. *J Anim Ecol* 73:1007-1012.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL (2005) *Ecology: from individuals to ecosystems*, 4th ed., Oxford, Blackwell Science.
- Berta A, Sumich JL, Kovak K (2008) *Marine mammals: evolutionary biology*, 2nd edition, Academic press. San Diego
- Brander KM (2007) Global fish production and climate change. *Proc Nat Acad Sci USA* 104: 19709-19714.
- Buchheister A, Latour RJ (2010) Turnover and fractionation of carbon and nitrogen stable isotopes in tissues of a migratory coastal predator, summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Can J Fish Aquat Sci* 67: 445-461.
- Cabral H, Costa MJ (2001) Abundance, feeding ecology and growth of 0-group sea bass, *Dicentrarchus labrax*, within the nursery areas of the Tagus estuary. *J Mar Biol Assoc UK* 81: 679-682.
- Certain G, Ridoux V, Canneyt O Van, Bretagnolle V (2008) Delphinid spatial distribution and abundance estimates over the shelf of the Bay of Biscay. *ICES J Mar Sci* 65: 656-666.
- Chatelier A, McKenzie DJ, Prinnet A, Galois R, Robin J, Zambonino J, Claireaux G (2006) Associations between tissue fatty acid composition and physiological traits of performance and metabolism in the seabass (*Dicentrarchus labrax*). *J Exp Biol* 209: 3429-3439.
- Cherel Y, Fontaine C, Jackson GD, Jackson CH, Richard P (2009) Tissue, ontogenic and sex-related differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the oceanic squid *Todarodes filippovae* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Mar Biol* 156: 699-708.
- Chesson J (1978) Measuring preference in selective predation. *Ecology* 59: 211-215.
- Cheung WWL, Lam VWY, Sarmiento JL, Kearney K, Watson R, Pauly D (2009) Projecting global marine biodiversity impacts under climate change scenarios. *Fish Fish* 10: 235-251.
- Chouvelon T, Spitz J, Cherel Y, Caurant F, Sirmel R, Mèndez-Fernandez P, Bustamante P (2011) Inter-specific and ontogenic differences in ^{13}C and ^{15}N values and Hg and Cd concentrations in cephalopods. *Mar Ecol Prog Ser* 433: 107-120.
- Clarke MR (1986) *A handbook for the identification of cephalopod beaks*, Clarendon Press, Oxford.
- Clua E, Grosvalet F (2001) Mixed-species feeding aggregation of dolphins, large tunas and seabirds in the Azores. *Aquat Living Resour* 14: 11-18.
- DeNiro MJ, Epstein S (1977) Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science* 197: 261-263.
- France RL (1995) Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: food web implications. *Mar Ecol Prog Ser* 124: 307-312.
- Härkönen TJ (1986) *Guide to the otoliths of the bony fishes of the northeast Atlantic*. Danbiu Aps Biological Consultants, Hellerup, Denmark.
- Heithaus MR, Frid A, Wirsing AJ, Worm B (2008) Predicting ecological consequences of marine top predator declines. *Trends Ecol Evol* 23: 202-210.
- Hobson KA, Welch HE (1992) Determination of trophic relationships within a high arctic marine food web using $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 84: 9-18.

- Kiszka J, Macleod K, Canneyt O Van, Walker D, Ridoux V (2007) Distribution, encounter rates, and habitat characteristics of toothed cetaceans in the Bay of Biscay and adjacent waters from platform-of-opportunity Data. *ICES J Mar Sci* 64: 1033-1043.
- Kitchell JF, Boggs CH, He X, Walters CJ (1999) Keystone predators in the central Pacific. In: Keller S (ed), *Ecosystem approaches for fisheries management*. University of Alaska Sea Grant, Fairbanks, pp 665-683.
- Laffaille P, Lefeuvre J-C, Schricke M-T, Feunteun E (2001) Feeding ecology of 0-group sea bass, *Dicentrarchus labrax*, in salt marshes of Mont Saint Michel Bay (France). *Estuaries* 24: 116-125.
- Lagardère JP (1971) Les crevettes des côtes du Maroc. *Travaux de l'Institut Scientifique Cherifien et de la Faculté des Sciences* 36: 1-140.
- Lassalle G, Lobry J, Loc'h F Le, Bustamante P, Certain G, Delmas D, Dupuy C, Hily C, Labry C, Pape O Le, Marquis E, Petitgas P, Pusineri C, Ridoux V, Spitz J, Niquil N (in press) Lower trophic levels and detrital biomass controlled the Bay of Biscay continental food web: implications for ecosystem management. *Progr Oceanogr*.
- Lorance P, Bertrand J, Brind'Amour A, Rochet MJ, Trenkel V (2009) Assessment of impacts from human activities on ecosystem components in the Bay of Biscay in the early 1990s. *Aquat Living Resour* 22: 409-431.
- Mahe K, Amara R, Bryckaert T, Kacher M, Brylinski JM (2007) Ontogenetic and spatial variation in the diet of hake (*Merluccius merluccius*) in the Bay of Biscay and the Celtic Sea. *ICES J Mar Sci* 64: 1210-1219.
- Martinho F, Leitão R, Neto JM, Cabral H, Lagardère F, Pardal MA (2008) Estuarine colonization, population structure and nursery functioning for 0 group sea bass (*Dicentrarchus labrax*), flounder (*Platichthys flesus*) and sole (*Solea solea*) in a mesotidal temperate estuary. *J Appl Ichthyol* 24: 229-237.
- Meynier L, Pusineri C, Spitz J, Santos MB, Pierce GJ, Ridoux V (2008) Intraspecific dietary variation in the short-beaked common dolphin *Delphinus delphis* in the Bay of Biscay: importance of fat fish. *Mar Ecol Prog Ser* 354: 277-287.
- Morizur Y, Berrow SD, Tregenza NJC, Couperus AS, Pouvreau S (1999) Incidental catches of marine-mammals in pelagic trawl fisheries of the northeast Atlantic. *Fish Res* 41: 297-307.
- Northridge S, Morizur Y, Souami Y, Van Canneyt O (2006) PETRACET: Project EC/FISH/2003/09 Final report to the European Commission 1735R07D, June 2006.
- Pace ML, Cole JJ, Carpenter SR, Kitchell JF (1999) Trophic cascades revealed in diverse ecosystems. *Trends Ecol Evol* 14: 483-488.
- Parnell AC, Inger R, Bearhop S, Jackson AL (2010) Source partitioning using stable isotopes: coping with too much variation. *Plos One* 5: e9672. doi:10.1371/journal.pone.0009672.
- Pereira HM, Leadley PW, Proença V, Alkemade R, Scharlemann JP, Fernandez-Manjarrés JF, Araújo MB, Balvanera P, Biggs R, Cheung WW. (2010) Scenarios for global biodiversity in the 21st century. *Science* 330: 1496-1501.
- Pickett GD, Pawson MG (1994) Sea bass biology, exploitation and conservation. In: Chapman and Hall (ed) *Fish and Fisheries series*. London, 349 p.
- Pierce GJ, Boyle PR (1991) A review of methods for diet analysis in piscivorous marine mammals. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev* 29: 409-486.
- Pinnegar JK, Trenkel VM, Tidd AN, Dawson WA (2003) Does diet in Celtic Sea fishes reflect prey availability? *J Fish Biol* 63: 197-212.
- Post DM (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83: 703-718.

- Pusineri C, Vasseur Y, Hassani S, Meynier L, Spitz J, Ridoux V (2005) Food and feeding ecology of juvenile albacore, *Thunnus alalunga*, off the Bay of Biscay: a case study. ICES J Mar Sci 62: 116-122.
- Quéro JC (2003) Guide des Poissons de l'Atlantique Européen, Les guides du naturaliste. Delachaux and Niestlé (eds), Paris, France.
- Riley WD, Ibbotson AT, Beaumont WRC, Pawson MG, Cook AC, Davison PI (2011) Predation of the juvenile stages of diadromous fish by sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the tidal reaches of an English chalk stream. Aquatic Cons 21: 307-312.
- Rogdakis Y, Ramfos A, Koukou K, Dimitriou E, Katselis G (2010) Feeding habits and trophic level of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Messolonghi-Etoliko lagoons complex (Western Greece). J Biol Res Thessalon 13: 13-26.
- Spitz J, Mourocq E, Leauté JP, Quéro JC, Ridoux V (2010) Prey selection by the common dolphin: Fulfilling high energy requirements with high quality food. J Exp Mar Biol Ecol 390: 73-77.
- Spitz J, Mourocq E, Schoen V, Ridoux V (2010) Proximate composition and energy content of forage species from the Bay of Biscay: high- or low-quality food? ICES J Mar Sci 67: 909-915.
- Spitz J, Rousseau Y, Ridoux V (2006) Diet overlap between harbour porpoise and bottlenose dolphin: An argument in favour of interference competition for food? Estuar Coast Shelf S 70: 259-270.
- Sweeting CJ, Barry J, Barnes C, Polunin NVC, Jennings S (2007) Effects of body size and environment on diet-tissue $\delta^{15}\text{N}$ fractionation in fishes. J Exp Mar Biol Ecol 340: 1-10.
- Sweeting CJ, Barry JT, Polunin NVC, Jennings S (2007) Effects of body size and environment on diet-tissue $\delta^{13}\text{C}$ fractionation in fishes. J Exp Mar Biol Ecol 352: 165-176.
- Tollit DU, Steward MJ, Thompson PM, Pierce GJ, Santos MB, Hughes S (1997) Species and size differences in the digestion of otoliths and beaks: implications for estimates of pinniped diet composition. Can J Fish Aquat Sci 54: 105-119.
- Trites AW, Donnelly CP (2003) The decline of Steller sea lions *Eumetopias jubatus* in Alaska: a review of the nutritional stress hypothesis. Mam Rev 33: 3-28.
- Zlatanov S, Laskaridis K (2007) Seasonal variation in the fatty acid composition of three Mediterranean fish - sardine (*Sardina pilchardus*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and picarel (*Spicara smaris*). Food Chem 103: 725-728.

Annexe 8

Foraging ecology of five toothed whale species in the North West Iberian Peninsula, inferred using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotopic signatures

Méndez-Fernandez P, Bustamante P, Bode A, **Chouvelon T**, Ferreira M, López
A, Pierce GJ, Santos MB, Spitz J, Vingada JV, Caurant F

Soumise à Journal of Experimental Marine Biology and Ecology



Abstract

The common dolphin (*Delphinus delphis*), bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), harbour porpoise (*Phocoena phocoena*), striped dolphin (*Stenella coeruleolba*) and long-finned pilot whale (*Globicephala melas*) are frequently sighted and/or regularly reported stranded or by-caught along the coast of the North Western Iberian Peninsula (NWIP). In order to investigate their feeding and habitat use, stable isotope ratios of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) were analysed in muscle samples taken from stranded and by-caught animals between 2004 and 2008 in NWIP. Stable isotopes were also measured in 17 species of fish and cephalopods previously identified as prey species, and in plankton, to determine the trophic position (TP) of both predators and prey and to infer their trophic relationships. With this aim TP and trophic enrichment factors (TEFs) were calculated for all four species. In addition, isotopic mixing models were applied to estimate the proportional contribution of each prey source to the diet of the common dolphin, which was the cetacean species best sampled in our study. Plankton, fish and cephalopods exhibited an increasing trend in their $\delta^{13}\text{C}$ values (from -19.6‰ to -15.3‰ along the offshore-inshore axis, with a less clear spatial pattern observed for $\delta^{15}\text{N}$ values. Striped dolphins exhibited the lowest mean $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ and TP values (-17.6, 10.8 and 4.3, respectively), which confirms the oceanic character of this species and its lower trophic position compared to the other toothed whales analyzed. The common dolphin exhibited mean $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ and TP values that were at an intermediate level (-17.0, 11.7 and 4.7, respectively) and results of the mixing model indicated that blue whiting (*Micromesistius poutassou*) was the main component of the diet. The harbour porpoise, bottlenose dolphin and pilot whale exhibited higher and very similar isotopic compositions and TPs. The mean TEF obtained between cetacean predators and their main prey were 1.4‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and 0.8‰ for $\delta^{15}\text{N}$. These results provide information on stable isotope incorporation data for cetaceans, which are essential if conclusions are to be drawn in issues concerning trophic structures, carbon sources and habitat use in the NWIP.

Keywords

Stable isotopes, toothed whales, trophic position, trophic relationships, isotopic mixing model, North West Iberian Peninsula.

Introduction

The waters of the North West Iberian Peninsula are characterized by high marine biodiversity and productivity, which is supported by strong nutrient enrichment during seasonal upwelling periods (Fraga 1981), and a relatively narrow (20-35 km wide) shelf. From April to September, the prevalent northerly winds favour the upwelling of the nutrient-rich Eastern North Atlantic Central Water (Fraga 1981), sustaining a high level of productivity when compared to adjacent areas. The marine fauna of the NWIP includes at least 19 marine mammal species (16 cetaceans and 3 pinnipeds; López et al. 2002). Based on strandings and sightings data, the most common cetacean species are all toothed whales: common dolphin (*Delphinus delphis*), bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), harbour porpoise (*Phocoena phocoena*), long-finned pilot whale (*Globicephala melas*), striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) and Rissos's dolphin (*Grampus griseus*) (López et al. 2002, 2004, Pierce et al. 2010).

Although marine mammals are recognized as top predators in marine trophic webs, little is known about their role in the structuring of marine ecosystems (Bowen 1997) with the main limitation being that the ecological needs of such large animals often exceed the temporal and spatial scales used to define community boundaries. This role is especially important in habitats with enhanced productivity such as upwelling areas, where high species richness contributes to increased trophic linkage density and exceptional resource abundance (Bode et al. 2003). In spite of the abundance of resources, species that have similar ecological requirements could exhibit some degree of segregation (either by occupying different habitats or by feeding on different prey) to avoid competition. Knowledge of diet composition and the trophic relationships within a community is needed to underpin sound management measures, in particular in areas such as the NIWP where fishery by-catch mortality (López et al. 2002, 2003), prey depletion due to overfishing, and oil spills (Ridoux et al. 2004) are the main threats to cetacean populations.

Insights into the trophic relationships and feeding habits of marine mammals can be obtained by measuring the ratios of naturally occurring isotopes such as those of carbon and nitrogen, in specific tissues (Hobson and Welch 1992). This methodology is based on the assumption that predator stable isotope compositions are a reflection of those of their prey (De Niro and Epstein 1978, 1981). Ratios of the natural abundance of stable isotopes of carbon (C, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and nitrogen (N, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) have been extensively used in studies of cetacean ecology to assess

dietary variation in space and time (Abend and Smith 1995, Knoff et al. 2008, Mendes et al. 2007). Turnover rates vary among tissues depending on their metabolic activity, e.g., faster turnover rates have been measured for skin than for teeth (Abend and Smith 1995). The difference in turnover rates between tissues allows the exploration of the dietary history of individual animals over different time windows from few days to several years (Abend and Smith 1995), in contrast to the information provided by stomach contents that normally allows the identification of the prey consumed shortly before the stomachs were collected (Pierce and Boyle 1991).

In addition to information on diet, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values can act as chemical tracers that reflect characteristics of the ecosystem where an animal forages. As a consequence, stable isotope analyses have been widely applied not only to determine the trophic position of species in marine food webs (Fry and Sherr 1984, Bode et al. 2003, 2007) but also to study migration patterns (Mendes et al. 2007) and population substructure (Borrell et al. 2006).

Stable isotopes of carbon and nitrogen show enrichment (an increase in the abundance of the heavier isotope) through food webs with increasing trophic level. The enrichment of $\delta^{13}\text{C}$ is generally small or insignificant (De Niro and Epstein 1978, Vander Zanden and Rasmussen 2001) and, therefore, $\delta^{13}\text{C}$ is primarily used to provide information on the origin of the base of the food chain (France 1995) and can reveal information such as inshore versus offshore feeding preferences (Hobson et al. 1992). On the other hand, $\delta^{15}\text{N}$ enrichment per trophic level in marine food webs is normally considerably higher, with an estimated mean trophic enrichment factor (TEF) ranging from 2 to 5 ‰ (De Niro and Epstein 1978, 1981, Hobson and Welch 1992, Vander Zanden and Rasmussen 2001). Nitrogen isotope ratios are thus more useful as an indicator of trophic position although some variability of $\delta^{15}\text{N}$ has also been demonstrated, for example a near-shore *vs.* offshore enrichment of $\delta^{15}\text{N}$ signatures (Chouvelon et al. under review) due to the use of different nitrogen sources by phytoplankton. TEF also vary depending on the tissue analysed (Hobson et al. 1996). For example, metabolically active tissues show less enrichment in $\delta^{13}\text{C}$ (or $\delta^{15}\text{N}$) relative to the diet than is the case for inactive or keratinous tissues (Hobson et al. 1996). This represents a potential confounding factor when using isotope ratios in different tissues to infer information on diet over different time periods.

In this context, the aim of the present study was to investigate the feeding and habitat use of five toothed whales species inhabiting the NWIP waters through the use of stable isotopes

analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of muscle tissue obtained from stranded or by-caught individuals between 2004 and 2008. The species analyzed were the common dolphin, bottlenose dolphin, harbour porpoise, striped dolphin and long-finned pilot whale. The carbon and nitrogen isotope ratios of known prey species (eight fish species and nine cephalopod species; see below for details) and plankton (selected as the base of the food web in the research area) were also analyzed, in order to position the predators and their potential prey in the food web and to study their trophic relationships. Following this aim, TEFs of toothed whales and prey species were calculated. For the common dolphin, which is the most abundant cetacean species in the Iberian Peninsula, and also the best represented in the samples available, isotopic mixing models were also applied to estimate the proportional contribution of each prey source in the diet.

Materials and methods

Sample collection

The fieldwork was carried out in the North West of the Iberian Peninsula, in an area extending from the northern limit of the Galician coast (43° 31' N, 7° 2' W) to Nazaré on the Portuguese coast (39° 36' N, 9° 3' W; Fig. A8-1). Stranded cetaceans were attended by experienced personnel of the Galician (Coordinadora para o Estudo dos Mamíferos Mariños, CEMMA) or Portuguese (Sociedade Portuguesa de Vida Salvagem, SPVS) stranding networks. Animals were identified to species, measured, sexed and, if the state of preservation of the carcass allowed it, full necropsies were performed and samples collected following a standard protocol defined by the European Cetacean Society (after Kuiken 1996). For this study, between 2004 and 2008, muscle tissues were sampled from stranded and by-caught individuals of five toothed whales species: common dolphin (n = 114), bottlenose dolphin (n = 9), harbour porpoise (n = 19), striped dolphin (n = 21) and long-finned pilot whale (n = 9). After collection, muscle samples were stored at -20°C until processed in the laboratory.

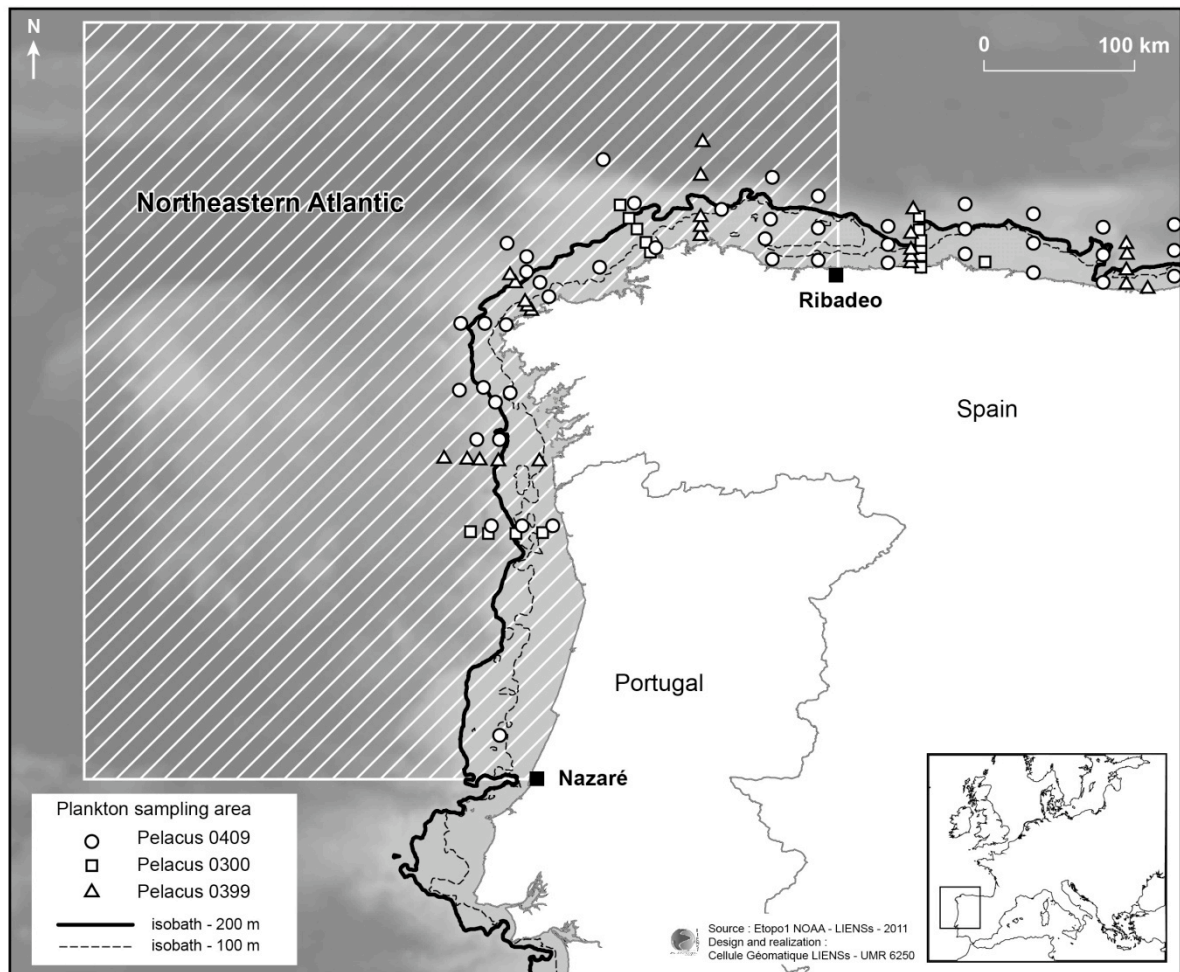


Figure A8-1: Map of the study area (North West of the Iberian Peninsula) with location of plankton stations and with 100 and 200 m isobaths. The 200 m isobath is taken as the limit for the shelf-break.

Muscle tissues of 17 species of fish and cephalopods previously identified in the literature as prey of the sampled cetacean species in the study area (see Santos et al. 2004, 2007) were also analyzed (see Table A8-1). All the fish samples and those of common squid (*Loligo vulgaris*) were collected with a pelagic trawl, during the PELACUS 0409 survey. This survey, carried out by Instituto Español de Oceanografía (IEO) in spring 2009 aimed to acoustically assess pelagic marine living resources of northwestern and northern Spanish shelf waters. Plankton was also collected during the survey, at night at 100 m depth using a conical net deployed at regularly distributed stations over the shelf up to the shelf-break throughout the surveyed area. Plankton samples were subsequently fractionated through a 200 μ m mesh, carefully washed with filtered seawater, transferred to glass-fibre filters and stored frozen until subsequent isotopic analysis (Bode et al. 2007). Only nitrogen isotopes were analyzed for the PELACUS 0409 samples. Carbon isotopes were measured in samples collected during the

PELACUS 0399 (March 1999) and PELACUS 0300 (March 2000) surveys in the same area (Bode et al. 2003). Samples from these cruises were collected as described for the nitrogen isotope samples but using a net of 20 μm mesh, thus comprising plankton in the 20-200 μm size range. The isotopic composition of this fraction is expected to be essentially the same as that of the 40-200 μm sample from 2009, as there is no significant isotopic enrichment within plankton fractions < 200 μm (see Bode et al. 2007).

Specimens of *Octopus vulgaris*, *Eledone cirrhosa* and *Sepia officinalis* were acquired in the Vigo (Galicia) fish market, while oceanic cephalopod species with no commercial value (the squids *Teuthowenia megalops*, *Ancistrocheirus lesueurii*, *Galiteuthis armata*, *Histioteuthis bonnellii* and *H. reversa*) were collected during the EVHOE groundfish surveys conducted by the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), from the southern part of the Bay of Biscay in autumns 2001 to 2008.

Individuals of each species were measured, weighted and dissected to obtain portions of lateral white muscle or mantle (for fish and cephalopods, respectively), which were also stored at - 20°C prior to analysis.

Stable isotope analysis

Muscle samples were freeze-dried and then ground into a fine powder. Since lipids are highly depleted in ^{13}C relative to other tissue components (De Niro and Epstein 1978), they were extracted from muscle samples using cyclohexane. To this end, an aliquot of approximately 100 mg of fine powder was agitated with 4 mL of cyclohexane for 1h. Next, the sample was centrifuged for 5 min at 4000 g, and the supernatant containing lipids was discarded. The sample was dried in an oven at 45°C for 48 h, and 0.35 ± 0.05 mg subsamples of lipid-free powder were then weighed in tin cups for stable isotope analyses. Plankton samples were analyzed after oven drying at 50°C for 24h with no lipid extraction.

These analyses were performed with an elemental analyzer coupled to an Isoprime (Micromass) continuous-flow isotope-ratio mass spectrometer (CF IR-MS). Plankton samples were analyzed using an isotope-ratio mass spectrometer (Finnigan Matt Delta Plus) coupled to an elemental analyzer (Carlo Erba CHNSO 1108).

The results are presented in the usual δ notation relative to Vienna PeeDee Belemnite Standard for $\delta^{13}\text{C}$ and atmospheric N_2 for $\delta^{15}\text{N}$, in parts per thousand (‰). Replicate measurements of internal laboratory standards (acetanilide) during each autorun indicate measurements errors < 0.15 ‰ and < 0.20 ‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively.

Table A8-1: Carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotope ratios (mean \pm SD, ‰), length range (cm) and mean trophic position of sampled fish, cephalopods and plankton from the North West Iberian Peninsula. Lengths are total length for fish and dorsal mantle length for cephalopods. TP: trophic position. N = number of samples.

Species	N	Length range (cm)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰) mean \pm SD	$\delta^{15}\text{N}$ (‰) mean \pm SD	TP
Fish					
<i>Sardina pilchardus</i>	15	18.5 - 22.5	-16.4 \pm 0.5	10.2 \pm 0.6	3.5
<i>Engraulis encrasicolus</i>	5	15.5 - 17.0	-15.7 \pm 0.2	12.0 \pm 0.3	4.0
<i>Micromesistius poutassou</i>	10	22.0 - 24.0	-17.8 \pm 0.2	10.6 \pm 0.4	3.6
<i>Trisopterus luscus</i>	3	20.0 - 21.0	-15.3 \pm 0.1	14.0 \pm 0.1	4.6
<i>Merluccius merluccius</i>	8	25.5 - 33.0	-17.8 \pm 0.8	11.3 \pm 0.8	3.8
<i>Trachurus trachurus</i>	19	12.0 - 31.0	-17.0 \pm 0.7	11.4 \pm 0.5	3.8
<i>Scomber scombrus</i>	14	28.0 - 32.0	-17.4 \pm 0.5	10.7 \pm 1.0	3.6
<i>Maurolicus muelleri</i>	5	4.4 - 5.5	-18.1 \pm 0.4	10.2 \pm 0.7	3.5
Cephalopods					
<i>Eledone cirrhosa</i>	9	208.0 - 495.0	-17.3 \pm 0.2	10.8 \pm 0.2	3.6
<i>Octopus vulgaris</i>	5	670.0 - 810.0	-15.9 \pm 0.3	11.2 \pm 0.2	3.8
<i>Sepia officinalis</i>	5	150.0 - 194.0	-15.9 \pm 0.6	12.7 \pm 0.7	4.2
<i>Loligo vulgaris</i>	7	9.7 - 27.4	-17.2 \pm 0.5	12.7 \pm 1.2	4.2
<i>Teuthowenia megalops</i>	3	118.0 - 147.0	-18.7 \pm 0.4	9.0 \pm 0.2	-
<i>Galiteuthis armata</i>	2	147.0 - 308.0	-18.7 \pm 0.1	9.7 \pm 0.2	-
<i>Ancistrocheirus lesueurii</i>	3	21.0 - 49.0	-19.6 \pm 0.2	11.6 \pm 0.6	-
<i>Histioteuthis bonnellii</i>	6	27.0 - 73.0	-19.2 \pm 0.2	11.7 \pm 0.2	-
<i>Histioteuthis reversa</i>	4	30.0 - 69.0	-19.2 \pm 0.3	12.2 \pm 0.4	-
Plankton					
Plankton	46	< 200 (μm)	-19.6 \pm 1.3	5.2 \pm 1.0	2.0

Isotopic model

The trophic position (TP) of cetaceans and prey species was estimated from $\delta^{15}\text{N}$ following Vander Zanden and Rasmussen (2001):

$$\text{TP} = 2 + (\delta^{15}\text{N}_{\text{consumer}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{base}}) / \text{TEF}$$

where $\delta^{15}\text{N}_{\text{consumer}}$ is the mean $\delta^{15}\text{N}$ value of a given consumer (toothed whale, fish or cephalopod species in this case). The $\delta^{15}\text{N}$ value of < 200 μm fraction of plankton was

attributed to primary consumers ($\delta^{15}\text{N}_{\text{base}}$) and thus represented the reference value at the base of the food web (TP = 2; Bode et al. 2007). The TEF used for the calculation of trophic position in this study was set to 3.4‰ (Vander Zanden and Rasmussen 2001) with the exception of toothed whales for which a TEF value of 2.4‰ was used, as obtained in the muscles of two harp seals (*Pagophilus groenlandicus*) fed on a constant diet of herring (*Clupea harengus*) (Hobson et al. 1996).

Data analysis

Mean isotopic composition in muscle, and its standard deviation (SD) and 95% confidence intervals, were calculated for toothed whales, their prey and plankton. The existence of significance differences in the isotopic composition of the samples was investigated using ANOVA or Kruskal-Wallis tests among species, separately for both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values (Table A8-2). The choice of test was based on the results of Shapiro (to check for normality in the sample distributions) and Bartlett (to check the homogeneity of variances) tests.

Isotopic mixing models were applied with the software package SIAR (Stable Isotope Analysis in R) to estimate the proportional contribution of sources (dietary items) within the isotopic mixture (consumer tissue) of the common dolphin. The main prey species contributing to their total diet by weight determined from stomach content analyses (Santos et al. 2004) were considered as sources: blue whiting (*Micromesistius poutassou*), sardine (*Sardina pilchardus*), scad (*Trachurus trachurus*), sand smelt (*Atherina presbyter*), mackerel (*Scomber scombrus*), pouting (*Trisopterus luscus*), common squid (*Loligo vulgaris*) and hake (*Merluccius merluccius*). For sand smelt, isotopic signatures from the literature were used (Fernandez et al. 2011a) since we did not sample this species. The isotopic values for food sources must be adjusted by appropriate enrichment factors between diet and consumer tissue (Phillips and Gregg 2003). We obtained the most appropriate enrichment factor and standard deviation (from analytical errors) values from the literature, and then two model runs were carried out. The first model used $1.3\text{‰} \pm 0.1$ for $\delta^{13}\text{C}$ and $2.4\text{‰} \pm 0.3$ for $\delta^{15}\text{N}$ (Hobson et al. 1996) while the second model used $0.34\text{‰} \pm 0.2$ for $\delta^{13}\text{C}$ and $1.21\text{‰} \pm 0.15$ for $\delta^{15}\text{N}$ (Caut et al. 2010). We selected these TEF values as they correspond to the only published studies carried out on captive marine mammals fed a controlled diet, although they were determined for harp seals (Hobson et al. 1996), bottlenose dolphins and killer whales (Caut et al. 2010).

Finally we ran the mixing models using default parameters (iterations = 500,000, burnin = 50,000, thinby = 15).

All models and statistical tests mentioned above were performed using the free software R, version 2.11.1 (R Development Core Team 2008).

Results

Stable isotopes composition and trophic position of toothed whales

The muscle $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the five toothed whales differed significantly between species (Kruskal-Wallis, $H = 30.39$ and 60.26 , respectively, both $p < 0.0001$; Table A8-2). As revealed by the mean $\delta^{13}\text{C}$ values (Post-hoc test, $p < 0.05$) three major groups exist as delineated by their distribution along the coastal-oceanic axis (Fig. A8-2). The first group was characterized by the highest $\delta^{13}\text{C}$ values (-16.5‰) and included harbour porpoise, bottlenose dolphin and long-finned pilot whale. The most depleted and highly negative mean $\delta^{13}\text{C}$ value (-17.6‰) was found in the muscle of striped dolphin whereas common dolphin exhibited a value for $\delta^{13}\text{C}$ (-17.0‰), which was intermediate between those of these two groups.

Comparison tests showed that $\delta^{15}\text{N}$ values in muscle of striped dolphin were significantly lower than those of the other species (Post-hoc tests, all $p < 0.05$), and $\delta^{15}\text{N}$ values in muscle of harbour porpoise were significantly higher than those in the other species with the exception of bottlenose dolphin. The $\delta^{15}\text{N}$ value of bottlenose dolphin was higher than those of common dolphin ($p < 0.01$) and long-finned pilot whale but not statistically different from the latter. Finally $\delta^{15}\text{N}$ values were not statistically different between long-finned pilot whales and common dolphins (Table A8-2 and Fig. A8-2).

Trophic positions (TP) of toothed whale species were estimated based on the $\delta^{15}\text{N}$ values of prey and primary consumers (Table A8-2 and Fig. A8-3). No significant differences in TP appeared among the five cetacean species (ANOVA, $p > 0.05$). However, the highest trophic position was occupied by the harbour porpoise (TP = 5.3) and the lowest by the striped dolphin (TP = 4.3). The bottlenose dolphin (TP = 5.1) displayed a TP close to that of harbour porpoise, whereas common dolphin and long finned pilot whale appeared to occupy an intermediate TP (4.7 and 4.9 respectively).

Table A8-2: Carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotope ratios (mean \pm SD, ‰), ranges (minimum, maximum) and mean trophic position (TP) of the toothed whale species sampled along the North West Iberian Peninsula. Groups with the same letter indicate that isotopic signatures or TP are not significantly different (pairwise multiple comparison test [MPC] in the case of Kruskal-Wallis [KW], post hoc Tukey's test in the case of ANOVA). N = number of samples.

	Species	N	Mean \pm SD	Range (min, max)	Test and characteristics	Groups
$\delta^{13}\text{C}$	<i>Delphinus delphis</i>	114	-17.0 \pm 0.5	-18.1, -16.3	KW + MPC tests (Holm's) $\chi^2 = 30.4$ df = 4 p < 0.0001	a
	<i>Phocoena phocoena</i>	19	-16.5 \pm 0.7	-17.5, -15.1		b
	<i>Tursiops truncatus</i>	9	-16.5 \pm 0.8	-17.2, -15.1		b
	<i>Stenella coeruleoalba</i>	21	-17.6 \pm 0.6	-18.5, -16.4		c
	<i>Globicephala melas</i>	9	-16.5 \pm 0.5	-17.3, -15.7		b
$\delta^{15}\text{N}$	<i>Delphinus delphis</i>	114	11.7 \pm 0.6	10.1, 13.6	KW + MPC tests (Holm's) $\chi^2 = 60.2$ df = 4 p < 0.0001	a,d
	<i>Phocoena phocoena</i>	19	13.0 \pm 1.2	11.5, 17.1		b
	<i>Tursiops truncatus</i>	9	12.6 \pm 0.9	11.3, 14.0		b,e
	<i>Stenella coeruleoalba</i>	21	10.8 \pm 0.7	9.8, 12.4		c
	<i>Globicephala melas</i>	9	12.2 \pm 0.6	11.0, 13.3		d,e
TP	<i>Delphinus delphis</i>	114	4.7	3.8, 5.3	1-way ANOVA + Tukey's test F = 0.1469 df = 4 p = 0.4248	a
	<i>Phocoena phocoena</i>	19	5.3	4.4, 6.7		a
	<i>Tursiops truncatus</i>	9	5.1	4.3, 5.4		a
	<i>Stenella coeruleoalba</i>	21	4.3	3.7, 4.7		a
	<i>Globicephala melas</i>	9	4.9	4.2, 5.1		a

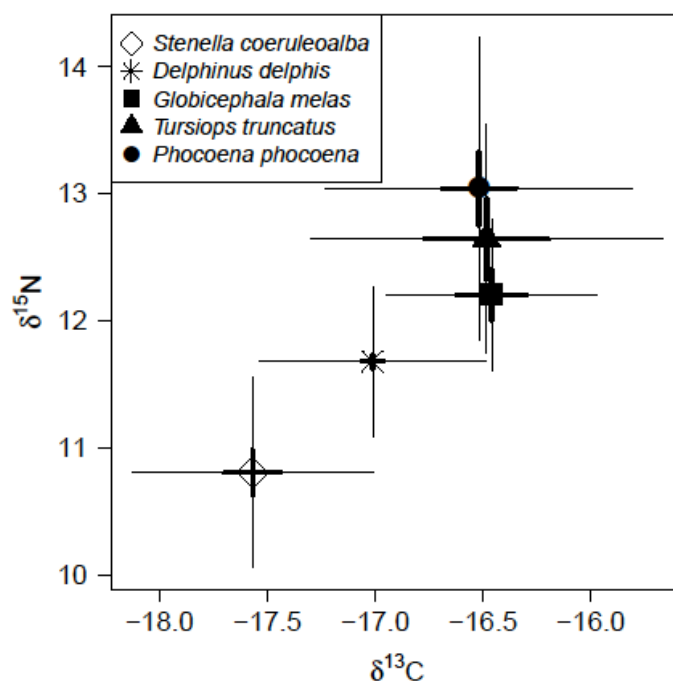


Figure A8-2: Carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotope ratios in muscle tissue of *Stenella coeruleoalba* (\diamond), *Delphinus delphis* (*), *Globicephala melas* (\blacksquare), *Tursiops truncatus* (\blacktriangle) and *Phocoena phocoena* (\bullet) from the study area. Data are mean (‰) \pm SD and SE (**bold**).

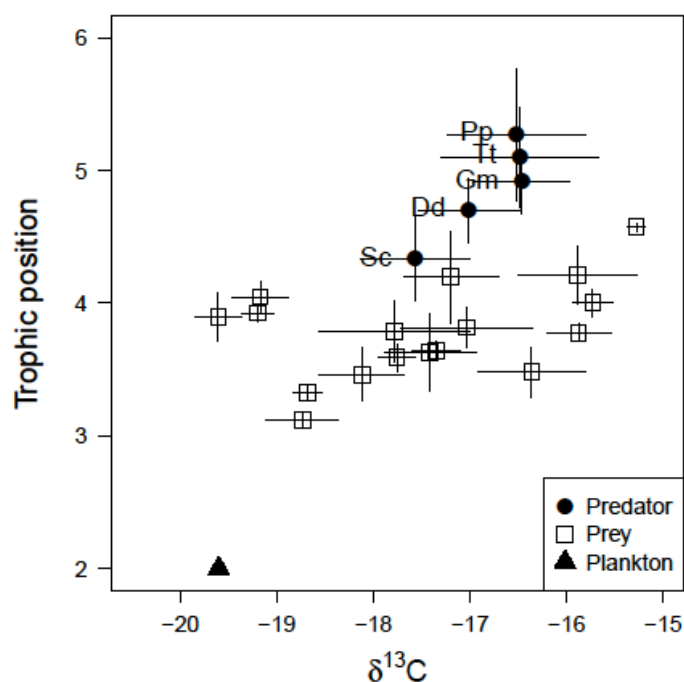


Figure A8-3: Trophic structure of the North West Iberian Peninsula food web as determined by trophic position (TP) and carbon ($\delta^{13}\text{C}$) isotope ratios of their different components. Data are mean \pm SD. Toothed whales: *Stenella coeruleoalba* (Sc), *Delphinus delphis* (Dd), *Globicephala melas* (Gm), *Tursiops truncatus* (Tt), *Phocoena phocoena* (Pp).

Stable isotopes composition of prey and plankton

Values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ differed significantly between prey species and plankton ($H = 105.03$ and 86.4 respectively, $p < 0.0001$; Fig. A8-4). As expected, plankton showed the lowest $\delta^{13}\text{C}$ values (19.6‰).

There was wide variation in the $\delta^{13}\text{C}$ signatures of the different prey organisms collected from the NWIP. Plankton, fish and cephalopods exhibited $\delta^{13}\text{C}$ values (Fig. A8-4), ranging from -19.6‰ for the sharpnose squid (*Ancistrocheirus lesueurii*) to -15.3‰ for pouting (*Trisopterus luscus*), a trend broadly consistent with an increase from the offshore system to the inshore system. Three broad groups can be identified (Fig. A8-4), consisting of oceanic squids (*Teuthowenia megalops*, *Ancistrocheirus lesueurii*, *Galiteuthis armata*, *Histioteuthis bonnellii* and *H. reversa*) and hake in one group, pelagic fish (sardine, mackerel, scad), silvery lightfish (*Maurolicus muelleri*), blue whiting and common squid in a second group, and a third group including coastal/benthic cephalopods and fish (*Octopus vulgaris*, *Eledone cirrhosa*, *Sepia officinalis* and pouting).

Regarding $\delta^{15}\text{N}$ values, as for $\delta^{13}\text{C}$, pouting exhibited the highest $\delta^{15}\text{N}$ values (14.0‰) while the lowest mean $\delta^{15}\text{N}$ values were recorded in the oceanic squids *Teuthowenia megalops* and *Galiteuthis armata* (9.0‰ and 9.7‰, respectively), followed by sardine and the silvery lightfish (both 10.2‰). Plankton (as was the case for $\delta^{13}\text{C}$) exhibited the lowest $\delta^{15}\text{N}$ values (5.2‰) (see Table A8-1).

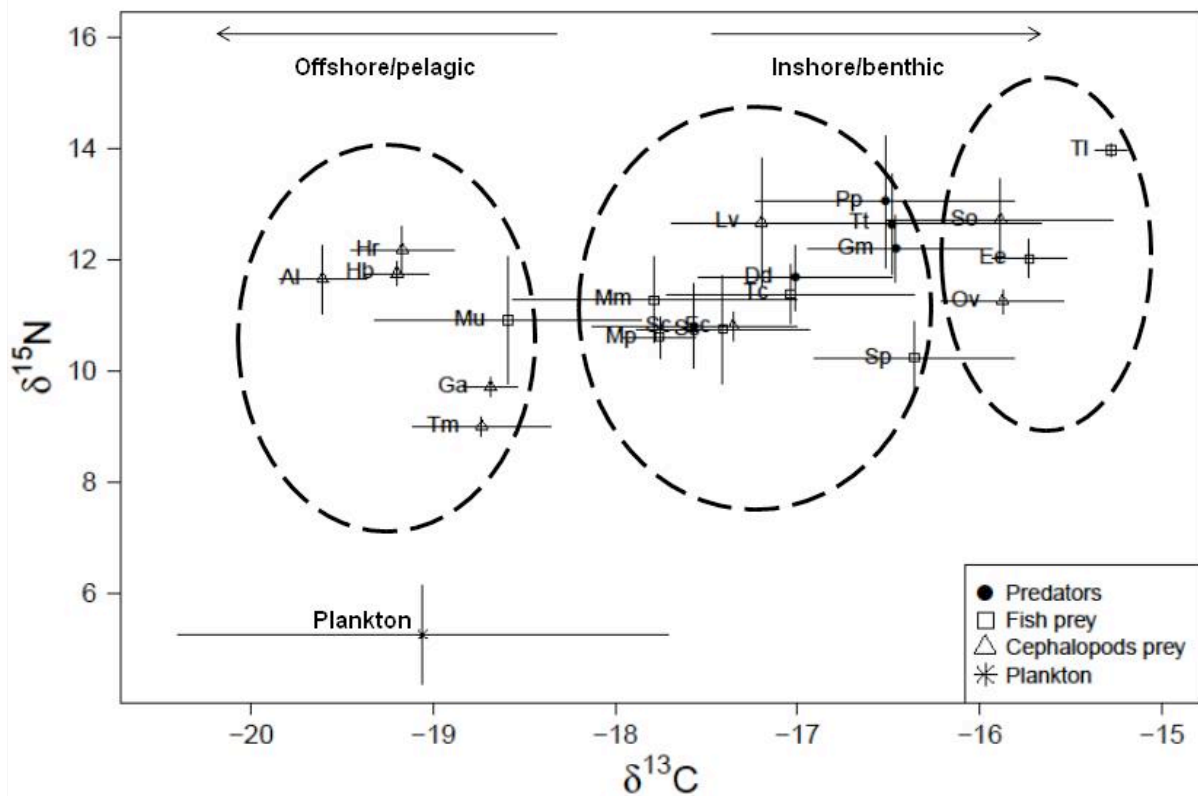


Figure A8-4: Carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotope ratios (mean \pm SD and ranges, ‰) in plankton and in the muscle tissue of selected fish, cephalopods, and toothed whale species of the study area. The discontinuous ellipses grouped the species according to their distribution on the offshore-inshore axis and $\delta^{13}\text{C}$ values: *Ancistrocheirus lesueurii* (Al), *Delphinus delphis* (Dd), *Eledone cirrhosa* (Ee), *Galiteuthis armata* (Ga), *Globicephala melas* (Gm), *Histioteuthis bonnellii* (Hb), *H. reversa* (Hr), *Loligo vulgaris* (Lv), *Mauroliticus muelleri* (Mu), *Merluccius merluccius* (Mm), *Micromesistius poutassou* (Mp), *Octopus vulgaris* (Ov), *Phocoena phocoena* (Pp), *Sardina pilchardus* (Sp), *Scomber scombrus* (Ss), *Sepia officinalis* (So), *Stenella coeruleoalba* (Sc), *Teuthowenia megalops* (Tm), *Trachurus trachurus* (Tc), *Trisopterus luscus* (TI), *Tursiops truncatus* (Tt).

Trophic relationship between predators and prey

Harbour porpoise, bottlenose dolphin and long-finned pilot whale had higher $\delta^{15}\text{N}$ values in muscle than those obtained from the prey species. On the other hand, striped dolphin and

common dolphin showed stable isotope values lower than those of several fish and cephalopod species, including those of one of their main prey – scad. Comparing the isotopic values between diet (i.e., the main prey selected from literature for each predator species) and muscle (tissue) of the five toothed whales, as in Hobson et al. (1996), mean TEF values of 1.4‰ $\delta^{15}\text{N}$ and 0.8‰ for $\delta^{13}\text{C}$ were obtained. Note that these are unweighted means which do not take into account the relative importance of the different species and included only those prey species that could be sampled.

Results from the isotopic mixing model (SIAR) for common dolphin suggest a high contribution of blue whiting to the diet of this species based on muscle isotopic values. When we used the TEFs from Hobson et al. (1996) (model 1, see Fig. A8-5a), blue whiting showed a high mean contribution of 91%, with hake in second position but with a much lower mean contribution of 3.5%, followed by mackerel with a mean contribution of 2.9%.

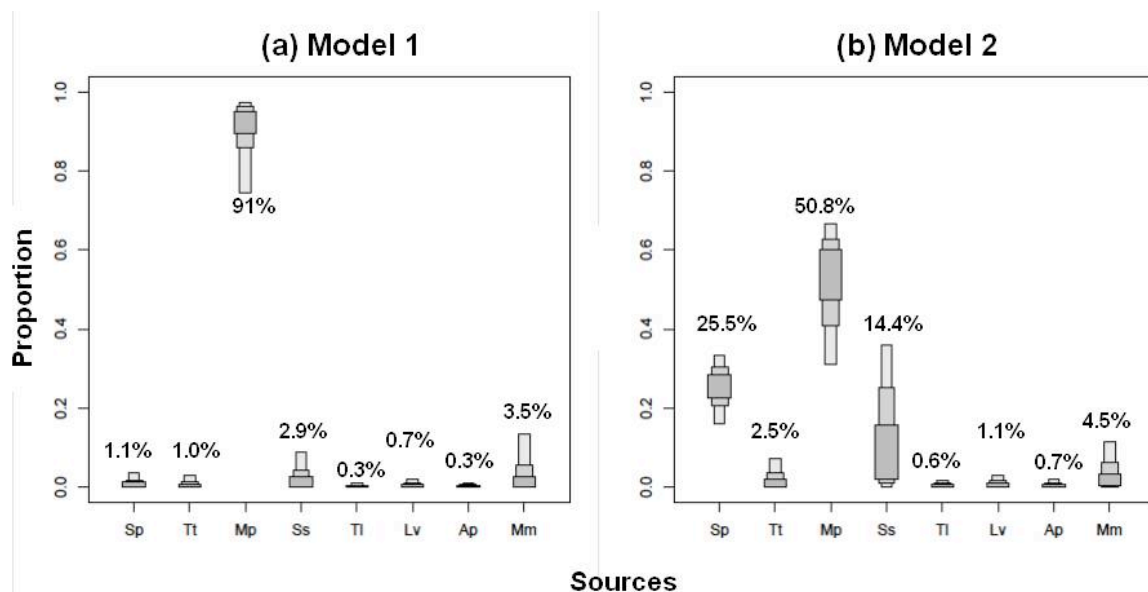


Figure A8-5: Results of SIAR mixing model, showing 50%, 75% and 95% confidence intervals (respectively dark grey, light grey and white boxes) of the probably sources proportion in diet of *Delphinus delphis* in the North West Iberian Peninsula. Model 1 (a) was run with a TEF of 1.3 ± 0.1 and 2.4 ± 0.3 for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively, and model 2 (b) was run with a TEF of 0.34 ± 0.2 and 1.21 ± 0.15 for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively. The mean proportion (%) of each source is labeled: *Sardina pilchardus* (Sp), *Trachurus trachurus* (Tt), *Micromesistius poutassou* (Mp), *Scomber scombrus* (Ss), *Trisopterus luscus* (Tl), *Loligo vulgaris* (Lv), *Atherina presbyter* (Ap), *Merluccius merluccius* (Mm).

In contrast, when we used the lower TEFs suggested by Caut et al. (2010) (model 2, see Fig. A8-5b), results indicated that the blue whiting contribution was lower than in model 1 (50.8%) and sardine was the second most important prey species with a mean contribution of 25.5%. Sand smelt showed a mean contribution < 1%, allowing a greater contribution of mackerel and scad (14.4% and 2.5%, respectively).

Discussion

Spatial feeding ecology differences into the NWIP food web

$\delta^{13}\text{C}$ values are generally used as an indicator of the habitat and/or feeding zone of an organism (France 1995). Here $\delta^{13}\text{C}$ signatures values varied from -19.6‰ to -15.1‰ with plankton being ^{13}C -depleted relative to fish, cephalopods and toothed whale species, as would be expected from their position at the base of the consumer chain. $\delta^{13}\text{C}$ isotopic signatures showed a decreasing trend from coastal and neritic habitats to oceanic and deep-sea habitats (Fig. A8-2 and A8-4). This offshore-inshore gradient has been previously described in freshwater and marine ecosystems (Fry and Sherr 1984). Within the community of toothed whales inhabiting NWIP waters, we found interspecific differences in the $\delta^{13}\text{C}$ signatures of the five toothed whales analyzed. Values ranged from -18.5 for striped dolphin to -15.1‰ for harbour porpoise and suggest that the species analyzed are spatially segregated and/or specialize on different prey in the study area. Thus structuring is present even though the continental shelf area is relatively limited, due to the narrowness of the continental shelf (< 40 km wide). Such marked differences have not been found in studies on marine mammals from the North Sea (Das et al. 2003b), the Gulf of St Lawrence (Lesage et al. 2001) or the northern Bay of Biscay (Chouvelon et al. under review). The ^{13}C -depletion observed in striped dolphin and common dolphin relative to the other three toothed whale species (Figs. A8-2 and A8-3) may result from an exploitation of oceanic, relatively ^{13}C -depleted, resources by both species. Striped dolphin shows a high level of foraging plasticity, as evidenced by several studies carried out in various part of the world (Desportes 1985, Meotti and Podestà 1997, Miyazaki et al. 1973, Ringelstein et al. 2006, Spitz et al. 2006). In the NWIP, the main fish prey of striped dolphin are blue whiting, scads and sand smelt while the main cephalopods eaten are *Gonatus* sp. and ommastrephids (Santos et al. 2007). It is also known that striped dolphins in the NWIP feed on crustaceans, specifically on pelagic shrimp species (Jose Cedeira, personal communication), and on oceanic fish such as silvery lightfish. Thus, although some coastal

species have been found in the stomach contents of NWIP striped dolphins, the low $\delta^{13}\text{C}$ signatures of the present study tend to show that this dolphin species mainly exploits the oceanic habitats of the NWIP.

Common dolphin is the most abundant cetacean in the NWIP (López et al. 2004) and the second most frequently sighted from the coast (Pierce et al. 2010). Observations from fishing boats suggest that this species is mainly found in waters of less than 200 m depth (Spyrakos et al. 2011). This apparent preferential use of shallow waters may relate to foraging preferences. The most important prey of common dolphin in Galician waters are blue whiting and sardine as shown by the analysis of stomach contents of stranded and by-caught individuals (Santos et al. 2004) and here supported by the isotopic mixing models results, which suggested that blue whiting is the most important prey and that, depending on assumptions made about trophic fractionation, sardine may be the second most important prey (see Fig. A8-5). It is clear from comparing the results of the two mixing models that the details of the results are strongly dependent on the trophic fractionation assumed and caution is thus needed in interpreting such models (see below for further discussion on this point).

Common dolphin probably feeds on blue whiting on the upper part of the shelf break, while sardine is taken on the shelf and in more coastal areas. This would explain the intermediate $\delta^{13}\text{C}$ signature of the common dolphin, i.e., between that of the striped dolphin and those of the other toothed whales found in our study. This result is in agreement with the results of similar work carried out in other areas of the North East Atlantic: off Ireland (Das et al. 2003a), in the French Channel (Das et al. 2003a) and in the Bay of Biscay (Chouvelon et al. under review) (see Table A8-3).

Table A8-3: Carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotope ratios (mean \pm SD, ‰) in muscle tissue of the five toothed whale species analyzed in the present study. Values obtained for the same species by other authors are also included for comparison. N = number of samples.

Species	Geographic area	N	$\delta^{13}\text{C}$ (‰) mean \pm SD	$\delta^{15}\text{N}$ (‰) mean \pm SD	References
<i>Delphinus delphis</i>	Bay of Biscay	26	-17.4 \pm 0.5	12.1 \pm 0.6	Chouvelon et al. under review
	Galicia (NW Spain)	5	-17.0 \pm 0.3	13.1 \pm 0.8	Bode et al. 2007
	Channel coast (NE Atlantic)	8	-16.5 \pm 0.5	12.1 \pm 0.4	Das et al. 2003b
	Irish coast (NE Atlantic)	14	-17.1 \pm 0.4	12.2 \pm 1.0	Das et al. 2003b
	NW Iberian Peninsula	114	-17.0 \pm 0.5	11.7 \pm 0.6	This study
<i>Phocoena phocoena</i>	Bay of Biscay	10	-17.0 \pm 0.4	13.0 \pm 0.7	Chouvelon et al. under review
	Channel coast (NE Atlantic)	4	-16.1 \pm 0.6	16.5 \pm 2.4	Das et al. 2003b
	Irish coast (NE Atlantic)	7	-16.5 \pm 0.7	14.1 \pm 1.6	Das et al. 2003b
	North Sea	46	-16.4 \pm 1.6	16.2 \pm 1.6	Das et al. 2003a
	NW Africa	42	-11.7 \pm 0.9	13.6 \pm 0.8	Pinela et al. 2010
	NW Iberian Peninsula	19	-16.5 \pm 0.7	13.0 \pm 1.2	This study
<i>Tursiops truncatus</i>	Bay of Biscay	7	-16.0 \pm 0.7	14.5 \pm 0.8	Chouvelon et al. under review
	Galicia (NW Spain)	37	-16.5 \pm 0.8	12.6 \pm 0.9	Fernandez et al. 2011
	NW Africa	60	-11.1 \pm 1.2	13.9 \pm 1.3	Pinela et al. 2010
	NW Iberian Peninsula	9	-16.5 \pm 0.8	12.6 \pm 0.9	This study
<i>Stenella coeruleoalba</i>	Bay of Biscay	11	-17.5 \pm 0.3	11.2 \pm 0.9	Chouvelon et al. under review
	Channel coast (NE Atlantic)	3	-16.7 \pm 0.4	11.0 \pm 1.8	Das et al. 2003b
	Irish coast (NE Atlantic)	3	-17.5 \pm 0.1	10.8 \pm 0.6	Das et al. 2003b
	NW Africa	1	-12.0	11.9	Pinela et al. 2010
	NW Iberian Peninsula	21	-17.6 \pm 0.5	10.8 \pm 0.7	This study
<i>Globicephala melas</i>	Bay of Biscay	16	-16.3 \pm 0.8	13.2 \pm 1.7	Chouvelon et al. under review
	NW Africa	2	-11.1 \pm 0.4	14.1 \pm 0.3	Pinela et al. 2010
	NW Iberian Peninsula	9	-16.4 \pm 0.5	12.2 \pm 0.6	This study

While $\delta^{13}\text{C}$ isotopic signatures were not significantly different between harbour porpoise, bottlenose dolphin and long-finned pilot whale, these species exhibited ^{13}C -enriched signatures when compared to common and striped dolphin (Fig. A8-2). This could be related to a more coastal distribution of the former or a greater use of benthic resources. Harbour porpoises in the NWIP appear to be genetically isolated from those in the rest of Europe (Fontaine et al. 2007) with the NWIP population being at risk due to high incidental mortality in fishing gear (ICES 2009). In this study, the harbour porpoise exhibited a mean $\delta^{13}\text{C}$ value of -16.5‰, which is extremely close to the values found for the same species in studies carried out in the French Channel coast (-16.1‰; Das et al. 2003a), Irish coast (-16.5‰; Das et al. 2003a) and North Sea (-16.4‰; Das et al. 2003b) (see Table A8-3). The most important prey of harbour porpoise in Galician waters are scads, pouting and garfish (*Belone belone*), whereas blue whiting is only the fourth most important species in their diet (Pierce et al. 2010; Santos et al. unpublished data). Pouting and scads in the present study exhibited mean $\delta^{13}\text{C}$ values of -15.3‰ and -17.0‰, respectively, consistent with their coastal distribution.

In the NWIP bottlenose dolphin is the species most frequently sighted from the coast (Pierce et al. 2010) but there are also sightings of this species in offshore waters. Two recent studies demonstrated the existence of ecological and genetic differences between the animals stranded in the southern part of the Galician Rías (originating from the proposed resident population in these coastal waters) and those stranded elsewhere (Fernandez et al. 2011ab). The high variability obtained in the $\delta^{13}\text{C}$ values of bottlenose dolphin in the present study could be explained by the presence in our samples of individuals from both the inshore and offshore populations, which would exploit different prey species. Santos et al. (2007) found blue whiting and hake to be the most important prey species of stranded and by-caught bottlenose dolphins in Galicia, both numerically and in terms of biomass. Both blue whiting and hake exhibited consistent $\delta^{13}\text{C}$ isotopic signatures, approximately 1‰ lower than bottlenose dolphins, harbour porpoises and long-finned pilot whales (Tables A8-1 and A8-2) although the latter cetacean species is mainly teuthophagous (González et al. 2004).

The ^{13}C -enrichment (-16.5‰) measured in long-finned pilot whale tissues suggests a coastal habitat or that the individuals were mainly foraging on more coastal and/or benthic species over the sampling period (2004-2008). Although pilot whales are considered an oceanic species (Mead and Brownell 2005), foraging over the shelf is believed to take place since coastal cephalopod species such as common and curled octopus have been recorded in the stomach (González et al. 1994, Santos unpublished data) and long-finned pilot whales are

sometimes sighted from the coast (Pierce et al. 2010). Similar results were obtained by Spitz et al. (2011) in the northern Bay of Biscay, who reported the diet of this species as being a unique combination of mesopelagic prey living in oceanic waters and of prey living at or close to the bottom in neritic waters. Fish and cephalopods species were more ^{13}C -enriched compared to marine plankton and considerable segregation between species was observed along the oceanic-coastal axis (Fig. A8-4). Sharpnose squid, umbrella squid (*Histioteuthis bonnellii*), elongate jewel squid (*Histioteuthis reversa*), *Teuthowenia megalops*, armed cranch squid (*Galiteuthis armata*) and silvery lightfish have the more ^{13}C -depleted signature due to their oceanic feeding habitat. Common octopus, common cuttlefish, anchovy and pouting showed the highest $\delta^{13}\text{C}$ signatures, consistent with their more coastal and/or benthic habitats. In the case of the hake, blue whiting, mackerel, scads, common squid and sardine, the $\delta^{13}\text{C}$ values are intermediate between the previously mentioned prey species (Fig. A8-4). Similar results were obtained by Fernández et al. (2011a) who analysed stable isotope signatures of 17 prey species of bottlenose dolphins in Galicia waters.

Trophic position and isotopic enrichment in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$

The primary utility of nitrogen isotope ratios for animal ecology lies on their relationship with trophic level (e.g., Hobson 1999). Most ecosystems appear to be limited to four to six trophic levels, with terrestrial chains generally being shorter (Briand and Cohen 1987) although there is no agreement on the factors constraining food web length. Some hypotheses that have not yet been fully explored involve dimensionality of habitats and species richness. Three-dimensional habitats may support longer chains than two-dimensional habitats (Briand and Cohen 1987), and chains should be longer in communities supporting a larger number of species (Bengtsson 1994). Previous studies have also indicated that pelagic food webs in upwelling areas are relatively short due to the prevalence of the plankton consumers (Ryther 1969) but in our case, the food web exhibited five trophic levels, with the toothed whales occupying the highest two levels, which is relatively long for an upwelling system.

By applying a combination of the ^{13}C and ^{15}N enrichment factors, one can approximate the TP at which marine mammals are feeding and identify the type of habitat (i.e., nearshore vs. offshore, benthic vs. pelagic) in which they are foraging. Several studies have calculated the diet-tissue fractionation of nitrogen isotopes in marine mammals. Hobson et al. (1996) estimated the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ TEFs of harp seals (*Pagophilus groenlandicus*) to be 2.8 and

2.3‰ in skin and 1.3 and 2.4‰ in muscle, respectively, compared to their prey. Das et al. (2003b) reported a mean $\delta^{15}\text{N}$ enrichment of 2.2‰ between harbour porpoise calves and adult female muscle, considering that pups “feed” on their mother during lactation. Fernandez et al. (2011a) reported a TEF of 2.0‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and of 3.3‰ for $\delta^{15}\text{N}$ in muscle between calves and females of bottlenose dolphins stranded in southern Galicia. Our results indicate overall TEF values of 0.8‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and 1.4‰ for $\delta^{15}\text{N}$ between the muscle of the five toothed whales and muscle of their main prey. These results are much lower than those obtained by previous studies but agree quite well with the results of Caut et al. (2010) who obtained TEF values from the muscle of captive killer whales (*Orcinus orca*) fed on controlled diets. Their TEF estimates were 0.3‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and 1.2‰ for $\delta^{15}\text{N}$. However our TEF calculus does not take into account the relative importance of the different species and included only those prey species that could be sampled. Moreover several sources of variation have been proven to affect the estimation of TEF (e.g., Vanderklift and Ponsard 2003). Those variables can be grouped at two different scales: 1) the individual scale, which includes the consumer class and species, the tissues and organs examined, the physiological stress and the form of nitrogen excretion; and 2) the diet scale, which includes the diet proteins quality, the type of food and the diet isotopic ratios (Vanderklift and Ponsard 2003). And because isotope models are very sensitive to changes ($> 1\%$) of TEFs (Ben-David and Schell 2001), the use of diet-dependent TEFs could significantly change the results and hence the interpretation. As an example, in our mixing models, applying lower TEFs the contribution of the main prey of common dolphin (blue whiting) changed from 91 to 50.8% (see Fig. A8-5).

Conclusions

Despite the frequent sightings of striped dolphin and common dolphin over the continental shelf of the NWIP, their $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures in muscle seem to indicate that they mainly feed in offshore waters although they probably target different prey species. Harbour porpoise, bottlenose dolphin and long-finned pilot whale appear to frequent the coastal (or inshore) habitats and to feed consequently on higher trophic level prey than either striped or common dolphin. However, dietary segregation probably also occurs between these three more coastal species (the first two are mainly piscivorous but may take different sizes of prey while long-finned pilot whales feed mainly on cephalopods). The low TEFs estimated in this study allows a food web with five trophic levels where the cetaceans studied occupy the top

positions (4 and 5). In addition, the SIAR analysis confirmed that common dolphin seem to feed mostly on important economical species such as blue whiting, sardine and mackerel in our study area (as shown by stomach contents analysis). This is also probably the case for the other four cetacean species and highlights the need to take this information into account when designing and implementing conservation measures such as Special Areas of Conservation (SACs). By exploiting the same resources as the fisheries, toothed whales in the NWIP could be at risk from both prey depletion and incidental capture in fishing gear (by-catch) and, indeed there is abundant evidence that by-catch of cetaceans is a common occurrence (López et al. 2002, 2003, Fernandez-Contreras et al. 2010). Interaction with fisheries and any other anthropogenic activity are a particular cause for concern in relation to the conservation of the recently described isolated Iberian harbour porpoise population and the resident bottlenose dolphin population inhabiting the southern Galician Rías.

Our work highlights the usefulness of stable carbon and nitrogen isotope ratios together with mixing models (albeit with some caveats concerning the latter) to gain understanding on the trophic relationships and the structure of marine food webs. Because the information on diet provided by the isotopic analysis is relatively coarse but potentially covers a long time-scale, while stomach contents analysis provides snapshots of detailed diet composition, the ideal approach involves a combination of these techniques. In combination, and together with the analysis of other ecological tracers, these methods will allow information on feeding ecology to be obtained over a range of different time spans.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the assistance of volunteers from the Galician (CEMMA) and Portuguese (SPVS) strandings network and members from the IEO (Instituto Español de Oceanografía) for facilitating the sampling during PELACUS cruises and members from the IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) for facilitating the sampling during EVHOE cruises. We also thank P. Richard and G. Guillou (UMR LIENSs) for technical support during stable isotope measurements and P. Brunello from the cellule Géomatique (UMR LIENSs) for providing the map of study area. Thanks to B. Simon-Bouhet (UMR LIENSs) for useful comments during data analysis and discussion. This work was supported in part by project ECOPEL (IEO) and through the PhD grant of P. Méndez-Fernandez from the Portuguese Foundation for Science and Technology of the Government of

Portugal (SFRH/BD/36766/2007). G. Pierce acknowledges support from the EU under the ANIMATE project (MEXC-CT-2006-042337).

References

- Abend AG, Smith TD (1995) Differences in ratios of stable isotopes of nitrogen in long-finned pilot whales (*Globicephala melas*) in the western and eastern North Atlantic. *ICES J Mar Sci* 52: 837-841.
- Bengtsson J (1994) Confounding variables and independent observations in comparative analyses of food webs. *Ecology* 75: 1282-1288.
- Ben-David M, Schell DM (2001) Mixing models in analyses of diet using multiple stable isotopes: a response. *Oecologia* 127: 180-184.
- Bode A, Carrera P, Lens S (2003) The pelagic foodweb in the upwelling ecosystem of Galicia (NW Spain) during spring: natural abundance of stable carbon and nitrogen isotopes. *ICES J Mar Sci* 60: 11-22.
- Bode A, Alvarez-Ossorio MT, Cunha ME, Garrido S, Peleteiro JB, Porteiro C, Valdes L, Varela M (2007) Stable nitrogen isotope studies of the pelagic food web on the Atlantic shelf of the Iberian Peninsula. *Progr Oceanogr* 74: 115-131.
- Borrell A, Aguilar A, Tornero V, Sequeira M, Fernandez G, Alis S (2006) Organochlorine compounds and stable isotopes indicate bottlenose dolphin subpopulation structure around the Iberian Peninsula. *Environ Int* 32: 516-523.
- Bowen WD (1997) Role of marine mammals in aquatic ecosystems. *Mar Ecol Prog Ser* 158: 267-274.
- Briand F, Cohen JE (1987) Environmental correlates of food chain length. *Science* 238: 956-960.
- Caut S, Laran S, Garcia-Hartmann E, Das K (2010) Stable isotopes of captive cetaceans (killer whales and bottlenose dolphins). *J Exp Biol* 214: 538-545.
- Chouvelon T, Spitz J, Caurant F, Mèndez-Fernandez P, Chappuis A, Laugier F, Le Goff E, Bustamante P (under review in *Prog Oceanogr*) Spatio-temporal variations in stable isotopic signatures revisit the use of $\delta^{15}\text{N}$ in meso-scale studies of marine food webs. The case of an open ecosystem: the Bay of Biscay (North-East Atlantic).
- Das K, Beans C, Holsbeek L, Mauger G, Berrow SD, Rogan E, Bouquegneau JM (2003a) Marine mammals from northeast Atlantic: relationship between their trophic status as determined by $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ measurements and their trace metal concentrations. *Mar Environ Res* 56: 349-365.
- Das K, Lepoint G, Leroy Y, Bouquegneau JM (2003b) Marine mammals from the southern North Sea: feeding ecology data from $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ measurements. *Mar Ecol Progr Ser* 263: 287-298.
- De Niro MJ, Epstein S (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 42: 495-506.
- De Niro MJ, Epstein S (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 45: 341-351.
- Desportes G (1985) La nutrition des odontocètes en Atlantique nordest (côtes Françaises - îles Feroë). PhD thesis, Université de Poitiers, France.
- Evans PGH (1987) The natural history of whales and dolphins, Academic Press, London.
- Fernandez R, Garcia-Tiscar S, Santos MB, López A, Martinez-Cedeira JA, Newton J, Pierce GJ (2011a) Stable isotope analysis in two sympatric populations of bottlenose

- dolphins *Tursiops truncatus*: evidence of resource partitioning? *Mar Biol* 158: 1043-1055.
- Fernandez R, Santos MB, Pierce GJ, Llavona A, López A, Silva MA, Ferreira M, Carrillo M, Cermeño P, Lens S, Piertney SB (2011b) Fine-scale genetic structure of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in Atlantic coastal waters of the Iberian Peninsula. *Hydrobiologia* 670: 111-125.
- Fernandez-Contreras MM, Cardona L, Lockyer CH, Aguilar A (2010) Incidental bycatch of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) by pair trawlers off northwestern Spain. *ICES J Mar Sci* 67: 1732-1738.
- Fontaine MC, Tolley KA, Siebert U, Gobert S, Lepoint G, Bouquegneau JM, Das K (2007) Long-term feeding ecology and habitat use in harbour porpoises *Phocoena phocoena* from Scandinavian waters inferred from trace elements and stable isotopes. *BMC Ecology* 7: 1-12.
- Fraga F (1981) Upwelling of the Galician coast, Northwest Spain. In: Richards F (ed), Coastal Upwelling. American Geophysical Union Washington, DC, pp 176-182.
- France RL (1995) Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: food web implications. *Mar Ecol Progr Ser* 124: 307-312.
- Fry B, Sherr EB (1984) $\delta^{13}\text{C}$ measurements as indicators of carbon flow in marine and freshwater ecosystems. *Contrib Mar Sci* 27: 13-47.
- González AF, López A, Guerra A, Barreiro A (1994) Diets of marine mammals stranded on the northwestern Spanish Atlantic coast with special reference to Cephalopoda. *Fish Res* 21: 179-191.
- Guichet R (1995) The diet of European hake (*Merluccius merluccius*) in the northern part of the Bay of Biscay. *ICES J Mar Sci* 52: 21-31.
- Hobson KA, Welch HE (1992) Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis. *Mar Ecol Progr Ser* 84: 9-18.
- Hobson KA, Schell DM, Renouf D, Elizabeth N (1996) Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissues of captive seals: implications for dietary reconstructions involving marine mammals. *Can J Fish Aquat Sci* 53: 528-533.
- Hobson KA (1999) Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120: 314-326.
- ICES (2009) Report of the Working Group on Marine Mammal Ecology (WGMME), Vigo, Spain. *ICES CM 2009/ACOM:21*, 129 p.
- Knoff A, Hohn A, Macko S (2008) Ontogenetic diet changes in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) reflected through stable isotopes. *Mar Mam Sci* 24: 128-137.
- Kuiken T (1996) Review of the criteria for the diagnosis of by-catch in cetaceans. In: Kuiken T (eds), Diagnosis of by-catch in cetaceans. Proceedings of the Second ECS Workshop on Cetacean Pathology, newsletter 26 (Special Issue), Saskatoon, Saskatchewan, Canada: European Cetacean Society, pp 38-43.
- Lesage V, Hammill MO, Kovacs KM (2001) Marine mammals and the community structure of the Estuary and Gulf of St Lawrence, Canada: evidence from stable isotope analysis. *Mar Ecol Progr Ser* 210: 203-221.
- López A, Santos MB, Pierce GJ, Gonzalez AF, Valeiras X, Guerra A (2002) Trends in strandings of cetaceans on the Galician coast, NW Spain, during the 1990s. *J Mar Biol Assoc UK* 82: 513-521.
- López A, Pierce GJ, Santos MB, Gracia J, Guerra A (2003) Fishery by-catches of marine mammals in Galician waters: results from on-board observations and an interview survey of fishermen. *Biol Conserv* 111: 25-40.
- López A, Pierce GJ, Valeiras X, Santos MB, Guerra A (2004) Distribution patterns of small cetaceans in Galician waters. *J Mar Biol Assoc UK* 84: 283-294.

- Mead JG, Brownell RL Jr (2005) Order Cetacea. In: Wilson DE, Reeder DM (eds), Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference, Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp 723-743.
- Mendes S, Newton J, Reid RJ, Zuur AF, Pierce GJ (2007) Stable carbon and nitrogen isotope ratio profiling of sperm whale teeth reveals ontogenetic movements and trophic ecology. *Oecologia* 151: 605-615.
- Meotti C, Podestà M (1997) Stomach contents of striped dolphins, *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833), from the Western Ligurian, Sea (Cetacea, Delphinidae). *Atti della Società Italiana di Scienze Naturali e del Museo Civico di Storia Naturale di Milano* 137: 5-15.
- Miyazaki N, Kusaka T, Nishiwaki M (1973) Food of *Stenella coeruleoalba*. *Scientific Reports of the Whales Research Institute* 25: 265-275.
- Phillips DL, Gregg JW (2003) Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources. *Oecologia* 136: 261-269.
- Pierce GJ, Boyle PR (1991) A review of methods for diet analysis in piscivorous marine mammals. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 29: 409-486.
- Pierce DGJ, Caldas M, Cedeira J, Santos MB, Llavona A, Covelo P, Martinez G, Torres J, Sacau M, López A (2010) Trends in cetacean sightings along the Galician coast, north-west Spain, 2003-2007, and inferences about cetacean habitat preferences. *J Mar Biol Assoc UK* 90: 1547-1560.
- Pinela AM, Borrell A, Cardona L, Aguilar A (2010) Stable isotope analysis reveals habitat partitioning among marine mammals off the NW African coast and unique trophic niches for two globally threatened species. *Mar Ecol Progr Ser* 416: 295-306.
- R Development Core Team (2008) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, www.R-project.org.
- Ringelstein J, Pusineri C, Hassani S, Meynier L, Nicolas R, Ridoux V (2006) Food and feeding ecology of the striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*, in the oceanic waters of the north-east Atlantic. *J Mar Biol Assoc UK* 86: 909-918.
- Ridoux V, Lafontaine L, Bustamante P, Caurant F, Dabin W, Delcroix C, Hassani S, Meynier L, Pereira da Silva V, Simonin S, Robert M, Spitz J, Van Canneyt O (2004) The impact of the “Erika” oil spill on pelagic and coastal marine mammals: combining demographic, ecological, trace metals and biomarker evidences. *Aquat Living Resour* 17: 379-387.
- Ryther JH (1969) Photosynthesis and fish production in the sea. *Science* 166: 72-76.
- Santos MB, Learmonth JA, Pierce GJ, Moffat CF, Rogan E, Murphy S, Ridoux V, Meynier L, Lahaye V, Pusineri C, Spitz J (2004a) Dietary studies on small cetaceans in the NE Atlantic using stomach contents and fatty acid analyses, BIOCET. University of Aberdeen, University College, Université de La Rochelle, CRMM, Aberdeen, 106 p.
- Santos MB, Pierce GJ, López A, Martínez JA, Fernández MT, Ieno E, Mente E, Porteiro C, Carrera P, Meixide M (2004b) Variability in the diet of common dolphins (*Delphinus delphis*) in Galician waters 1991-2003 and relationship with prey abundance. *ICES CM* 2004/ Q:09.
- Santos MB, Fernandez R, López A, Martinez JA, Pierce GJ (2007) Variability in the diet of bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, in Galician waters, north-western Spain, 1990-2005. *J Mar Biol Assoc UK* 87: 231-241.
- Spitz J, Richard E, Meynier L, Pusineri C, Ridoux V (2006) Dietary plasticity of the oceanic striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*, in the neritic waters of the Bay of Biscay. *J Sea Res* 55: 309-320.

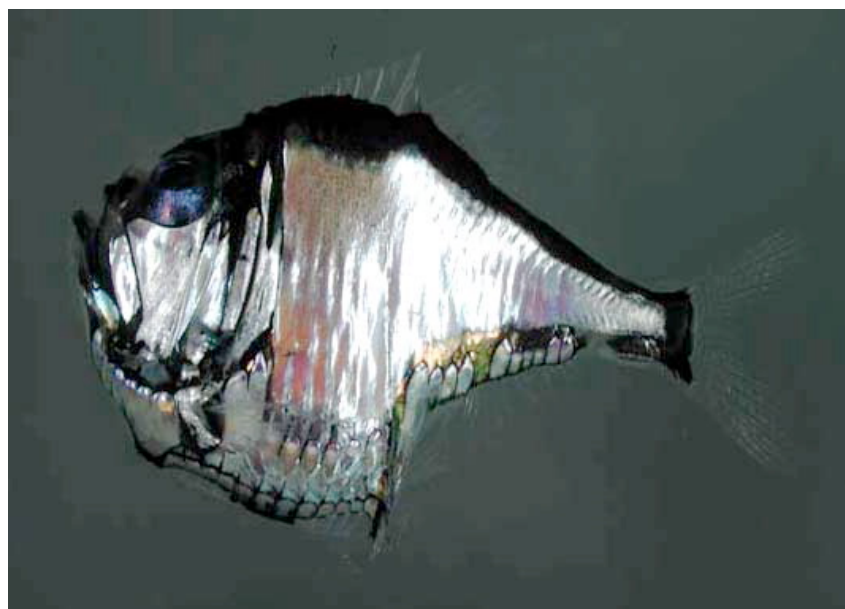
- Spitz J, Cherel Y, Bertin S, Kiszka J, Dewez A, Ridoux V (2011) Prey preferences among the community of deep-diving odontocetes from the Bay of Biscay, Northeast Atlantic. *Deep-Sea Res PT I* 58: 273-282.
- Spyrakos E, Santos-Diniz TC, Martinez-Iglesias G, Torres-Palenzuela JM, Pierce GJ (2011) Spatio-temporal patterns of marine mammal distribution in coastal waters of Galicia, NW Spain. *Hydrobiologia* 670: 87-109.
- Sorbe JC (1980) Régime alimentaire de *Micromesistius poutassou* (Risso, 1826) dans le sud du Golfe de Gascogne. Ifremer. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes (0035-2276) (ISTPM)* 44: 245-255.
- Vander Zanden MJ, Rasmussen JB (2001) Variation in $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ trophic fractionation: Implications for aquatic food web studies. *Limn Oceanogr* 46: 2061-2066.
- Vanderklift M, Ponsard S (2003) Sources of variation in consumer diet $\delta^{15}\text{N}$ enrichment: a meta analysis. *Oecologia* 136: 169-182.

Annexe 9

Enhanced bioaccumulation of mercury in deep-sea fauna from the Bay of Biscay (North-East Atlantic) revealed by stable isotope analysis

**Chouvelon T, Spitz J, Caurant F, Mèndez Fernandez P, Autier J, Lassus-
Débat A, Bustamante P**

Soumise à Deep-Sea Research Part I



Abstract

The Bay of Biscay (North-East Atlantic) is an open marine ecosystem of particular concern in current European environmental policies. Indeed, it supports both a high biological diversity and numerous anthropogenic activities such as important fisheries. For the first time, stable isotope analyses of carbon and nitrogen (SIA) and analysis of total mercury (T-Hg) concentrations in the muscle (edible flesh) were performed on adult stages of a wide range of species (i.e., 120 species), from various taxa and from various habitats of this ecosystem. Concentrations of this non-essential metal, toxic to all living organisms, ranged from 39 to 5074 ng.g⁻¹ dry weight. Calculations of species' trophic position (TP) through SIA revealed a limited effect of TP in explaining Hg bioaccumulation by high trophic level consumers in particular. On the contrary, our results suggest an important role of habitat and/or feeding zone, which strongly influence Hg bioaccumulation. Deep-sea fish species effectively presented the highest Hg concentrations. Possible interactions between biological factors (e.g., age of deep-sea organisms) and bioavailability of the metal in the deep-sea environment are discussed to explain such enhanced bioaccumulation of Hg by deep-sea fauna in the Bay of Biscay. This study also highlights a potential risk for human health when frequently consuming deep-sea fish.

Keywords

Metal, stable isotopes, trophic transfer, fish, mollusc, crustaceans, marine environment.

Introduction

Maintaining both a sustainable exploitation of natural marine resources together with maintaining the integrity (i.e., structure and functioning) of marine ecosystems is the challenge that human societies currently face, and that they should meet through ecosystem-based management (Larkin 1996, Curtin and Prellezo 2010). To implement an ecosystem-based management for marine European ecosystems, the European commission recently adopted the Marine Strategy Framework Directive (MSFD). Precisely, the MSFD proposes the use of 11 qualitative descriptors to define and to monitor the "good environmental status" of ecosystems of concern, by the year 2020 at the latest, among which are the descriptor "food webs", the descriptor "contaminants", or the descriptor "contaminants in fish and seafood for human consumption" (European Commission 2008, 2010).

Trophic linkages between organisms of a food web effectively take a central place in the general structure and functioning of marine ecosystems (Cury et al. 2003). In the last decades, analysis of carbon (C) and nitrogen (N) stable isotopes ratios (SIA) in consumers' tissues ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) have proved to be a powerful tool to describe the trophic ecology and trophic relationships within marine organisms at the ecosystem scale. This method represents an alternative or complementary tool to the traditional methods of dietary studies (e.g., analysis of guts or stomach contents) (Michener and Kaufman 2007). Indeed, the use of these ecological tracers is principally based on the fact that 1) primary producers of an ecosystem generally present different isotopic compositions, due to the different nutrients fixed and the biochemical cycle they use for photosynthesis (Peterson and Fry 1987, France 1995); 2) the enrichment in ^{13}C and ^{15}N between a source and its consumer (also called Trophic Enrichment Factor, TEF) is relatively predictable. It is less important in C ($\leq 1\text{‰}$) than in N (3.4‰ in average) (De Niro and Epstein 1978, 1981, Post 2002a). Hence, $\delta^{13}\text{C}$ values are generally used as a tracer of the habitat or the feeding zone of organisms (Hobson 1999, France 1995). $\delta^{15}\text{N}$ values are mainly used as an indicator of the trophic position (TP) of organisms, and have been widely used to calculate the absolute trophic level of organisms in various ecosystems (Hobson and Welch 1992, Lesage et al. 2001, Le Loc'h et al. 2008). Furthermore, the knowledge of marine food webs' structure, through food-chain length for example (Post 2002b, Vander Zander and Fetzer 2007), is one key aspect for understanding the transfer of certain contaminants such as mercury (Hg) in those food webs (Wang 2002). Overall, SIA and derived TP and/or feeding zones of organisms may thus help to investigate the transfer of Hg in food webs of interest (e.g., Vander Zanden and Rasmussen 1996, Lavoie et al. 2010).

Hg is a metal released in the environment from both natural and anthropogenic sources (e.g., volcanism and waste incineration for Hg), reaching the ocean through river inputs and atmospheric depositions (Cossa et al. 1990). Trophic transfer is then the main pathway for the intake of Hg by organisms; furthermore, this metal is particularly known to bioaccumulate in higher trophic level consumers (Eisler 1987, Cossa et al. 1990), and to biomagnify along food chains (Gray 2002). However, among metals, Hg has no known biological function (i.e., non-essential element), and is toxic to all living organisms including human consumers (Eisler 1987, Boening 2000). In fact, microorganisms methylate Hg in marine sediments from the shelf (Bacci 1989, Fitzgerald et al. 2007). The production of methyl-Hg may be also enhanced in sub-thermocline low oxygen waters, in which the organic form dimethyl-Hg becomes the dominant form among the organic forms of Hg in the environment (Mason et al. 1995). However, dimethyl-Hg is a very unstable form and the principal source for monomethyl-Hg. This last organic form of Hg is finally the most stable form, the most bioavailable and thus the more bioaccumulated by marine organisms (Fitzgerald et al. 2007). It is also the most toxic form of Hg (Boening 2000). In this way, some authors have already suggested an enhanced bioaccumulation of Hg in biota from mesopelagic and deep-water environments (Monteiro et al. 1996, Thompson et al. 1998, Choy et al. 2009). Seabirds feeding on mesopelagic fish thus exhibit higher Hg concentrations in their feathers than epipelagic feeders (Thompson et al. 1998, Ochoa-Acuña et al. 2002).

The Bay of Biscay is a marine environment of particular concern in current European environmental policies. It is a large bay opened on the North-East Atlantic Ocean, located from 1 to 10°W and from 43 to 48°N (Fig. A9-1). Along the French coast, the continental shelf covers over 220 000 km², extends more than 200 km offshore in the north of the Bay and only 10 km in the south. Two main rivers plumes (i.e., Loire and Gironde) influence its hydrological structure (Planque et al. 2004, Puillat et al. 2004). The Bay of Biscay also presents a vast oceanic domain and a continental slope indented by numerous canyons (Koutsikopoulos and Le Cann 1996). Overall, the Bay of Biscay supports a rich fauna and is subjected to numerous anthropogenic activities such as important fisheries (Lorance et al. 2009). Nonetheless, in its last report, the OSPAR commission particularly underlined the general lack of supervision in the deep waters of the Bay of Biscay (i.e., above 200 m depth and so beyond the shelf edge). Moreover, very few studies have investigated the level of contamination of fish and seafood from the Bay of Biscay (OSPAR 2010, Borja et al. 2011),

or have mainly focused on few, coastal and/or mollusc species in the case of Hg (e.g., Cossa et al. 1990 and references associated, Claisse et al. 2001, Bustamante et al. 2006).

In this context, the specific objectives of this study were to 1) first calculate the TP of a wide variety of organisms from the different food webs of the Bay of Biscay through SIA; 2) secondly evaluate the transfer and/or the behaviour of Hg in those food webs, with the hypothesis that oceanic and/or deep-sea organisms may be more contaminated than neritic organisms due to a greater exposure to bioavailable Hg (i.e., monomethyl-Hg).

Materials and methods

Sampling

In this study, more than 1000 individuals were sampled, belonging to 120 species. Those species covered a wide range of representative taxa of the different Bay of Biscay food webs components, including both cartilaginous and bony fish, molluscs, and crustaceans (Table A9-1). All organisms were collected during the EVHOE groundfish surveys conducted by the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), from the continental shelf to the shelf-edge of the French part of the Bay of Biscay in autumns 2001 to 2010 (Fig. A9-1). During these surveys, bottom and pelagic trawls were also performed in the canyons indenting the continental slope to specifically collect oceanic and deep-sea organisms.

As many species switch their diet during the ontogenesis with increasing size (Karpouzi and Stergiou 2003, Chauvelon et al. 2011), the different species have to be compared at an equivalent stage of their life history (Jennings et al. 2001). Moreover, age of individuals is one of the most influent factors for Hg bioaccumulation in the muscle of marine organisms (e.g., Monteiro and Lopes 1990, Rossi et al. 1993, Cronin et al. 1998). Thus, only adult individuals, and a relatively narrow range of sizes within each species were sampled for most of the species analysed (Chauvelon et al. 2011). When several size classes were available for a species, they were treated separately (see Table A9-1).

Each individual was measured and a piece of muscle was taken for SIA and Hg analyses. Indeed, muscle is the reference tissue in food web studies inferred from SIA (Hobson and Welch 1992, Pinnegar and Polunin 1999). It allows comparisons of isotopic signatures

between individuals and taxa, minimizing inter-tissue differences in terms of biochemical and physiological properties like protein turnover rate and metabolic routing (Cherel et al. 2005). Concerning Hg, this metal likely bind with sulphhydryl groups of muscular proteins in the muscle (Bloom 1992, Bustamante et al. 2006). So, Hg concentrations in the muscle were thought to reflect metal exposure on the relatively long term, in comparison with others soft tissues such as the liver of fish, or the digestive gland of cephalopods (Reinfelder et al. 1998, Lacoue-Labarthe et al. 2009). After collection, muscle samples were immediately placed in individual plastic bags, frozen at -20°C and freeze-dried. Freeze-dried tissues were finally grounded into a fine powder and stored in individual plastic vials until further analyses.

Samples preparation, SIA and Hg analyses

For SIA, lipids were extracted from muscle subsamples using cyclohexane, as described by Chouvelon et al. (2011), because they are highly depleted in ^{13}C relative to other tissue components (De Niro and Epstein 1977). 0.40 ± 0.05 mg subsamples of lipid-free powder were finally weighed in tin cups for SIA. SIA were performed with an elemental analyser coupled to an Isoprime (Micromass) continuous-flow isotope-ratio mass spectrometer (CF IR-MS). The results presented in this study are given in the usual δ notation relative to the deviation from standards (Pee Dee Belemnite for $\delta^{13}\text{C}$ and atmospheric nitrogen for $\delta^{15}\text{N}$), in parts per thousand (‰). Based on replicate measurements of internal laboratory standards, experimental precision is of ± 0.15 and ± 0.20 ‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively. However, most of isotopic results are not detailed here but in Chouvelon et al. (under review). Indeed, as one of the specific objectives of this study was to calculate TP from SIA, only values of stable isotopes-derived TP are presented for all species (see calculation below).

Total Hg analyses were carried out with an Advanced Mercury Analyser (ALTEC AMA 254) as described in Bustamante et al. (2006) on at least 2 homogenized dry muscle tissue subsamples (untreated powder) for each individual. Hg analyses were run according to a thorough quality control program including the analysis of a certified reference material (CRM) TORT-2 (lobster hepatopancreas; National Research Council, Canada [NRCC]). CRM aliquots were treated and analysed in the same conditions as the samples. CRM results were in good agreement with the certified values, with an average recovery rate of 95%. The detection limit was 5 ng.g^{-1} dry weight (dwt). All Hg concentrations in tissues reported below are expressed in ng.g^{-1} dwt.

Data treatment

Definition of species' general distribution

The spatial distribution (that we assume to generally correspond to the habitat and/or the feeding zone) of each species analysed was defined both on the "horizontal" (i.e., from coastal to oceanic or deep sea areas) and "vertical" axis (i.e., benthic, benthopelagic or pelagic). On the horizontal axis of the distribution, species were actually classified following the depth layer of their sampling. This depth layer corresponds to the average depth under the research vessel at the end of species' individuals trawling. The depth layer A was thus attributed to species whose average depth sampling of individuals was ≤ 30 m; B: from 31 to 120 m depth; C: 121-200 m; D: 201-600 m; E: > 600 m (Fig. A9-1). On the vertical axis of distribution, species were first classified following general published literature for most species (Quéro 2003, Palomares and Pauly 2010). Finally, species' general distribution was refined following specific shipboard surveys data in the area for fish species in particular (Lorance et al. 2000, Trenkel et al. 2009) (Table A9-1).

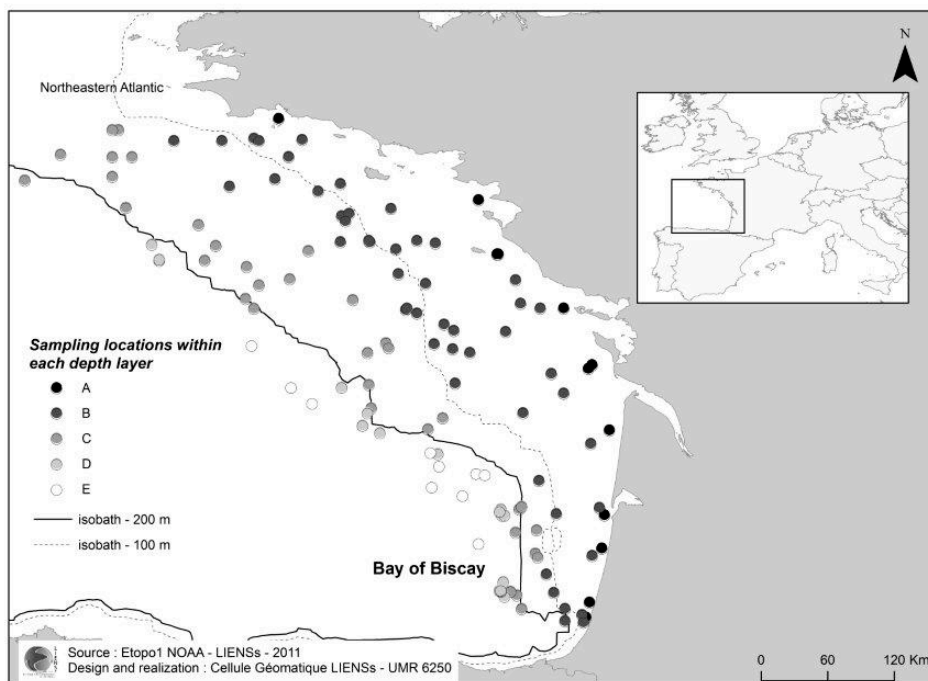


Figure A9-1: Map of the study area and sampling locations in Bay of Biscay (North-East Atlantic). The depth layer corresponding to each sampling location is indicated (i.e., depth under the research vessel at the end of species' individuals trawling). A: ≤ 30 m; B: 31-120 m; C: 121-200 m; D: 201-600 m; E: > 600 m.

Table A9-1: Characteristics of studied species from the Bay of Biscay: distribution, average trawling depth, number of individuals (N), size of individuals, stable isotopes-derived trophic position (TP), and Hg concentrations in the muscle. The mean TP of each major taxa considered in also given (in bold). Species are classified by taxa, then by depth layer, then vertical distribution in the water column, then TP, finally by increasing Hg concentrations (see detailed grouping strategy in Materials and Methods). SD = Standard Deviation. N= number of individuals.

Taxa and species	N	Depth layer ^a	Depth (m) ^b	Vertical distribution ^c	Size (mm) ^d	TP ^e	Hg concentration in the muscle (ng.g ⁻¹ dwt)
			Mean		Mean ± SD		Mean ± SD (min-max)
FISH							
Actinopterygians							
<i>Dicentrarchus labrax</i> (≤ 400 mm TL)	6	A	29	bp	373 ± 23	3.6	672 ± 168 (398 - 841)
<i>Labrus bergylta</i>	3	A	20	bp	507 ± 25	4.3	1001 ± 192 (865 - 1220)
<i>Engraulis encrasicolus</i>	5	A	25	p	124 ± 11	3.9	178 ± 55 (123 - 268)
<i>Sprattus sprattus</i>	5	A	28	p	86 ± 5	4.0	59 ± 12 (50 - 80)
<i>Atherina presbyter</i>	5	A	25	p	110 ± 10	4.2	189 ± 69 (116 - 276)
<i>Solea solea</i>	27	B	53	b	316 ± 59	3.3	556 ± 602 (92 - 1739)
<i>Dicologlossa cuneata</i>	5	B	60	b	188 ± 16	3.8	427 ± 201 (197 - 712)
<i>Microchirus variegatus</i>	5	B	47	b	162 ± 8	3.8	1152 ± 150 (996 - 1340)
<i>Callionymus lyra</i>	5	B	109	bp	222 ± 16	3.5	450 ± 68 (378 - 551)
<i>Trachinus draco</i>	9	B	39	bp	236 ± 21	3.8	276 ± 160 (101 - 636)
<i>Argentina sphyraena</i>	5	B	109	bp	194 ± 11	3.8	396 ± 261 (208 - 842)
<i>Trisopterus minutus</i>	25	B	104	bp	183 ± 14	3.9	469 ± 414 (146 - 1988)
<i>Echiichthys vipera</i>	5	B	47	bp	108 ± 8	3.9	523 ± 169 (326 - 720)
<i>Eutrigla gurnardus</i>	18	B	114	bp	311 ± 62	3.9	849 ± 512 (301 - 2277)
<i>Lesueurigobius friesii</i>	5	B	60	bp	76 ± 5	4.0	125 ± 27 (83 - 155)
<i>Gadiculus argenteus</i>	5	B	47	bp	110 ± 7	4.0	259 ± 33 (215 - 296)
<i>Boops boops</i>	5	B	99	bp	262 ± 24	4.0	306 ± 101 (145 - 387)
<i>Trisopterus luscus</i>	14	B	63	bp	180 ± 30	4.0	389 ± 215 (161 - 943)
<i>Dicentrarchus punctatus</i>	4	B	36	bp	357 ± 15	4.0	1140 ± 45 (1081 - 1187)
<i>Pomatoschistus minutus</i>	5	B	60	bp	56 ± 5	4.1	65 ± 6 (55 - 71)
<i>Cepola macrophthalma</i>	5	B	109	bp	554 ± 18	4.1	162 ± 54 (104 - 245)
<i>Merlangius merlangus</i>	15	B	55	bp	423 ± 36	4.1	680 ± 177 (379 - 1065)
<i>Zeus faber</i>	5	B	116	bp	550 ± 19	4.1	2031 ± 485 (1426 - 2783)
<i>Conger conger</i>	5	B	67	bp	1278 ± 88	4.2	1638 ± 988 (753 - 3310)
<i>Dicentrarchus labrax</i> (>400 mm TL)	5	B	98	bp	668 ± 24	4.2	2725 ± 763 (1654 - 3701)
<i>Spondyliosoma cantharus</i>	7	B	44	bp	254 ± 34	4.3	325 ± 143 (182 - 554)
<i>Ammodytes tobianus</i>	5	B	58	p	290 ± 16	3.7	124 ± 26 (102 - 162)
<i>Scomber japonicus</i>	5	B	43	p	338 ± 19	3.7	198 ± 37 (142 - 237)
<i>Trachurus trachurus</i>	39	B	106	p	284 ± 61	4.0	461 ± 299 (115 - 1112)
<i>Hyperoplus lanceolatus</i>	5	B	58	p	340 ± 14	4.0	710 ± 70 (598 - 774)
<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	5	C	127	b	432 ± 24	3.9	655 ± 569 (252 - 1661)
<i>Chelidonichthys lucerna</i>	5	C	137	bp	554 ± 63	3.8	1180 ± 191 (964 - 1411)
<i>Aspitrigla cuculus</i>	5	C	131	bp	254 ± 11	3.9	486 ± 100 (354 - 627)
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	5	C	163	bp	532 ± 44	3.9	522 ± 392 (194 - 1180)
<i>Lophius piscatorius</i> (400-700 mm TL)	18	C	193	bp	570 ± 72	4.1	807 ± 209 (339 - 1230)
<i>Merluccius merluccius</i> (350-550 mm TL)	21	C	140	bp	466 ± 56	4.3	346 ± 199 (120 - 981)
<i>Merluccius merluccius</i> (>550 mm TL)	12	C	127	bp	632 ± 59	4.3	941 ± 622 (356 - 1954)
<i>Lophius budegassa</i>	5	C	136	bp	746 ± 88	4.3	1809 ± 983 (746 - 3410)
<i>Scorpaena scrofa</i>	4	C	128	bp	400 ± 45	4.3	3223 ± 790 (2552 - 4280)
<i>Sardina pilchardus</i>	25	C	123	p	209 ± 20	3.8	174 ± 81 (62 - 355)
<i>Scomber scombrus</i>	3	C	150	p	300 ± 10	4.0	201 ± 42 (154 - 235)
<i>Bathysolea profundicola</i>	5	D	333	b	192 ± 13	3.9	2465 ± 679 (1377 - 3087)
<i>Argentina silus</i>	5	D	492	bp	352 ± 27	3.6	797 ± 221 (495 - 1073)
<i>Micromesistius poutassou</i> (>300 mm TL)	5	D	246	bp	320 ± 7	3.8	594 ± 170 (354 - 771)
<i>Micromesistius poutassou</i> (<300 mm TL)	34	D	260	bp	202 ± 24	3.9	148 ± 91 (53 - 454)
<i>Malacocephalus laevis</i>	5	D	337	bp	386 ± 21	3.9	587 ± 64 (502 - 665)
<i>Beryx decadactylus</i>	6	D	509	bp	348 ± 58	4.0	886 ± 139 (659 - 1056)
<i>Phycis blennoides</i>	5	D	259	bp	510 ± 66	4.0	959 ± 719 (362 - 1795)
<i>Caelorhynchus caelorhynchus</i>	5	D	461	bp	278 ± 19	4.1	906 ± 159 (726 - 1106)

<i>Molva macrophtalma</i>	5	D	492	bp	646 ± 50	4.1	968 ± 325 (572 - 1395)
<i>Helicolenus dactylopterus</i>	5	D	492	bp	370 ± 22	4.1	4769 ± 839 (3889 - 6128)
<i>Lophius piscatorius (>700 mm TL)</i>	12	D	313	bp	831 ± 107	4.2	1403 ± 496 (624 - 2460)
<i>Trachyrincus scabrur</i>	5	D	536	bp	408 ± 35	4.2	3525 ± 288 (3206 - 3799)
<i>Polymetme thaeocoryla</i>	5	D	506	bp	134 ± 7	4.4	350 ± 55 (272 - 406)
<i>Molva molva</i>	4	D	203	bp	812 ± 112	4.6	1202 ± 565 (698 - 1864)
<i>Notoscopeus kroeyeri</i>	4	D	496	p	120 ± 9	4.1	1013 ± 387 (786 - 1591)
<i>Alepocephalus bairdii</i>	5	E	1209	bp	684 ± 65	3.7	432 ± 154 (215 - 610)
<i>Notacanthus bonaparte</i>	5	E	1010	bp	326 ± 73	3.7	675 ± 111 (558 - 843)
<i>Mora moro</i>	5	E	1089	bp	568 ± 32	4.0	3252 ± 767 (2557 - 4565)
<i>Coryphaenoides rupestris</i>	4	E	1142	bp	690 ± 60	4.1	1980 ± 958 (1146 - 3137)
<i>Nezumia aequalis</i>	5	E	1033	bp	286 ± 9	4.1	2481 ± 906 (1586 - 3553)
<i>Lepidion eques</i>	5	E	1177	bp	362 ± 16	4.1	3128 ± 737 (1895 - 3738)
<i>Alepocephalus rostratus</i>	5	E	1118	bp	560 ± 20	4.2	2256 ± 748 (1331 - 2968)
<i>Normichthys operosa</i>	5	E	2250	bp	141 ± 9	4.4	418 ± 139 (274 - 593)
<i>Trachyscorpia cristulata</i>	5	E	1118	bp	388 ± 48	4.4	2400 ± 798 (1528 - 3589)
<i>Hoplostethus atlanticus</i>	5	E	1153	bp	514 ± 21	4.5	3014 ± 696 (1970 - 3630)
<i>Bathypterois dubius</i>	5	E	1147	bp	162 ± 4	4.6	658 ± 296 (306 - 921)
<i>Benthoosema glaciale</i>	5	E	800	p	39 ± 2	3.6	130 ± 25 (94 - 162)
<i>Xenodermichthys copei</i>	6	E	1129	p	142 ± 13	3.7	259 ± 44 (200 - 327)
<i>Lampanyctus crocodilus</i>	5	E	2250	p	115 ± 7	3.8	310 ± 59 (229 - 376)
<i>Serrivomer beanii</i>	5	E	1033	p	724 ± 34	3.8	482 ± 180 (383 - 801)
<i>Arctozenus risso</i>	5	E	1316	p	167 ± 11	3.9	61 ± 21 (42 - 96)
<i>Ceratoscopolus maderensis</i>	5	E	1316	p	67 ± 4	3.9	150 ± 78 (76 - 262)
<i>Argyropelecus olfersii</i>	5	E	1316	p	79 ± 4	3.9	269 ± 64 (176 - 329)
<i>Bathylagus greyae</i>	5	E	1980	p	125 ± 6	4.1	74 ± 69 (35 - 197)
<i>Myctophum punctatum</i>	5	E	1316	p	71 ± 6	4.1	78 ± 24 (63 - 121)
<i>Stomias boa</i>	5	E	1033	p	278 ± 25	4.1	559 ± 275 (232 - 972)
<i>Aphanopus carbo</i>	5	E	1033	p	996 ± 55	4.2	2208 ± 595 (1464 - 3061)

4.0

Chondrichthyans

<i>Raja microocellata</i>	5	A	21	b	694 ± 99	3.6	169 ± 40 (128 - 217)
<i>Torpedo marmorata</i>	3	B	33	b	383 ± 81	5.0	151 ± 99 (83 - 265)
<i>Mustelus asterias</i>	11	B	112	bp	874 ± 91	3.8	1710 ± 451 (1065 - 2529)
<i>Mustelus mustelus</i>	4	B	108	bp	935 ± 163	4.0	1997 ± 1138 (1095 - 3598)
<i>Raja clavata</i>	11	C	128	b	735 ± 111	3.7	1021 ± 816 (524 - 3147)
<i>Leucoraja naevus</i>	10	C	126	b	604 ± 28	3.8	569 ± 239 (396 - 1205)
<i>Scyliorhinus canicula</i>	10	C	126	bp	579 ± 31	4.5	2123 ± 1186 (935 - 4630)
<i>Galeus melastomus</i>	12	D	289	bp	606 ± 75	4.4	2195 ± 1378 (1038 - 5115)
<i>Etmopterus spinax</i>	10	D	492	bp	422 ± 25	4.7	5074 ± 1403 (3426 - 7473)
<i>Hydrolagus mirabilis</i>	5	E	1116	bp	420 ± 12	3.7	2188 ± 419 (1797 - 2678)
<i>Chimaera monstrosa</i>	16	E	637	bp	589 ± 170	4.1	1718 ± 1044 (344 - 3960)
<i>Centroselachus crepidater</i>	5	E	1147	bp	678 ± 36	4.3	2329 ± 1065 (1150 - 3652)
<i>Deania calcea</i>	10	E	1033	bp	934 ± 63	4.3	3753 ± 883 (2252 - 4902)
<i>Deania profundorum</i>	4	E	1033	bp	445 ± 87	4.5	502 ± 232 (155 - 646)

4.2

CRUSTACEANS

<i>Alpheus glaber</i>	5	B	60	b	43 ± 1	2.6	150 ± 41 (113 - 216)
<i>Nephrops norvegicus</i>	5	B	60	b	147 ± 11	2.8	624 ± 71 (546 - 692)
<i>Crangon crangon</i>	5	B	40	b	53 ± 4	2.9	202 ± 133 (92 - 418)
<i>Munida intermedia</i>	5	B	47	b	58 ± 12	3.0	202 ± 65 (152 - 312)
<i>Crangon allmanni</i>	5	B	60	b	54 ± 5	3.0	210 ± 25 (177 - 246)
<i>Goneplax rhomboides</i>	5	B	60	b	34 ± 2	3.0	256 ± 33 (205 - 292)
<i>Liocarcinus depurator</i>	5	B	60	b	48 ± 2	3.0	480 ± 239 (308 - 900)
<i>Polybius holsatus</i>	5	B	60	b	42 ± 3	3.0	540 ± 309 (204 - 900)
<i>Cancer pagurus</i>	11	C	155	b	197 ± 9	2.9	2048 ± 917 (736 - 3663)
<i>Plesionika heterocarpus</i>	5	D	221	b	82 ± 1	2.9	551 ± 132 (444 - 769)
<i>Systellaspis debilis</i>	5	E	1860	p	56 ± 2	2.9	483 ± 128 (328 - 640)
<i>Ephyrina hoskynii</i>	5	E	1860	p	98 ± 3	3.1	320 ± 182 (127 - 621)
<i>Sergia robusta</i>	5	E	1316	p	75 ± 5	3.4	429 ± 166 (236 - 696)
<i>Meganyctiphanes norvegica</i>	5x3 ^c	E	1873	p	8 ± 0	3.6	172 ± 14 (160 - 193)
<i>Gnathophausia ingens</i>	5	E	2250	p	130 ± 12	4.1	2986 ± 2599 (838 - 7179)

3.1

MOLLUSCS**Cephalopods**

<i>Octopus vulgaris</i>	5	B	39	b	129 ± 40	3.1	313 ± 162 (181 - 592)
<i>Sepia officinalis</i>	42	B	35	bp	167 ± 52	3.6	263 ± 102 (108 - 633)
<i>Loligo vulgaris</i>	36	B	30	bp	179 ± 56	3.9	149 ± 32 (72 - 200)
<i>Eledone cirrhosa</i>	28	C	134	b	87 ± 23	3.3	351 ± 98 (193 - 632)
<i>Loligo forbesi</i>	38	C	195	bp	290 ± 99	4.0	260 ± 119 (99 - 547)
<i>Bathypolypus sponsalis</i>	5	D	494	b	67 ± 6	3.4	250 ± 68 (153 - 333)
<i>Octopus salutii</i>	5	D	252	b	82 ± 15	3.5	287 ± 87 (200 - 394)
<i>Todarodes sagittatus</i>	22	D	442	p	260 ± 42	3.9	324 ± 380 (139 - 1998)
<i>Opisthoteuthis agassizii</i>	3	E	1081	b	310 ± 73	3.9	156 ± 23 (130 - 175)
<i>Teuthowenia megalops</i>	4	E	1939	p	134 ± 12	3.2	150 ± 33 (111 - 192)
<i>Galiteuthis armata</i>	3	E	1844	p	252 ± 91	3.6	252 ± 41 (206 - 284)
<i>Histioteuthis reversa</i>	7	E	2076	p	54 ± 22	4.6	219 ± 87 (132 - 320)

3.7**Bivalves**

<i>Aequipecten opercularis</i>	5	A	29	b (SF ^f)	61 ± 1	2.2	39 ± 9 (27 - 49)
<i>Pecten maximus</i>	8	B	40	b (SF ^f)	115 ± 9	2.0	44 ± 13 (27 - 67)
<i>P. maximus</i>	3	C	171	b (SF ^f)	113 ± 6	1.9	103 ± 11 (90 - 113)

2.0**Gastropods**

<i>Buccinum undatum</i>	5	A	29	b	76 ± 4	2.2	130 ± 80 (59 - 232)
<i>Scaphander lignarius</i>	5	B	63	b	39 ± 15	2.3	42 ± 14 (31 - 63)
<i>S. lignarius</i>	8	C	150	b	42 ± 6	2.2	135 ± 45 (63 - 202)
<i>Buccinum humphreysianum</i>	5	D	511	b	35 ± 3	3.1	782 ± 543 (442 - 1723)

2.4

^a Corresponds to the categories defined in Materials and Methods (function of the depth under the research vessel at the end of trawling).

^b Corresponds to the depth under the research vessel at the end of trawling.

^c b = benthic; bp = benthopelagic; p = pelagic.

^d Total Length (TL) for most fish, gastropod molluscs and "shrimp type" crustaceans; Dorsal Mantle Length (DML) for most cephalopod molluscs; Standard Width (SW) for bivalve molluscs and "crab type" crustaceans. Exceptions are described below.

- *Trachyrincus scabrus*, *Polymetme thaeocoryla*, *Bathypterois dubius*, *Nezumia aequalis*, *Xenodermichthys copei*, *Benthoosema glaciale*, *Ceratospopolus maderensis*, *Bathylagus greyae*, *Myctophum punctatum*, *Arctozenus risso*, *Argyrolepecus olfersii*, *Lampanyctus crocodilus*, *Notoscopelus kroeyeri*, *Stomias boa*, *Notacanthus bonaparte*, *Normichthys operosa*: Standard Length (SL) instead of Total Length.

- *Chimaera monstrosa*, *Hydrolagus mirabilis* and *Coryphaenoides rupestris*: Pre-Anal Fin Length (PAFL) instead of Total Length.

- *Opisthoteuthis agassizii*: Total Length (TL) instead of Mantle Length.

- *Meganyctiphanes norvegica*: Cephalothorax Length (CL) instead of Total Length.

^e Trophic Position (see details of calculation in Materials and Methods)

^f SF = suspension feeder

Calculation of species' trophic position from SIA

A previous study in the area highlighted the importance to consider spatial variations in stable isotopic signatures to calculate the trophic position of organisms from SIA (Chouvelon et al. under review). Indeed, this study revealed that $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values significantly decreased from inshore to offshore species. Thus, authors recommended considering several baselines when deriving trophic positions from $\delta^{15}\text{N}$ values at the scale of such an open marine ecosystem with *a priori* several (but probably linked) food webs.

In the present study, we first continued the investigation of the inshore-offshore gradient of isotopic signatures at the species and individual scales. To this end, 3 species with individuals sampled on the different habitats along the inshore-offshore gradient (i.e., from coastal to oceanic waters) were selected, belonging to 3 different trophic guilds: the scallop *Pecten maximus* (a suspended particulate organic matter or POM feeder), the gastropod *Scaphander lignarius* (a sub-surface deposit feeder), and the European anchovy *Engraulis encrasicolus* (a small pelagic fish, zooplankton feeder).

Then, taking into account such spatial variations in isotopic signatures, we calculated the trophic position of organisms analysed in this study. To calculate such trophic positions through SIA, the formula generally used is as follow (Post 2002a):

$$\text{TP}_{\text{consumer}} = \text{TP}_{\text{basis}} + (\delta^{15}\text{N}_{\text{consumer}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{basis}}) / \text{TEF}$$

in which:

- TP_{basis} is the trophic position of the primary consumer used to estimate the TP of other consumers in the food web. In our study, we estimated that the suspended POM feeder *P. maximus* was the most relevant species to directly reflect the whole organic matter at the base of food webs in the Bay of Biscay, the POM being a mix of primary production (i.e., phytoplankton and/or phytobenthos in coastal areas) and other detrital or regenerated material;
- $\delta^{15}\text{N}_{\text{consumer}}$ is the value measured in the consumer whose we aim to calculate the TP;
- $\delta^{15}\text{N}_{\text{basis}}$ should be the average value of the primary consumer used (i.e., *P. maximus* in this case). After evidence for an inshore-offshore gradient of isotopic signatures in the Bay of Biscay (Chouvelon et al. under review), and particularly within individuals of *P. maximus* in

this study (see below), $\delta^{15}\text{N}_{\text{basis}}$ in the formula above has been corrected 1) as a function of the parameters of the regression line obtained for *P. maximus* (Fig. A9-2), 2) as a function of the $\delta^{13}\text{C}$ value of the consumer λ considered, that is:

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{basis}} = Y = 1,556 * \delta^{13}\text{C}_{\text{consumer}} + 33,47$$

- TEF is the Trophic Enrichment Factor for the $\delta^{15}\text{N}$ difference between a source and its consumer. In general, when considering whole ecosystems, the average 3.4‰ is used as the TEF (Post 2002a). Nevertheless, there is increasing evidence in the literature that the TEF may be highly variable as a function of the consumer's taxa, or as function of the type and the quality of the consumer's food (Vanderklift and Ponsard 2003, Caut et al. 2009). Given the wide variety of consumers sampled in the Bay of Biscay, we thus used a TEF appropriate to each major type of consumer analysed in this study, following the taxonomic criteria in particular, and derived from literature (Table A9-2).

Table A9-2: Values of some Trophic Enrichment Factors (TEFs) available in the literature for different consumers (i.e., from different taxa), and TEFs finally used to calculate trophic positions (TP) of organisms in this study from stable isotope ratios.

Taxa	TEF from the literature (examples)	Reference	TEF finally used in TP calculation and explanation
Actinopterygian fish	wide range of values in various species	Vanderklift and Ponsard 2003; Sweeting et al. 2007; Caut et al. 2009	3.2 (as recommended by Sweeting et al. 2007, the most specific study for $\delta^{15}\text{N}$ TEF in Actinopterygian fish muscle)
Chondrichthyan fish	2.3 in average in sand tiger (<i>Carcharias taurus</i> , n=3) and lemon shark (<i>Negaprion brevirostris</i> , n=1)	Hussey et al. 2010a (see also Hussey et al. 2010b, Logan and Lucatvage 2010)	2.3 (as recommended by Hussey et al. 2010a, the most specific study for $\delta^{15}\text{N}$ TEF in Chondrichthyan fish muscle)
Crustaceans	3.3 in red rock lobster (<i>Jasus edwardsii</i> , n=69) 3.6 to 3.7 in ghost shrimps (<i>Nihonotrypaea japonica</i> , n=14 and <i>N. harmandii</i> , n=13)	Suring and Wing 2009 Yokoyama et al. 2005	3.4 for all invertebrates (as recommended by Post 2002a in general, and due to the general lack of specific data)
Cephalopod molluscs	3.3 in common cuttlefish (<i>Sepia officinalis</i> , n=5)	Hobson and Cherel 2006	

Generalised Additive modelling (GAM) for muscle Hg concentrations

Gaussian Generalized Additive Models (GAMs) were fitted to average log-transformed Hg concentrations for each species analysed for metal concentrations in the muscle (i.e., $n = 120$), using the `mgcv` package in R (R Development Core Team 2010). In this way, GAMs were used to identify trophic position-related, spatial and taxonomic trends in explaining Hg concentrations variability (Zuur et al. 2007). The average trophic position of species was considered as a continuous explanatory variable, while the distribution of species on the horizontal axis or depth layer (i.e., depth layer A, B, C, D, or E), the distribution on the vertical axis (i.e., benthic, benthopelagic or pelagic), and the taxa (i.e., Actinopterygian fish, Chondrichthyan fish, crustaceans, or molluscs) were treated as categorical explanatory variables in the model. The general form of the model performed on the 120 species analysed for muscle Hg concentrations was thus:

$$\text{Log [Hg]} = s(\text{TP}) + \text{Depth layer} + \text{Vertical distribution} + \text{Taxa}.$$

The assumption of Gaussian error distributions was finally checked through the residuals of the model.

Results

Trophic positions of food webs components analysed

First, within each of these 3 species analysed for spatial variations in stable isotopic signatures on the horizontal axis (i.e., *P. maximus*, *S. lignarius*, and *E. encrasicolus*), the inshore-offshore gradient was confirmed. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values decreased from individuals trawled inshore to individuals trawled offshore (Fig. A9-2). Moreover, the slopes of the regressions were very close for the three species (i.e., varying from 1.556 in *P. maximus* to 1.631 in *S. lignarius*, finally being of 1.740 in *E. encrasicolus*; Fig. A9-2).

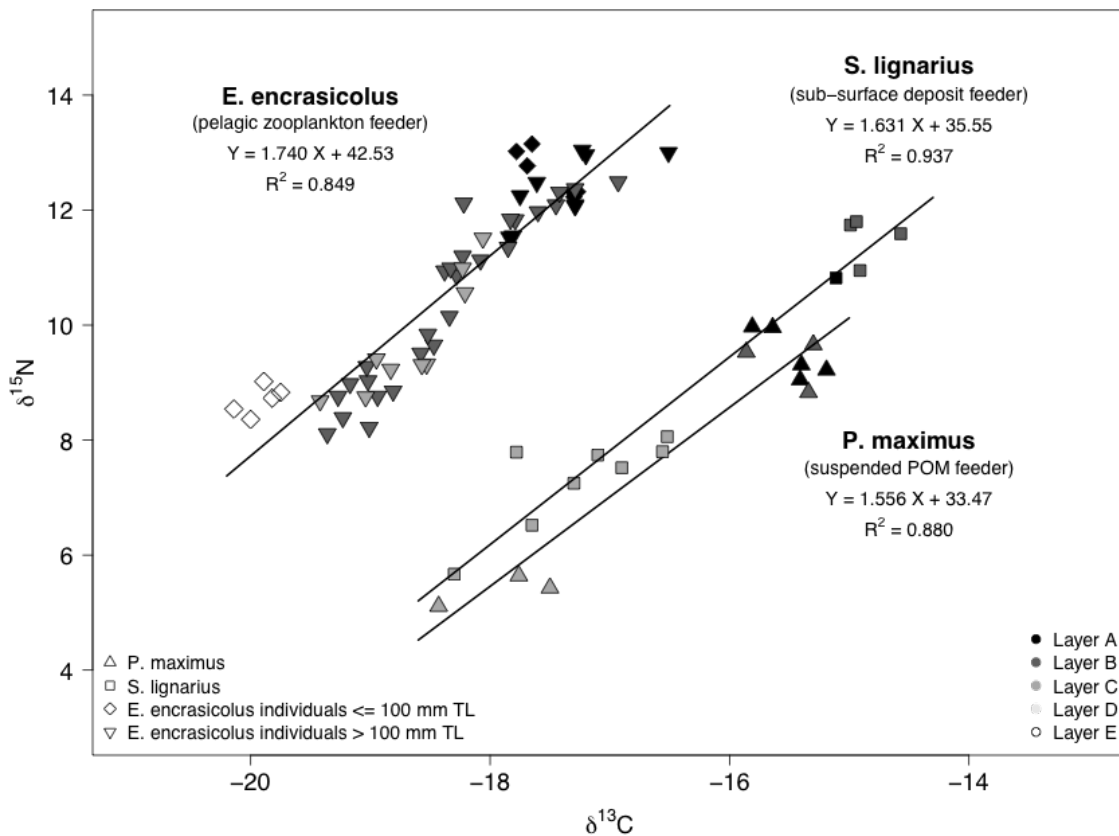


Figure A9-2: Investigation of the inshore-offshore gradient of isotopic signatures in the Bay of Biscay, through individuals isotopic signatures within 3 species belonging to 3 different trophic guilds: the great scallop *Pecten maximus* (a suspended particulate organic matter or Particulate Organic matter - POM- feeder), the sea snail *Scaphander lignarius* (a sub-surface deposit feeder), and the European anchovy *Engraulis encrasicolus* (a small pelagic fish, zooplankton feeder). Regression parameters and the squared Pearson correlation coefficient (R^2) are indicated for each species. The different colours correspond to the depth layer organisms were trawled (i.e., depth under the research vessel at the end of trawling): A: ≤ 30 m; B: 31-120 m; C: 121-200 m; D: 201-600 m; E: > 600 m.

Then, TP derived from this variable isotopic baseline along the inshore-offshore gradient varied greatly among species and taxa from the Bay of Biscay's food webs analyzed. Individuals of the great scallop *Pecten maximus* trawled on the shelf edge displayed the lower TP (1.9), whereas the highest TP (5.0) was found in the marbled electric ray *Torpedo marmorata*. Considering taxa, TP ranged from 2.0 in average in bivalve molluscs to 4.2 in average in Chondrichthyan fish, reaching an average of 2.4 in gastropod molluscs, 3.7 in cephalopod molluscs, 3.1 in crustaceans, finally 4.0 in Actinopterygian fish (Table A9-1).

Fish taxa (both Actinopterygians and Chondrichthyans) displayed a higher proportion of high TP consumers (i.e., > 4.0) than did crustaceans and molluscs taxa (Fig. A9-3). Considering the different environments where species were trawled (i.e., from the neritic area to the oceanic and deep-sea areas, that are depth layers A to E; or, from the benthic domain to the pelagic domain), high TP consumers were found everywhere (Fig. A9-3). Nevertheless, a high proportion of organisms sampled beyond 200 m depth (depth layers D and E) were high TP consumers (i.e., nearly more than 50% with TP > 4.0) (Fig. A9-3). Organisms classified as benthopelagic organisms were mostly high TP consumers also (Fig. A9-3).

Mercury concentrations and trophic positions

Mercury concentrations varied considerably among species and taxa analyzed, ranging from 39 ng.g⁻¹ dwt in average in the queen scallop *Aequipecten opercularis* to 5074 ng.g⁻¹ dwt in average in the lantern shark *Etmopterus spinax*. In general, species from categories presenting a higher proportion of high TP consumers presented the highest Hg concentrations (i.e., species from the depth layers D and E, benthopelagic species for the vertical distribution, and fish species among taxa analysed, as commented above) (Tables A9-1 and A9-3, Fig. A9-3). However, in the final GAM for Hg concentrations (deviance explained = 52.4%, AIC = 113.3), the effect of TP was not significant (F = 2.01, p = 0.080). In fact, there is a slight trend of increasing Hg concentrations with increasing TP up to around TP = 4.3 (Fig. A9-4), then the 95% confidence interval of the smoother is wide.

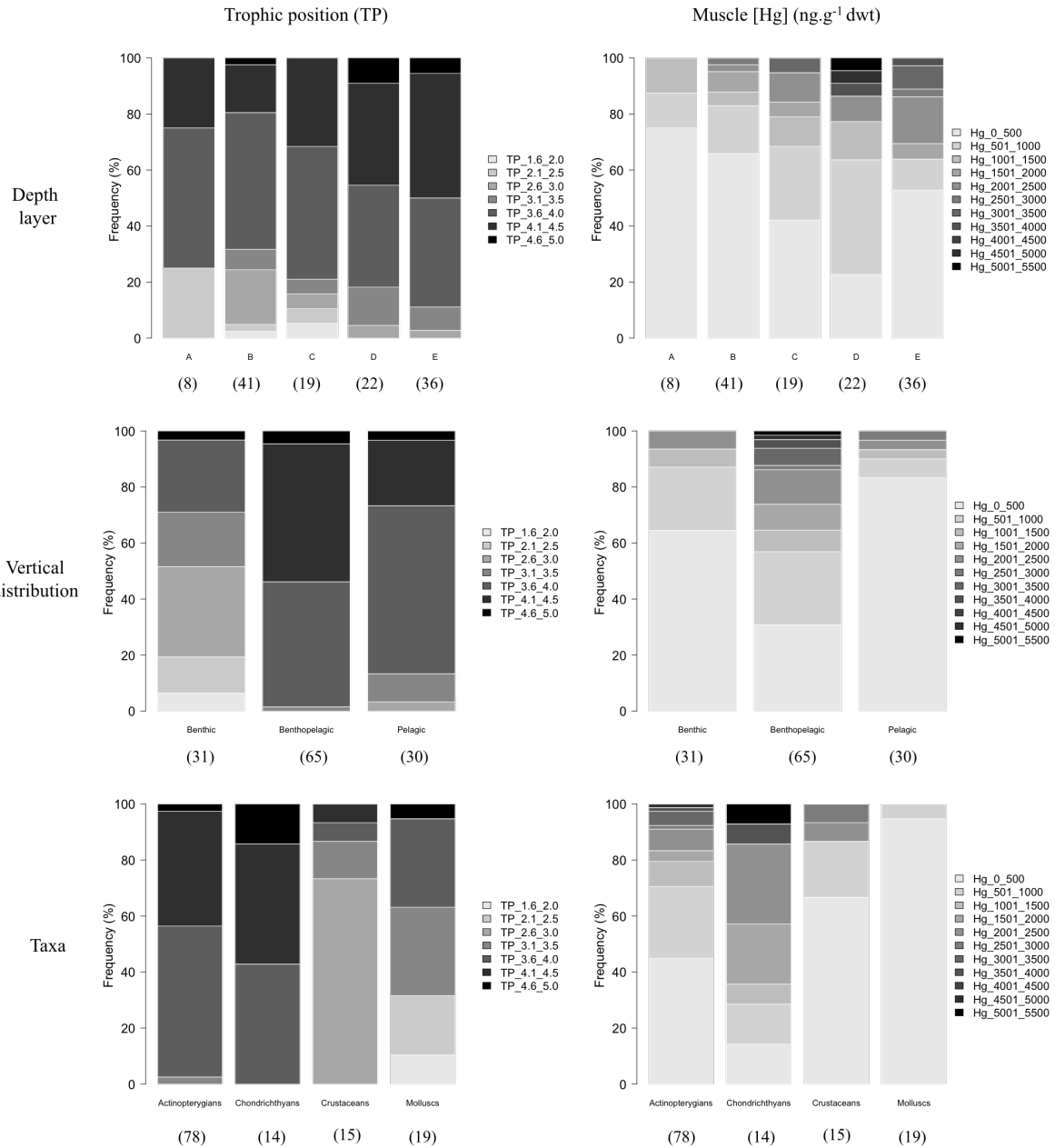


Figure A9-3: Frequency (in %) of the stable isotopes-derived trophic positions (TP), and of the Hg concentrations measured in the muscle of the different species analysed in the Bay of Biscay. Species are classified following the depth layer of their sampling (i.e., average depth under the research vessel at the end of trawling), their vertical distribution in water column, or the taxa they belong to. A: ≤ 30 m; B: 31-120 m; C: 121-200 m; D: 201-600 m; E: > 600 m. Numbers between brackets correspond to the number of species in each category.

Mercury concentrations and species' distribution or taxa

Contrary to TP, the 3 categorical explanatory variables included in the final GAM for Hg concentrations (i.e., depth layer, vertical distribution and taxa) all had a significant effect. The vertical distribution was the most contributing factor in explaining muscle Hg concentrations variability ($F = 11.90$, $p < 0.0001$), followed by depth layer ($F = 4.55$, $p = 0.002$), finally taxa ($F = 4.64$, $p = 0.004$). Considering the vertical distribution of organisms, pelagic species displayed significant lower Hg concentrations than the benthic (reference vertical distribution in the GAM) or benthopelagic species (Table 2, Fig. A9-4). Within the depth layer factor, species from depth layers D and E (i.e., species trawled > 200 m depth in average) presented significant higher Hg concentrations than species from lower depth layers, i.e., A (reference depth layer in the GAM), B and C (Table 2, Fig. A9-4). Finally, significantly higher Hg concentrations were found in Chondrichthyan fish relative to Actinopterygian fish (reference taxa in the GAM), and in comparison with crustaceans and mollusc taxa (Table 2, Fig. A9-4). Mollusc taxa effectively presented the lowest Hg concentrations compared to other taxa (Fig. A9-4), and although non-significant the p-value for mollusc taxa was very low (Table A9-2). Finally, at the species scale, when considering low trophic position species in which individuals could be trawled in different depth layers (i.e., *P. maximus* and *S. lignarius*), individuals trawled inshore, near the coast or on the shelf (mostly layer B) displayed significantly lower Hg concentrations than those trawled offshore, on the shelf edge (layer C) (Wilcoxon test, $p = 0.012$ and $p = 0.005$ for *P. maximus* and *S. lignarius* respectively, see mean values in Table A9-1).

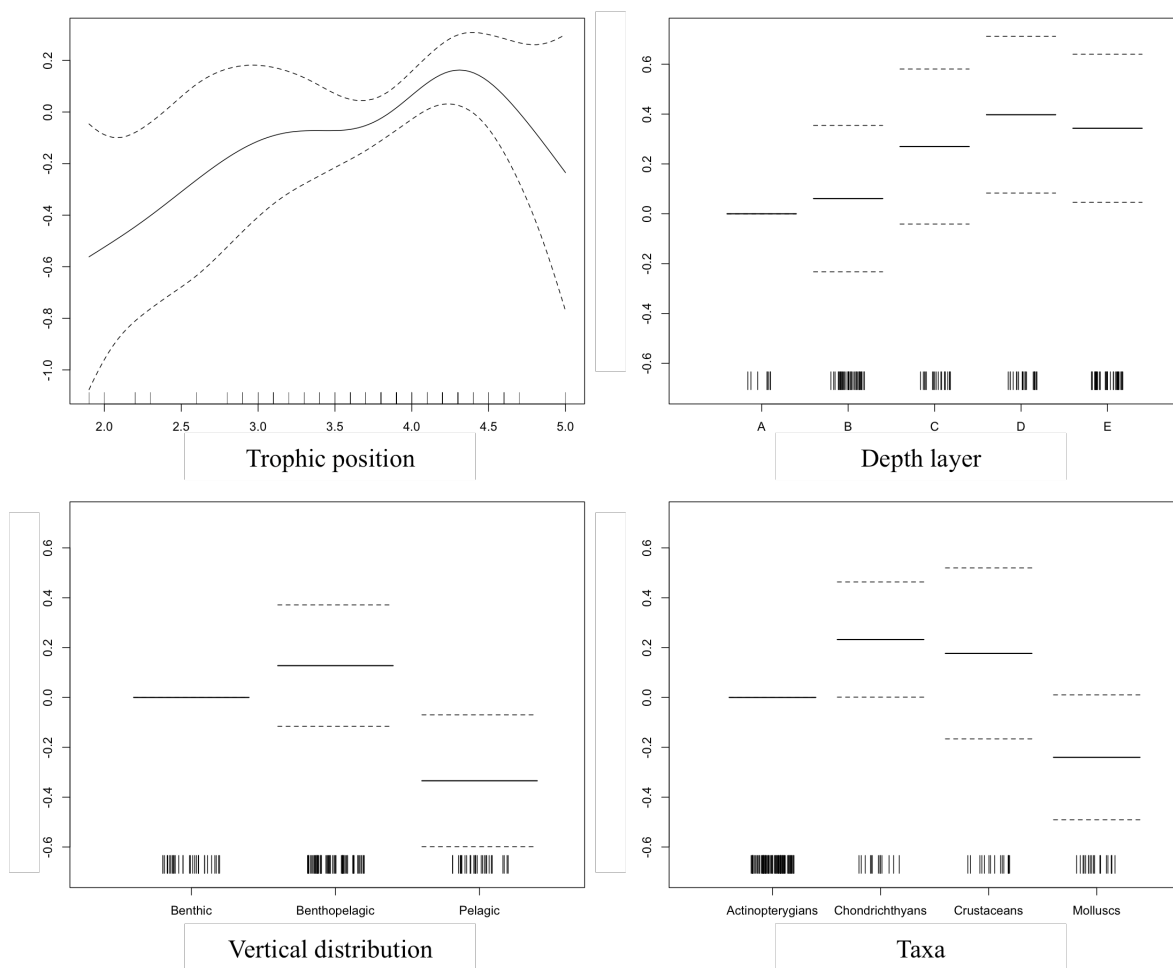


Figure A9-4: Graphical results of the GAM model fitted to average log-transformed Hg concentrations for each species analysed for metal concentrations in the muscle (120 species), to identify trophic position-related, spatial and taxonomic trends in explaining Hg concentrations variability. For the average trophic position (TP) of species, the smoother illustrates the partial effect of this continuous explanatory variable once the effects of all other explanatory variables or factors included in the model have been taken into account (i.e., effects of the 3 categorical explanatory variables). For these 3 factors (i.e., depth layer of trawling of species, vertical distribution of species, and taxa), the model also calculates their effect once the effects of all other explanatory variables have been taken into account. In fact, the effect of each category within a factor is also calculated to a reference category, which corresponds to the first category for each factor. The y-axis shows the contribution of the smoother or of the category to the predictor function in the model (in arbitrary units). Dashed lines represent 95% confidence intervals. Finally, whiskers on the x-axis indicate data presence.

Table A9-3: Detailed results for the 3 categorical variables included in the GAM model, fitted to average log-transformed Hg concentrations for each species analysed for metal concentrations in the muscle (120 species).

GAM categorical explanatory variables	Categories	Number of species	Trophic position (min-max)	Hg concentration in the muscle (ng.g ⁻¹ dwt) (min-max)	p-value
Depth layer	A (< 30 m)	8	2.2 - 4.3	39 - 1001	—
	B (30-119 m)	41	2.0 - 5.0	42 - 2725	0.679
	C (120-199 m)	19	1.9 - 4.5	103 - 3223	0.085
	D (200-599 m)	22	2.9 - 4.7	148 - 5074	0.013
	E (≥ 600 m)	36	2.9 - 4.6	61 - 3753	0.023
Vertical distribution	Benthic	31	1.9 - 5.0	39 - 2465	—
	Benthopelagic	65	3.5 - 4.7	65 - 5074	0.297
	Pelagic	30	2.9 - 4.6	59 - 2986	0.013
Taxa	Actinopterygians	78	3.3 - 4.6	59 - 4769	—
	Chondrichthyans	14	3.6 - 5.0	151 - 5074	0.047
	Crustaceans	15	2.6 - 4.1	150 - 2986	0.305
	Molluscs	19	1.9 - 4.6	39 - 782	0.058

Discussion

Hg is a metal of particular concern in the marine environment because it has no known biological function and is toxic to all living organisms including human consumers (Eisler 1987, Boening 2000, WHO 2003, 2010). However, in the Bay of Biscay, very few studies have investigated the levels of Hg contamination of biological components constituting the different food webs, while this system is an important marine area from ecological and economical points of view (OSPAR 2010). Moreover, previous studies only focused on a limited number of species, such as coastal and/or mollusc species (e.g., Claisse et al. 2001, Bustamante et al. 2006), or are not recent (e.g., Cossa et al. 1990 and associated references). Thus, this study is the first to assess the Hg contamination level of a wide variety of organisms, as 120 species belonging to four major taxa (i.e., Actinopterygian fish, Chondrichthyan fish, crustaceans, molluscs) have been analysed for muscle Hg concentrations. These species are representative of the various habitats that such a marine ecosystem may present, i.e., from coastal and neritic domains to oceanic and deep-sea domains (Fig. A9-1).

Trophic positions and their limited effect for higher Hg bioaccumulation

The food chain length (FCL) represents an important regulator of community and ecosystems function (Post and Takimoto 2007, Vander Zanden and Fetzer 2007). In this study, we consider the FCL to be the maximum TP in the pool of apex predators in an ecosystem. Indeed, it is the most commonly used definition, it is based on patterns of energy or material flow, and thus it can be estimated in natural food webs using SIA (Post et al. 2000, Post and Takimoto 2007, Vander Zanden and Fetzer 2007). Moreover, as Hg is the only one metal for which the biomagnification in food webs is now well admitted and not discussed (Gray 2002), the use of SIA (tracing organic material fluxes in food webs) and the consideration of several trophic levels to study Hg behaviour in food webs are particularly appropriated (Vander Zanden and Rasmussen 1996, Wang 2002).

In this study, the maximum TP calculated from SIA was the one of the marbled electric ray *Torpedo marmorata* (TP = 5.0). This is in accordance with the general distribution of FCL that may be calculated from this method in marine ecosystems, when marine mammals are excluded (Vander Zanden and Fetzer 2007). Then, muscle Hg concentrations analysed in the 120 species from the Bay of Biscay revealed that these concentrations slightly increased with the TP of species in the food webs of interest (Fig. A9-4). However, in higher TP consumers in particular, the high variability of muscle Hg concentrations suggested that the TP alone does not suffice to explain such differences in metal accumulation. Among the 3 other factors than TP tested in the model, the vertical distribution thus appeared as the most important factor in explaining Hg variability, followed by the depth layer of sampling, and finally the taxa. In fact, the importance of the vertical distribution in explaining muscle Hg concentrations variability may be partly biased by a relative subjectivity or uncertainty when defining a species as a "true" pelagic species, benthopelagic or benthic species. Indeed, for instance, some species may perform specific vertical migrations in the water column to feed (e.g., diel migrations; Roe and Badcock 1984). So, for highly mobile species in general, it is difficult to categorically assess their vertical distribution, and many species of our study thus belong to the category "benthopelagic" including many high TP consumers with elevated Hg concentrations in the muscle. On the contrary, the classification of species in one of the category for both others factors, depth layer of sampling and taxa, is totally objective. In this way, the effect of those factors in explaining muscle Hg concentrations variability is less questionable.

In fact, more generally, two principal types of factors may influence metal concentrations differences between individuals of a same species, or between species: 1) "metabolic" factors (in the broad sense of the term), including for example the age of organisms (e.g., Monteiro and Lopes 1990), the different detoxification mechanisms (e.g., Rainbow 2002), or the dilution due to growth (e.g., Pierce et al. 2008); 2) "exposure" factors, by the abiotic environment through respiration for example, or by the food, especially for metals which mainly transfer by the trophic pathway such as Hg (e.g., Mathews and Fisher 2008, Lacoue-Labarthe et al. 2009). Exposure factors by food thus include the concentration and the bioavailability of the metal in prey consumed (e.g., Bustamante et al. 2002), or the trophic level of prey, for instance. In natural systems where the different parameters cannot be controlled, the importance of one or the other type of factors (i.e., metabolic or exposure) remains difficult to assess. In this study, we included in the model one metabolic factor (i.e., taxa), and 3 exposure factor (species' TP, depth layer of sampling, and vertical distribution) to explain Hg concentrations variability. However, age would remain a factor of major importance for Hg accumulation (principally in its methylated form; Fitzgerald et al. 2007) in the muscle of numerous marine organisms (e.g., Monteiro and Lopes 1990, Rossi et al. 1993, Cronin et al. 1998).

Interaction between biological and environmental factors on Hg bioaccumulation

In this study, to minimise such the possible bias due to the age of organisms, we only considered adult and mature individuals within each species, and sampled a relatively narrow range of sizes for most of the species analysed (Chouvelon et al. 2011). However, it does not really account for the fact that individuals of the different species analysed and compared may be of very different age, as a function of species' own longevity. If age-length keys are available and widely applicable for most of commercial species in general, it is not the case of less studied species and of deep-sea species in particular. Indeed, in those last species, uncertainties on the determination of age still exist (Allain and Lorange 2000, Cailliet et al. 2001). In relation with this, the fact that molluscs and especially cephalopod molluscs of relatively high TP present very low muscle Hg concentrations, in comparison with fish of the same TP and those of the deep-sea fauna in particular, may be linked to the age of organisms also. Indeed, cephalopods are known to be short-lived species (i.e., one to few years for the majority of species, except nautilus that could live more than 20 years; Calow 1987, Wood

and O'Dor 2000). As for deep-sea fish species (e.g., some Sebastidae, or the orange roughy *Hoplostethus atlanticus*), they may live more than 100 years (Allain and Lorance 2000, Cailliet et al. 2001). This explains, at least in part, the enhanced bioaccumulation of Hg in those last species.

In addition to age, other potentially important factors for high muscle Hg accumulation could not be included in the model because of lack of data. For instance, other metabolic factors such as the different processes of detoxification that may occur in the different organisms, or other biological factors that could greatly influence the exposure to Hg such as the specific ingestion rates of the different species (i.e., other than their TP or their feeding zone through their general distribution). Modelling muscle Hg concentrations by GAMs, we estimate that model residuals (i.e., the Hg variability not explained by the variables included) may reflect, at least in part, the importance of factors whose importance is difficult to quantify or cannot be controlled *in situ*. Thus, in our GAM model run on the 120 species analysed, the variability explained in muscle Hg concentrations is finally of 52.4%. This clearly suggests the importance of other factors that could not be included such as those mentioned, and such as the age, for example. However, we should not forget that the production of methyl-Hg and of monomethyl-Hg in particular may be enhanced in sub-thermocline low oxygen waters (Bacci 1989, Mason et al. 1995). Moreover, this organic form of Hg is a very stable form, the most bioavailable and the more accumulated by marine organisms (Fitzgerald et al. 2007). Indeed, our results highlight a higher Hg bioaccumulation by mesopelagic, bathypelagic and bathydemersal species (particularly in fish species). Thus, it may be linked to a higher exposure to methyl-Hg in deep-waters environment, as suggested by other authors in other areas of the world (Monteiro et al. 1996, Thompson et al. 1998, Ochoa-Acuña et al. 2002, Choy et al. 2009). Furthermore, considering a mean moisture content of about 75% in fish muscle (from dry weight/wet weight ratios measured in our samples), and that virtually 100% of total-Hg is under methyl-Hg form in fish muscle (Bloom 1992), a number of deep-sea species in particular present a sanitary risk for regular consumption. For instance, over a muscle Hg concentration of 1500 ng.g⁻¹ dwt, less than 300 g of flesh consumed by a 60 kg adult per week are thus sufficient to exceed the Provisional Tolerable Weekly Intake allocated by the JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) for methyl-Hg (WHO 2003, 2010; detailed calculation of Maximum Safe Weekly Consumption can be found in Chauvelon et al. 2009).

Conclusions

Analyses of muscle Hg concentrations in 120 species from various taxa and from various habitats of an open marine ecosystem, the Bay of Biscay in the North-eastern Atlantic, revealed that the feeding zone play an important role in influencing Hg accumulation by organisms. Thus, deep-sea species present particularly high level of Hg in their flesh, and chronicle consumption of deep-sea fish in particular may therefore present a risk for human health. To confirm such enhanced Hg bioaccumulation in deep-waters environment, the inclusion of high trophic level marine mammals inhabiting the different habitats of the Bay of Biscay might improve the accumulation model. In this case and more generally, the age of organisms or others potentially important factor (e.g., ingestion rates) should be included in the model also. Anyway, the study of contaminants' behaviour in food webs using the isotopic data (here transformed in TP) seems to encourage.

Acknowledgments

This work was supported through the PhD grant of T. Chauvelon from the Conseil Régional de Poitou-Charentes, and by the Contrat de Projet Etat-Région. Authors are very grateful to J.P. Léauté, R. Bellail, M. Salaun and P. Lorance from IFREMER for facilitating the sampling, and the crew of the R/V “Thalassa” for their support during the EVHOE cruises. They also thank P. Richard and G. Guillou (UMR LIENSs) for assistance in stable isotope analysis, C. Churlaud and M. Kalombo from the Fédération de Recherche en Environnement pour le Développement Durable FR 3097 CNRS-IFREMER-Université de La Rochelle) for running part of the metal analyses, finally C. Pignon-Mussaud from the Cellule Géomatique (UMR LIENSs) for providing the map of the study area.

References

- Allain V, Lorance P (2000) Age estimation and growth of some dep-sea fish from the Northeast Atlantic Ocean. *Cybiurn* 24: 7-16.
- Bacci E (1989) Mercury in the Mediterranean. *Mar Pollut Bull* 20: 59-63.
- Bloom NS (1992) On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue. *Can J Fish Aquat Sci* 49: 1010-1017.
- Boening D (2000) Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere* 40: 1335-1351.
- Borja A, Galparsoro I, Irigoien X, Iriondo A, Menchaca I, Muxika I, Pascual M, Quincoes I, Revilla M, Rodríguez JG, Santurtún M, Solaun O, Uriarte A, Valencia V, Zorita I

- (2011) Implementation of the European Marine Strategy Framework Directive: a methodological approach for the assessment of environmental status, from the Basque Country (Bay of Biscay). *Mar Pollut Bull* 62: 889-904.
- Bustamante P, Cosson RP, Gallien I, Caurant F, Miramand P (2002) Cadmium detoxification processes in the digestive gland of cephalopods in relation to accumulated cadmium concentrations. *Mar Environ Res* 53: 227-241.
- Bustamante P, Lahaye V, Durnez C, Churlaud C, Caurant F (2006) Total and organic Hg concentrations in cephalopods from the North Eastern Atlantic waters: influence of geographical origin and feeding ecology. *Sci Total Environ* 368: 585-596.
- Cailliet GM, Andrews AH, Burton EJ, Watters DL, Kline DE, Ferry-Graham LA (2001) Age determination and validation studies of marine fishes: do deep-dwellers live longer? *Exp Gerontol* 36: 739-764.
- Calow P (1987) Fact and theory - an overview. In: Boyle PR (ed) *Cephalopod life cycles: comparative reviews*. Vol. 2, Academic Press, London, pp 351-366.
- Caut S, Angulo E, Courchamp F (2009) Variation in discrimination factors ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction. *J Appl Ecol* 46: 443-453.
- Cherel Y, Hobson KA, Hassani S (2005) Isotopic discrimination between food and blood and feathers of captive penguins: implication for dietary studies in the wild. *Physiol Biochem Zool* 78: 106-115.
- Chouvelon T, Spitz J, Caurant F, Mèndez-Fernandez P, Chappuis A, Laugier F, Le Goff E, Bustamante P (under review) Spatio-temporal variations in stable isotopic signatures revisit the use of $\delta^{15}\text{N}$ in mesoscale studies of marine food webs. The case of an open ecosystem: the Bay of Biscay (North-East Atlantic). *Prog Oceanogr*.
- Chouvelon T, Spitz J, Cherel Y, Caurant F, Sirmel R, Mèndez-Fernandez P, Bustamante P (2011) Inter-specific and ontogenic differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and Hg and Cd concentrations in cephalopods. *Mar Ecol Prog Ser* 433: 107-120.
- Chouvelon T, Warnau M, Churlaud C, Bustamante P (2009) Hg concentrations and related risk assessment in coral reef crustaceans, molluscs and fish from New Caledonia. *Environ Pollut* 157: 331-340.
- Choy CA, Popp BN, Kaneko JJ, Drazen JC (2009) The influence of depth on mercury levels in pelagic fishes and their prey. *P Natl Acad Sci USA* 106: 13865-13869.
- Claisse D, Cossa D, Bretaudeau-Sanjuan J, Touchard G, Bombled B (2001) Methylmercury in molluscs along the French coast. *Mar Pollut Bull* 42: 329-332.
- Cossa D, Thibaud Y, Roméo M, Gnassia-Barelli M (1990) Le mercure en milieu marin. *Biogéochimie et écotoxicologie. Rapports Scientifiques et Techniques de l'IFREMER* 19, Brest, France, 130 p.
- Cronin M, Davies IM, Newton A, Pirie JM, Topping G, Swan S (1998) Trace metal concentrations in deep sea fish from the North Atlantic. *Mar Environ Res* 45: 225-238.
- Curtin R, Prellezo R (2010) Understanding marine ecosystem based management: a literature review. *Mar Policy* 34: 821-830.
- Cury P, Shannon L, Shin YJ (2003) The functioning of marine ecosystems: a fisheries perspective. In: Sinclair M, Valdimarsson G (eds) *Responsible fisheries in the marine ecosystem*. CAB International, Walingford, pp 103-123.
- De Niro MJ, Epstein S (1977) Mechanism of carbon fractionation associated with lipid synthesis. *Science* 197: 261-263.
- De Niro MJ, Epstein S (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 42: 495-506.
- De Niro MJ, Epstein S (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 45: 341-351.

- Eisler R (1987) Mercury hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. US Fish and Wildlife Service Biological Report 85 (1.10).
- European Commission (2008) Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008, establishing a framework for community action in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive). Official Journal of the European Union L 164, pp 19-40.
- European Commission (2010) Commission Decision of 1 September 2010 on criteria and methodological standards on good environmental status of marine waters. Official Journal of the European Union L 232, pp 14-24.
- Fitzgerald WF, Lamborg CH, Hammerschmidt CR (2007) Marine biogeochemical cycling of mercury. *Chem Rev* 107: 641-662.
- France RL (1995) Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: food web implications. *Mar Ecol Prog Ser* 124: 307-312.
- Gray JS (2002) Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Mar Pollut Bull* 45: 46-52.
- Hobson KA (1999) Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120: 314-326.
- Hobson KA, Cherel Y (2006) Isotopic reconstruction of marine food webs using cephalopod beaks: new insight from captively raised *Sepia officinalis*. *Can J Zool* 84: 766-770.
- Hobson KA, Welch HE (1992) Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 84: 9-18.
- Hussey NE, Brush J, McCarthy ID, Fisk AT (2010) $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ diet-tissue discrimination factors for large sharks under semi-controlled conditions. *Comp Biochem Phys A* 155: 445-453.
- Hussey NE, MacNeil MA, Fisk AT (2010) The requirement for accurate diet-tissue discrimination factors for interpreting stable isotopes in sharks. Comment on: stable isotope dynamics in elasmobranch fishes. *Hydrobiologia* 654: 1-5.
- Jennings S, Pinnegar JK, Polunin NVC, Boon TV (2001) Weak cross-species relationships between body size and trophic level belie powerful size-based trophic structuring in fish communities. *J Anim Ecol* 70: 934-944.
- Karpouzi VS, Stergiou KI (2003) The relationships between mouth size and shape and body length for 18 species of marine fishes and their trophic implications. *J Fish Biol* 62: 1353-1365.
- Koutsikopoulos C, Le Cann B (1996) Physical processes and hydrological structures related to the Bay of Biscay anchovy. *Sci Mar* 60: 9-19.
- Lacoue-Labarthe T, Warnau M, Oberhänsli F, Teyssié JL, Bustamante P (2009) Bioaccumulation of inorganic Hg by the juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* exposed to ^{203}Hg radiolabelled seawater and food. *Aquat Biol* 6: 91-98.
- Larkin PA (1996) Concepts and issues in marine ecosystem management. *Rev Fish Biol Fisher* 6: 139-164.
- Lavoie RA, Hebert CE, Rail JF, Braune BM, Yumvihoze E, Hill LG, Lean DRS (2010) Trophic structure and mercury distribution in a Gulf of St. Lawrence (Canada) food web using stable isotope analysis. *Sci Total Environ* 408: 5529-5539.
- Le Loc'h F, Hily C, Grall J (2008) Benthic community and food web structure on the continental shelf of the Bay of Biscay (North Eastern Atlantic) revealed by stable isotopes analysis. *J Mar Syst* 72: 17-34.
- Lesage V, O'Hammill M, Kovacs KM (2001) Marine mammals and the community structure of the Estuary and Gulf of St Lawrence, Canada: evidence from stable isotope analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 210: 203- 221.

- Logan JM, Lutcavage ME (2010) Stable isotope dynamics in elasmobranch fishes. *Hydrobiologia* 644: 231-244.
- Lorance P, Bertrand JA, Brind'Amour A, Rochet MJ, Trenkel VM (2009) Assessment of impacts from human activities on ecosystem components in the Bay of Biscay in the early 1990s. *Aquat Living Resour* 22: 409-431.
- Lorance P, Latrouite D, Séret B (2000) Observations of Chondrichthyan fishes (sharks, rays and chimaeras) in the Bay of Biscay (North-Eastern Atlantic) from submersibles. Proc 3rd Europ Elasm Assoc Meet, Boulogne sur Mer, France, pp. 29-45.
- Mason RP, Rolffhus KR, Fitzgerald WF (1995) Methylated and elemental mercury cycling in surface and deep ocean waters of the North Atlantic. *Wat Air Soil Pollut* 80: 665-677.
- Mathews T, Fisher NS (2008) Evaluating the trophic transfer of cadmium, polonium, and methylmercury in an estuarine food chain. *Environ Toxicol Chem* 27: 1093-1101.
- Michener RH, Kaufman L (2007) Stable isotope ratios as tracers in marine food webs: an update. In: Michener R and Lajtha K (eds) *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Blackwell Publishing Ltd, pp 238-282.
- Monteiro LR, Costa V, Furness RW, Santos RS (1996) Mercury concentrations in prey fish indicate enhanced bioaccumulation in mesopelagic environments. *Mar Ecol Prog Ser* 141: 21-25.
- Monteiro LR, Lopes HD (1990) Mercury content of swordfish, *Xiphias gladius*, in relation to length, weight, age, and sex. *Mar Pollut Bull* 21: 293-296.
- Ochoa-Acuña H, Sepúlveda MS, Gross TS (2002) Mercury in feathers from Chilean birds: influence of location, feeding strategy, and taxonomic affiliation. *Mar Pollut Bull* 44: 340-349.
- OSPAR (2010) Quality Status Report 2010. OSPAR Commission, London, 176 p.
- Palomares MLD, Pauly D (eds) (2010) *SeaLifeBase*, World Wide Web electronic publication, www.sealifebase.org, version (12/2010).
- Peterson BJ, Fry B (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu Rev Ecol Syst* 18: 293-320.
- Pierce GJ, Stowasser G, Hastie LC, Bustamante P (2008) Geographic, seasonal and ontogenetic variation in cadmium and mercury concentrations in squid (Cephalopoda: Teuthoidea) from UK waters. *Ecotoxicol Environ Saf* 70: 422-432.
- Pinnegar JK, Polunin NVC (1999) Differential fractionation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. *Funct Ecol* 13: 225-231.
- Planque B, Lazure P, Jégou AM (2004) Detecting hydrological landscapes over the Bay of Biscay continental shelf in spring. *Climate Res* 28: 41-52.
- Post DM (2002a) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods and assumptions. *Ecology* 83: 703-718.
- Post DM (2002b) The long and short of food-chain length. *Trends Ecol Evol* 17: 269-277.
- Post DM, Pace ML, Hairston NGJ (2000) Ecosystem size determines food-chain length in lakes. *Nature* 405: 1047-1049.
- Post DM, Takimoto G (2007) Proximate structural mechanisms for variation in food-chain length. *Oikos* 116: 775-782.
- Puillat I, Lazure P, Jégou AM, Lampert L, Miller PI (2004) Hydrographical variability on the French continental shelf in the Bay of Biscay, during the 1990s. *Cont Shelf Res* 24: 1143-1163.
- Quéro JC (2003) *Guide des Poissons de l'Atlantique Européen*. Les guides du naturaliste. Delachaux and Niestlé (eds), Paris, France.
- R Development Core Team (2010) *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, www.R-project.org.

- Rainbow PS (2002) Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ Pollut* 120: 497-507.
- Reinfelder JR, Fisher NS, Luoma SN, Nichols JW, Wang WX (1998) Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. *Sci Total Environ* 219: 117-135.
- Roe HSJ, Badcock J (1984) The diel migrations and distributions within a mesopelagic community in the North East Atlantic. 5. Vertical migrations and feeding of fish. *Progr Oceanogr* 13: 389-424.
- Rossi A, Pellegrini D, Belcari P, Barghigiani C (1993) Mercury in *Eledone cirrhosa* from the Northern Tyrrhenian Sea: contents and relations with life cycle. *Mar Pollut Bull* 26: 683-686.
- Suring E, Wing SR (2009) Isotopic turnover rate and fractionation in multiple tissues of red rock lobster (*Jasus edwardsii*) and blue cod (*Parapercis colias*): Consequences for ecological studies. *J Exp Mar Biol Ecol* 370: 56-63.
- Sweeting CJ, Barry J, Barnes C, Polunin NVC, Jennings S (2007) Effects of body size and environment on diet-tissue $\delta^{15}\text{N}$ fractionation in fishes. *J Exp Mar Biol Ecol* 340: 1-10.
- Thompson DR, Furness RW, Monteiro LR (1998) Seabirds as biomonitors of mercury inputs to epipelagic and mesopelagic marine food chains. *Sci Total Environ* 213: 299-305.
- Trenkel VM, Berthel  O, Lorance P, Bertrand J, Brind'Amour A, Cochard ML, Coppin F, Léauté JP, Mahé JC, Morin J, Rochet MJ, Salaun M, Souplet A, V rin Y (2009) Atlas des grands invertébrés et poissons observés par les campagnes scientifiques. Bilan 2008. Ifremer, Nantes, EMH: 09-003, 100 p.
- Vanderklift MA, Ponsard S (2003) Source of variation in consumer-diet $\delta^{15}\text{N}$ enrichment: a meta-analysis. *Oecologia* 136: 169-182.
- Vander Zanden MJ, Rasmussen JB (1996) A trophic position model of pelagic food webs: impact on contaminant bioaccumulation in lake trout. *Ecol Monogr* 66: 451-477.
- Vander Zanden MJ, Fetzer WW (2007) Global patterns of aquatic food chain length. *Oikos* 116: 1378-1388.
- Wang WX (2002) Interactions of trace metals and different marine food chains. *Mar Ecol Prog Ser* 243: 295-309.
- WHO (2003) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Sixty-first meeting. Summary and conclusions, 22 p.
- WHO (2010) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Seventy-second meeting. Summary and conclusions, 16 p.
- Wood JB, O'Dor RK (2000) Do larger cephalopods live longer? Effects of temperature and phylogeny on interspecific comparisons of age and size at maturity. *Mar Biol* 136: 91-99.
- Yokoyama H, Tamaki A, Harada K, Shimoda K, Koyama K, Ishihi Y (2005) Variability of diet-tissue isotopic fractionation in estuarine macrobenthos. *Mar Ecol Prog Ser* 296: 115-128.
- Zuur AF, Ieno EN, Smith GM (2007) *Analysing Ecological Data*. Springer, New York.

Annexe 10

Isotopic investigation of mercury accumulation in the oceanic and deep-sea food webs from the Bay of Biscay

(POSTER)

Chouvelon T, Spitz J, Autier J, Caurant F, Méndez Fernandez P, Bustamante P

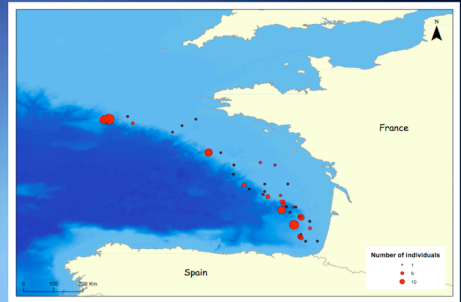
*12th International Deep-Sea Biology Symposium, 7-11 juin, 2010, Reykjavík
(Islande)*

Isotopic investigation of mercury accumulation in the oceanic and deep-sea food webs from the Bay of Biscay

Chouvelon Tiphaine, Spitz J, Autier J, Caurant F, Mendez Fernandez P, Bustamante P
LIENSs - Littoral Environnement and Sociétés - UMR 6250, University of La Rochelle, FRANCE

Mercury (Hg) is a non-essential metal, with both natural and anthropogenic origins, whose organic forms (mono and di-methyl Hg) are partly formed in sub-thermocline and deep ocean waters where they bioaccumulate in biota. Moreover, deep-sea sediments could also be an important source of mono-methyl Hg (Me-Hg) for marine organisms. Me-Hg is the most stable form in the marine environment and the most toxic to organisms, is highly bioavailable for predators and biomagnifies along food chains. Finally, it is considered that more than 90% of the total Hg (T-Hg) in fish muscles is present as Me-Hg, so the consumption of high trophic level species with elevated Hg concentrations in their tissues represent a non-negligible risk for Human health. Thus, the understanding of the processes of Hg accumulation in the different compartments of food webs appears crucial, especially in deep waters which are increasingly targeted by fisheries.

In this study, we investigated 66 species from the Bay of Biscay belonging to 3 taxa (i.e., fish, cephalopods and crustaceans) and following mesopelagic, bathypelagic and bathydemersal distributions. Stable isotope ratios of carbon (¹³C/¹²C, δ¹³C ‰) and of nitrogen (¹⁵N/¹⁴N, δ¹⁵N ‰) were analyzed in the muscle tissue of each individual as indicators of their foraging area (beginning of the slope vs deeper environment) and trophic level, respectively. T-Hg analyses were also performed on the muscle tissue, as well as on cephalopod digestive gland in order to provide an insight on the bioaccumulation processes of Hg. All results are expressed in ng.g⁻¹ dry weight (dwt).



Map of the study area (Bay of Biscay) and trawling stations

FOOD WEBS IN THE BAY OF BISCAY DEEP ENVIRONMENT

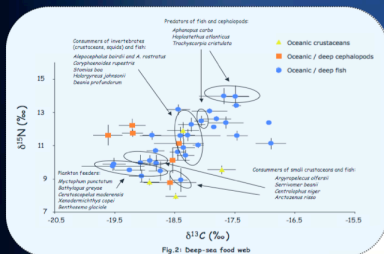


Fig. 2: Deep-sea food web

Stable isotopes of carbon (δ¹³C ‰) discriminate relatively well organisms trawled at the beginning of the slope (until 600 m depth) and those fished deeper (between 1000 and 1500 m depth for demersal species, 1000 and 2500 m for pelagic ones) (Fig.2). Overall, our results are in agreement with the known distribution of the different species: the more oceanic are depleted in δ¹³C ‰ relative to those that may be also found on the continental shelf (e.g. *Lophius* spp. or *Micromesistius poutassou* for fish, *Todarodes sagittatus* for cephalopods).

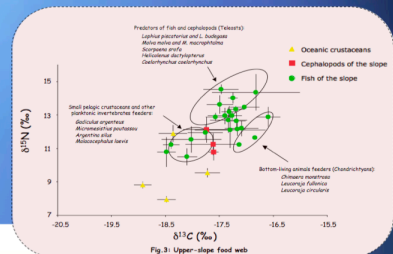


Fig. 3: Upper-slope food web

The deep-sea food web with pelagic (e.g. *Aphanopus carbo*) and demersal (e.g. *Hoplostethus atlanticus*) predators seems to be largely supported by small mesopelagic fish such as Myctophidae (e.g. *Myctophum punctatum*, *Notoscopelus kroeyeri*).

Pelagic cephalopods (e.g. *Teuthowenia megalops*, *Galiteuthis armata*) and crustaceans (e.g. *Sergia robusta*, *Systemaspis debilis*) may also constitute important food items for high trophic level species of this food web.

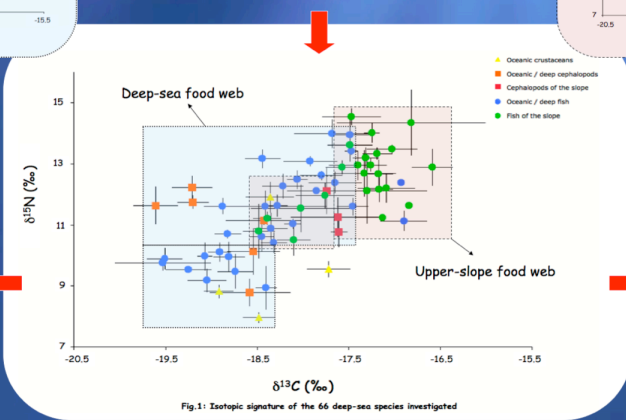


Fig. 1: Isotopic signature of the 66 deep-sea species investigated

On the upper slope, teleost (e.g. *Molva molva*, *Helicolenus dactylopterus*, *Macrouridae Nezumia aequalis*, *Coelorhynchus coelorhynchus*) and elasmobranch predators (e.g. *Etmopterus spinax*, *Deania calcea*) are enriched in δ¹⁵N relative to smaller pelagic bony fish such as *Gadus aeglefinus*, *Argentinus silus* or *Micromesistius poutassou*, that probably constitute important prey items for them.

Benthic cephalopods like *Bathypolypus sponsalis* or *Octopus salutii* may also constitute an important link in this food web, consuming bottom-living animals such as benthic crustaceans that could unfortunately not be analyzed in this study.

MERCURY ACCUMULATION IN DEEP-SEA ORGANISMS

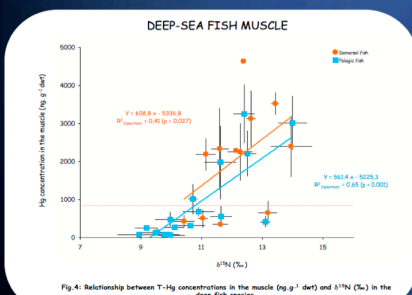


Fig. 4: Relationship between T-Hg concentrations in the muscle (ng.g⁻¹ dwt) and δ¹⁵N (‰) in the deep fish species

Bioaccumulation of Hg in the muscle of the deep-sea food-web fish is clearly linked to the trophic level of the species (δ¹⁵N ‰), whether they are pelagic or demersal (Fig. 4).

Moreover, considering that 90% of T-Hg is under Me-Hg form in fish, a number of species present a sanitary risk for regular consumption: over the red dashed line, less than 900 g of flesh consumed by a 60 kg adult per week are sufficient to exceed the Provisional Tolerable Weekly Intake allocated by the JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) for Me-Hg (WHO, 2003)*.

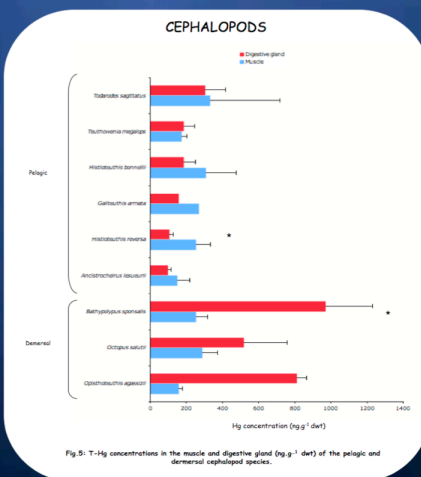


Fig. 5: T-Hg concentrations in the muscle and digestive gland (ng.g⁻¹ dwt) of the pelagic and demersal cephalopod species.

As for cephalopods, the digestive gland is supposed to play a major role in the storage and detoxification of many essential and non-essential elements such as Hg. In this particular taxa, T-Hg accumulation in this organ seems to be linked to the habitat (benthic vs pelagic) (Fig. 5). Benthic prey of demersal cephalopods may be particularly enriched in Hg relative to small pelagic fish. Unfortunately, deep-sea benthic fauna (crustaceans, gastropods, polychaetes) was not available for this study and their Hg concentrations remain to explore as well as their stable isotopes signatures (Fig.1).

Acknowledgements: Authors are very grateful to P. Lorance and IFREMER scientists of the EVHOE survey for facilitating the sampling in these areas.

Correspondence: Tiphaine Chouvelon, LIENSs 2 rue Olympe de Gouges 17000 La Rochelle France
E-mail: tiphaine.chouvelon@univ-lr.fr



* WHO, 2003. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants, Sixty-first Meeting. Summary and Conclusions Available from: <http://ftp.fao.org/esn/jecfa/jecfa16c.pdf>.

Annexe 11

Use of stable carbon and nitrogen isotopes for trophic levels evaluation and food webs reconstruction: the Bay of Biscay case study

(POSTER)

Chouvelon T, Spitz J, Caurant F, Méndez Fernandez P, Bustamante P

International Symposium on Isotopes in Hydrology, Marine Ecosystems, and Climate Change Studies, 27 mars-01 avril 2011, Monaco (Monaco)

Use of stable carbon and nitrogen isotopes for trophic levels evaluation and food webs reconstruction: the Bay of Biscay case study

Chouvelon Tiphaine ^a, Spitz J ^{a,b}, Caurant F ^a, Méndez Fernandez P ^a, Bustamante P ^a

^a Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 6250 CNRS-ULR, La Rochelle, France

^b Centre de Recherche sur les Mammifères Marins (CRMM), UMS 3414 CNRS-ULR, La Rochelle, France

Introduction

The Bay of Biscay is a very large bay opened on the North-East Atlantic Ocean (Fig. 1). The continental shelf covers over 220 000 km². The hydrological structure is influenced by 2 main rivers plumes (Loire and Gironde) and a continental slope indented by numerous canyons. The Bay of Biscay supports both numerous important fisheries and a rich fauna including many protected species (e.g., marine mammals). The management of this ecosystem subjected to numerous anthropogenic impacts notably depends on the good understanding of its food webs' structure.

Results & Discussion

Within each major group of taxa, spatial groups displayed significantly different $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values (KW tests, all $p < 0.0001$). A gradient in stable C and N ratios was evidenced. As expected from literature, $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values decreased from near-shore organisms to deep-sea or oceanic organisms (Fig. 2). These results highlighted the existence of several food webs with distinct baseline signatures in the Bay of Biscay.

Differences in $\delta^{15}N$ values in particular are linked to processes occurring at the Dissolved Inorganic Nitrogen (DIN) level (not detailed here), and to nutrients and particulate organic matter available for primary production in general.

Therefore, the contrasted hydrological landscapes from the Bay of Biscay probably impact signatures of the primary producers in the different areas of the Bay.

Methods

In trophic ecology, stable isotope ratios (SIR) of carbon (C) and nitrogen (N) are generally used as proxies of:

- the feeding zone or habitat ($\delta^{13}C$)
- trophic position ($\delta^{15}N$).

Here, we analysed C and N SIR in the muscle of 1520 individuals belonging to 129 species from various taxa.

Species were grouped following:

- taxonomic criteria
- general spatial distribution (i. e., pelagic vs. demersal/benthic species, and from coastline to oceanic area).

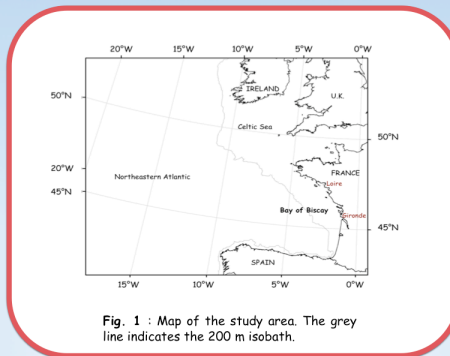


Fig. 1 : Map of the study area. The grey line indicates the 200 m isobath.

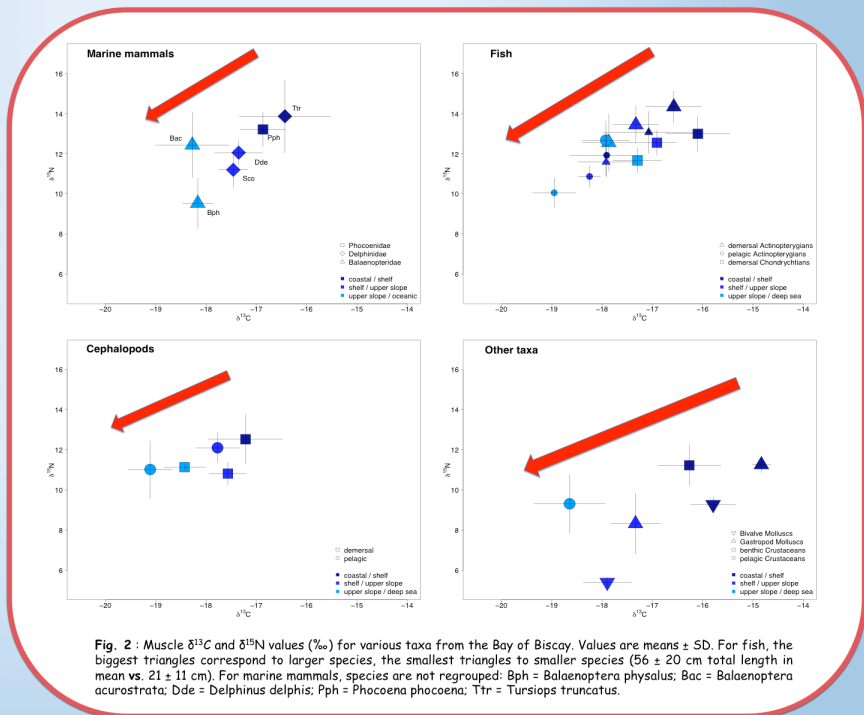


Fig. 2 : Muscle $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values (‰) for various taxa from the Bay of Biscay. Values are means \pm SD. For fish, the biggest triangles correspond to larger species, the smallest triangles to smaller species (56 ± 20 cm total length in mean vs. 21 ± 11 cm). For marine mammals, species are not regrouped: Bph = *Balaenoptera physalus*; Bac = *Balaenoptera acronotata*; Dde = *Delphinus delphis*; Pph = *Phocoena phocoena*; Ttr = *Tursiops truncatus*.

Conclusions

- Near-shore, upper-slope, and deep-sea or oceanic environments must be distinguished in the Bay of Biscay, notably when calculating trophic levels from $\delta^{15}N$ values.
- The results encourage further study on trophic relationships in the different environments.
- Finally, spatial variations in $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values between areas is promising for the study of particularly poor-known species, and those difficult to sample and/or to observe (e. g., deep-sea species, marine mammals).

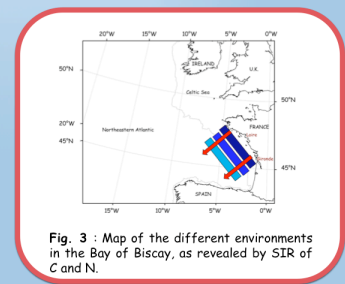


Fig. 3 : Map of the different environments in the Bay of Biscay, as revealed by SIR of C and N.

Acknowledgements: Authors are very grateful to JP Léauté, R Bellail and JC Mahé from IFREMER for facilitating the sampling during the EVHOE cruises, and to members of the French Stranding Network and the whole staff of CRMM for providing the marine mammal samples. They also thank P Richard and G Guillou (LIENSs) for assistance in stable isotope analysis, and students for assistance in sample preparation.

Correspondence: Tiphaine Chouvelon, LIENSs 2 rue Olympe de Gouges 17000 La Rochelle France
E-mail: tiphaine.chouvelon@univ-lr.fr

STRUCTURE AND FUNCTIONING OF FOOD WEBS USING ECOLOGICAL TRACERS IN OPEN MARINE ECOSYSTEMS: THE BAY OF BISCAY CASE STUDY

The study of organisms' trophic ecology and those of food webs' structure and functioning are not easy in marine environments, while it is an essential characteristic of ecosystems' organisation. Thus, the use of indirect methods such as « ecological tracers » has dramatically increased recently. These methods consist in measuring (bio)chemical parameters in biological tissues of organisms. Based on the assumption « you are what you eat », ecological tracers constitute reliable indicators of the trophic position and/or of the feeding zone of organisms.

First, the importance of some biological and environmental factors of variations on isotopic signatures and metal concentrations (mercury Hg and cadmium Cd) was examined in the Bay of Biscay. Indeed, in such an open marine ecosystem supporting a high biological diversity and undergoing various oceanic and terrigenous influences, we hypothesized that sources of variations are numerous. This work highlighted that different biological and environmental factors of variations have to be taken into account to use these ecological tracers in this type of ecosystem. For instance, we evidenced a change in the baseline along the inshore-offshore gradient that can considerably bias calculations of trophic positions from stable isotopes values, if it is not considered.

Secondly, the isotopic tool in particular has been applied to study the trophic ecology of some commercially important species, such as sardine, anchovy and sea bass. Isotopic signatures revealed a relative specialisation of sardine on some mesozooplanktonic prey. On the contrary, anchovy showed a relative trophic plasticity on this type of prey, and a greater flexibility in terms of feeding zones. As for sea bass, the combination of isotopic data (giving an information on diet on the long term) and stomach contents data (giving an information on diet on the short term) highlighted the selectivity of adult individuals on small pelagic fish of high energy content, when foraging in offshore waters.

Finally, ecological tracers were used to refine the understanding of food webs' structure and functioning in the Bay of Biscay, as well as Hg behaviour in these food webs. More than 140 species from the different food webs of this ecosystem have been analysed for their isotopic signature, and 120 species for muscle Hg concentrations. Isotopic data in particular revealed that in this ecosystem: 1) marine mammals are a structuring component of food webs; 2) food chains are relatively short; 3) food chains and trophic relationships are strongly "food web like" organised; 3) the degree of omnivory is intermediate in this ecosystem, with a slight trend to increase with increasing trophic position. This work also highlighted an enhanced bioaccumulation of Hg in the muscle of deep-sea fauna from the Bay of Biscay.

In the context of the need for tools to monitor the environmental status of marine ecosystems, and of species that structure food webs, this work finally demonstrated the great interest of using ecological tracers for both fundamental and applied marine ecological research.

Keywords: ecological tracers, stable isotopes, metals, variations factors, food webs, open marine ecosystem, Bay of Biscay.

**STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DES RÉSEAUX TROPHIQUES PAR L'UTILISATION DE
TRACEURS ÉCOLOGIQUES (ISOTOPES STABLES, MÉTAUX) EN ENVIRONNEMENT MARIN
OUVERT : LE CAS DU GOLFE DE GASCogne**

L'étude de l'écologie alimentaire des organismes ainsi que l'étude de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques, principale caractéristique de l'organisation des écosystèmes, ne sont pas aisées en environnement marin. Des méthodes indirectes d'étude ont donc été développées récemment, telles que l'utilisation de « traceurs écologiques » qui sont des paramètres (bio)chimiques mesurés dans les tissus biologiques des organismes. Sur la base du postulat « je suis ce que je mange », les traceurs écologiques constituent des indicateurs relativement fiables du niveau trophique des organismes et/ou de leur zone d'alimentation.

Dans un premier temps, l'importance de certains facteurs de variations biologiques et environnementaux des traceurs isotopiques et métalliques (mercure Hg et cadmium Cd) a été étudiée dans le Golfe de Gascogne. Dans un tel environnement marin ouvert, supportant une grande diversité biologique et subissant diverses influences, notre hypothèse de travail était effectivement que les sources de variations sont nombreuses. Cette thèse a ainsi mis en évidence qu'il était nécessaire d'intégrer différents facteurs de variations pour utiliser ces traceurs écologiques dans ce type d'écosystème, tels que le changement de la ligne de base sur un gradient côte-large pour un calcul pertinent des positions trophiques.

Dans un second temps, ces outils ont été directement appliqués pour l'étude de l'écologie alimentaire de quelques espèces d'intérêt commercial, telles que la sardine, l'anchois et le bar. Ils ont ainsi révélé une relative spécialisation de la sardine sur certaines proies mésozooplanctoniques, alors que l'anchois montre d'une part une plasticité trophique plus importante sur ce compartiment planctonique, et d'autre part une plus grande flexibilité en termes de zones d'alimentation. Dans le cas du bar, dont l'écologie alimentaire était jusqu'à présent très peu connue en dehors des zones côtières, le couplage des données isotopiques (révélant des informations sur le régime alimentaire sur le moyen à long terme) avec des données de contenus stomacaux (révélant des informations sur le court terme) a permis de mettre en évidence la sélectivité des individus de bars adultes sur les petits poissons pélagiques à forte valeur énergétique, lorsque ce prédateur fréquente les eaux du large.

Enfin, ces traceurs écologiques ont été utilisés pour affiner la compréhension de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques dans le Golfe de Gascogne, et le comportement de certains contaminants tels que le Hg dans ces réseaux. Plus de 140 espèces provenant des différents réseaux trophiques de cet écosystème ont ainsi été analysées en isotopie, et 120 espèces pour leurs concentrations de Hg dans le muscle. Les traceurs isotopiques en particulier ont révélé que dans cet écosystème : 1) les mammifères marins sont un compartiment structurant des réseaux trophiques ; 2) les chaînes alimentaires sont relativement courtes ; 3) les chaînes alimentaires et les relations trophiques sont fortement organisées en "réseau" ; 4) le degré d'omnivorie est plutôt moyen dans l'écosystème, avec une tendance à l'augmentation chez les niveaux trophiques supérieurs. Ce travail de thèse a également mis en évidence une contamination en Hg plus importante dans le muscle des espèces provenant des habitats profonds du Golfe de Gascogne.

Dans un contexte de besoin d'outils de suivi de l'état écologique des écosystèmes marins, et des espèces composant les réseaux trophiques en présence, cette thèse a finalement démontré tout l'intérêt d'utiliser les traceurs écologiques tant à des fins de recherches fondamentales qu'à des fins appliquées en écologie marine.

Mots-clés : traceurs écologiques, isotopes stables, métaux, facteurs de variations, réseaux trophiques, environnement marin ouvert, Golfe de Gascogne.