



Ecophysiologie trophique des bivalves *Nodipecten subnodosus* et *Spondylus crassisquama* soumis à la variabilité environnementale dans la lagune d'Ojo de Liebre (Basse Californie, Mexique)

Margaux Mathieu-Resuge

► To cite this version:

Margaux Mathieu-Resuge. Ecophysiologie trophique des bivalves *Nodipecten subnodosus* et *Spondylus crassisquama* soumis à la variabilité environnementale dans la lagune d'Ojo de Liebre (Basse Californie, Mexique). Physiologie [q-bio.TO]. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2018. Français. NNT : 2018BRES0067 . tel-03020638

HAL Id: tel-03020638

<https://theses.hal.science/tel-03020638>

Submitted on 24 Nov 2020

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE
Comue Université Bretagne Loire

Ecole Doctorale n° 598
Sciences de la Mer et du littoral
Spécialité : *Ecologie marine*

Par

Margaux MATHIEU-RESUGE

Ecophysiologie trophique des bivalves *Nodipecten subnodosus* et *Spondylus crassisquama* soumis à la variabilité environnementale dans la lagune d'Ojo de Liebre (Basse Californie, Mexique)

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 23 Novembre 2018
Unité de recherche : Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin

Rapporteurs avant soutenance :

Marie-Elodie PERGA Professeur associée, Université de Lausanne

Martin KAINZ Directeur de recherche, Université de Danube Krems

Composition du Jury :

Marie-Elodie PERGA Professeur associée, Université de Lausanne

Martin KAINZ Directeur de recherche, Université de Danube Krems

Tarik MEZIANE Professeur, Muséum National d'Histoire Naturelle

Président du jury
Fred JEAN Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Directeur de thèse
Edouard KRAFFE Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale

Co-directeur de thèse
Savaldor LLUCH Chargé de recherche, CIBNOR

Invités

Fabienne LE GRAND Ingénieure de recherche, Université de Bretagne Occidentale

Gauthier SCHAAL Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale

Ecophysiologie trophique des bivalves *Nodipecten subnodosus* et *Spondylus crassisquama* soumis à la variabilité environnementale dans la lagune d'Ojo de Liebre (Basse Californie, Mexique)



Margaux MATHIEU-RESUGE

Directeur de thèse : Edouard KRAFFE

Co-directeur de thèse : Salvador LLUCH

Encadrants scientifiques : Fabienne LE GRAND

Gauthier SCHAAL

Le gras, c'est la vie.

Sir Karadoc

Remerciements

Cette histoire avec la mer elle a commencé à Port-Cros, quand mon père m'apprenait à dénicher les trous à mérous ou que ma mère me montrait comment nager sans crainte au-dessus des bancs de posidonies, que mon frère dressait les poulpes ou que l'on partait, sceau à la main, à la découverte de toutes les espèces méditerranéennes avec mes cousins.

Cette histoire elle a grandi au fil des mers, et des rencontres... De la rade de Toulon, au littoral Bordelais, en passant par le lagon Néo-Calédonien, les stations marines de Roscoff, Banyuls et Villefranche, pour s'épanouir quelques instants autour de la rade de Brest, et de la lagune d'Ojo de Liebre.

Cette histoire elle n'aurait pas été possible sans ce trio de femme qui m'a appris persévérance, force, courage et qui sans cesse m'a encouragé à poursuivre mes rêves. Ces trois sœurs qui nous ont offert la plus merveilleuse des Funky family ! Celles qui nous lient et protègent inconditionnellement...

Cette histoire elle ne serait peut-être pas née sans les histoires de plongées de mon père, de ses parties de pêches, ou de ses histoires de navigations ! Elle grandit aussi avec mon frère, qui avec patience et bienveillance me raconte son histoire à lui, devenant jour après jour, de plus en plus extraordinaire.

Durant ces trois dernières années, cette histoire a été remplie de rires, de joie et d'ami(e)s... de colloqs mignonettes, de repas dominicaux avec film et tisane, de parties de ping-pong, de café matinaux et de bières tardives. De soirées à danser sur les tables, de pluie et de vent mais aussi de ramassage d'escargots. Elle a connu la joie des galopades à poney le long des falaises du Conquet, et des balnéos dans l'eau froide. Elle a été faite d'apprentissages et de découvertes, de sessions surf à boire la tasse et d'autres à réussir à grimper sur une vague, de sorties plongées avec holothuries et sans visibilité, ou d'escapades Roscovittes et de piqueniques dans le vent... Elle a connu des compagnons de routes et de bureaux, tous extraordinaires ! Elle a aussi traversé les mers pour découvrir le Mexique, les baignades à Balandra et les palmeraies. Pour nager avec les requins baleines et les lobos. Pour découvrir des piscines naturelles perchées en haut des montagnes, pour s'endormir à la belle étoile, ou pour boire des bières au-dessus des toits. Elle a vu cette péninsule désertique et si riche, elle

a traversé les montagnes pour rencontrer des pêcheurs. Elle s'est perdue au milieu des dunes, pour slalomer entre les baleines. Elle a connu des dissections nocturnes, et le goût des tacos à 3h du matin. Elle s'est levée tôt pour admirer le soleil apparaître au milieu des cactus. Pendant trois ans cette histoire a découvert des îles Méditerranéennes et Indiennes, des pays longilignes, et qui à chaque rencontre, ont fait grandir cet intérêt pour la science...

Cette histoire elle n'aurait pas existé sans un autre trio, qui avec bienveillance, pédagogie et détermination m'a appris rigueur, organisation et raisonnement. Doudou, Fabi, Gauthier, à vous trois vous m'avez formé et conduit jusqu'ici, ma reconnaissance et mon amitié vous sont éternelles. Doudou je n'oublierai pas ces virées surf qui ont soulevé tant de questions mais ont apporté presque autant de réponses. Fabi tu as été mon refuge et sans cesse tu as su me montrer les routes à emprunter. Gauthier tu as été le pilier sur lequel j'ai pu m'appuyer, ton soutien fut si précieux !

Enfin, je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui ont contribué à cette thèse et son cheminement.

Je remercie les deux directeurs du LEMAR, Olivier Ragueneau et Luis Tito de Morais de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire. Ainsi que Christophe d'avoir pris les rênes du début thèse. Je tiens à remercier Martin Kainz et Marie-Elodie Perga pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail, ainsi que Tarik Meziane et Fred Jean d'avoir accepté d'examiner ma soutenance.

Je remercie l'équipe Discovery, la plateforme Lipidocean et particulièrement Phiphi, mais aussi le PSO, Oanez, Clément et Rudolph, pour m'avoir soutenu et permis de mener à bien toutes les tâches de cette thèse ! Merci Antoine, pour ton appui au labo, et Andy d'avoir analysé tous ces stérols. Merci à Julien d'avoir essayé de découper ces coquilles un peu trop épineuses.

Je souhaite également remercier le CIBNOR, Illie, Kitty, et Elena qui m'ont accueilli et permis de récupérer et préparer toutes ces coquilles. Mais surtout Rosy de m'avoir accompagné à chaque sortie terrain et de m'avoir toujours apporté ton aide. Merci à Pepe et toute son équipe pour avoir plongé et cherché mes coquilles, merci à Juanito d'avoir été le dernier de la liste ! Muchas gracias, nos vemos !

Je remercie aussi toute les équipes administratives (Anne So, Gene, Yves, Elisabeth et Elodie) qui même débordées solutionnent tous nos problèmes !

Table des matières

Remerciements	7
Liste des abréviations.....	16
Introduction generale.....	17
1. Les écosystèmes côtiers	18
a. Généralités.....	18
b. La lagune d'Ojo de Liebre	20
2. Biologie et Ecologie des bivalves filtreurs	27
a. Nodipecten subnodosus	28
b. Spondylus crassisquama	30
3. Objectifs de la thèse	34
Approche méthodologique :	37
une approche multi-traceurs et multi-tissus.....	37
1. Des tissus aux fonctions biologiques différentes.....	38
2. Les traceurs trophiques et physiologiques	39
a. Les isotopes stables	39
b. Les lipides	41
c. Les acides gras	43
d. Signature isotopique de composés spécifiques.....	46
e. Les stérols.....	47
Chapitre 1	53
1. Résumé	54
2. Article n°1	57
Abstract	58
Introduction.....	59

Material and methods.....	61
Results	66
Discussion	72
Conclusion	76
Acknowledgements	77
Additional tables	78
Chapitre 2	83
1. Résumé.....	84
2. Article n°2	86
Abstract	87
Introduction.....	88
Material and methods.....	91
Results	96
Discussion	103
Conclusion	106
Funding.....	106
Acknowledgements	107
Chapitre 3	109
1. Résumé.....	110
2. Article n°3	113
Abstract	114
Introduction.....	115
Material and methods.....	117
Results	119
Discussion	125
Funding.....	129

Acknowledgements	129
Supplementary data	130
Discussion générale et perspectives	133
1. Caractérisation trophique de la lagune.....	135
a. Les apports océaniques	135
b. Caractérisation du réseau trophique microbien.....	138
2. Ecophysiologie des bivalves filtreurs soumis à des variations environnementales ...	142
a. Influences trophique sur les compositions membranaires.....	142
b. Apports du CSIA sur les fractionnements physiologiques	144
3. Conclusion	149
Bibliographie	151

Liste des Figures

Figure 1. Schéma d'une lagune et des principaux échanges qui y ont lieux.....	19
Figure 2. Image satellite de la lagune d'Ojo de Liebre (Basse Californie du sud, Mexique)	20
Figure 3. Observation satellite de la concentration en Chlorophylle a de surface à différentes périodes.....	21
Figure 4. Suivi temporel de l'oxygène dissous (A), de la salinité (B) et de la température (C), depuis Janvier 2015 jusqu'à Juin 2016, à deux sites distincts « Entrada » en entrée de lagune et « Fondo » en fond de lagune (carte).....	23
Figure 5. Illustration des embarcations de pêches présentent dans la lagune d'Ojo de Liebre.	25
Figure 6- Principales espèces de bivalves, à valeur commerciale, pêchées dans la lagune d'Ojo de Liebre.....	26
Figure 7. - Photographie de <i>Nodipecten subnodosus</i>	29
Figure 8 - Photographie de <i>Spondylus crassisquama</i>	31
Figure 9. Photographie illustratrice d'une coupe transversale de la charnière de <i>Spondylus crassisquama</i>	33
Figure 10. Photographie d'une dissection de <i>Nodipecten subnodosus</i> représentant les tissus d'intérêts.	38
Figure 11. Fractionnement isotopique du carbone et de l'azote dans une chaîne alimentaire, les consommateurs primaires sont représentés en bleus, en vert : les consommateurs secondaires, et en marron : un prédateur.	40
Figure 12. Schémas représentant l'organisation de la bicouche lipidique (D) constituant les membranes cellulaires et d'une lipoprotéine (E).....	42
Figure 13. Représentation des principales classes de lipides : de réserve et membranaires.	43
Figure 14. Schéma de la structure d'un stérol. Avec la structure de base (A) et la chaîne latérale carbonée (B).	47
Figure 15. Structure standard d'un stérol (β -sitosterol) par la recommandation de l'IUPAC-IUB 1989.....	48
Figure 16. Location of the 4 sampling stations in the Ojo de Liebre lagoon (Baja California Sur, Mexico).....	61

Figure 17. Stable Isotope (SI) bi-plot ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, mean values $\pm\text{SD}$ when $n \geq 2$) of the adductor muscles of <i>Spondylus crassissquama</i> (represented by circles) and of their potential food sources (POM, SOM and seag seagrass).....	67
Figure 18. Principal Component Analyses (PCA) of neutral lipids (NL) fatty acids (FA) and sterols compositions (mass %) of <i>Spondylus crassissquama</i> digestive gland in February (A and C) and August (B and D).....	69
Figure 19. Boxplot of the ratios of 24-Methylencholesterol/Brassicasterol ($n=5$) and of 20:5n-3/22:6n-3 (EPA/DHA; $n=10$) of <i>Spondylus crassissquama</i> at the both periods.....	70
Figure 20. Correlations between the three biomarkers (Spearman's test): stable isotope rations (carbon and nitrogen; ‰), neutral lipid fatty acids, and sterols (mass %) for <i>Spondylus crassissquama</i>	72
Figure 21. Location of the 3 sampling stations in the Ojo de Liebre lagoon (Baja California Sur, Mexico).....	91
Figure 22. Stable Isotope (SI) bi-plot ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, mean values $\pm\text{SD}$ when $n > 2$) of the abductor muscles of <i>Spondylus crassiquama</i> and of its potential food sources, in June 2017, at the 3 sampled stations.	97
Figure 23. Box plot of $\delta^{13}\text{C}$ values (‰) of some selected neutral lipid fatty acid (FA) of <i>Spondylus crassissquama</i> digestive gland in June 2017 at each stations (1, 2, and 3).	100
Figure 24. Location of the 2 sampling stations in the Ojo de Liebre lagoon (Baja California Sur, Mexico).....	117
Figure 25. Principal Component analyses (PCA) of gill PL FA composition (mass %) of <i>N. subnodosus</i> and <i>S. crassissquama</i> gills in February and August.	121
Figure 26. Illustration des valeurs de fractionnements isotopiques du carbone d'un acide gras (AG) provenant d'un précurseur lipidique chez son consommateur. Le flux (1) représente le fractionnement « trophique » du à l'ingestion d'une proie, le (2) le fractionnement « physiologique » du aux élongations et désaturations d'un acides gras afin d'obtenir un AG dit bioconverti, le (3) représente le pool restant chez le consommateur après bioconversion d'un acide gras.	146
Figure 27. Schéma récapitulatif des influences saisonnières sur les ressources trophiques des bivalves en fond de lagune, et leur répercussion sur le métabolisme. Les flèches décrivent les flux de lipides ingérés et métabolisés par les bivalves, les éclairs désignent les facteurs qui peuvent influencer la régulation de ces flux.	148

Liste des tables

Tableau 1. Synthèse bibliographique des principaux phytostérols utilisés comme traceurs trophiques dans des études sélectionnées.....	51
Table 2. Total fatty acid (FA) composition (mean when n=2; mass %; for sedimentary organic matter (SOM) and <i>Zostera marina</i> n = 2; for particulate organic matter (POM) n = 1) of food sources during February and August 2016 from the both stations.....	79
Table 3. Sterol composition (mean; %; n ≤ 2) of food sources in February and August 2016 from the both stations.	80
Table 4. Neutral fatty acid (FA) composition (mean ± SD; mass %; n = 10) of <i>Spondylus crassisquama</i> digestive gland in February and August 2016, for the both stations. Only the FA accounting for > 0.5 % of total FA in at least one sample are shown.....	81
Table 5. Sterol composition (mean ± SD; %; n = 5) of <i>Spondylus crassisquama</i> digestive gland (DG) in February and August 2016, at both stations (Chocolatero and Datil). Only the sterols accounting for 0.5 % of total sterol in at least one sample are shown.	82
Table 6. Neutral lipid fatty acid (FA) composition (mean ± SD; mass % of total FA; n = 10) and Compound Specific Isotopic analysis (CSIA) of neutral lipid FA (mean ± SD; $\delta^{13}\text{C}$ ‰; n = 5) of <i>Spondylus crassisquama</i> digestive gland in June 2017, for the 3 stations (1, 2, and 3)	99
Table 7. Total fatty acid (FA) composition (mean; mass % of total FA; n = 2) and Compound Specific Isotopic analysis (CSIA) of FA (mean; $\delta^{13}\text{C}$ ‰; n = 2) of potential food sources, for the 3 stations (1, 2, and 3).....	102
Table 8. PL FA composition (mean ± SD; mass %; n = 10) of <i>N. subnodosus</i> gills in February and August 2016, for the both stations	123
Table 9. PL FA composition (mean ± SD; mass %; n = 10) of <i>S. crassiquama</i> gills in February and August 2016, for the both stations.	124
Table 10. NL FA composition (mean ± SD; mass %; n = 10) of <i>N. subnodosus</i> and <i>S. crassisquama</i> gills in February and August 2016, for the both stations Only the FAs accounting for > 1 % of total FA in at least one sample are shown.	130

Liste des abréviations

Fr	Eng	Definitions	
AA	AA	Acide Arachidonique 20:4n-6	Arachidonic acid
ACP	PCA	Analyse en composante principale	Principal component analyses
AG	FA	Acide gras	Fatty acid
AGMI	MUFA	Acide gras monoinsaturé	Monounsaturated fatty acid
AGPI	PUFA	Acide gras polyinsaturé	Polyunsaturated fatty acid
AGS	SFA	Acide gras saturé	Saturated fatty acid
ANOVA		Analyse de la variance	Analysis of variance
CSIA		Analyses de composés isotopiques spécifiques	Compound specific isotope analysis
DHA		Acide docosahexaénoïque 22:6n-3	Docosahexaenoic acid
EPA		Acide eicosapentaénoïque 20:5n-3	Eicosapentaenoic acid
KW		Kruskal-Wallis	Kruskal-Wallis
LN	NL	Lipide neutre	Neutral lipid
LP	PL	Lipide polaire	Polar lipid
MOP	POM	Matière organique particulaire	Particulate organic matter
MOS	SOM	Matière organique sédimentaire	Sedimentary organic matter
PERMANOVA		Analyse de variance par permutation	Permutational variance analyses
SIMPER		Analyse du pourcentage de similarité	Similarity percentages analyses
IS	SI	Isotopes stables	Stable isotopes

INTRODUCTION

GENERALE

1. Les écosystèmes côtiers

a. Généralités

Les zones côtières, situées à l'interface entre la terre et les océans, sont reconnues pour leur rôle majeure tant sur le plan écologique que socio-économique (Costanza, d'Arge, De Groot, Farber, Grasso, Hannon, Limburg, Naeem, O'Neill & Paruelo 1997; Martínez, Intralawan, Vázquez, Pérez-Maqueo, Sutton & Landgrave 2007). Le trait de côte mondial est si long qu'il serait possible de faire 402 fois le tour de l'équateur, 84% des pays du monde en dispose si bien qu'il abrite un quart de la population mondiale (Martínez *et al.* 2007). Grâce à leur grande diversité biologique et géomorphologique, les zones côtières rendent de nombreux services écosystémiques tel que l'approvisionnement en nourriture et en matière première, une protection du littoral face à l'érosion, ou un rôle essentiel dans le recyclage des nutriments et la réalisation des cycles biologiques (Gattuso, Frankignoulle & Wollast 1998; Levin, Boesch, Covich, Dahm, Erséus, Ewel, Kneib, Moldenke, Palmer & Snelgrove 2001; Martínez *et al.* 2007). Les eaux côtières fournissent aussi des habitats, des zones d'alimentation et de nourriceries (Clavier, Chauvaud, Amice, Lazure, Van Der Geest, Labrosse, Diagne, Carlier & Chauvaud 2014) essentiels pour de nombreuses espèces commerciales (Seitz, Wennhage, Bergström, Lipcius & Ysebaert 2014), soulignant leur importance dans la dynamique des populations et les ressources de pêches qui en découlent.

Les zones côtières, bien que fragiles et ne recouvrant que 7% de la surface globale des océans, représentent entre 14 et 30% de la production primaire océaniques (Gattuso *et al.* 1998), ce qui en fait les écosystèmes marins les plus productifs (Nixon 1982; Clavier *et al.* 2014). Cette forte production primaire s'explique notamment par d'importants apports de nutriments depuis les écosystèmes adjacents (Cloern, Foster & Kleckner 2014), qui vont être accentués par la nature peu profonde des écosystèmes côtiers. Les zones côtières sont par nature des carrefours soumis aux influences océaniques (marées), atmosphériques (vents), terrestres (apports fluviaux et lessivage des sols) et anthropiques (Grangeré, Lefebvre & Blin 2012). Les complexes interactions entre ces influences engendrent une grande dynamique spatio-temporelle (Cloern & Jassby 2008).

Les lagunes côtières (Figure 1) peuvent être définies comme une masse d'eau côtière peu profonde séparée de l'océan par une barrière, reliée au moins de façon intermittente à l'océan

par une ou plusieurs ouvertures plus ou moins larges (Kjerfve 1994). Les lagunes côtières comptent pour 13% des écosystèmes côtiers mondiaux (Kjerfve 1994). Elles sont généralement retrouvées le long des côtes abritées (Harris 2008). Du fait de l'intensité des phénomènes biogéochimiques qui s'y produisent, les lagunes côtières sont caractérisées par des niveaux de productivité primaires et secondaires très importantes ce qui les rends très propices aux activités de pêches et d'aquaculture. Leur faible profondeur en fait également parfois des lieux propices à l'exploitation de sels d'évaporites (Kjerfve 1994).

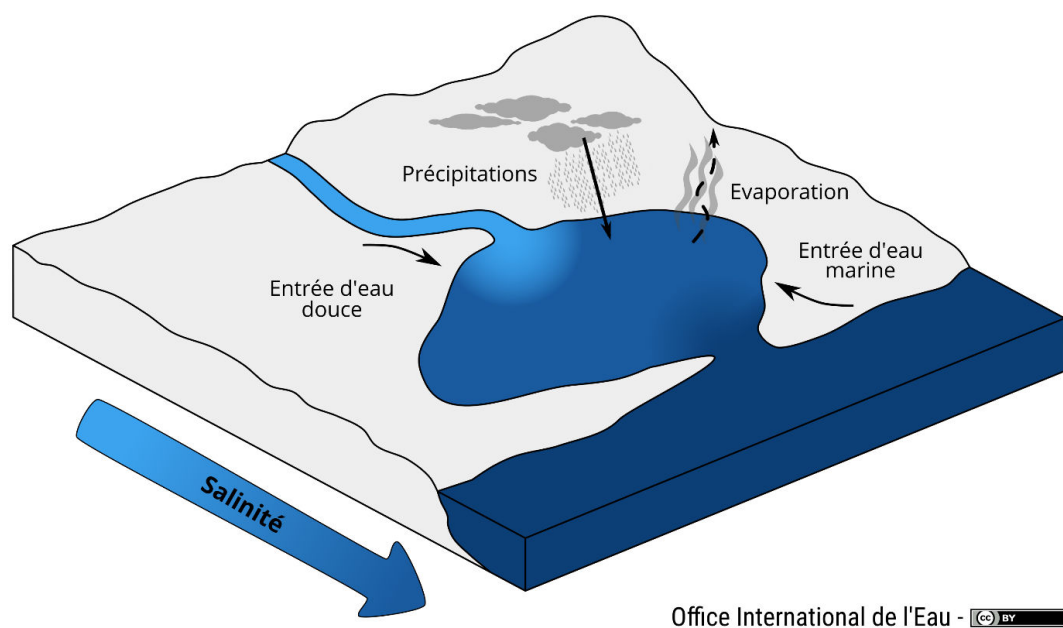


Figure 1. Schéma d'une lagune et des principaux échanges qui y ont lieu.

b. La lagune d'Ojo de Liebre

Généralités

La lagune d'Ojo de Liebre (Basse Californie, Mexique) (Figure 2), est l'une des lagunes les plus importantes du Pacifique Nord Est (≈ 40 km de long et ≈ 10 km de large, env. 446km^2). Depuis 1988, afin de protéger la faune et flore locale, elle fait partie intégrante de la réserve de

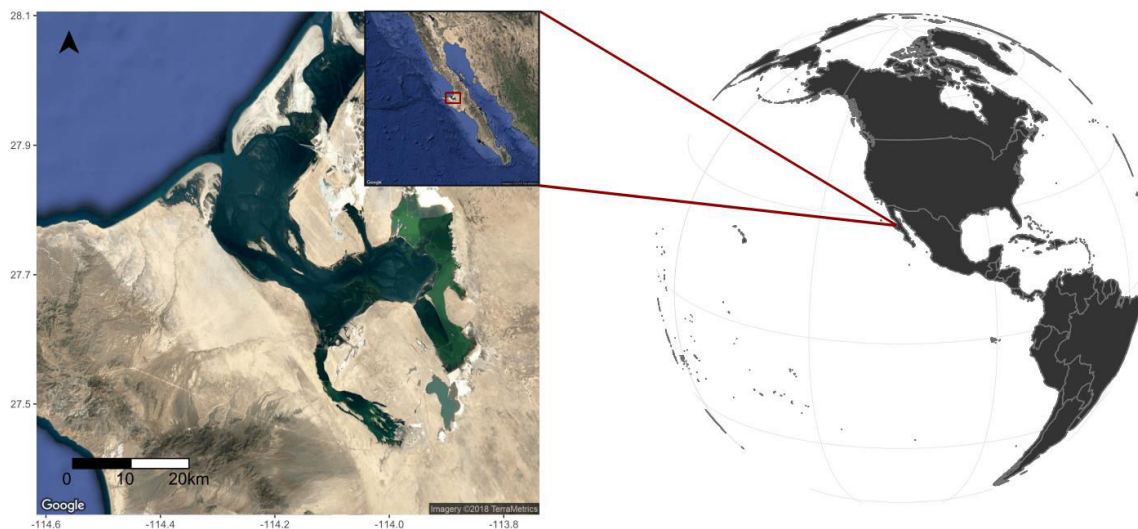


Figure 2. Image satellite de la lagune d'Ojo de Liebre (Basse Californie du sud, Mexique)

biosphère « El Vizcaíno », qui bénéficie de plusieurs protections internationales comme les conventions RAMSAR et le classement au patrimoine mondial de l'UNESCO. En effet, la lagune abrite de nombreux mammifères marins comme le dauphin (*Tursiops truncatus*), le lion de mer (*Zalophus californianus*), des phoques communs (*Phoca vitulina*), des éléphants de mers (*Mirounga angustirostris*), et cinq espèces de tortues marines (*Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys olivacea*, *Caretta caretta* *gigas*, and *Dermochelys coriacea*) (UNESCO; Carabias, Provencio, de la Maza, Gutiérrez, Gómez & Sánchez 2000). De Décembre à Avril, c'est aussi un site important de migration et de reproduction de baleines grises (*Eschrichtius robustus*) (Caraveo-Patino, Hobson & Soto 2007), ce qui engendre une importante activité de tourisme. D'autres activités anthropiques prospèrent autour de la lagune, notamment l'exploitation de sel. En effet, Ojo de Liebre comporte la seconde plus importante saline mondiale (Exportadora de Sal, S.A.), dont la production annuelle avoisine les 10 millions de tonnes, mais dont les nombreux marais salants permettent la présence plus de 250 espèces d'oiseaux migrateurs comme des oies ou des oiseaux de rivages (UNESCO).

Topographie et hydrodynamisme

Connectée à l'océan Pacifique par une ouverture large d'environ 4 km, sa topographie est caractérisée par de larges et profonds chenaux (18-20m) entrecoupés de bancs de sable intertidaux ou peu profonds (3-7m). Le régime de marée est de type semi-diurne (Ibarra-Obando, Camacho-Ibar, Carriquiry & Smith 2001), et le marnage varie entre 1 et 3m (Phleger & Ewing 1962). Les courants plus importants au centre des chenaux (≈ 2.5 à 3 km/h) diminuent au niveau des bancs de sable (≈ 0.6 à 2.5 km/h) (Phleger & Ewing 1962), sur lesquels se développent d'importants herbiers de *Zostera marina* largement répartis dans la lagune (Cabello-Pasini, Muñiz-Salazar & Ward 2003).

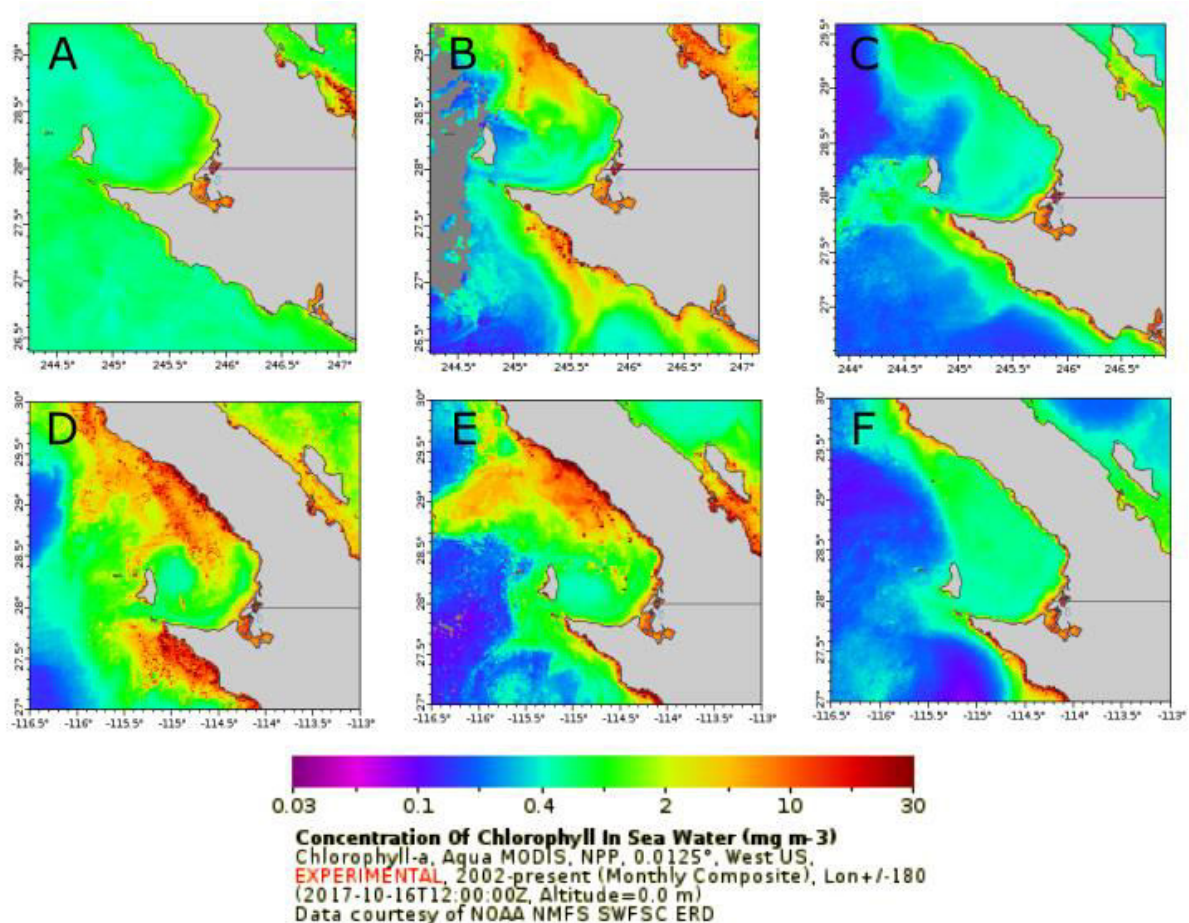


Figure 3. Observation satellite de la concentration en Chlorophylle a de surface à différentes périodes : Février (A), Juin (B), et Août (C) 2016, ainsi qu'en Avril (D), Juin (E), et Août (F) 2017.

La côte Pacifique de la Basse Californie fait face au Système du Courant Californien (CCS), où les phénomènes d'upwelling sont fréquents d'Avril à Juin (Du, Peterson & O'Higgins 2015), et engendrent des alternances de dominance des communautés marines (Chenillat 2011). Un important système d'upwelling décrit par (Zaytsev 2003) est actif à 200 km au Nord de la lagune (Figure 3B,D,E). Les masses d'eau côtières sont poussées le long de la côte

Californienne, par des vents qui sont tout au long de l'année dirigés vers l'équateur (Chenillat 2011). Aidées par le Courant de Californie auquel s'ajoutent les balancements des marées, ces masses d'eau peuvent influencer l'hydrodynamique et la production primaire de la zone (Zaytsev 2003).

De par le climat aride de la région, la lagune ne dispose de quasiment aucun apport d'eau douce (Phleger & Ewing 1962), ni par des eaux de surfaces ni par des sources souterraines et le taux de précipitation est inférieur au taux d'évaporation (Ibarra-Obando *et al.* 2001). En effet, les puissants vents présents dans la région, associés aux fortes radiations solaires, provoquent d'importantes évaporations qui ont pour effet d'augmenter la salinité en fond de lagune où les profondeurs sont les plus faibles (Phleger & Ewing 1962; Roldan-Carillo, Maeda-Martinez, Mass-Rojas & Sicard-Gonzalez 2005). Qualifiée d'hypersaline (Phleger & Ewing 1962), la lagune présente un gradient croissant de salinité depuis son embouchure jusqu'au fond (Phleger & Ewing 1962; Ibarra-Obando *et al.* 2001). Même si peu de fluctuations saisonnières sont observées durant la période de Janvier 2015 à Juin 2016 (Figure 4B), l'entrée de lagune est caractérisée par des valeurs plus faibles, comprises entre 34 et 35 psu, alors que le fond montre des variations de 36 à 40 psu (Figure 4B). La température de la colonne d'eau suit aussi un léger gradient de l'entrée vers le fond ($\approx 1-2^{\circ}\text{C}$ de différence), avec des valeurs plus hautes en fond de baie qu'à l'entrée (Figure 4C), probablement induites par la diminution de la profondeur et de la vitesse des courants (Phleger & Ewing 1962). Les changements saisonniers font que l'on retrouve les températures les plus importantes en été ($\approx 28^{\circ}\text{C}$, en moyenne de juin à août) et les températures les plus basses en hiver ($\approx 17.5^{\circ}\text{C}$, en moyenne de décembre à mars) (Figure 4C). Des études ont montré qu'aucune stratification verticale de la colonne d'eau n'était observée dans la lagune au cours de l'année, ce qui est très probablement due aux faibles profondeurs (Phleger & Ewing 1962). L'oxygène dissous présente des taux, à l'entrée et au fond de la lagune avec des variations saisonnières similaires aux deux stations (Figure 4A), avec des valeurs d'oxygène dissous légèrement plus hautes en entrée de lagune. Les valeurs les plus hautes sont observées durant l'hiver (7.4 mg.l^{-1} en moyenne de décembre à mars, à la station Entrada, et 6.6 mg.l^{-1} en moyenne à la station

Fondo), alors que les plus basses sont relevées en été (6.6 mg.l⁻¹ en moyenne de juin à août, à la station Entrada, et 5.6 mg.l⁻¹ en moyenne à la station Fondo).

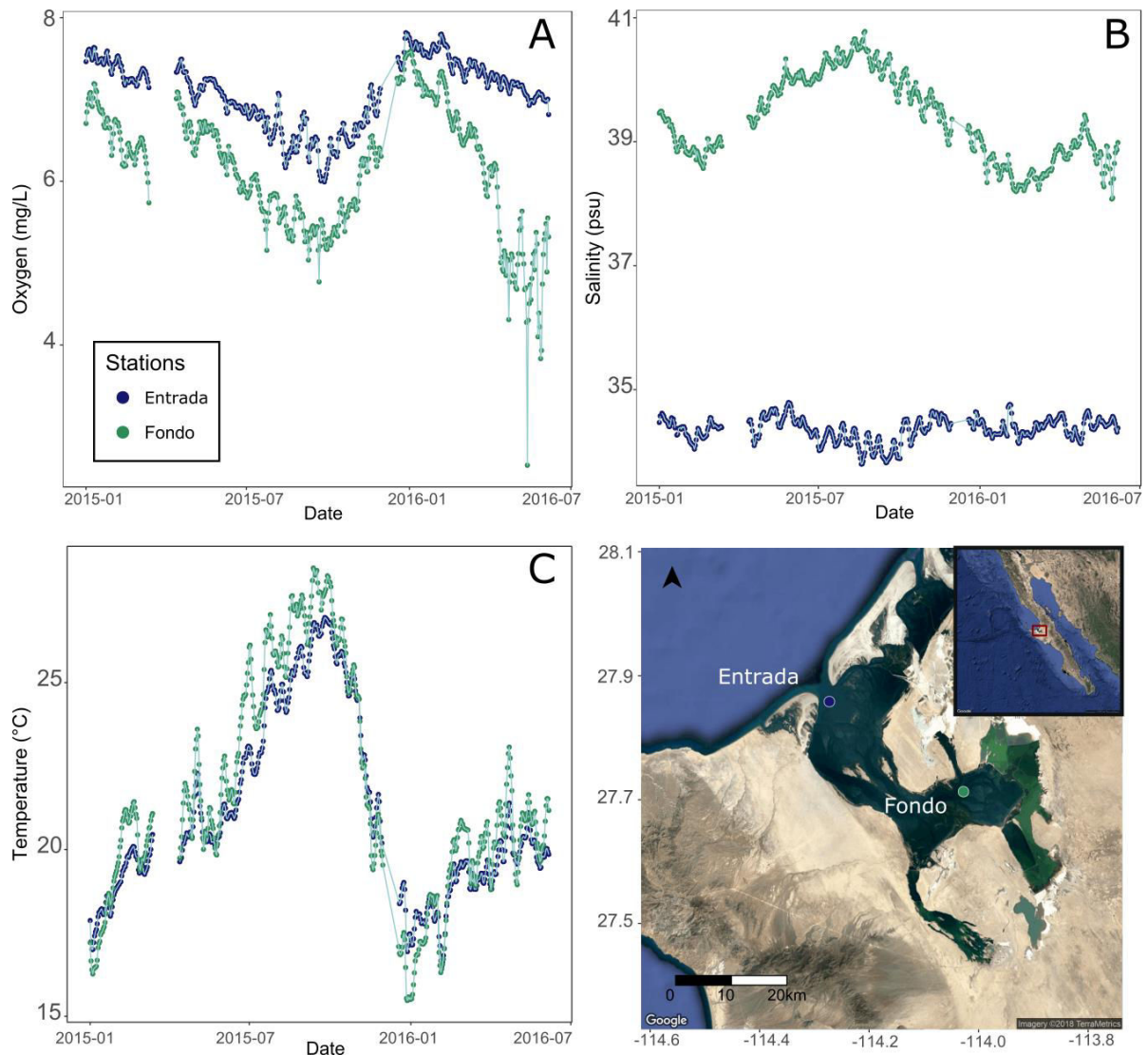


Figure 4. Suivi temporel de l'oxygène dissous (A), de la salinité (B) et de la température (C), depuis Janvier 2015 jusqu'à Juin 2016, à deux sites distincts « Entrada » en entrée de lagune et « Fondo » en fond de lagune (carte). Données récoltées par la réserve de biosphère « El Vizcaíno ».

Production primaire

La lagune d'Ojo de Liebre est considérée comme très productive (Phleger & Ewing 1962; Ibarra-Obando *et al.* 2001; Cabello-Pasini *et al.* 2003). Des estimations de concentration en Chlorophylle a ont pu être réalisées via les données satellitaires Aqua MODIS mises à disposition par la NOAA. Les variations annuelles ont été suivies au cours de l'année 2016. On observe des valeurs basses en janvier (7.43 mg.m⁻³), un maximum en avril (11.18 mg.m⁻³), des valeurs relativement stables en juin (8.4 mg.m⁻³) et août (8.49 mg.m⁻³), ainsi qu'une

diminution en décembre (5.99 mg.m⁻³). Ne disposant d'aucuns apports d'eaux d'origine continentales, les apports en nutriments dans la lagune sont uniquement d'origine locale (reminéralisation) et océaniques. De nombreuses espèces de macroalgues sont présentes dans la lagune (Ramírez, Casas Valdez, Cruz Ayala & Nunez Lopez 2000; Ramírez, Valdez, García, López & Ayala 2003), réparties en fonction de la salinité, des températures, de l'irradiance, et du type de substrat, leurs biomasses fluctuent au cours de l'année avec un maximum en été (Ramírez *et al.* 2003). La lagune abrite aussi l'un des plus importants herbiers de zostère (*Zostera marina*) du Pacifique Nord (Cabello-Pasini *et al.* 2003). Ces herbiers sont d'importantes ressources alimentaires pour de nombreuses espèces, et servent aussi d'habitat clef dans le recrutement des larves de poissons et mollusques (Santamaría Gallegos, Félix Pico, Sánchez-Lizaso, Palomares García & Mazón Suástegui 1999). Leur biomasse est aussi conditionnée par les changements des paramètres biotiques et abiotiques du milieu. Dans la lagune d'Ojo de Liebre, les densités maximums sont atteintes à la fin du mois de juin (1457 pieds.m⁻²) alors que les densités minimums sont observées entre octobre et février (501 pieds.m⁻²) (Cabello-Pasini *et al.* 2003). A notre connaissance, les espèces phytoplanctoniques présentent dans la lagune n'ont été décrites qu'une seule fois par Millán-Núñez *et al.* (1987). Durant trois jours, des analyses en pigments et en espèces planctoniques ont été réalisées, révélant que le type de microalgues le plus présent à l'échelle de la baie était les diatomées, représentant 17 genres sur les 19 recensés, suivis des dinoflagellés (1 genre recensés) et de microflagellés dont le genre n'a pas été précisé.

Pêcheries

Grâce à sa production primaire très importante et à l'abondance d'herbiers de zostères, Ojo de Liebre est une zone de nourrissage et de nurserie pour de nombreuses espèces de mammifères, de poissons, de céphalopodes, de crustacés et de mollusques. Depuis les années 50, plusieurs coopératives de pêches se regroupent pour gérer et exploiter ces ressources sous la surveillance de la réserve de biosphère El Vizcaíno. La pêche (Figure 5) est l'une des principales ressources économiques de la région. L'une des pêcheries les plus importantes est celle de bivalves, localement appelés « almejas ». Depuis les années 60, des réglementations (*i.e.* quotas de pêche, période d'exploitation) régissent les captures de différentes espèces de bivalves prélevées dans la lagune (*i.e.* *Megapitaria squalida*, *Atrina maura*, *Argopecten*

ventricosus, *Nodipecten subnodosus*, *Spondylus crassisquama*) (Figure 6). Des dizaines d'espèces sont pêchées manuellement en plongée par une technique de narguilé, sur des bancs aux sédiments vaseux et/ou sableux. L'INAPESCA (Instituto Nacional de Pesca) est responsable de l'évaluation des stocks et délivre annuellement environ 144 permis de pêche, pour un total de 354 bateaux. Cependant les données de biomasse et quotas de pêche sont difficilement accessibles auprès de l'INESCA. Aujourd'hui la saison de pêche s'étend généralement de Mai à Novembre (Ruiz-Verdugo, Koch, Félix-Pico, Beltran-Lugo, Cáceres-Martínez, Mazon-Suastegui, Robles-Mungaray & Cáceres-Martínez 2016a), mais en fonction des stocks disponibles celle-ci peut être réduite et/ou interdite pour certaines espèces ciblées.



Figure 5. Illustration des embarcations de pêches présentes dans la lagune d'Ojo de Liebre. Une équipe de pêcheurs s'apprête à prélever des coquillages au narguilé (haut gauche) ; la pêche à la palangre est couramment utilisée pour prélever poissons et céphalopodes (haut droit) ; port de pêche ou les pêcheurs débarquent des prises journalières (bas).

Ojo de Liebre représentait historiquement la principale zone d'exploitation du pays de *Nodipecten subnodosus* (aussi appelée Mano de Leon), bien que des comptages effectués par la National Fisheries Institute (Mexico) démontrent qu'elle est aussi présente le long des côtes du golfe de Californie (Masso-Rojas, Morales-Bojorquez & Talavera-Mayer 2000) et tout au long

de la péninsule Californienne. Dans la lagune d'Ojo de Liebre, elle a été pêchée intensivement depuis les années 90, où elle atteignait alors une production annuelle de 35 de tonnes de muscle frais. Des stratégies de gestion des populations ont avaient été mises en place et les stocks ont été maintenus constants une dizaine d'années. Son plus haut niveau de prélèvement fut atteint en 2009 avec 320 tonnes de muscles pêchées (Crespo Guerrero & Pelcastre 2016). En 2010, 280 tonnes ont été prélevés (Crespo Guerrero & Pelcastre 2016),

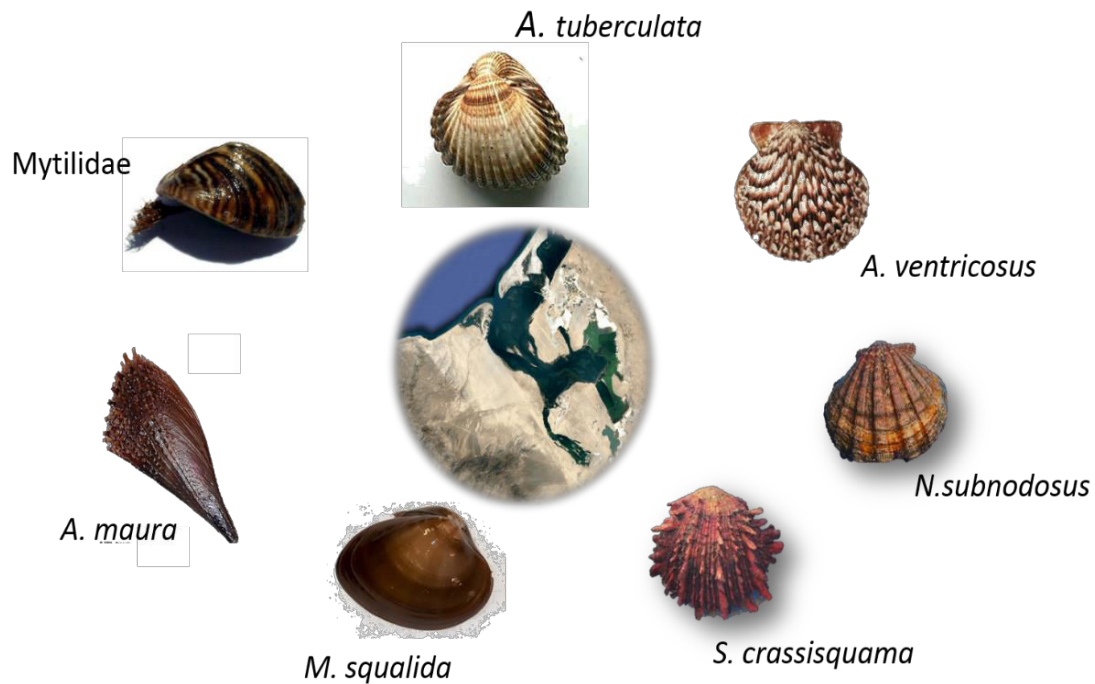


Figure 6- Principales espèces de bivalves, à valeur commerciale, pêchées dans la lagune d'Ojo de Liebre

puis en 2011 les stocks se sont effondrés, amenant les autorités à fermer la pêche de *N. subnodosus* depuis 2012 jusqu'à aujourd'hui (Ruiz-Verdugo, Koch, Félix-Pico, Beltran-Lugo, Cáceres-Martínez, Mazon-Suastegui, Robles-Mungaray & Cáceres-Martínez 2016b).

La pêcherie de *N. subnodosus* à Ojo de Liebre n'est pas la seule à avoir subi ce type d'effondrement de stock en Basse Californie. *Argopecten ventricosus* était ainsi fortement prélevée dans la baie de Magdalena (à 200 km au sud d'Ojo de Liebre) depuis 1970. Les débarquements atteignant la valeur record de 11 926 kt (de muscles et coquilles) en 2010, avant un déclin à 497 kt en 2013 qui a conduit les autorités à fermer sa pêche depuis 2014 (Ruiz-Verdugo *et al.* 2016b). *A. ventricosus* a également fait l'objet d'une pêche intensive à Ojo de Liebre dans les années 80, avant que sa raréfaction dans la zone pousse vers l'exploitation de *N. subnodosus*. Actuellement, l'effort de pêche à Ojo de Liebre est focalisé

sur *Spondylus crassisquama*, dont la population dans la lagune d'Ojo de Liebre est estimée à plus de 20 millions d'organismes (Centro Regional de Investigación de Pesquera, et Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca).

Si aujourd'hui aucune explication n'a permis d'éclaircir de manière définitive les causes cette succession d'espèces, différentes hypothèses ont été investiguées. L'importante colonisation dont peut faire l'objet les coquilles de *N. subnodosus*, y compris par des éponges et polychètes foreurs, a été imaginée comme pouvant jouer un rôle dans la chute des populations. Aucun réel effet sur le fonctionnement de l'organisme n'a cependant été mis en évidence (González-Ortiz, Hernández-Alcántara, Vázquez-Juárez, Quiroz-Guzmán, García-Garza & de León-González 2017). Des études sur les différents pathogènes y compris l'herpès virus (OsHV-1) présents dans *N. subnodosus* n'ont pas non plus réussi à conclure quant à leurs impacts (R Vázquez-Juárez, Comm. Pers.). Ces différentes études laissent penser que les raisons des successions d'espèces restent multi factorielles et qu'un effort simultané sur la bonne compréhension du fonctionnement de l'écosystème et des espèces reste nécessaire.

2. Biologie et Ecologie des bivalves filtreurs

Les organismes filtreurs benthiques, principaux composants des communautés côtières (Dame 1993), jouent un rôle majeur en tant que régulateur des flux biogéochimiques benthopélagiques (Dame 1993; Smaal & Prins 1993; Grall & Chauvaud 2002). Les bivalves sont des consommateurs primaires qui se nourrissent de matériel particulaire en suspension dans la colonne d'eau (seston). Cependant, il a été démontré que plusieurs espèces de bivalves peuvent avoir des alimentations variées dans un même écosystème (Rossi, Herman & Middelburg 2004), certaines espèces étant même capables de changer de mode d'alimentation en fonction de la nourriture disponible dans l'environnement (Levinton 1991). La qualité de la matière organique ainsi que la taille des particules sont prises en compte dans le choix des particules qui vont être triées puis ingérés ou rejetés (Shumway, Cucci, Newell & Yentsch 1985). Même si les bivalves filtreurs se nourrissent principalement de phytoplancton et de microphytobenthos (Lefebvre, Harma & Blin 2009), des études ont révélé que la contribution de nanoplancton, de matériel détritique, de bactéries, de zooplanctons et de détritus de macroalgues dans leur alimentation était aussi possible (Chauvaud, Donval,

Thouzeau, Paulet & Nézan 2001; Decottignies, Beninger, Rincé, Robins & Riera 2007; Schaal, Riera & Leroux 2008; Yokoyama, Sakami & Ishihi 2009; Nerot, Lorrain, Grall, Gillikin, Munaron, Le Bris & Paulet 2012; Chouvelon, Schaal, Grall, Pernet, Perdriau, A-Pernet & Le Bris 2015). Cette variabilité de ressources alimentaires souligne le besoin de caractériser et d'appréhender ces changements via différents outils.

Les organismes filtreurs benthiques sont aussi utilisés comme témoins des variations environnementales spatiales et/ou saisonnières (Riera & Richard 1997; Decottignies *et al.* 2007). L'utilisation des organismes suspensivores benthiques comme traceurs des conditions environnementales s'est particulièrement développée dans les environnements côtiers, le long de gradients côte-large (Marchais, Schaal, Grall, Lorrain, Nerot, Richard & Chauvaud 2013; Chouvelon *et al.* 2015; Nerot, Meziane, Schaal, Grall, Lorrain, Paulet & Kraffe 2015), au sein de baies côtières (Riera 2007; Lavaud, Artigaud, Le Grand, Donval, Soudant, Flye-Sainte-Marie, Strohmeier, Strand, Leynaert & Beker 2018) ou dans des lagunes (Carlier, Riera, Amouroux, Bodiou, Escoubeyrou, Desmalades, Caparros & Grémare 2007; Clavier *et al.* 2014). De nombreuses propriétés écologiques et physiologiques favorisent l'utilisation des bivalves comme bioindicateurs des conditions environnementales (Nerot *et al.* 2015; Dame 2016) : leur abondance et large distribution spatiale, leur sédentarité, leur tolérance à une large gamme de paramètres physico-chimiques, leur intégration des éléments chimiques induite par un fort taux de filtration, leur faible activité métabolique, la facilité de mesure de leurs réponses physiologiques et comportementales. Ces caractéristiques permettent ainsi l'utilisation des bivalves pour le suivi des variations spatio-temporelles de la concentration en matières organiques présentes dans les écosystèmes côtiers.

a. *Nodipecten subnodosus*

Généralités

Nodipecten subnodosus est un bivalve filtreur présent sur la côte Pacifique en Amérique centrale et du Sud, son aire de répartition géographique allant de la Basse Californie (Mexique) au Nord jusqu'au Pérou, au Sud en passant par le Golfe de Californie. Elle fait partie de l'embranchement des mollusques :

- Classe : Bivalvia
- Ordre : Pectinida

- Famille : Pectinidae
- Genre : Nodipecten
- Espèce : *Nodipecten subnodosus* (G.B. Sowerby I, 1835)

Sa coquille calcaire peut atteindre 21 cm de haut et environ 22 cm de long. Ses deux valves asymétriques, de couleur brune à rougeâtre, se caractérisent par des côtes radiales, ainsi que des stries journalières concentriques (Figure 7).



Figure 7. - Photographie de *Nodipecten subnodosus*.

Sa masse viscérale est enveloppée d'un manteau qui joue un rôle dans la synthèse de la coquille. Au printemps, la gonade se développe progressivement grâce aux réserves accumulées. Autour du manteau, se trouve les branchies, qui ont un double rôle : la respiration et la nutrition. A l'extrémité de ses branchies se trouvent des ocelles. Ces photorécepteurs sensibles aux changements de luminosité interviennent dans les cycles nyctéméraux pour la reproduction, mais aussi pour détecter d'éventuels prédateurs. Les particules filtrées par les branchies sont sélectionnées par les palpes labiaux et sont ensuite introduites par la bouche dans le système digestif, ou rejetées sous forme de pseudo-fèces. En entrant par la bouche, elles sont dirigées vers l'estomac qui est entouré par la glande digestive, avant d'être absorbées. La gonade hermaphrodite est séparée de la masse viscérale, et il est possible de différencier la partie gonade femelle (rosée) de la partie gonade mâle (blanche).

Le système circulatoire des bivalves est constitué d'un cœur et d'un système veineux sous forme de ramifications diffuses. Le système nerveux est lui constitué de trois paires de ganglions (cérébraux, pédieux et viscéraux).

Sa croissance a été décrite par (Racotta et al. 2003) au sein de la Baie de Magdalena (Basse Californie du Sud, Mexique) sur une période de 18 mois, avec une augmentation journalière de hauteur de coquille égale à 0.22 mm et présentant des stries journalières et annuelles. Une autre étude menée dans la baie de La Paz (Basse Californie du Sud, Mexique), montre une croissance totale sur une période de 13 mois, d'environ 57 mm de hauteur, de 55 mm de longueur et de 23 mm de largeur (Barrios-Ruiz, Chávez-Villalba & Cáceres-Martínez 2003).

Reproduction

N. subnodosus est un hermaphrodite simultané, chez lequel les gamètes mâles et femelles deviennent matures en même temps mais dont l'émission des gamètes peut être décalée (Arellano-Martinez 2004).

Le développement gonadique peut être différencié en 7 stades (Arellano-Martinez 2004) :

- L'indifférencié : absence de gamètes
- Le développement précoce : prolifération des gamètes et expansion des follicules
- Le développement tardif : augmentation des gamètes matures
- La maturation : les gamètes sont totalement matures
- La ponte partielle : des quantités variables de follicules sont partiellement ou totalement vides
- Post-ponte : les gonades sont totalement vides de follicules
- Réabsorption : nombreux hémocytes macrophages observés entre et dans les follicules

L'indifférenciation a généralement lieu en hiver de décembre à mars. Ce stade est suivi du stade de développement d'avril à juillet, puis de la période de ponte principale d'août à novembre. Des pontes partielles peuvent être observées entre décembre et mars (Arellano-Martinez 2004).

b. *Spondylus crassisquama*

Généralités

Spondylus crassisquama, aussi trouvé dans la littérature sous le nom de *Spondylus princeps* (Broderip, 1833), présente les mêmes limites de répartition que *N. subnodosus* avec une distribution à la fois sur les côtes pacifiques et sur celles du Golfe de Californie en Basse

Californie (Mexico), jusqu'au Pérou. Elle fait partie de l'embranchement des mollusques, mais se différencie de *N. subnodosus* au niveau de la famille :

- Classe : Bivalvia
- Ordre : Pectinida
- Famille : Spondylidae
- Genre : Spondylus
- Espèce : *Spondylus crassisquama* (Lamarck, 1819)



Figure 8 - Photographie de *Spondylus crassisquama*.

Sa coquille calcaire peut atteindre jusqu'à 13 cm de haut et environ 15 cm de long. Ses deux valves asymétriques, de couleur orangeâtre à rougeâtre, se caractérisent par des côtes radiales ornementées d'épines (Figure 8) qui lui sert de défense contre les prédateurs. La coquille, fortement colonisée par une faune variée et parfois perforante (éponges et annélides polychètes), peut abriter jusqu'à 71 espèces d'épibionthes (Mackensen, Brey, Bock & Luna 2012). A taille adulte, les spécimens les plus colonisés perdent leurs épines. L'intérieur de la coquille est blanc, avec les bords de couleur rouge et la présence de stries. Sa coquille avait une grande importance dans les cultures préhispaniques d'Amérique Latine (Marcos 2005), servant d'offrandes lors de rituels, mais aussi d'objets personnels et décoratifs servant à marquer son statut social (Lodeiros, Soria, Valentich-Scott, Munguía-Vega, Cabrera, Cudney-Bueno, Loor, Márquez & Sonnenholzner 2016). L'hypothèse la plus répandue sur sa symbolique réside dans son association à la fécondité, ses périodes de forte abondance correspondant à une augmentation des températures de l'eau et au début de la saison des

pluies annonçant les récoltes, en lien avec les oscillations d'el Niño (Marcos 2005; Lodeiros *et al.* 2016).

Comme *N. subnodosus*, la coquille renferme une masse viscérale maintenue par un muscle adducteur, et enveloppée d'un manteau qui participe aussi à la synthèse de la coquille. Possédant la même période de reproduction que *N. subnodosus*, c'est au printemps que la gonade se développe progressivement grâce aux réserves accumulées. *S. crassisquama* possède une particularité au niveau de la gonade puisque celle-ci se développe autour de la glande digestive. Les branchies ont aussi un double rôle à la fois dans la respiration et dans la nutrition. Mais à l'identique de tous les bivalves filtreurs, les particules filtrées par les branchies et sélectionnées par des palpes, sont ensuite introduites dans le système digestif ou rejetées sous forme de pseudo-fèces. Elles entrent par la bouche, sont dirigés vers l'estomac, qui est entouré par la glande digestive, avant d'être absorbées puis excrétées. De même, le système circulatoire présente la même organisation simple et commune à tous les mollusques bivalves.

Sa croissance n'est pour l'instant pas décrite dans la littérature, même si des études préliminaires de sclérochronologie ont été effectuées au LEMAR. Il n'a pas été possible de lire les stries sur les valves en raison des épines (davantage présentes chez les plus petits organismes) et des nombreuses perforations de la valve dues aux éponges (pour les organismes les plus grands). La lecture a donc été effectuée sur la charnière (Figure 9), et il semblerait que la croissance soit marquée par des stries annuelles, comme observé pour les pectenidés. Les multiples perforations visibles jusque dans la charnière ont rendu la lecture compliquée, mais il semblerait qu'un individu mesurant environ 8 cm de long aurait un âge au moins égal à 7 ans, ce qui correspondrait à une croissance annuelle de 1 à 1.14cm, ce qui serait légèrement plus important que pour *N. subnodosus* (dont la croissance est décrite à environ 0.80 cm.an⁻¹).

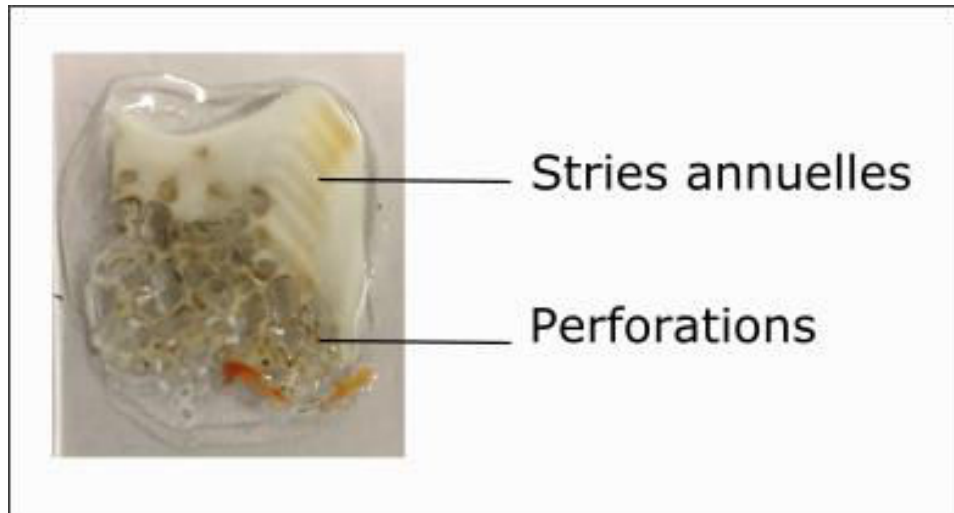


Figure 9. Photographie illustratrice d'une coupe transversale de la charnière de *Spondylus crassisquama*, les stries annuelles apparaissent en claires (en haut), et les perforations causées par les éponges forment les trous (en bas).

Reproduction

S. crassisquama est une espèce gonochorique. Son cycle de reproduction est pauvrement décrit dans la littérature mais quelques auteurs le comparent à celui de *Spondylus calcifer* qui présente un sexe ratio de 1:1 (Villalejo-Fuerte, Muñetón-Gómez & Socorro 2002). Son cycle reproductif est annuel et semble suivre le même schéma que celui de *N. subnodosus* (Villalejo-Fuerte, Tripp-Quezada & García-Domínguez 2005), avec une alternance des phases de maturation au printemps (de mai à juillet), une phase de ponte estivale observée d'août à octobre, et une phase de repos hivernal de novembre à mars (Villalejo-Fuerte *et al.* 2005).

3. Objectifs de la thèse

L'objectif de la thèse a été de caractériser comment les variations environnementales et saisonnières ont influencés l'écophysiologie trophique de *S. crassisquama* et *N. subnodosus* au sein de la lagune d'Ojo de Liebre. Dans un contexte de successions d'espèces, caractériser l'écophysiologie trophique des deux espèces est importante afin de savoir (1) si elles exploitent ou non des ressources trophiques identiques et (2) si leurs réponses physiologiques en sont impactées. Au cours de cette thèse, différentes techniques ont été employées, certaines couramment utilisées dans des études trophiques et physiologiques (*i.e.* analyses d'isotopes stables et d'acides gras des lipides de réserve et membranaires) mais aussi d'autres plus novatrices dans ces domaines (*i.e.* analyse isotopique sur composés spécifiques et analyse de la composition en stérols). Ce travail se compose de trois parties dans lesquelles il s'agit de :

- i. Décrire et comparer les différences **de composition isotopiques, en acides gras des lipides de réserve, et en stérols** chez une espèce de bivalve (*Spondylus crassisquama*) au sein de la lagune et à deux saisons contrastées.

Aux vues des faibles connaissances sur l'écologie des bivalves filtreurs et sur le fonctionnement trophique de la lagune d'Ojo de Liebre, la première partie de ce chapitre permet de comprendre comment la structure de la lagune et les changements saisonniers influenceraient le régime trophique de *S. crassisquama*. Dans un second temps, afin de caractériser plus précisément le régime alimentaire de l'espèce étudiée, la composition en stérols a été analysée et comparée à celle en acide gras afin de comprendre comment l'utilisation conjointe de ces biomarqueurs lipidiques peut être complémentaire.

- ii. Caractériser les contributions respectives de la **production allochtone issue des masses d'eaux océaniques** et de la **production locale** dans l'alimentation des deux espèces.

L'objectif a été de caractériser l'origine des différentes composantes du régime alimentaire de *S. crassisquama* au sein de la lagune et ce grâce à l'analyse isotopiques des composés spécifiques (ici les acides gras des lipides de réserve).

- iii. Décrire comment la disparité environnementale et saisonnière engendre des **régulations physiologiques** différentes chez les deux espèces.

Au travers de cet ultime chapitre le but a été d'évaluer si et comment les différents apports trophiques (saisonniers et spatiaux) influencent les réponses physiologiques de *Spondylus crassisquama* et *Nodipecten subnodosus* face à la variabilité de leur environnement.

Il s'agit ici d'aborder le concept d'écophysiologie trophique ou comment les individus répondent aux variabilités environnementales et à leurs besoins physiologiques dans un contexte de ressources trophiques variables.

APPROCHE

METHODOLOGIQUE :

UNE APPROCHE MULTI-

TRACEURS ET MULTI-

TISSUS

1. Des tissus aux fonctions biologiques différentes

Pour pouvoir accéder à différentes informations liées à la fois au régime alimentaire mais aussi à la physiologie des individus, plusieurs tissus ont été échantillonnés et analysés dans le cadre de cette thèse. En effet, les tissus ont des fonctions biologiques, des turnovers (taux de renouvellement tissulaire), et des taux de lipides différents et intègrent donc des réponses métaboliques et trophiques à différentes échelles de temps.

Pour chaque échantillonnage, et sur chacun des individus prélevés, quatre tissus ont été sélectionnés afin d'analyser différents traceurs physiologiques et trophiques : le muscle adducteur, la glande digestive, les branchies (Figure 10).

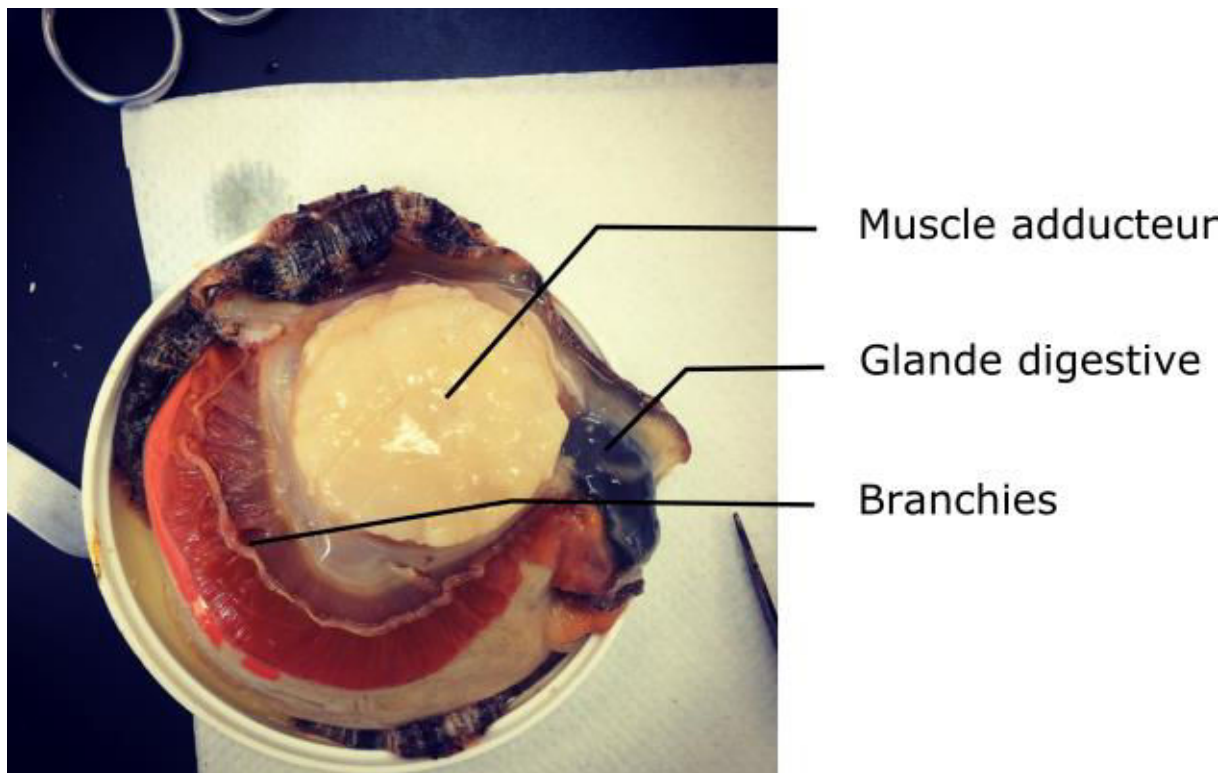


Figure 10. Photographie d'une dissection de *Nodipecten subnodosus* représentant les tissus d'intérêt.

2. Les traceurs trophiques et physiologiques

Les traceurs trophiques sont des composés à l'origine unique et dont l'intégrité structurelle est conservée au cours des transferts trophiques. Leur utilisation permet de comprendre les interactions proies/prédateurs au sein des écosystèmes (Dalsgaard, St. John, Kattner, Müller-Navarra & Hagen 2003). Toutefois, la grande diversité des sources présentes dans un environnement rend souvent difficile la parfaite identification et quantification de ces composés dans un organisme consommateur. Pour pallier cette difficulté, de nombreuses études emploient simultanément différents traceurs trophiques, dont les modes de transfert et d'incorporation/assimilation sont connus et/ou quantifiables.

a. Les isotopes stables

Définition

Les isotopes sont différentes formes d'un même élément chimique ayant le même nombre de protons, mais qui diffèrent par leur nombre de neutrons. Ils ont donc des masses atomiques différentes, ce qui leur confère des propriétés physicochimiques variables. Les isotopes stables (IS) sont particulièrement intéressants en écologie trophique puisqu'ils conservent leur structure, contrairement aux isotopes radioactifs, qui se désintègrent au cours du temps en éléments plus légers (perte de neutrons). Le rapport isotopique d'un échantillon est exprimé en δ (‰) et calculé par la formule suivante :

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{échantillon}} \text{ ou } \delta^{15}\text{N}_{\text{échantillon}} = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}})-1] \cdot 10^{-3} \text{ et où } R \text{ est } ^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ ou } ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}.$$

Pour le carbone, la composition isotopique du standard correspond à celle du Pee Dee Belmnite (une roche fossile du Carbonifère) alors que celui utilisé pour l'azote correspond à l'azote atmosphérique.

En écologie trophique, ce sont principalement les isotopes du **carbone** et de l'**azote** qui sont utilisés. Le traçage isotopique est basé sur le rapport entre l'abondance d'un isotope lourd sur un léger ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ou $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). Ce rapport varie de manière prédictible entre les organismes tout au long de la chaîne trophique, puisque les isotopes légers sont préférentiellement utilisés lors de la respiration et de l'excrétion, ce qui augmente l'accumulation des isotopes lourds à chaque niveau trophique. Cette augmentation de la teneur en isotopes lourds est appelée **fractionnement isotopique** (Fry 2006). Le fractionnement isotopique (Figure 11) entre une source et son consommateur est établi et correspond généralement à une augmentation de

1 ‰ du $\delta^{13}\text{C}$ et de 2.5 ‰ du $\delta^{15}\text{N}$ (entre un producteur primaire et son consommateur) ou de 3.4 ‰ (entre un consommateur primaire et un prédateur) (Vander Zanden & Rasmussen 2001). Cependant, des études montrent que ces valeurs de fractionnement sont dépendantes de l'espèce, du tissu étudié et du type d'organisme consommé (Lorrain, Paulet, Chauvaud, Savoye, Donval & Saout 2002; Yokoyama, Tamaki, Harada, Shimoda, Koyama & Ishihi 2005; Kim, del Rio, Casper & Koch 2012) et il est donc nécessaire d'être prudent avec son application.

Les isotopes stables comme marqueurs trophiques

Les isotopes stables sont couramment utilisés par les écologistes et les biologistes afin de comprendre les transferts de matière au sein des écosystèmes. Ils peuvent être utilisés à **différentes échelles**, à celle des populations afin d'étudier les relations trophiques entre un consommateur et ses sources potentielles de nourriture (Nerot *et al.* 2012; Marchais *et al.* 2013), mais aussi à celle des communautés afin de mieux comprendre le fonctionnement des réseaux trophiques (Grall, Le Loc'h, Guyonnet & Riera 2006; Schaal *et al.* 2008).

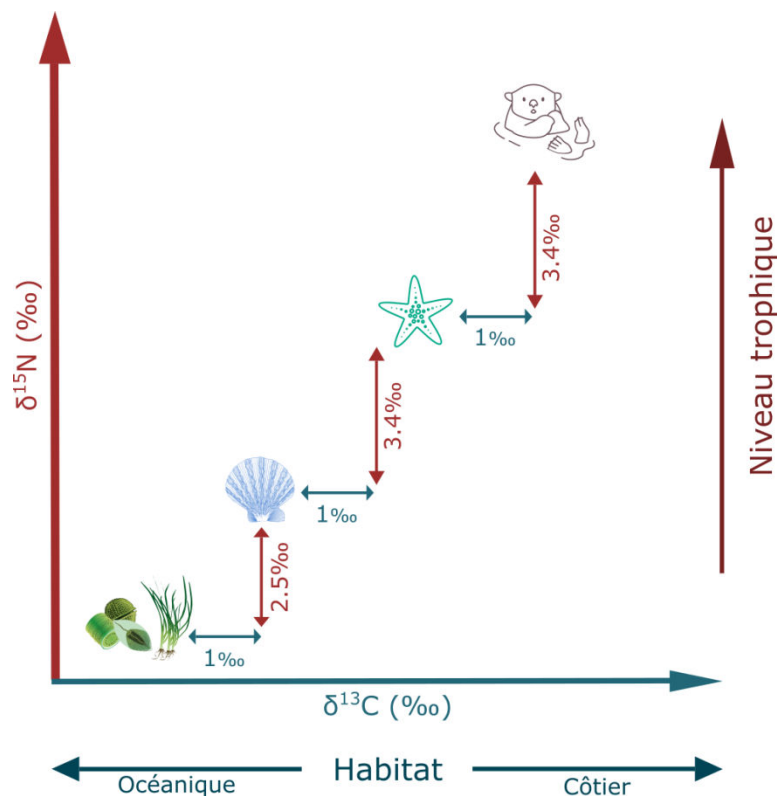


Figure 11. Fractionnement isotopique du carbone et de l'azote dans une chaîne alimentaire, les consommateurs primaires sont représentés en bleus, en vert : les consommateurs secondaires, et en marron : un prédateur. Les rapports isotopiques du carbone ($\delta^{13}\text{C}$) sont représentés en abscisse, ceux de l'azote en ordonnée ($\delta^{15}\text{N}$), valeurs tirées de Vander Zanden & Rasmussen (2001).

Il est possible de distinguer les rapports isotopiques des différents producteurs primaires au sein d'un écosystème. Des différences de composition isotopique vont être engendrées par les diverses sources de carbone et d'azote et/ou par les voies métaboliques utilisées lors de la photosynthèse (Fry & Sherr 1989).

Le $\delta^{13}\text{C}$ est peu modifié lors de la consommation d'une proie par un prédateur. Ainsi, le $\delta^{13}\text{C}$ d'un consommateur peut permettre de retracer sa **zone d'alimentation et/ou son habitat**. Un faible $\delta^{13}\text{C}$ indiquera généralement une appartenance à un réseau trophique affilié à un environnement océanique et/ou pélagique, alors qu'un fort $\delta^{13}\text{C}$ traduira l'appartenance à une affinité côtière et/ou benthique. Les valeurs du $\delta^{15}\text{N}$ sont plutôt utilisées comme marqueurs de la **position trophique relative**, ou absolue après retranchement de la ligne de base de l'écosystème. Grâce à l'association des isotopes stables du carbone et de l'azote, il est possible d'avoir une information en plusieurs dimensions sur l'écologie trophique des organismes, ce qui aboutit à la notion de niche isotopique qui est une estimation de la niche trophique.

Dans cette thèse, il a été choisi de mesurer les rapports isotopiques du carbone et de l'azote dans le muscle adducteur des bivalves. Cet organe présente un contenu en lipide plus faible que les autres organes (Yokoyama *et al.* 2005), et les lipides étant appauvris en ^{13}C , leur présence dans les échantillons pourrait modifier les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$. De plus, le turnover du muscle étant plus lent que celui de la glande digestive ou de la gonade (Lorrain *et al.* 2002), sa signature isotopique confère une vision plus intégrée dans le temps des variations des conditions environnementales spatiales et saisonnières.

b. Les lipides

Définition

Dans son sens le plus large, le terme lipide désigne l'ensemble des molécules telles que les huiles, les graisses et les cires, qui partagent les propriétés suivantes :

- Originaires d'animaux ou de plantes vivants ou fossilisés.
- Insolubles ou immiscibles dans l'eau, mais solubles dans des solvants organiques comme le chloroforme, l'éther diéthylique, le benzène ou l'acétone.
- Formées principalement de longues chaînes hydrocarbonées, mais pouvant aussi contenir de l'oxygène, du phosphore, du soufre ou de l'azote.

Cette définition inclut une gamme de molécules très diverses, en particulier en milieu marin, comme les acides gras et leurs dérivés, les stérols, les caroténoïdes, les terpènes, les stéroïdes et les acides biliaires, qui n'ont que très peu de points communs au niveau structural ou fonctionnel. Une définition plus cohérente du point de vue biologique et fonctionnel peut alors être proposée : « **les lipides sont les acides gras, leurs dérivés, et les substances qui leur sont reliées, du point de vue de la biosynthèse ou du rôle fonctionnel** ».

Les lipides ont des rôles biologiques essentiels : ce sont par excellence des molécules biologiques multifonctionnelles. Les lipides peuvent intervenir aussi bien comme **éléments structuraux dans les membranes cellulaires** (*i.e.* phospholipides et stérols), que comme connecteurs permettant l'insertion membranaire de certaines protéines ou comme **métabolites particulièrement riches en énergie** lorsqu'il s'agit des acides gras par exemple (Figure 12). Ils sont aussi des précurseurs d'un grand nombre de messagers intra- et extracellulaires (eicosanoïdes, diacylglycérol, phosphoinositides, stéroïdes, céramides, ...).

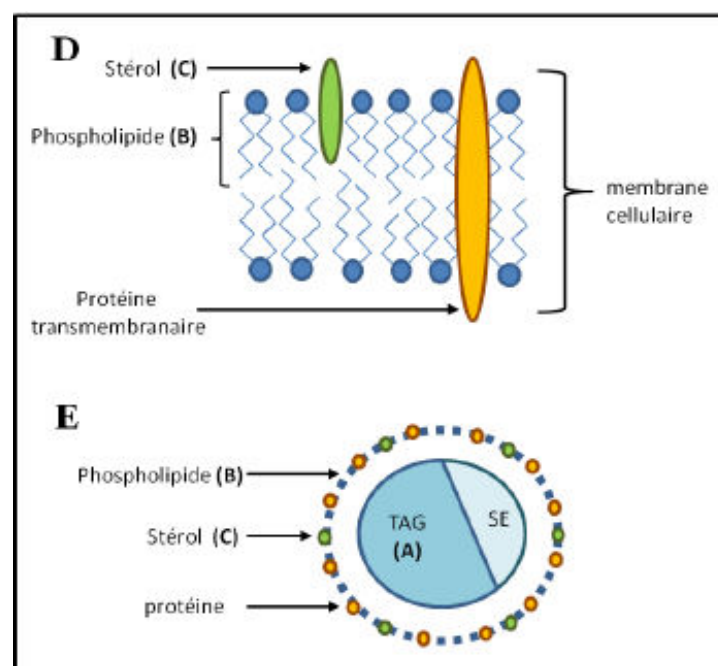


Figure 12. Schémas représentant l'organisation de la bicouche lipidique (D) constituant les membranes cellulaires et d'une lipoprotéine (E), où TAG = Triacylglycéride, SE = Esters de Stérol. Tiré de Sardenne (2016).

Lipides membranaires vs lipides de réserve

En fonction de leur polarité pour certains solvants en chromatographie liquide, les lipides peuvent être subdivisés en **deux grandes classes** : les lipides neutres (LN) et les lipides polaires

(LP) (Figure 13). Cette subdivision, bien qu'assez imprécise, est très largement utilisée dans la littérature, dans la mesure où ces deux grandes classes représentent des compartiments ayant des fonctions biologiques distinctes : les **lipides de réserve** (LN) et **lipides membranaires** (LP) sont couramment utilisés.

Les triglycérides peuvent être considérés comme les représentants principaux des lipides de réserve, mais on peut également y trouver des diglycérides, des monoglycérides, des esters de stérols ou d'alcools gras (cires) et des acides gras libres. Parmi les lipides membranaires, on trouve principalement des phospholipides, des sphingolipides, des glycolipides, et des stérols. Les stérols sont considérés comme des lipides simples neutres, mais localisés dans les membranes cellulaires (Figure 13).

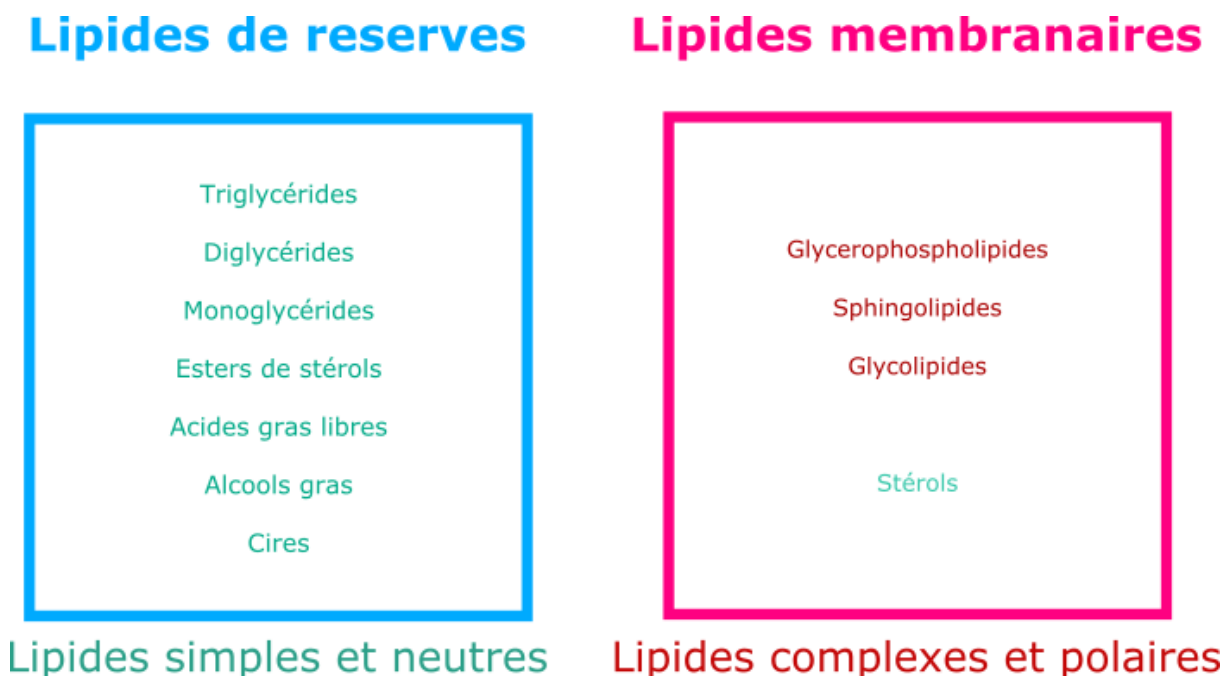


Figure 13. Représentation des principales classes de lipides : de réserve et membranaires.

c. Les acides gras

Définition

Les acides gras (AG) sont les constituants majeurs des lipides. Ils sont généralement constitués par un groupement méthyle (CH_3), une chaîne hydrocarbonée linéaire (CH_2), possédant à son extrémité un groupement carboxyle ($-\text{COOH}$). On les distingue par la longueur de leur chaîne (allant de 4 à 40 carbones), et par le nombre et la position des insaturations (*i.e.* le nombre de doubles liaisons entre deux atomes de carbone successifs). Les doubles liaisons sont

supposées être de configuration *cis* et se succéder en alternance avec un groupement méthyle. On classe les AG en trois catégories en fonction de leur nombre d'insaturations :

- Les acides gras **saturés** (AGS)
- Les acides gras **monoinsaturés** (AGMI)
- Les acides gras **polyinsaturés** (AGPI)

Les AG sont notés sous la forme C :Xn-Y, où C est le nombre de carbones, X est le nombre de doubles liaisons, et Y est la position de la première double liaisons à partir du groupe méthyle terminal.

Biomarqueurs trophiques et physiologiques

Les organismes vivants sont principalement capables de synthétiser des acides gras saturés (AGS) avec 16 (acide palmitique) et 18 (acide stéarique) carbones. A partir de ces AGS, divers acides gras polyinsaturés (AGPI) peuvent être obtenus par des processus enzymatiques d'élongation (*i.e.* ajout de 2 carbones dans les mitochondries) et de désaturation (ajout d'une double liaison dans le réticulum endoplasmique), ainsi que de β -oxydation (**Erreur ! Source du envoi introuvable.**).

Les différences de composition d'AG entre les groupes taxonomiques résultent de capacités différentes à réaliser ces processus enzymatiques. A la base de la chaîne alimentaire, les producteurs primaires sont dotés des enzymes nécessaires ($\Delta 15$ -désaturase et $\Delta 12$ -désaturase) pour la bioconversion du 18:1n-9 (acide oléique) en 18:2n-6 (acide linoléique) et 18:3n-3 (acide linolénique). Ces deux AG sont biosynthétisés en milieu marin par les microalgues, ainsi que l'ensemble des AGPI à longues chaînes (20 et 22 carbones) des séries n-6 et n-3 (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Les animaux marins sont peu capables de synthétiser *de novo* les AG à 20 et 22 carbones à partir du 18:2n-6 et le 18:3n-3 et l'acquièrent donc par voie nutritionnelle. Ces AG indispensables aux activités métaboliques sont qualifiés d'AG « essentiels ».

Ceux d'entre eux indispensables pour la survie, la croissance et la reproduction des organismes marins sont : le 20:4n-6 (acide arachidonique, ARA), le 20:5n-3 (acide eicosapentaénoïque, EPA) et le 22:6n-3 (acide docosahexaénoïque, DHA) (Kelly & Scheibling 2012). Les **lipides structuraux des membranes** (phospholipides) des organismes marins sont généralement enrichis en AGPI à longues chaînes de type n-3 et sont impliqués dans diverses activités membranaires. La composition des acides gras dans les lipides membranaires (LP) est

donc très régulée pour assurer un fonctionnement optimal de ses activités (Delaporte, Soudant, Moal, Kraffe, Marty & Samain 2005). **Les lipides de réserve** sont moins soumis à régulation métabolique que les lipides membranaires et leur analyse est par conséquent plus adaptée à l'étude des relations trophiques, car leur composition reflète celle de la nourriture assimilée (Napolitano & Ackman 1993; Dalsgaard *et al.* 2003).

En milieu marin, lors du transfert trophique, l'intégrité structurale des AG est généralement conservée, permettant de les utiliser en tant **que traceurs des relations proie-prédateur**. Ainsi, il a été montré lors d'études expérimentales que les AG sont effectivement transmis tout au long de la chaîne trophique, et que la composition en AG des tissus reflète celle des aliments chez diverses espèces de mollusques (Pazos, Sánchez, Román, Luz Pérez-Parallé & Abad 2003; Richoux, Vermeulen & Froneman 2014). Enfin, comme les producteurs primaires synthétisent des AG différents en fonction de leur groupe taxonomique, l'utilisation de ces derniers permet d'évaluer le rôle respectif de différents taxons phytoplanctoniques (*i.e.* diatomées vs dinoflagellés), macroalgues et bactéries dans la structure de base des réseaux trophiques (Dalsgaard *et al.* 2003, Kelly & Scheibling 2012). Les AG ont ainsi permis au cours de plusieurs études de déterminer les ressources trophiques de différentes espèces de filtreurs au sein de divers écosystèmes, comme les mangroves (Bachok, Mfilinge & Tsuchiya 2003), les plages sableuses (Perez, Olivier, Tremblay, Neumeier, Thébault, Chauvaud & Meziane 2013), ou le long du plateau continental (Nerot *et al.* 2015).

Au cours de cette thèse, la composition en AG a été analysée dans les lipides de réserve de la glande digestive et dans les lipides membranaires des branchies. La composition en lipides de réserve de la glande digestive a principalement servi aux études trophiques, puisqu'elle reflète directement la quantité et la qualité de nourriture ingérée (Pazos *et al.* 2003; Nerot *et al.* 2015). De plus, du fait de son turnover très rapide, elle reflète les variations des ressources trophiques sur une courte période de temps et permet d'obtenir des informations à une échelle de temps réduite (Napolitano & Ackman 1993).

Les compositions en lipides membranaires des branchies ont quant à elles été utilisées à des fins physiologiques. La composition des AG dépendant des besoins métaboliques et énergétiques des organismes, des régulations s'effectuent au niveau du compartiment membranaire en fonction de facteurs endogènes (*i.e.* physiologie, respiration) et de facteurs exogènes (*i.e.* température, nourriture) (Hazel 1995; Delaporte *et al.* 2005).

d. Signature isotopique de composés spécifiques

Récemment, la détermination de **la composition isotopique de certains composés** (Compound-Specific Stable Isotope Analyses, **CSIA**) tels que les acides aminés (Popp, Graham, Olson, Hannides, Lott, López-Ibarra, Galván-Magaña & Fry 2007), les acides gras (AG) (Bec, Perga, Koussoroplis, Bardoux, Desvillettes, Bourdier & Mariotti 2011) ou les stérols (Crandall, Teece, Estes, Manfrino & Ciesla 2016), a été développée afin de compléter les méthodes déjà utilisées en écologie trophique.

L'analyse par CSIA est supposées offrir une plus grande spécificité de biomarqueurs (Evershed, Bull, Corr, Crossman, van Dongen, Evans, Jim, Mottram, Mukherjee & Pancost 2007), puisque les analyses ne concernent que le composé ciblé (*i.e.* acide aminé ou AG spécifique) et ouvre donc une vision au niveau moléculaire, qui n'était pas accessible avec des mesures sur le tissu total. Si cette technique d'analyse a permis de lever certains verrous, elle est basée sur un certain nombre de postulats pas toujours résolus, notamment en ce qui concerne les valeurs de fractionnement isotopique entre une source et son consommateur. Des études décrivent des méthodes mathématiques pour obtenir une valeur quantitative du fractionnement digestif de la composition isotopique des AG polyinsaturés (Gladyshev, Sushchik, Makhutova & Kalachova 2014). Cependant, il est difficile de savoir si ces données sont applicables à d'autres chaînes trophiques et dans d'autres écosystèmes, puisque Bec et al. (2011) relèvent que le fractionnement isotopique pourrait varier entre 1 et 4 ‰ entre le consommateur et sa proie, selon les espèces considérées. De plus, le turnover de chaque AG va engendrer des différences dans le fractionnement isotopique observé, les lipides membranaires intégrant le signal alimentaire du $\delta^{13}\text{C}$ plus lentement que les lipides de réserve (Koussoroplis, Bec, Perga, Koutrakis, Desvillettes & Bourdier 2010). Il a aussi été démontré que le fractionnement isotopique des AG polyinsaturés et ramifiés varie en fonction de la source considérée (Bec *et al.* 2011). En revanche, la variabilité du fractionnement isotopique observée au niveau des AG semble comparable à celle trouvée au niveau des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ du tissu (Bec *et al.* 2011), ce qui laisse penser que des phénomènes déjà observés au niveau du tissu peuvent être transférés au niveau moléculaire, même si des études sites et espèces dépendantes sont nécessaires avant de valider les valeurs de fractionnement isotopiques. L'utilisation combinée des IS et des CSIA est très utile et semble nécessaire pour décrire pleinement le découplage

entre les composés essentiels et les principaux transferts de matière organique au sein des écosystèmes (Koussoroplis *et al.* 2010; Bec *et al.* 2011).

Au cours de cette thèse, la collaboration entre la plateforme d'analyses du Pôle Spectrométrie Océan (PSO) et la plateforme d'analyses lipidiques (LIPIDOCEAN), des techniques d'analyses de CSIA sur les AG et les stérols ont été validées et mises en place afin de fonctionner en routine à l'Institut Universitaire Européen de la Mer. Seuls les résultats de CSIA sur AG seront présentés dans ce manuscrit. Après avoir décrit spatialement et saisonnièrement le régime trophique des deux espèces de bivalves étudiées à partir des données en IS et AG, il a été choisi d'explorer l'origine précise (*i.e.* océanique vs côtière) des éléments nutritifs le long d'un transect, depuis l'extérieur de la lagune jusqu'à la limite de répartition des espèces. Pour cela les analyses se sont concentrées sur six acides gras retrouvés majoritairement dans les lipides de réserve des glandes digestives, et dans les sources potentielles de nourritures des deux bivalves. Les résultats étant très similaires entre les deux espèces, l'étude présentée dans ce manuscrit se concentre sur *S. crassisquama* qui est l'espèce actuellement exploitée dans la lagune.

e. Les stérols

Définition

Les stérols sont constitués d'un squelette composé de deux parties : une « structure de base », le cyclopentanoperhydrophenanthrène, et une chaîne carbonée latérale (Volkman 1986; Giner 1993) (Figure 14). Afin de déterminer le nom chimique d'un stérol, une **nomenclature**

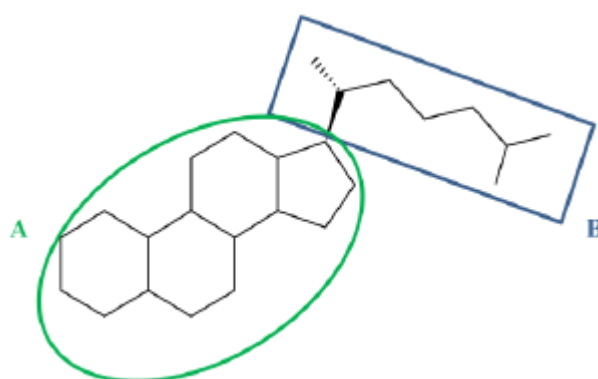


Figure 14. Schéma de la structure d'un stérol. Avec la structure de base (A) et la chaîne latérale carbonée (B).

principale existe. Elle suit les recommandations de l'IUPAC-IUB 1989, et se présente sous la forme suivante :

Les cycles aromatiques sont nommés A, B, C et D et les chiffres correspondent au numéro du carbone. Un stérol peut posséder 27, 28, 29, 30 ou 31 carbones, avec la présence de groupements (méthyle ou éthyle). Sur le carbone numéro 3 (Figure 15), il y a toujours un groupement alcool (OH). Les atomes ou groupes d'atomes (OH, méthyle, éthyle) peuvent avoir une configuration stéréochimique différente dans l'espace.

Au sein d'un organisme, il existe trois voies possibles d'acquisition de stérols spécifiques : **la nutrition, la biosynthèse et la bioconversion**. La biosynthèse est la synthèse de stérols à partir de composés chimiques simples présents dans les organes et les tissus. Des avis divergent sur la capacité des bivalves marins à biosynthétiser les stérols, car si elle a été détectée dans des

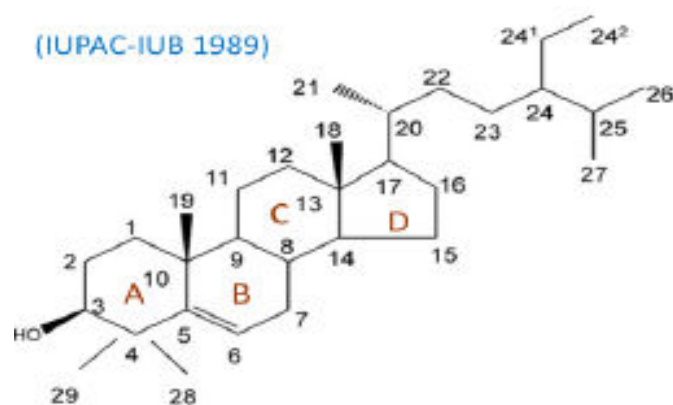


Figure 15. Structure standard d'un stérol (β -sitosterol) par la recommandation de l'IUPAC-IUB 1989.

études préliminaires (Voogt, Florkin & Scheer 1972), elle n'a par la suite presque plus jamais été démontrée. Si bien que la capacité de biosynthèse des mollusques marins est considérée comme négligeable ou inexistante (Knauer, Kerr, Lindley & Southgate 1998; Kanazawa 2001; Giner, Zhao, Dixon & Wikfors 2016). La bioconversion est la formation d'un stérol à partir d'un autre stérol. La bioconversion peut être réalisée par deux formes distinctes de réactions chimiques : l'alkylation et la déalkylation (Giner *et al.* 2016). Les algues, qui constituent la nourriture majeur des bivalves filtreurs, contiennent une forte diversité de stérols nommés « **phytostérols** » (Wasowicz & Rudzinska 2011), souvent simplifié et regroupé sous le terme de « stérols ». Chez les bivalves, les réactions de bioconversion ne semble être observées que si la nourriture n'est pas suffisamment riche en phytostérols essentiels pour le bon fonctionnement de l'organisme (Knauer *et al.* 1998). De ce fait, on peut avancer que dans le

contexte d'un apport suffisant en nourriture la composition en stérols chez ces animaux reflète majoritairement celle de son alimentation.

Leurs rôles physiologiques

En fonction de leur origine, les stérols peuvent être classés en deux groupes : les **stérols libres** intégrés dans les membranes cellulaires (Volkman 2003; Valitova, Sulkarnayeva & Minibayeva 2016) (Figure 12), et les **stérols estérifiés** à un AG (*i.e.* esters de stérols) (Figure 12) qui ont un rôle dans le stockage d'énergie et de réserve de stérols libres (Soudant, Marty, Moal, Robert, Quéré, Le Coz & Samain 1996).

Le type et la quantité de stérols présents dans la membrane cellulaire ont un effet sur la **fluidité et la perméabilité des membranes** (Irazú, Pollero & Brenner 1988; Giner *et al.* 2016). Cela peut notamment avoir un effet direct ou indirect sur des fonctions telles que la prolifération cellulaire, la transduction du signal, l'activité respiratoire, la résistance contre des agents pathogènes et le développement embryonnaire. Des études ont montré que l'incorporation d'un stérol plutôt qu'un autre dans les tissus est un mécanisme sélectif (Soudant *et al.* 1996), qui dépend des conditions environnementales et des besoins physiologiques de l'organisme. La composition en stérols d'un organisme dépendra donc à la fois de ses ressources trophiques (Napolitano & Ackman 1993; Soudant *et al.* 1996), de sa physiologie (Parrish 2013) et des facteurs environnementaux (*i.e.* intensité lumineuse, température) (Volkman 2003), qui influencent aussi les ressources en matières organiques.

Leur utilisation en tant que traceurs trophiques

Comme les AG, certains stérols sont dit « **essentiels** », et sont transmis le long de la chaîne alimentaire de manière relativement conservative. Synthétisés par les producteurs primaires, et ayant une grande diversité biochimique (Kerr & Baker 1991), les stérols paraissent être de bon outils potentiels pour caractériser les relations trophiques au sein d'un écosystème (Dalsgaard *et al.* 2003; Lavaud *et al.* 2018).

Le stérol le plus communément observé chez les organismes marins est le cholestérol, cependant différentes études ont démontré qu'en plus du cholestérol, les bivalves contiennent une grande variété de phytostérols, **biosynthétisés par les producteurs primaires** (Piretti, Zuppa & Pagliuca 1989; Knauer *et al.* 1998; Soudant, Le Coz, Marty, Moal, Robert &

Samain 1998a; Kanazawa 2001; Parrish 2013). Certains phytostérols peuvent être considérés comme caractéristiques d'un genre ou d'une espèce de producteur primaire (Tableau 1). Par exemple, le Brassicastérol est généralement retrouvé en grande quantité chez les haptophytes et plus précisément dans les prymnesiophyceae (Volkman 1986; Napolitano, Ackman & Silva-Serra 1993; Soudant *et al.* 1998a). Les diatomées sont plutôt caractérisées par une forte teneur en 24-Méthylènecholesterol (Volkman 1986; Yamauguchi, Koichi & Mitsuo 1986; Soudant *et al.* 1998a). Il est même possible de distinguer différentes espèces de diatomées, puisque *Skeletonema costatum* est connu pour contenir d'importantes proportions en Campesterol comparé à *Chaetoceros calcitrans* qui n'en contient presque pas (Soudant *et al.* 1996, 1998a). Les études de (Volkman 1986) ont montré que le Stigmastérol se retrouve plutôt chez les angiospermes.

Dans cette étude nous avons étudié la composition en stérols totaux des deux bivalves filtreurs ainsi que celle de leurs potentielles sources de nourriture afin de comparer et/ou compléter les informations obtenues avec les autres biomarqueurs lipidiques. De nombreuses études ont utilisé les stérols afin de déterminer leur rôle fonctionnel dans les organismes (Valitova *et al.* 2016), comme marqueur des conditions environnementales (Parrish 2013) et comme marqueur des capacités d'ingestion et d'absorption des organismes (Soudant *et al.* 1998a). Cependant, peu de travaux ont appliqué cet outils dans le cadre d'études d'écologie trophique (Napolitano *et al.* 1993; Lavaud *et al.* 2018).

Tableau 1. Synthèse bibliographique des principaux phytostérols utilisés comme traceurs trophiques dans des études sélectionnées. Attention si des phytostérols se retrouvent dans deux sources différentes, leurs proportions peut varier en fonction de la source considérées, se référer à l'étude.

Samples	Dietary tracer Sterols	Precisions	Sources
Diatoms	24-Methylenecholesterol		Volkman (1986), Napolitano et al. (1993), Soudant et al. (1996, 1998), Volkman (2003), Lavaud et al. (2018)
	β -Sitosterol		Napolitano et al. (1993), Soudant et al. (1996, 1998)
	Brassicasterol		(Volkman 1986; Napolitano <i>et al.</i> 1993; Volkman, Barrett, Blackburn, Mansour, Sikes & Gelin 1998)
	Dinosterol		(Volkman, Barrett, Dunstan & Jeffrey 1993)
	Campesterol	Bacillariophyceae	Yamauguchi et al. (1986), Soudant et al. (1998), Mohammady (2004)
	24-Methylenecholesterol/Brassicasterol	> 1	(Volkman 1986)
Dinoflagellates	Brassicasterol		(Volkman 1986; Giner 1993; Soudant <i>et al.</i> 1996, 1998a; Mohammady 2004; Hurtado, Racotta, Arcos, Morales-Bojórquez, Moal, Soudant & Palacios 2012)
	Dinosterol		(Withers 1983; Mansour, Volkman, Jackson & Blackburn 1999; Volkman 2003)
	Lanosterol		Giner & Djerassi (1991), Giner (1993), Volkman (2003)
	β -Sitosterol	Haptophytes, Pavloficeae	Napolitano et al. (1993), Soudant et al. (1998), Hurtado et al. (2012)
	Desmosterol	Haptophytes, Pavloficeae	Holden & Patterson (1991), Soudant et al. (1998)
	Stigmasterol		Soudant et al. (1998), Mohammady (2004), Hurtado et al. (2012)
	24-Methylenecholesterol/Brassicasterol	< 1	(Volkman 1986)
Eelgrass	Stigmasterol		Ramirez et al. (2000)
Plant superior	Stigmasterol		Volkman (1986), Valitova et al. (2016)
	β -Sitosterol		Volkman (1986), Valitova et al. (2016)
Green algae	Ergosterol		Patterson (1969), Holden & Patterson (1991), Volkman (2003)
Rhodophyta	Ergosterol		Beastall et al. (1971), Volkman (2003)

CHAPITRE 1

Apports océaniques vs apports locaux dans le régime alimentaire de bivalves d'une lagune côtière du Pacifique Nord-Est

Margaux Mathieu-Resuge, Edouard Kraffe, Fabienne Le Grand, Andy Boens, Antoine Bideau, Salvador E. Lluch-Cota, Ilie S. Racotta, Gauthier Schaal

Ce chapitre fait l'objet d'un article en révision dans Marine Environmental Research.

1. Résumé

Les écosystèmes côtiers, parmi lesquels figurent les lagunes, sont caractérisés par une forte productivité liée à une importante concentration en nutriments d'origine à la fois terrestre et océanique (Mann 1982; Martínez *et al.* 2007; Clavier *et al.* 2014). Les lagunes, de par leur faible profondeur et leur structure fermée, favorisent la production primaire, ce qui leur confère un rôle écologique et économique très important. Les consommateurs primaires de ces milieux, tels que les bivalves, sont soumis aux variations saisonnières des apports en sources de nourriture. Du fait de leur niveau trophique, ainsi que de leur mode de vie sessile, ils peuvent être utilisés comme indicateurs des processus écologiques impactant les premiers maillons de la chaîne trophique (Lefebvre *et al.* 2009; Marchais *et al.* 2013).

La compréhension du fonctionnement trophique des écosystèmes côtiers a été largement étudiée grâce à différentes techniques, et notamment via l'utilisation de biomarqueurs. Les isotopes stables (IS) ont été couramment utilisés pour décrire le niveau trophique (via le $\delta^{15}\text{N}$), et tracer l'origine des producteurs primaires (via le $\delta^{13}\text{C}$) dans le régime alimentaire des bivalves marins (Riera, Stal & Nieuwenhuize 2002; Nerot *et al.* 2012). Leur analyse est souvent associée à celle des acides gras (AG) qui permettent d'avoir une vision plus qualitative du régime alimentaire des consommateurs en permettant d'identifier certains taxons de sources (Dalsgaard *et al.* 2003) et d'appréhender les relations trophiques qui existent entre les différents organismes au sein d'un écosystème (Alfaro *et al.* 2006, Kelly & Scheibling 2012, Le Croizier *et al.* 2016). Les stérols sont encore peu utilisés en écologie trophique, et certaines voies de biosynthèse sont encore mal connues en particulier chez les mollusques bivalves (Napolitano & Ackman 1993; Giner *et al.* 2016). Leur forte spécificité au niveau des classes, genres et parfois même des espèces, ainsi que leurs devenir métabolique aux caractéristiques voisines des acides gras (AG) en font cependant de bons candidats pour une utilisation en écologie trophique (Volkman 1986; Napolitano & Ackman 1993; Soudant *et al.* 1998a). En effet, les microalgues produisent de nombreux phytostérols (Wasowicz & Rudzinska 2011) qui, transmis de manière conservative le long de la chaîne trophique, peuvent permettre leur utilisation comme biomarqueurs trophiques.

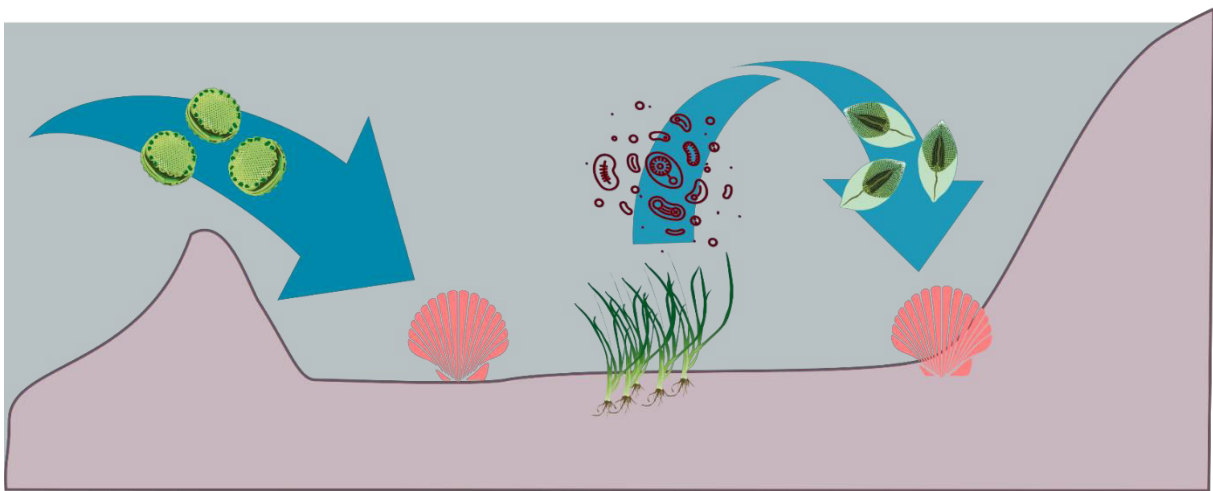
Ce chapitre se propose d'explorer les caractéristiques du régime alimentaire de *Spondylus crassisquama* présente le long d'un gradient d'éloignement à l'embouchure dans la lagune

d'Ojo de Liebre en Basse Californie (Mexique) via une approche multi traceurs (IS, AG et stérols). Très peu de données existent pour caractériser cette lagune, à la fois en termes de caractéristiques hydrologiques et de fonctionnement trophique. Dans ce chapitre, nous avons donc fait le choix de caractériser le fonctionnement trophique de la lagune, en considérant les potentielles sources de production primaire provenant de (1) des masses d'eau océaniques côtières et de (2) des importants herbiers de *Zostera marina* répartis dans toute la lagune (Cabello-Pasini *et al.* 2003). Pour cela, un échantillonnage a été effectué en Février et Août 2016, le long d'un gradient d'éloignement à l'embouchure.

En février, les valeurs en $\delta^{13}\text{C}$ montraient une faible variabilité le long du transect (0.7‰ de différence entre les deux stations les plus éloignées pour *S. crassisquama*). Parallèlement, un gradient de $\delta^{15}\text{N}$ a été observé de l'embouchure vers le centre de la lagune, présentant des valeurs plus élevées chez les individus prélevés aux stations proches de l'entrée de la lagune, et des valeurs plus faibles dans les individus prélevés en fond de lagune. Cet enrichissement en ^{15}N suggère une entrée de masses d'eaux océaniques dans la lagune. Les individus prélevés en entrée de lagune présentaient des abondances plus élevées en biomarqueurs de dinoflagellés (22:6n-3 et brassicastérol). Au mois d'Août, les apports océaniques étaient tout aussi importants en entrée de lagune, avec des différences de valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ de 0.9‰ entre les stations proches de l'entrée de la lagune et celles en fond de lagune. Contrairement à Février, l'analyse de la composition en AG des lipides de réserve révèle des différences spatiales marquées, avec des biomarqueurs de diatomées (16:1n-7, 20:5n-3 et 24-méthylènecholestérol) significativement plus abondants chez les individus prélevés à l'entrée de la lagune, alors que les individus des stations internes présentaient une forte abondance d'AG à 18 carbones (18:1n-9, 18:3n-3 and 18:4n-3), de campestérol et de stigmastérol, suggérant une ressource alimentaire plutôt basée sur des processus locaux et particulièrement la reminéralisation bactérienne, et le réseau trophique microbien en dépendant, et possiblement de détritits issus des herbiers de zostères. La variation spatiale des rapports EPA/DHA (20:5n-3/22:6n-3) et 24-Me./Bra (24-méthylènecholestérol/brassicastérol) plus élevé en entrée de lagune qu'en fond, souligne également l'importance relative décroissante des diatomées comparé aux dinoflagellés dans le régime alimentaire des bivalves prélevés le long du gradient. Par ailleurs les patrons spatiaux différents entre 24-Me et campestérol, deux stérols connus comme spécifiques des diatomées, suggèrent que le

régime trophique des bivalves est supporté par des assemblages phytoplanctoniques différents au sein de la lagune.

En plus de mettre en avant l'utilité de combiner différents biomarqueurs afin de caractériser les changements spatio-temporels du régime alimentaire de ces bivalves, ce chapitre a aussi permis de spécifier jusqu'à quelles limites les entrées océaniques influencent le fonctionnement trophique de cette lagune, et ainsi de distinguer la part de la production primaire locale dans le régime alimentaire des bivalves. Cette étude semble valider l'utilisation des stérols en tant que traceurs trophiques, tout en soulignant également leur potentielle complémentarité dans le but d'essayer de décrire de façon la plus exhaustive possible la contribution des différentes sources trophiques au sein d'une lagune côtière.



2. Article n°1

Trophic ecology of suspension-feeding bivalves inhabiting a north-eastern Pacific coastal lagoon: comparison of different biomarkers.

Margaux Mathieu-Resuge^{1*}, Edouard Kraffe¹, Fabienne Le Grand¹, Andy Boens¹, Antoine Bideau¹, Salvador E. Lluch-Cota², Ilie S. Racotta², Gauthier Schaal¹

1: Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, IUEM, F-29280, Plouzane, France

2: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, BCS, Mexico

Abstract

Understanding the nature and origins of food sources supporting coastal lagoon-inhabiting organisms is necessary to evaluate the ecological status of such ecosystems. The trophic ecology of a bivalve specie *Spondylus crassisquama* was studied in the Ojo de Liebre lagoon (Baja California, Mexico), combining stable isotope (SI), fatty acid (FA) and sterols analyses along a transect under oceanic influences. The second objective of the study was to investigate if sterols compositions give complementary information to those obtained from FA and SI. Temporal and spatial patterns of the three biomarkers in bivalve tissues suggest oceanic inputs at the mouth of the lagoon, while the inner station was characterized by a contribution of local sources including an important role of micro heterotrophs. This study revealed that the association of lipid biomarkers provide higher taxonomic resolution of the spatiotemporal heterogeneity in nutrient sources influencing the trophic functioning of a large coastal lagoons.

Keywords: coastal zone; Ojo de Liebre; suspension-feeders; multi-tracer analyses; fatty acids; stables isotopes; sterols

Highlights

- Stable isotopes fatty acids and sterols were used to characterize the diet of bivalves
- A transect was sampled in a Pacific lagoon with increasing distance from the mouth
- Bivalves at the entrance of the lagoon relied on oceanic phytoplankton inputs
- Bivalves in the inner lagoon relied on local microbial food web
- Lipid biomarkers and SI were complementary to distinguish the food sources origins

Introduction

Coastal areas are highly productive marine ecosystems (Nixon 1982; Clavier *et al.* 2014) that provide a variety of ecosystem services, such as nutrient recycling, biogeochemical cycles regulation, or food supply (Gattuso *et al.* 1998; Martínez *et al.* 2007). Among coastal ecosystems, lagoons play key ecological and economic roles, providing habitat to many resident and migratory species and hosting commercial, artisanal and subsistence fisheries that support local populations. Their high productivity originates from nutrients inputs of both terrestrial and marine origins (Mann 1982; Carlier *et al.* 2007), as well as from local primary productivity, enhanced by the shallow and enclosed nature of these areas. Understanding the relative contribution of autochthonous processes versus allochthonous inputs (lagoon vs oceanic primary production, respectively) for the functioning of coastal lagoons is therefore critical to understand the dynamics of these ecosystems, and how they are likely to react when facing anthropogenic disturbances.

Suspension-feeding bivalves are major components of coastal lagoons, where they can dominate benthic communities and play a key role in the regulation of benthic and pelagic biogeochemical fluxes (Dame 1993). Because these organisms are primary consumers, they directly reflect processes occurring at the lowest level of food webs (Marchais *et al.* 2013). Furthermore, suspension-feeders can feed on a wide variety of sestonic particles, hence can be integrative indicators of coastal oceanic versus lagoon autochthonous inputs into coastal ecosystems (Kraak, Scholten, Peeters & de Kock 1991; Coma, Ribes, Gili & Hughes 2001; Lefebvre *et al.* 2009).

Since a few decades, trophic studies have evolved from field or laboratory observational approaches (*i.e.* stomach contents, food choice experiments) to biomarker-based approaches (BBA). BBA have been applied to a variety of organisms, from primary consumers (Desvillettes, Bourdier, Amblard & Barth 1997) to marine mammals (Kelly 2000), as well as at the community level (Vander Zanden & Rasmussen 2001; Alfaro *et al.* 2006). Every BBA is based on several prerequisites, which need to be met in order to produce robust trophic information. Uncertainties concerning these prerequisites are common (*i.e.* concerning turnover, metabolic fate of biomarker compounds) and result in less reliable data, and stress the need to couple different BBA to fully understand trophic dynamics of natural environments. Among the most commonly used BBA, stable isotopes (SI) ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{34}\text{S}$) have been widely

and successfully used to characterize the origin of food sources and the trophic level of consumers (Peterson & Fry 1987; Post 2002). However, SI analysis requires potential food sources to be discriminated in the two or three dimensional isotopic space, which is not always the case in high diversity systems. Moreover, SI analysis provides a limited taxonomic resolution of the food sources assimilated concerning heterogeneous pools of organic matter (*e.g.* suspended particulate organic matter, sedimentary organic matter). In this context, the combination with others biomarkers can give useful information to complement identifications of food sources. Fatty acids allow the identification of some taxa in the diet of consumers due to the existence of specific FA (Parrish, Abrajano, Budge, Helleur, Hudson, Pulchan & Ramos 2000; Dalsgaard *et al.* 2003). Although primary producers have characteristic FA compositions, most do not possess unique FAs which can cause limitations for identifications of food sources (Bec, Perga, Desvillettes & Bourdier 2010). In addition, in the specific case of coastal benthic food webs, the important number of potential food sources is a problem for distinguishing their contributions to diets (Kelly & Scheibling 2012a).

Sterols are lipid compounds common in all primary producers. Some of them have been reported to allow the characterization of classes, genus and in some cases, species of primary producers that contribute to the diet of filter feeders (Volkman 1986; Napolitano *et al.* 1993; Soudant *et al.* 1998a). As for FAs, the different primary producers may display distinct sterols composition, which a necessary condition for using these compounds as trophic biomarkers. Moreover, since the capacity to synthesize *de novo* or modify dietary sterols is absent or considered very low in marine invertebrates (Holden & Patterson 1991; Kanazawa 2001), sterols have to be acquired from their diet. The role of sterols is still poorly understood, even if they are recognized as important structural components of cell membranes (Giner *et al.* 2016) and necessary for growth and larval development (Soudant *et al.* 1998a). Primary producers that constitute the major part of the diet of bivalves contain an important diversity of sterols, named phytosterols (Wasowicz & Rudzinska 2011), and their presence in consumers could be a reliable complementary biomarkers to identify and distinguish contribution of specific food sources to their diet.

The present study aims to characterize the trophic ecology of a suspension-feeding bivalve, *Spondylus crassisquama* (Lamarck, 1819) within the Northeastern Pacific coastal lagoon of Ojo de Liebre (Baja California, Mexico). By sampling this species at two sites, varying in their distance to the open ocean, and at two seasons, characterized by different environmental

conditions, we test the hypothesis that oceanic inputs induce a spatial structure in the trophic ecology of suspension-feeding bivalves within the lagoon, including a higher reliance towards oceanic production in individuals living close to the lagoon mouth. For this purpose, a multi-tracers approach was chosen, combining stable isotopes, fatty acids and sterols composition in bivalve digestive glands as well as in their potential food sources (particulate organic matter, sedimentary organic matter, and seagrass detritus). The potential complementarity among those different biomarkers is also discussed.

Material and methods

Sampling

The lagoon of Ojo de Liebre (Baja California, Mexico) is one of the largest coastal lagoons in the north-east Pacific (≈ 40 km long, ≈ 10 km wide, 446 km²). Its topography is characterized by deep and narrow channels surrounded by large intertidal flats. The tidal range is about 1 to 2.5 meters and currents are more turbulent in channels (maximum 2.5 knots) than intertidal flats (0.35 to 1.5 knots) (Phleger & Ewing 1962). Two stations, located on historically fished banks, characterized by a depth around 7 to 10 m, were studied into the Ojo de Liebre lagoon (Figure 16). Station 1 (Chocolatero) is a bank located close to the mouth of the lagoon (at 6.1

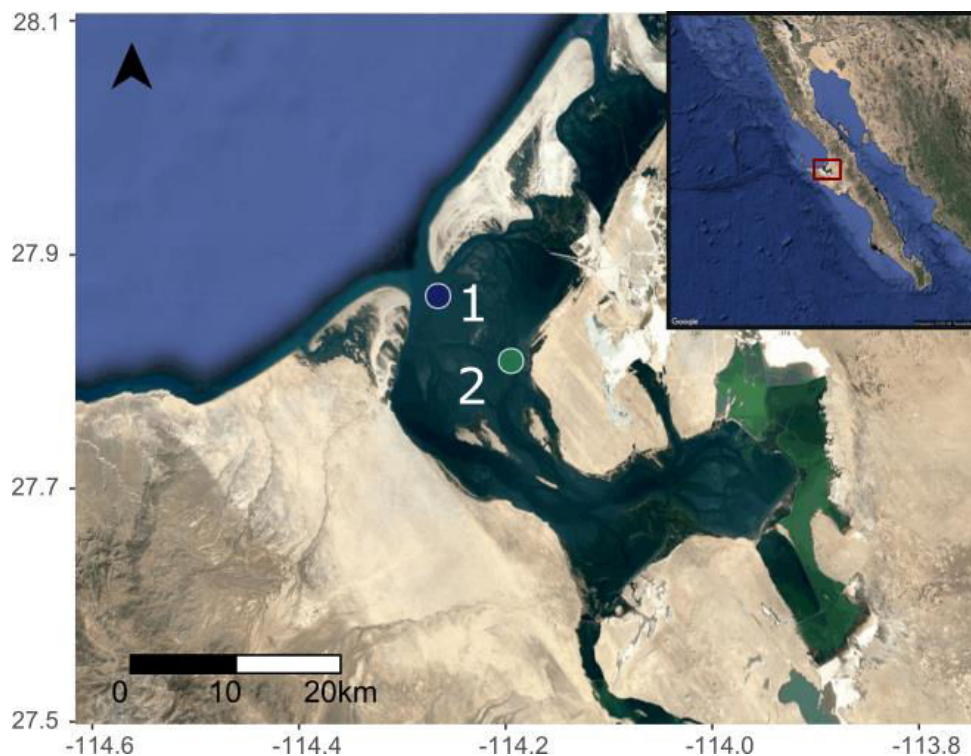


Figure 16. Location of the 4 sampling stations in the Ojo de Liebre lagoon (Baja California Sur, Mexico).

km from the entrance), while station 2 (Datil) represented the most inner station (15.5 km from the mouth) and the southern distribution limit of *Spondylus crassisquama* in this bay. Samples were collected in February and August 2016. For each station, 10 similarly sized individuals were sampled by divers. Potential food sources available for filters feeders were also sampled. One sedimentary core was sampled at each station. The upper centimeter, the most likely to be resuspended by currents and therefore available to suspension-feeders, was collected. Due to the absence of water column vertical stratification into the lagoon (Phleger & Ewing 1962), one surface water sample (3L) was collected for each site and each date. Because of logistical limitations associated to sampling in the lagoon, we could not replicate our source sampling within each site. Ojo de Liebre contains one of the largest seagrass bed of *Zostera marina* in the Pacific (Cabello-Pasini *et al.* 2003) which represents one of the dominant primary producer at the bay scale. Because seagrass detritus could contribute to the composition of particulate organic matter (POM) and potentially as a food source for bivalves, stranded *Z. marina* detritus were collected from the shore at the eastern part of the sampling area, and considered as proxies of eelgrass detritus within the lagoon. Indeed, the SI composition of seagrass is known to be little altered during degradation, in particular for $\delta^{13}\text{C}$ (Fenton & Ritz 1988).

After collection, samples were placed in cooler boxes containing water and transported to the laboratory (CIBNOR, Unidad Guerrero Negro). Bivalves were dissected and each tissue of interest (*i.e.* adductor muscle and DG) was sampled, packed into aluminum and stored in liquid nitrogen until further analysis. For each station, surface water samples were filtered on pre-combusted GF/F filters (6 h, 450°C). For each filter 1.5 L of sea water was filtered. Immediately after filtration, filters were frozen in liquid nitrogen. Sediment samples were soaked in local filtered water (GF/F 0.7 μm), and allowed to settle for a few seconds. The supernatant containing fine organic particles, was then collected and filtered on pre-combusted (6 h, 450°C) GF/F filters. Two subsamples of suspended particulate organic matter (POM) (one for SI analyses and one for FA analyses), and four subsamples of sedimentary organic matter (SOM) (two for SI and two for FA analyses) were taken at each sampling station/date. All samples were stored in liquid nitrogen during transportation to the laboratory (CIBNOR, La Paz) and then stored at -80°C until further preparations for analysis.

Stable isotopes analysis

For SI analyses, muscle samples were freeze dried for 24 h and ground into homogenized fine powder using a ball mill. Muscle samples were not previously delipidated because bivalve muscles generally show a very low content of lipids in this tissue (Lorrain *et al.* 2002), also C/N ratios were measured and did not exceed 3.5, suggesting delipidation unnecessary (Post, Layman, Arrington, Takimoto, Quattrochi & Montaña 2007). A minimum of 0.250 mg of powder were then placed in tin capsules (8x5 mm) for isotopic analyses. For SOM and POM, filters were scraped, and approximately 1.5 mg was placed in tin capsules.

Samples were analyzed by continuous flow on a Flash EA2000 elemental analyzer coupled to a Delta V Plus mass spectrometer (Thermo Fisher scientific). Reference gas calibration was conducted using IAEA-600 Caffeine, IAEA-CH-6 Sucrose and IAEA-N-2 Ammonium Sulphate. Analytical precision, based on repeated analyses of an acetanilide working standard (Thermo scientific), was ± 0.1 ‰ for both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. Results are expressed in δ , with respect to international standards (Vienna Pee Dee Belemnite for $\delta^{13}\text{C}$ and atmospheric nitrogen for $\delta^{15}\text{N}$), following the equation: $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N} = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}})-1] \cdot 10^{-3}$ (expressed in ‰) and where R is $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ or $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

Fatty acid analysis

Lipid extraction

Samples of bivalve DG and *Z. marina* were ground in liquid nitrogen into a fine homogeneous powder. Lipids were then extracted, between 0.2 and 0.4 g of material was placed in 6 ml of chloroform/methanol (2:1; v/v) and sonicated at 4°C during 5 min, to ensure complete extraction of lipids. Lipid extracts were stored at -20°C under nitrogen atmosphere until further analysis. Lipids from the other potential food sources (POM and SOM) were extracted following the same method, by resuspending filters directly in chloroform/methanol (2:1; v/v).

Separation of neutral lipids

Lipids from DG were separated into two fractions (neutral and polar lipids) following the method described by Le Grand *et al.* (2014). An aliquot (1/6) of total lipid extract was evaporated under nitrogen flux, recovered with 3 washes of 0.5 ml of chloroform/methanol (98:2; v/v) and deposited at the top of a silica gel column (40 mm x 4 mm, silica gel 60A 63-200 μm rehydrated with 6% H_2O (70-230 mesh)). NL were eluted with 10 ml of chloroform/methanol (98/2; v/v). NL fractions were collected in 20 ml glass vial containing 2.3

μg of each internal standards (tricosanoic acid (C23:0), and cholestane). After evaporation to dryness, NL fraction was recovered with 3 washes of 0.5 ml of chloroform/methanol (98:2; v/v) and separated in two aliquots (1/2), one for FA analysis and the second for sterol analysis.

Methylation of fatty acids

The NL fraction of DG, and an aliquot of the total lipid extract from food sources (POM, SOM, and eelgrass) were evaporated to dryness under nitrogen flux. Acidic transesterification was done to obtain fatty acid methyl esters (FAME). Briefly, 0.8 ml of H₂SO₄/methanol were added (3.4 %; v/v) and lipid samples were then vortexed and heated at 100°C for 10 min. After cooling, 0.8 ml of hexane and 1.5 ml of distilled water saturated in hexane were added. Vials were homogenized and centrifuged at 738 g, 1 min at 20°C. The aqueous phase (without FAME) was discarded and the organic phase—containing FAME was washed two more times with distilled water saturated in hexane.

Saponification and silylation of sterols

After evaporation to dryness of NL fraction of DG and of an aliquot of the total lipid extract from food sources (POM, SOM, and eelgrass), 3 ml of KOH/methanol (5.6:94.4; v/v) were added; samples were homogenized and placed under nitrogen atmosphere. Samples were then heated at 100°C during 10 min. After cooling at room temperature, 0.8 ml of hexane and 1.5 ml of distilled water saturated in hexane were added, followed by a homogenization and centrifugation at 738 g during 1 min at 20°C. The aqueous phase was discarded and the organic phase—containing sterols was washed two more times with distilled water saturated in hexane.

Before GC analysis, sterol samples were silylated to improve resolution for gas chromatography. For that, organic phases obtained after saponification were evaporated to dryness under nitrogen flux, then 100 μl of reagent (BSTFA:TMCS; 99:1; v/v) and 100 μl of pyridine were added. Sterols samples were then heated at 70°C during 30 min. After cooling at room temperature, 0.8 ml of hexane and 1.5 ml of distilled water saturated in hexane were added, followed by a homogenization and centrifugation at 738 g during 1 min at 20°C. The aqueous phase was discarded and the organic phase—containing silylated sterols was washed two more times with distilled water saturated in hexane.

Fatty acid Gas Chromatography analysis

FAME were analyzed in a Varian CP8400 gas chromatograph, programmed in temperature (from 0°C to 150°C at 50°C min⁻¹, then to 170°C at 3.5°C min⁻¹, to 185°C at 1.5°C min⁻¹, to 225°C

at $2.4^{\circ}\text{C min}^{-1}$, and finally to 250°C at $5.5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ and maintained for 15 min) and equipped with two splitless injectors and two flame-ionization detectors, with hydrogen as vector gas. FAME were injected and separated simultaneously on two columns, one polar (ZBWAX: 30 m x 0.25 mm ID x 0.2 μm) and one apolar (ZB5HT: 30 m x 0.25 mm ID x 0.2 μm), with two different polarities we can easily quantify FA in case of co-elution. FAME were identified by comparisons of their retention time with those of commercial standards (Supelco 37 Component FAME Mix, the PUFA No.1 and No.3, and the Bacterial Acid Methyl Ester Mix from Sigma) and in-house standard mixtures from marine bivalves and micro- and macroalgae. FA compositions were expressed as the mass percentage of the total FA content.

Sterols Gas Chromatography analysis

Sterols were analyzed in a Shimadzu GC-2010 gas chromatograph (GC). Sterols were injected and separated on a ZB5HT: 30 m x 0.25 mm ID x 0.2 μm (Phenomenex). The GC temperature program was from 40°C to 100°C at $25^{\circ}\text{C.min}^{-1}$, then to 250°C at $15^{\circ}\text{C.min}^{-1}$, and finally to 315°C at $3^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ and maintained for 10 min. GC was equipped of splitless injector slated at 280°C , and a flame-ionization detector programmed at 250°C , with hydrogen as vector gas and an interface maintained at 315°C . Sterols were then identified by comparisons of their retention time with those of commercial standards and an in-house standard mixtures from marine bivalves. Sterols relative proportions were expressed as the mass percentage of the total sterols content.

Statistical Analysis

All data were first tested for normality (Shapiro-Wilks test) and homoscedasticity (Bartlett test). If conditions were satisfied, parametric analyses were carried out, alternatively, non-parametric analyses were used. Due to number of replicates, the statistical comparison of food sources were impossible. SI variations between stations of bivalve muscles were compared by Student's test (t-tests). In total, 35 FA and 11 sterols having a mass proportion higher than 0.5 % of total FA or sterol were considered for statistical analyses, and non-identified FA and sterols were grouped as "unknown". Permutational variance analysis (PERMANOVA) permitted to test the interaction between periods and stations. As the interaction was significant, we analyzed the global spatial difference of both FA and sterol compositions by PERMANOVA tests at each periods. Due to the low proportion of zero in our dataset (less than

5 % for FA and 1.5% for sterols) Euclidean distances or Euclidean-based methods were used throughout our study. To identify which were the most discriminant FA and sterols between stations, a similarity of percentages analyses (SIMPER) was used. Principal component analyses (PCA) were performed to investigate the variation in lipid profiles between stations, for each species and both periods. FA and sterols which accounted for more than 80 % of dissimilarity (SIMPER) were represented on PCA. For each lipid fractions, pairwise comparisons (Wilcoxon tests) were carried out to explore spatial differences for each sterol, at each periods.

Firstly, we considered the consistency between trophic structures derived from FA and sterol tracers, at the species levels and at the two periods. Coinertia analyses (Dray, Chessel & Thioulouse 2003) were used to assess whether the same spatial and temporal patterns were retrieved with the two sets of markers. RV coefficient (between 0 and 1) was used to quantify the degree of adequacy between the two datasets, with high values indicating strong concordance. Secondly, we considered the simple relationships among the principal biomarkers using Spearman's rank correlation (where r_s is the correlation coefficient). When a correlation was detected, the model (linear or not) selected by the Akaike Information Criterion (AIC) was adjusted and the normality of residuals was checked using Q–Q plots.

All statistical analyses and graphics were performed with the free software R (Core Team 2017), with R Version 3.4.1 (2017 06 30).

Results

Spatial differences in biomarker compositions

Food sources

Spatial and seasonal trends were observed for all biomarker compositions (SI, FA and sterols) of potential food compartments that contribute to bivalve diets. Nevertheless, precautions should be taken as the low number of replicates ($n \leq 2$ per stations), did not permit to carry out statistical analyses to reveal spatial differences.

POM was more ^{15}N -enriched in February than in August (Figure 17). For both seasons, the highest $\delta^{15}\text{N}$ values for POM were recorded from station 1, near the lagoon entrance (8.3‰ in February and 5.5‰ in August) and the lowest at station 2, the furthest site from the bay mouth (5.9‰ in February and 3.7‰ in August). At the both periods, the $\delta^{13}\text{C}$ values of POM

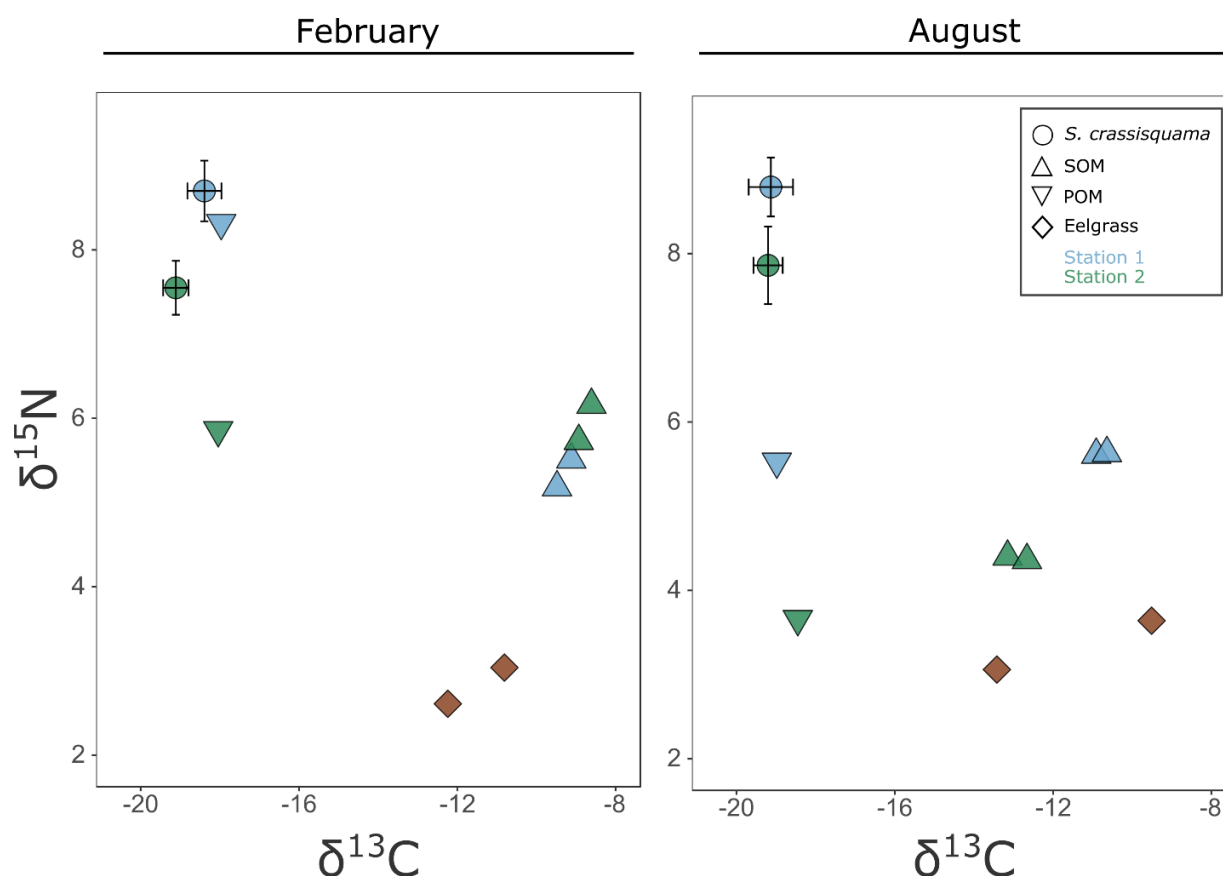


Figure 17. Stable Isotope (SI) bi-plot ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, mean values $\pm\text{SD}$ when $n \geq 2$) of the adductor muscles of *Spondylus crassisquama* (represented by circles) and of their potential food sources (POM, SOM and seagrass), in February and August. Samples from station 1 are shown in light blue and from station 2 in green.

were close between both stations but were quite ^{13}C -depleted compared to SOM (Figure 17). The $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ of SOM did not seem to differ between stations in February (Figure 17). As for POM, SOM samples from station 1 were more ^{15}N -enriched than samples from station 2. The same gradient also occurred for $\delta^{13}\text{C}$, with station 1 which seems more ^{15}N -enriched than station 2 (Figure 17). SOM $\delta^{13}\text{C}$ were close to those of *Zostera marina* detritus (Figure 17), between -13.1‰ and -8.6‰ , in February and in August. *Z. marina* detritus did not show big differences in $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ between seasons with an average $\delta^{13}\text{C}$ of -11.5‰ in February and August and an average $\delta^{15}\text{N}$ of 2.8‰ in February and 3.4‰ in August.

The main FA found in POM and SOM were 16:0 for saturated FA (SFA), and 16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7 for monounsaturated FA (MUFA) (Supplementary Table 2). For polyunsaturated FA (PUFA), 20:5n-3 and 22:6n-3 were the FA that exhibited the highest abundances in POM and SOM; 18:3n-3 and 18:4n-3 showed highest values in POM and 20:4n-6 in SOM (Supplementary Table 2). Station 2 samples had POM enriched in 18:4n-3 (8.3% in February and 5.3% in August)

and in 22:6n-3 (6.9% in February and 8.8% in August) (Supplementary Table 2). SOM showed specifically higher values of 20:4n-6 at station 2 (5.8% in February, and 4.3% in August) (Supplementary Table 2). In February, *Z. marina* was characterized by high levels of 16:3n-3 (6.7%) and 18:3n-3 (9.7%) (Supplementary Table 2). In August, the proportion of 18:3n-3 reached 33.6% of total FA, whereas 16:3n-3 proportion decreased to 3.7%. The proportion of 18:2n-6, which was at low levels in February (1.9%), reached 17.4% in *Z. marina* sampled in August (Supplementary Table 2).

The main sterols found in POM were Cholesterol, Brassicasterol, Norcholesterol, 24-Methylenecholesterol, Isofucosterol and β -Sitosterol. At both periods, proportions of Cholesterol in POM collected at station 1 showed higher proportions than station 2 (40.1% against 34% in February, and 56.1% against 38% in August) (Supplementary Table 3). Brassicasterol was present at similar levels in POM at both stations in February (15.4% and 15.5%), but was lower at station 1 in August (7.6%) (Supplementary Table 3). The 24-Methylenecholesterol was more abundant in the POM in February (9.0% at station 1 and 12.8% at station 2) (Supplementary Table 3). Stigmasterol was not detected in any samples of POM in February and only 2.9% at station 1 in August, but presented 26.4% of total sterols of POM sample at station 2 in August. In August, the ratio 24-Methylenecholesterol / Brassicasterol was more than twice higher in POM at station 1 (0.8) than at station 2 (0.3). Predominant sterols found in SOM were the same as POM except for Cholestanol, and Campesterol that were principally found in SOM (only detected in SOM for Campesterol). At both months, SOM seemed to present a higher abundance of Norcholesterol and Cholestanol at station 1 than at station 2 (Supplementary Table 3). Inversely, Cholesterol, Brassicasterol, and β -Sitosterol were present in higher proportions in SOM collected at station 2 (Supplementary Table 3). The main eelgrass sterols were β -Sitosterol, Stigmasterol and Cholesterol (Supplementary Table 3). Stigmasterol showed higher proportions in eelgrass sampled in August (20.9 vs 10.3% in February), whereas Cholesterol was in much higher proportions in February (16.7% vs 3.8% in August).

Bivalves

Although spatial differences were quantitatively low, $\delta^{13}\text{C}$ values significantly differed between stations in February, (-18.4‰ at station 1 and -19.1‰ at station 2) (t-test, $p < 0.001$, $df = 16.70$, $t = 4.21$; Figure 17). In August, $\delta^{13}\text{C}$ did not differ significantly between stations (t-

test, $p > 0.05$, $df = 15.54$, $t = 0.31$), with individuals from station 1 presenting values of -19.1‰ and from station 2 of -19.2‰ (Figure 17). $\delta^{15}\text{N}$ differed significantly between stations for both sampling dates, with $\delta^{15}\text{N}$ values higher at station 1 than at station 2, this difference being more pronounced in August. In February, $\delta^{15}\text{N}$ significantly decreased in muscles along the transect (t -test, $p < 0.001$, $df = 17.76$, $t = 7.56$), from 8.7‰ at station 1, to 7.6‰ at station 2 (Figure 17). In August, $\delta^{15}\text{N}$ significantly differed between station 1 (8.8‰) and station 2 (7.9‰) (t -test, $p < 0.001$, $df = 16.7$, $t = 5.12$; Figure 17).

Because significant interactions were found for FA proportions between periods and stations (PERMANOVA, p -value < 0.01 , $df = 1$, $F = 10.14$, $R^2 = 0.13$), and because sterol proportions presented same interactions (PERMANOVA, p -value < 0.01 , $df = 1$, $F = 4.45$, $R^2 = 0.09$), we compared spatial differences at each period.

The PCA based on NL FA and sterols composition shows the differences between stations and lipid biomarkers responsible for 80% of these differences (Figure 18).

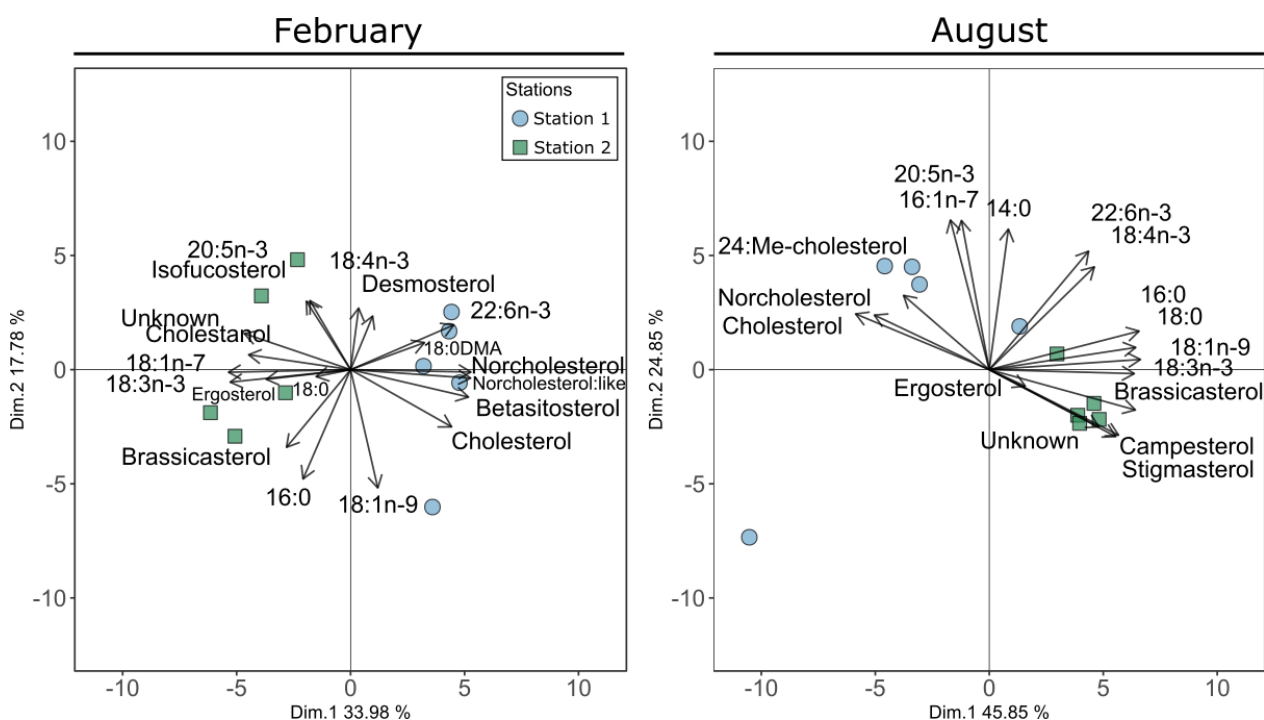


Figure 18. Principal Component Analyses (PCA) of neutral lipids (NL) fatty acids (FA) and sterols compositions (mass %) of *Spondylus crassisquama* digestive gland in February (A and C) and August (B and D). Only FA and sterols that account for $> 80\%$ of the contribution of dissimilarity between stations are shown.

In February, significant spatial differences were found for both NL FA composition (PERMANOVA, $p < 0.001$, $df = 2$, $F = 5.45$, $R^2 = 0.3$), and sterol composition (PERMANOVA, p -value < 0.05 , $df = 1$, $F = 10.02$, $R^2 = 0.56$). At this period individuals from station 1 were

characterized by higher levels in 20:4n-6 and 22:6n-3 (Figure 18 and Supplementary Table 4) and were associated to higher values of β -Sitosterol (Figure 18 and Supplementary Table 5). Individuals from station 2 tended to be characterized by FA 18:1n-7, 18:3n-3 (Figure 18 and Supplementary Table 4) and were not associated to any particular phytosterol.

In August, NL FA compositions differed among sampling location (PERMANOVA, $p < 0.001$, $df = 2$, $F = 34.11$, $R^2 = 0.74$). The same was found for sterol composition (PERMANOVA, p -value < 0.01 , $df = 1$, $F = 13.55$, $R^2 = 0.63$). Here again, a clear spatial pattern was observed along the first axis of the PCA (Figure 18). We observed significantly decreasing values of 20:5n-3 and 16:1n-7 from the mouth to the inner bay (Figure 18 and Supplementary Table 4). Even if PCA revealed a contribution of 24-Methylenecholesterol (Figure 18), pairwise comparisons revealed no significant spatial differences (Supplementary Table 5). Individuals from station 2 were characterized by higher proportions of 18:1n-9 and 18:3n-3 (Figure 18 and Supplementary Table 4), and by significantly higher proportions of Campesterol, Stigmasterol, Brassicasterol (Figure 18 and Supplementary Table 5).

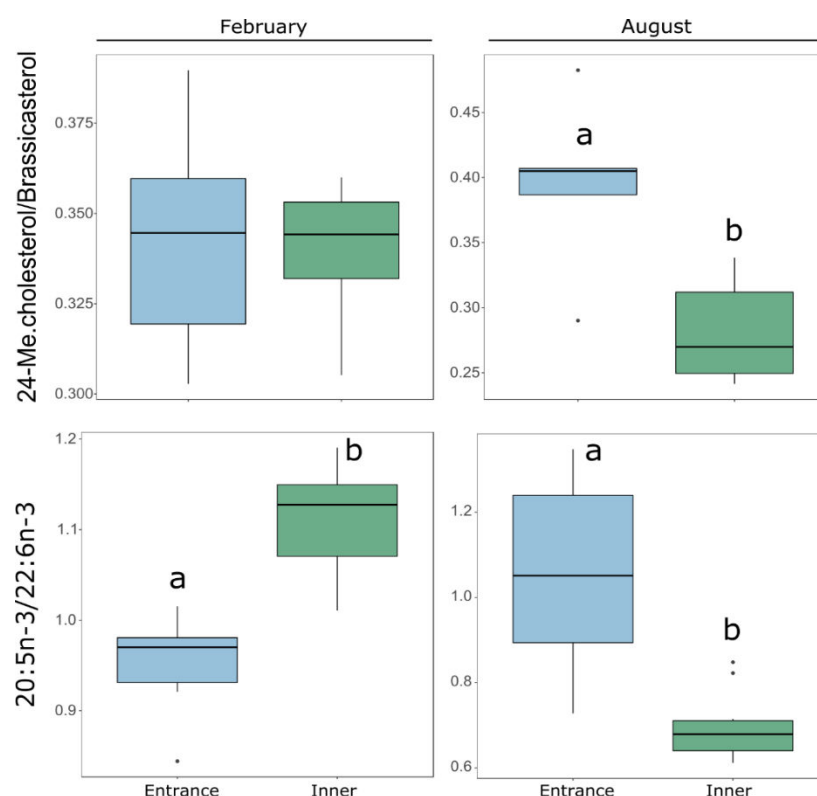


Figure 19. Boxplot of the ratios of 24-Methylenecholesterol/Brassicasterol ($n=5$) and of 20:5n-3/22:6n-3 (EPA/DHA; $n=10$) of *Spondylus crassissquama* at the both periods. Different letters indicate significant differences (Wilcoxon test, at significant level $\alpha < 0.05$). 24-ME.cholesterol: 24-Methylenecholesterol.

We calculated the ratio between 24-Methylenecholesterol and Brassicasterol and the ratio between 20:5n-3 and 22:6n-3 (EPA/DHA) (Figure 19). In February, the EPA/DHA was significantly higher at the inner site, while no difference was found for the 24-Methylenecholesterol/Brassicasterol. In August, the two ratios displayed the same pattern, being the highest near the entrance of the lagoon.

Comparisons of different biomarkers

We found a robust correlation between the two ordinations of FA and sterols. This relationship was stronger in February ($RV = 0.71$) than in August ($RV = 0.6$). Both co-inertia analyses were significant ($p\text{-value} < 0.01$). Significant Spearman's rank correlations were found between EPA/DHA and 24-Me/Bra ($r_s = 0.7$, $p\text{-values} < 0.05$; Figure 20). Both ratios were positively correlated to the 16:1n-7 ($0.33 < r_s < 0.54$, $p\text{-values} < 0.05$; Figure 20). Inversely, ratios were negatively correlated to Campesterol ($-0.76 < r_s < -0.78$, $p\text{-values} < 0.05$; Figure 20), as for Stigmasterol ($-0.69 < r_s < -0.91$, $p\text{-values} < 0.05$; Figure 20). Interestingly, Stigmasterol biomarker was strongly and positively correlated with Campesterol ($r_s = 0.8$, $p\text{-values} < 0.05$; Figure 20). In contrast, it was negatively correlated to 20:5n-3 ($r_s = -0.48$, $p\text{-values} < 0.05$; Figure 20). No correlation was observed between Stigmasterol and 16:1n-7 ($r_s = -0.39$, $P > 0.05$; Figure 20). 24-Methylenecholesterol was strongly correlated with EPA/DHA ratio ($r_s = 0.73$, $P < 0.05$; Figure 20).

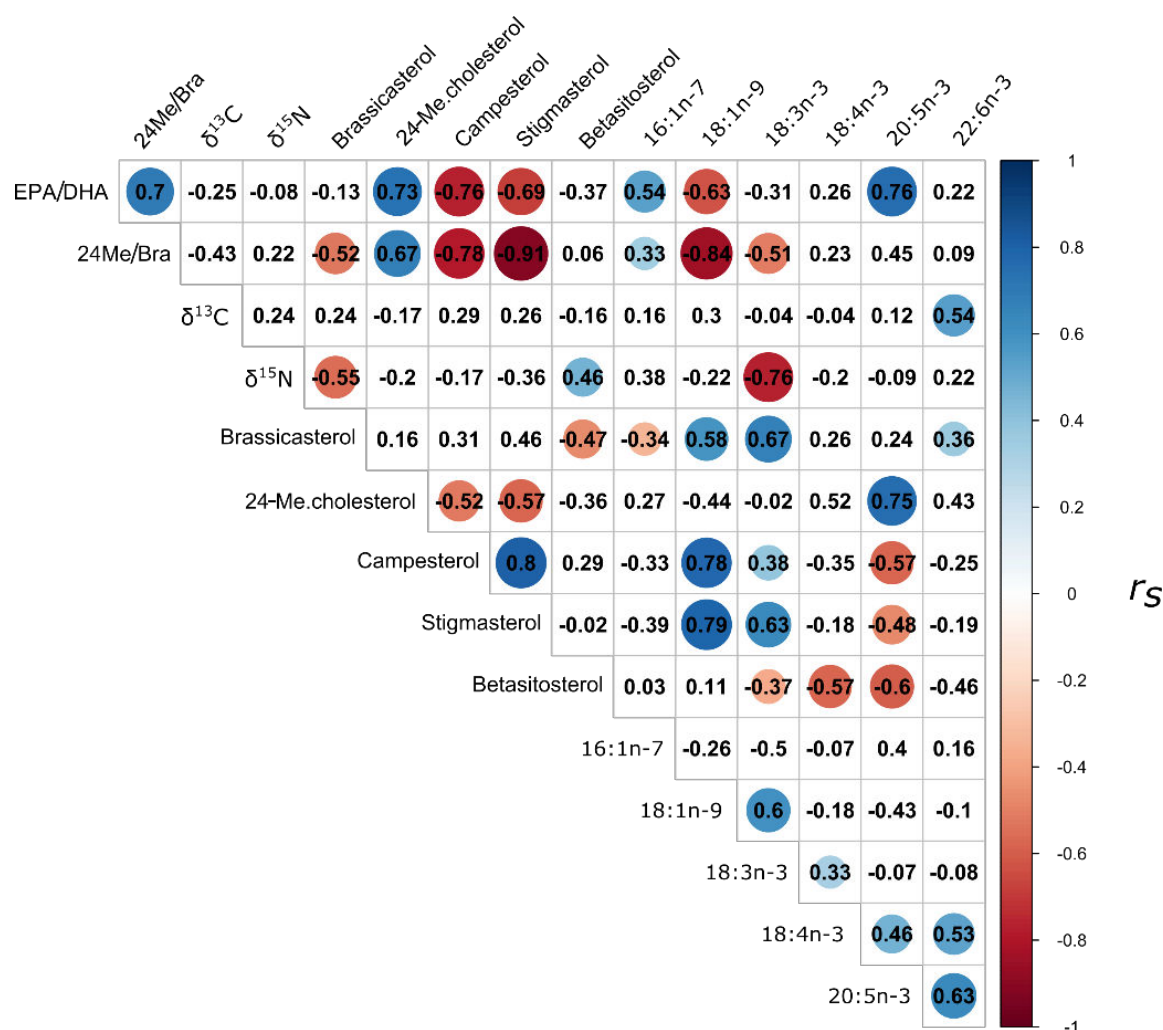


Figure 20. Correlations between the three biomarkers (Spearman's test): stable isotope ratios (carbon and nitrogen; ‰), neutral lipid fatty acids, and sterols (mass %) for *Spondylus crassisquama*. The colored circles represent significant correlations between two tracers (p -value < 0.05). The numbers inside cells are the associated Spearman's correlation.

Discussion

In coastal lagoons, investigating the nature of food sources consumed by bivalves can provide a spatially and temporally integrated overview of nutrient transfers within the system and across ecosystem boundaries (e.g lagoon primary production vs inputs from coastal ocean). Here, the coupled approach used revealed quite powerful to unravel spatial patterns in the trophic ecology of *S. crassiquama*. Our results point out the significant role played by oceanic inputs in the ecological functioning of coastal lagoons, including the support of bivalve populations. This study also highlights the role played by remineralization in the food web of the inner lagoon.

Spatial differences in biomarker compositions

The similarity of carbon SI composition observed between POM and bivalves isotopic composition is in accordance with a direct and non-selective feeding (Vander Zanden & Rasmussen 2001). Although significant differences were observed between stations especially for $\delta^{15}\text{N}$, the extent of these differences was low, typically below 1.5 ‰ suggesting that no major contrast occurred in the diet of this species in the lagoon. Individuals sampled close to the mouth displayed the highest $\delta^{15}\text{N}$, while those from the inner lagoon displayed the lowest $\delta^{15}\text{N}$. This pattern matches the one displayed in POM, suggesting that bivalve $\delta^{15}\text{N}$ directly reflect the composition of POM, and their diet does not drastically differ from its composition (Coma *et al.* 2001). Consequently, $\delta^{15}\text{N}$ indicates that oceanic inputs affecting the composition of POM are transferred into the local food web through their consumption by suspension-feeding bivalves of the lagoon. Ojo de Liebre is located in an arid region, with virtually no freshwater inputs (Phleger & Ewing 1962). In contrast, the open ocean facing the lagoon can induce ^{15}N -enriched nutrient or plankton pulses that could explain the spatial pattern observed here (Altabet, Pilskaln, Thunell, Pride, Sigman, Chavez & Francois 1999). The higher values at the entrance of the lagoon tend to be close to those described in the region (Olson, Popp, Graham, López-Ibarra, Galván-Magaña, Lennert-Cody, Bocanegra-Castillo, Wallsgrove, Gier, Alatorre-Ramírez, Ballance & Fry 2010; McMahon, Hamady & Thorrold 2013). It seems therefore that the lagoon of Ojo de Liebre, at least in its proximal part, is significantly influenced by its nearshore hydrological conditions, through the entrance of oceanic originating organic matter/nutrients.

At both seasons, global FA and sterol compositions differed, revealing spatial differences in the diet of *S. crassisquama*. In February, even though some biomarkers were significantly different between stations, the spatial pattern was quite slight, revealing only small dietary differences. Individuals from the mouth of the lagoon were characterized by higher proportions of 22:6n-3 and β -Sitosterol. The presence of 22:6n-3 suggests a dominance of dinoflagellates in the diet of *S. crassisquama* (Alfaro *et al.* 2006; Parrish 2009). Although β -Sitosterol was the major sterol found in eelgrass, it is not possible to conclude that β -Sitosterol found in bivalves DG is obtained from eelgrass detritus, as this sterol was also found in POM and SOM. High proportions of β -Sitosterol have also been reported in haptophytes and diatoms in the literature (Napolitano *et al.* 1993; Soudant *et al.* 1998a). In fact, most phytosterols found in this study were found in all POM, SOM, and eelgrass samples, making difficult to decipher their origin among potential foods sources of bivalves.

In August, a clear gradient from the mouth to the center of the bay suggested a more important spatial diet shift. Individuals from the most oceanic stations (station 1) were characterized by higher levels of 16:1n-7 as well as 20:5n-3, but also by higher levels of 24-Methylenecholesterol. The presence of these lipid biomarker, as well as higher EPA/DHA and 24-Me./Bra ratios, highlights the importance of diatoms in the diet of bivalves from this station during this period (Kharlamenko, Kiyashko, Imbs & Vyshkvartzev 2001; Volkman 2003; Alfaro *et al.* 2006; Lavaud *et al.* 2018). This supply in diatoms at the mouth of the lagoon supports the hypothesis of oceanic inputs and intake of primary production from coastal waters suggested by ^{15}N enrichment. Du *et al.* (2015) showed in the Northern California current that diatoms proliferate during strong upwelling events (from April to September), when nutrients and turbulence are relatively high. The fact that oceanic water masses present the same taxonomic dominances supports again the hypothesis that oceanic organic matter enters the lagoon and supports local the food web. However, the diminution of diatoms importance at the inner station suggests that oceanic inputs do not extend to the whole bay. At both seasons, in the center of the bay, *S. crassisquama* was characterized by high levels of C18 PUFA (18:3n-3) and/or MUFA (18:1n-9), but also by high proportions of Brassicasterol, Campesterol, or Stigmasterol. These FA can be found in various primary producers, such as macroalgae (Nelson, Leighton, Phleger & Nichols 2002), higher plants (Valitova *et al.* 2016), seagrass (Kharlamenko *et al.* 2001; Jaffé, Rushdi, Medeiros & Simoneit 2006; Volkman, Revill, Holdsworth & Fredericks 2008), various phytoplankton taxa (Soudant *et al.* 1998a; Dalsgaard

et al. 2003), including dinoflagellates (Soudant *et al.* 1998a; Kharlamenko *et al.* 2001; Hurtado *et al.* 2012; Nerot *et al.* 2015) and are very abundant in various ciliate species, which contribute to the marine microbial food web (Zhukova & Kharlamenko 1999). Consequently, bivalves from the center of the bay seem to rely, at least partly, on microheterotrophs (dinoflagellates, flagellates, ciliates), hence revealing the influence of the microbial food web in this part of the lagoon in summer. The lower EPA/DHA and 24-Me./Bra ratios also support the hypothesis of the presence of dinoflagellates in the diet of this species (Alfaro *et al.* 2006; Kelly & Scheibling 2012a; Lavaud *et al.* 2018).

Campesterol, has been reported in small amount in some species of diatoms like *Chaetoceros calcitrans* (Yamauguchi *et al.* 1986; Soudant *et al.* 1998a; Mohammady 2004). The contrast in the spatial repartition of Campesterol (higher at inner station) and 24-Methylencholesterol (higher at entrance station) suggests different diatom assemblages and the contribution of different diatom species in the diet of bivalves within the lagoon. In addition, Campesterol was absent from POM samples at both stations and for both seasons, whereas it was present in non-negligible amounts in SOM. The presence of this sterol in bivalves might therefore suggest a contribution of SOM in the diet of bivalves, through the resuspension of sediment. The contribution of eelgrass detritus to the diet of bivalves, although already reported as a secondary dietary source in enclosed coastal systems (Schaal *et al.* 2008) seems unlikely because of the lack of ^{13}C -enrichment in bivalves. However, lipid biomarkers as 18:3n-3 or Stigmasterol seem to reveal the presence of eelgrass in bivalve diets, and in particular at the inner station. Seagrass cover a surface of more than 590 km² in the Ojo de Liebre lagoon (Riosmena-Rodríguez, Muñiz-Salazar, López-Calderón, Torre-Cosío, Meling, Talbo, Sage, Ward & Cabello-Pasini 2013), and are known to produce large amounts of detritus, which can be buried in the sediment, exported to the adjacent nearshore environment, or locally transferred into the food web (Hyndes & Lavery 2005; Schaal *et al.* 2008). Here, SI ratios measured in sedimentary organic matter revealed strong ^{13}C enrichment, suggesting that detritus may be major components of sediment in the Ojo de Liebre lagoon. Although these high $\delta^{13}\text{C}$ in SOM could also reveal the importance of epiphytes, which commonly display a SI composition similar to their seagrass host, the highly degraded nature of sediments suggests a dominance of refractory compounds, which are abundant in seagrass (Fourqurean & Schrlau 2003). In contrast with sediment, POM did not seem to reflect any significant contribution of seagrass, which would have resulted in more ^{13}C -enriched SI composition than what was

observed. Only a slight ^{13}C -enrichment could be found in POM at stations inside the lagoon that could be due to abundant seagrass detritus in suspension on the water column, but the lack of replicates prevents any definitive conclusion about seagrass contribution to the POM pool.

Comparison of different lipid biomarkers

Comparing sterol composition with FA and SI analysis brings some interesting insights into the potential contribution of benthic primary producers in the diet of bivalve species. The compositions in FA and sterols were strongly correlated according to the RV coefficient of the co-inertia analyses. The higher RV coefficient in February could be explained by the fact that the diet of bivalves was more spatially homogeneous in the winter period. Spearman's correlations allowed to validate the use of 24Me./Bra as a maker of predominance of diatoms or dinoflagellates in the bivalve diet. Indeed, this ratio was strongly positively correlated with EPA/DHA ratio, which is currently used in literature (Parrish 2009; Le Croizier *et al.* 2016). Both ratios were also positively correlated to 16:1n-7, which confirmed their usefulness to unravel the predominance of diatoms in the diet of bivalves (Dalsgaard *et al.* 2003; Richoux & Froneman 2008). However, Campesterol was negatively correlated to both ratios, which could be surprising for a known diatom biomarkers. In fact, Campesterol is reported to be biomarker of Bacillariophyceae (Soudant *et al.* 1998a; Mohammady 2004), which seems to be a group of diatoms only predominant in the inner lagoon. Besides, Stigmasterol, which could be considered as biomarker of eelgrass (Jaffé *et al.* 2006; Volkman *et al.* 2008), is highly and positively correlated to 18:3n-3 also known as biomarker of eelgrass (Kharlamenko *et al.* 2001). This correlation and high amount of these lipid biomarkers found in seagrass detritus samples, support their utilization as biomarker of seagrass detritus in the lagoon of Ojo de Liebre.

Conclusion

Stable isotopes and fatty acids and sterols proved being highly complementary tools to identify spatio-temporal patterns in the Ojo de Liebre lagoon. The entrance of the lagoon seems to reflect coastal oceanic processes, supporting the hypothesis of significant oceanic primary production pulses into the lagoon. Although significant, the influence of oceanic

inputs does not extend to the whole lagoon. The center of the lagoon seems to be more local processes-driven, with a recycled organic matter-based food web and the role of seagrass suggested by FA and sterols analysis. Our results revealed strong correlations between FA and sterols in bivalves. Consequently, sterol compositions could be used as complementary and/or substitute biomarkers to FA. The approach used in this study brought some interesting new insights on the potential contribution of primary producers to bivalve diets. This coupling brings new information about phytoplankton assemblages and diet composition differences at low taxonomic level, which seems to be an improvement compared to the broader discrimination power and SI and FA.

Acknowledgements

This study was supported by the ECOS-ANUIES program (PROPHYMUS project), the "Laboratoire d'Excellence" LabexMER (ANR-10-LABX-19) and co-funded by a grant from the French government under the program "Investissements d'Avenir". MMR's PhD fellowship was provided by the French Research Ministry and Region Bretagne. We would like to thank the contribution of the Guerrero Negro unit of CIBNOR for hosting the first steps of sample preparation after fieldwork, the LIPIDOCEAN analytical facility for hosting all fatty acid analyses, and the Pôle Spectrométrie Océan (Clément Tanvet) for running stable isotope analyses.

We thank the "Pepe" Jose Alfredo Saenz Arce crew for the fieldwork, as well as Rosa Linda Salgado Garcia, and Laura Guzman for their precious help during sampling and dissections, and Dr. Elena Palacios and Dr. Kitty Arredondo Vega, for the laboratory facilities provided for the preparation of samples at CIBNOR La Paz. We thank the Reserva de la biosfera desierto de "el Vizcaino" for their help and support in carrying out sampling for this study. Authors would like to thank Aurelien Boye and Olivier Gauthier for their precious help and advices about statistical analyses.

Additional tables

Table 2. Total fatty acid (FA) composition (mean when n=2; mass %; for sedimentary organic matter (SOM) and *Zostera marina* n = 2; for particulate organic matter (POM) n = 1) of food sources during February and August 2016 from the both stations. Principal FA accounting for > 0.5 % of total FA in at least one sample are shown. SFA: saturated FA; MUFA: monosaturated FA; PUFA: polyunsaturated FA; Unknown: unidentified FA; Branched: FA [15iso+15anteiso+16iso+17iso+17anteiso]; DMA: dimethyl acetals.

	February					August				
	POM		SOM		Eelgrass	POM		SOM		Eelgrass
	Station 1	Station 2	Station 1	Station 2		Station 1	Station 2	Station 1	Station 2	
14:0	8.8	7.4	3.4	2.7	3.3	11.3	7.7	4.2	3.0	2.3
15:0	1.2	0.7	2.0	1.0	1.1	0.9	1.1	3.3	2.3	0.3
16:0	26.7	20.3	18.7	21.2	22.5	17.2	17.4	18.0	21.9	23.0
17:0	0.7	0.5	1.4	1.1	0.7	0.7	0.7	1.3	1.5	0.2
18:0	5.0	2.4	5.1	4.2	4.0	4.6	4.5	5.4	4.2	2.0
20:0	0.5	0.2	0.1	0.6	2.6	0.6	0.3	1.0	0.6	1.0
22:0	0.4	0.3	3.4	1.6	4.9	0.7	0.3	1.8	1.1	1.9
24:0	0.5	0.3	3.5	1.2	2.6	2.7	1.2	2.7	1.7	0.9
Σ SFA	44.0	32.2	38.1	34.2	42.6	38.8	31.7	38.1	36.7	31.9
16:1n-9	1.8	1.3	1.4	1.1	1.8	1.1	2.3	1.7	0.9	0.5
16:1n-7	4.4	6.5	8.5	14.0	2.8	8.6	8.0	7.6	15.4	0.7
18:1n-9	5.5	3.9	3.8	3.1	2.1	2.6	5.8	4.5	3.8	1.0
18:1n-7	2.5	3.7	6.7	4.5	4.6	2.9	8.1	4.3	3.5	0.0
20:1n-9	0.1	0.1	1.0	0.4	0.2	1.4	0.3	0.8	0.6	0.0
Σ MUFA	15.8	17.6	26.9	27.1	14.1	22.0	27.5	25.7	31.0	5.4
16:2n-4	0.6	1.0	0.5	0.8	0.1	1.2	2.0	0.5	0.6	0.0
16:3n-3	0.6	0.8	0.1	0.1	6.7	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7
16:4n-1	2.0	3.1	1.7	1.1	1.7	0.3	0.3	1.0	0.8	0.3
18:2n-6	2.3	2.0	1.2	1.2	1.9	1.2	2.5	1.5	1.2	17.4
18:3n-3	3.7	5.5	1.2	0.7	9.7	1.1	2.2	0.5	0.4	33.7
18:4n-3	5.5	8.3	1.6	1.4	0.6	2.9	5.3	1.4	1.4	0.2
20:4n-6	0.4	0.5	3.6	5.8	1.1	1.2	0.5	2.9	4.3	0.3
20:4n-3	0.4	0.5	0.5	0.3	0.3	0.4	0.3	0.5	0.3	0.1
20:5n-3	4.5	6.9	4.8	7.4	3.3	5.3	4.6	5.4	6.1	0.7
22:5n-6	0.3	0.4	0.4	0.8	0.6	1.2	0.9	0.7	0.6	0.2
22:5n-3	0.5	0.4	0.4	0.6	0.4	4.1	1.5	1.1	1.3	0.3
22:6n-3	5.4	6.9	1.7	2.3	3.6	7.9	8.8	4.1	2.3	0.5
Σ PUFA	28.8	39.1	22.3	28.5	34.3	32.2	32.2	25.9	25.2	58.7
Σ Unknown	8.0	7.1	4.4	3.7	3.1	3.0	4.2	3.6	1.6	0.4
Branched	2.5	2.5	6.0	4.2	3.2	1.9	3.1	4.3	3.4	2.5
DMA	0.9	1.5	2.2	2.1	2.7	2.1	1.2	2.4	2.0	1.0

Table 3. Sterol composition (mean; %; $n \leq 2$) of food sources in February and August 2016 from the both stations. Only the sterols accounting for 0.5 % of total sterol in at least one sample are shown. 24-Me.cholesterol: 24-Methylencholesterol; Σ Unknown: sum of unidentified sterols; 24-ME./Brassica: 24-Methylencholesterol on Brassicasterol ratio. NA = Not analyzed.

	February					August				
	POM		SOM		Eelgrass	POM		SOM		Eelgrass
	Station 1	Station 2	Station 1	Station 2		Station 1	Station 2	Station 1	Station 2	
Norcholesterol	12.6	11.3	12.3	6.7	3.1	6.9	4.8	12.6	8.4	0.0
Cholesterol	40.1	34.0	12.3	35.0	16.7	56.1	38.0	24.9	37.7	3.8
Cholestanol	0.0	0.0	11.1	4.1	1.0	4.0	0.0	9.5	6.7	3.8
Desmosterol	1.2	5.3	0.0	3.8	2.3	2.8	0.0	3.6	0.0	0.0
Brassicasterol	15.4	15.5	7.5	13.3	3.4	7.6	13.6	7.8	15.1	0.3
Lathosterol	0.0	0.0	1.7	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
24-Me.cholesterol	9.0	12.8	6.5	5.3	2.0	6.4	4.7	7.0	7.0	0.8
Campesterol	0.0	0.0	5.6	4.3	2.5	0.0	0.0	4.8	6.7	4.2
Stigmasterol	0.0	0.0	5.1	6.0	10.3	2.9	26.4	6.8	8.0	20.9
β -Sitosterol	3.1	7.1	8.8	14.5	40.8	4.6	5.7	7.9	10.4	49.3
Isofucosterol	12.2	14.1	1.6	3.4	4.0	6.1	6.8	4.6	0.0	6.2
Σ Unknown	6.4	0.0	12.3	2.4	3.1	2.5	0.0	10.6	0.0	5.0
24-Me./Brassica	0.6	0.8	0.9	0.4	NA	0.8	0.3	1.1	0.5	NA

Table 4. Neutral fatty acid (FA) composition (mean $\pm$ SD; mass %; $n = 10$) of *Spondylus crassisquama* digestive gland in February and August 2016, for the both stations. Only the FA accounting for > 0.5 % of total FA in at least one sample are shown. Different letters indicate significant differences (Wilcoxon test, at significant level $\alpha < 0.05$), indicating spatial variations of DG FA composition in February and August, respectively. SFA: saturated FA; MUFA: monosaturated FA; PUFA: polyunsaturated FA; Unknown: unidentified FA; Branched: FA [15iso+15anteiso+16iso+17iso+17anteiso]; DMA: dimethyl acetals.

<i>S. crassisquama</i>						
	February				August	
	Station 1		Station 2		Station 1	Station 2
14:0	4.8	$\pm 0.4^a$	4.4	$\pm 0.3^b$	8.2	$\pm 1.5^a$
15:0	0.6	$\pm 0.0^b$	0.6	$\pm 0.0^a$	0.7	± 0.1
16:0	21.2	± 0.6	21.8	± 1.3	21.1	$\pm 1.0^b$
17:0	1.3	$\pm 0.1^b$	1.4	$\pm 0.1^a$	1.1	$\pm 0.2^b$
18:0	4.5	± 0.3	5.0	± 0.7	4.3	$\pm 0.6^b$
ΣSFA	33.0	± 0.8	33.7	± 1.7	36.3	$\pm 2.0^b$
16:1n-7	5.6	± 0.3	5.5	± 0.4	8.8	$\pm 0.9^a$
18:1n-9	4.8	± 0.5	4.3	± 0.6	4.0	$\pm 0.5^b$
18:1n-7	2.2	$\pm 0.1^b$	2.7	$\pm 0.2^a$	2.7	± 0.3
20:1n-9	0.7	$\pm 0.1^b$	0.8	$\pm 0.1^a$	0.8	$\pm 0.3^b$
ΣMUFA	16.3	± 0.5	16.3	± 0.7	19.0	$\pm 0.5^a$
16:4n-1	0.5	± 0.1	0.5	± 0.1	0.4	± 0.1
18:2n-6	2.7	± 0.1	2.9	± 0.2	2.5	$\pm 0.3^b$
18:3n-3	3.6	$\pm 0.1^b$	4.5	$\pm 0.4^a$	3.1	$\pm 0.4^b$
18:4n-3	5.7	± 0.8	5.7	± 0.4	4.8	± 0.6
20:4n-6	2.2	$\pm 0.1^a$	1.9	$\pm 0.2^b$	2.0	$\pm 0.2^a$
20:4n-3	0.4	$\pm 0.0^b$	0.5	$\pm 0.1^a$	0.5	± 0.1
20:5n-3	11.9	± 0.4	12.5	± 0.8	10.8	$\pm 1.8^a$
21:5n-3	0.8	± 0.1	0.8	± 0.0	0.7	± 0.0
22:5n-6	0.8	$\pm 0.0^a$	0.7	$\pm 0.2^b$	0.7	$\pm 0.1^b$
22:5n-3	0.7	$\pm 0.0^b$	0.7	$\pm 0.0^a$	0.8	$\pm 0.3^b$
22:6n-3	12.5	$\pm 0.6^a$	11.3	$\pm 0.6^b$	10.2	± 0.9
ΣPUFA	46.0	± 0.9	45.7	± 1.8	40.6	± 2.3
ΣUnknown	0.8	± 0.1	0.8	± 0.3	1.1	± 0.3
ΣBranched	1.4	$\pm 0.1^a$	1.3	$\pm 0.1^b$	1.4	$\pm 0.2^b$
ΣDMA	2.5	± 0.4	2.2	± 0.4	1.5	$\pm 0.3^b$
EPA/DHA	1.0	$\pm 0.0^b$	1.1	$\pm 0.1^a$	1.1	$\pm 0.2^a$

Table 5. Sterol composition (mean $\pm$ SD; %; $n = 5$) of *Spondylus crassissquama* digestive gland (DG) in February and August 2016, at both stations (Chocolatero and Datil). Only the sterols accounting for 0.5 % of total sterol in at least one sample are shown. Different letters indicate significant differences (Wilcoxon test, at significant level $\alpha < 0.05$), indicating spatial variations of DG sterol composition in February and August, respectively. Norcholesterol like: Norcholesterol with same carbon configuration; 24-Me.cholesterol: 24-Methylencholesterol; Σ Unknown: sum of unidentified sterols; 24-ME./Brassica: ratio 24-Methylencholesterol / Brassicasterol.

	<i>S. crassissquama</i>			
	February		August	
	Station 1	Station 2	Station 1	Station 2
Norcholesterol.like	2.2 $\pm$ 0.1 ^a	1.4 $\pm$ 0.1 ^b	2.2 $\pm$ 0.3 ^a	1.3 $\pm$ 0.3 ^b
Norcholesterol	8.6 $\pm$ 0.2 ^a	7.6 $\pm$ 0.3 ^b	7.7 $\pm$ 0.7	6.8 $\pm$ 0.6
Cholesterol	34.3 $\pm$ 1.1 ^a	32.1 $\pm$ 0.8 ^b	41.4 $\pm$ 2.9 ^a	34.0 $\pm$ 2.3 ^b
Cholestanol	1.1 $\pm$ 0.3 ^b	1.8 $\pm$ 0.2 ^a	2.4 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.2
Desmosterol	1.4 $\pm$ 1.0	1.3 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.7	0.6 $\pm$ 0.5
Brassicasterol	17.0 $\pm$ 1.1	17.7 $\pm$ 0.6	13.9 $\pm$ 0.8 ^b	17.2 $\pm$ 0.5 ^a
Lathosterol	0.4 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.1 ^b	0.8 $\pm$ 0.1 ^a
Ergosterol	4.0 $\pm$ 0.3	4.4 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 1.2	1.6 $\pm$ 1.5
24-Me.cholesterol	5.8 $\pm$ 0.4	6.0 $\pm$ 0.3	5.4 $\pm$ 0.8	4.8 $\pm$ 0.7
Campesterol	3.0 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 0.1	2.9 $\pm$ 0.2 ^b	3.9 $\pm$ 0.4 ^a
Stigmasterol	3.4 $\pm$ 0.3	3.6 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 0.4 ^b	5.0 $\pm$ 0.9 ^a
β -Sitosterol	5.2 $\pm$ 0.2 ^a	3.9 $\pm$ 0.1 ^b	5.6 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 0.3
Isofucosterol	3.5 $\pm$ 0.7	3.9 $\pm$ 0.4	3.4 $\pm$ 0.7	3.6 $\pm$ 0.5
Σ Unknown	8.3 $\pm$ 0.5 ^b	10.5 $\pm$ 0.9 ^a	6.4 $\pm$ 1.7	8.8 $\pm$ 1.6
24-Me./Brassica	0.3 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.1 ^a	0.3 $\pm$ 0.0 ^b

CHAPITRE 2

L'analyse des isotopes stables, des acides gras et des isotopes sur composés spécifiques permet d'identifier l'origine des particules assimilées par un bivalve dans une lagune côtière

Margaux Mathieu-Resuge, Gauthier Schaal, Edouard Kraffe, Rudolph Corvaisier, Oanez Lebeau, Salvador E. Lluch-Cota, Rosa L. Salgado García, Martin J. Kainz, Fabienne Le Grand

Ce chapitre fait l'objet d'un article soumis dans Marine Biology.

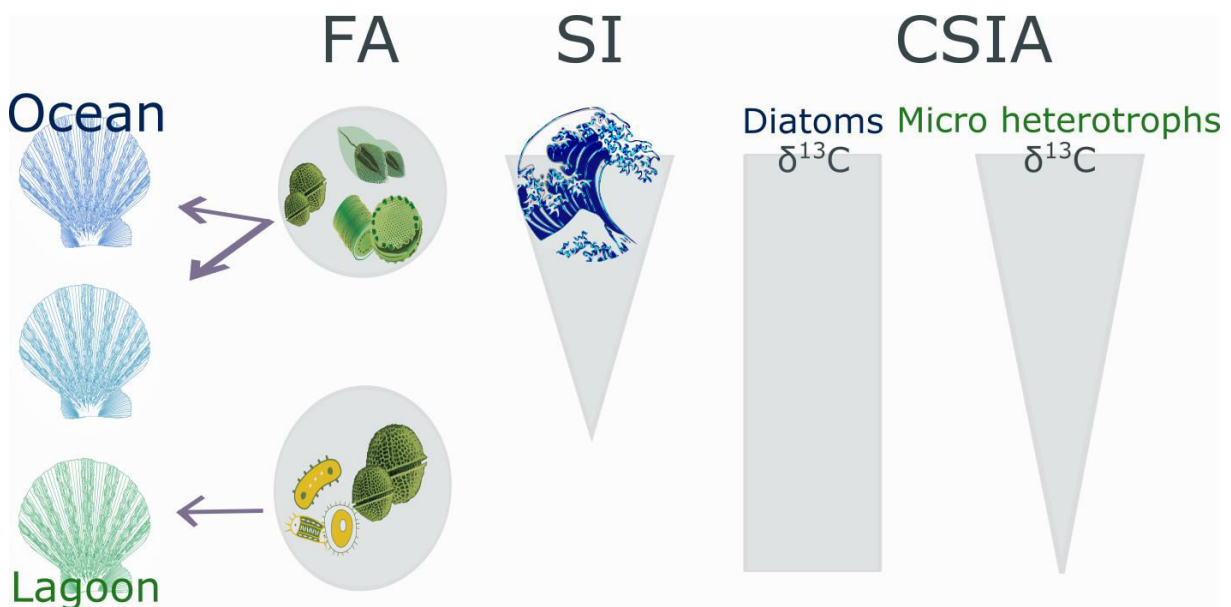
1. Résumé

Les résultats du chapitre précédent indiquent un changement saisonnier de régime alimentaire chez l'espèce de bivalve, qui semble être influencé par les entrées océaniques et le renouvellement des assemblages phytoplanctoniques. L'impact de ces apports océaniques est visible en fonction de la période de l'année durant laquelle les bivalves ont été prélevés, mais aussi en fonction de leur distance par rapport à l'entrée de la lagune. A la station la plus interne, la contribution des flagellés hétérotrophes a été mise en évidence. Cependant, l'origine des nutriments soutenant le réseau trophique microbien n'a pas pu être déterminée par l'étude des isotopes stables (IS) et des acides gras (AG) ou des stérols. Afin de déterminer l'origine des différentes composantes du régime alimentaire des bivalves dans cette lagune l'analyse isotopique sur composés spécifiques (ici acides gras ; CSIA) a été réalisée. En effet, l'analyse isotopique d'un AG spécifique d'une source permet d'identifier l'origine de cette source (benthique ou pélagique, océanique ou lagunaire), en s'affranchissant des limitations inhérentes à l'analyse isotopique « traditionnelle » (Budge, Wooller, Springer, Iverson, McRoy & Divoky 2008; Braeckman, Provoost, Sabbe, Soetaert, Middelburg, Vincx & Vanaverbeke 2012).

Ce chapitre a pour objectif d'identifier la nature et l'origine des éléments nutritifs dans le régime alimentaire de *Spondylus crassisquama* via une approche multi traceurs et multi tissus. L'échantillonnage a été réalisé à trois stations plus ou moins éloignées de l'embouchure de la lagune, comprenant une station externe à la lagune, une station située à proximité de l'embouchure et une station plus interne, il faut noter que les deux stations les plus extrêmes représentent la limite de distribution de cette espèce dans la lagune. L'analyse des IS a été effectuée dans le muscle, alors que la glande digestive a servi à la détermination de la composition des lipides de réserve et aux CSIA sur AG. Leurs potentielles sources de nourriture (MOP = Matière Organique Particulaire, MOS = Matière Organique Sédimentaire, et les détritiques de zostères) ont aussi été analysées. Les rapports isotopiques du carbone ($\delta^{13}\text{C}$) de six AG biomarqueurs de diatomées, de dinoflagellés et de micro-hétérotrophes ont été spécifiquement étudiés.

Les IS ne démontrent aucune variation du $\delta^{13}\text{C}$ dans le muscle le long du transect. En revanche, des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ plus élevées distinguent les stations les plus proches de l'embouchure de celle interne à la lagune. Le fait que la station à l'extérieur de la lagune et celle à l'embouchure

aient les mêmes compositions isotopiques semble confirmer l'hypothèse des entrées océaniques émise dans le premier chapitre. Cependant, ces entrées océaniques ne semblent pas avoir une influence majoritaire dans toute la lagune, puisque la station la plus interne n'est pas influencée par ces enrichissements. Les compositions en AG soulignent les mêmes différences spatiales, avec les stations externes systématiquement différentes de la station la plus interne. Le régime alimentaire des bivalves se différencie spatialement, avec une forte abondance de biomarqueurs de diatomées (16:1n-7 et 20:5n-3) et de dinoflagellés (22:6n-3) à l'entrée de la lagune, qui s'opposent aux biomarqueurs de micro hétérotrophes d'avantage retrouvés à la station en fond de lagune (18:1n-9, 18:1n-3, et 18:4n-3). L'analyse des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ d'AG spécifiques révèle quant à elle une uniformité dans l'origine des diatomées aux trois stations. A l'inverse, les micro-hétérotrophes et les dinoflagellés semblent avoir des origines distinctes le long du transect. En s'appuyant sur les résultats des IS et des AG, les diatomées semblent avoir une origine océanique dans l'ensemble de la lagune, alors que la proportion du régime alimentaire basé sur la reminéralisation de matière organique semble être interne à la lagune. Les trois approches utilisées dans cette étude sont apparues très complémentaires, leur utilisation conjointe semble nécessaire pour améliorer la compréhension du fonctionnement trophique de la lagune et l'identification des phénomènes saisonniers. En revanche, des questions persistent concernant l'origine des nutriments soutenant la chaîne trophique basée sur l'activité microbienne à l'intérieur de la lagune.



2. Article n°2

Different particle sources in a bivalve species of a coastal lagoon: evidence from stable isotopes, fatty acids, and compound-specific stable isotopes

Margaux Mathieu-Resuge^{1*}, Gauthier Schaal¹, Edouard Kraffe¹, Rudolph Corvaisier¹, Oanez Lebeau², Salvador E. Lluch-Cota³, Rosa L. Salgado García³, Martin J. Kainz⁴, Fabienne Le Grand¹

1: Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, IUEM, F-29280, Plouzané, France

2: Univ Brest, CNRS, UMS3113, IUEM, F-29280, Plouzané, France

3: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, BCS, Mexico

4: WasserCluster Lunz — Inter-University Centre for Aquatic Ecosystem Research, Dr. Carl Kupelwieser Promenade 5 A-3293 Lunz am See, Austria

Abstract

The trophic fate of various food sources is of central interest for ecologists, yet not well understood in coastal lagoon food webs. In this field study, fatty acids (FA), stable isotopes (SI), and compound-specific isotopic analysis (CSIA) on FA were used to investigate how diets from oceanic and local sources are retained in a bivalve species (*Spondylus crassisquama*) along a transect in the Ojo de Liebre lagoon (BCS, Mexico). SI and FA indicated the contribution of oceanic phytoplankton at the entrance of the lagoon, through ^{15}N enrichment, and higher proportions of 16:1n-7 and 20:5n-3 in digestive glands. In the inner bay, higher abundance of ^{18}C FA (18:1n-9, 18:3n-3, 18:4n-3) suggested a higher contribution of microheterotrophs, including (dino)flagellates and ciliates, to the diet of this bivalve derived from local production. Significant spatial differences for the $\delta^{13}\text{C}$ of FA highlighted changes in the origin of food sources. Indeed, a ^{13}C depletion was observed in the $\delta^{13}\text{C}$ of microheterotroph biomarkers in individuals from the innermost station, revealing that their origin in the diet of bivalves differs within the lagoon, highlighting the importance of local processes (sediment resuspension, remineralization) in the trophic functioning of the lagoon. $\delta^{13}\text{C}$ values of FA considered as diatoms biomarkers (16:1n-7 and 20:5n-3) were consistent, which suggests that diatoms assimilated have almost the same origin throughout the lagoon. The complementary of the tracers used here allowed a better understanding of the trophic functioning of this coastal lagoon submitted to oceanic influences.

Keywords: Compound-specific isotope analysis – Fatty acids – Stable isotopes – Trophic biomarkers – Coastal lagoon – Oceanic inputs – Bivalves

Introduction

Coastal lagoons are complex and productive ecosystems, and their primary production is supported by a highly diverse origin of nutrients (Nixon 1982). At the interface between land and ocean, lagoons are characterized by shallow water and a large diversity of potential food sources, including continental inputs, salt marsh, seagrass, macroalgae, and phytoplankton, and resulting in marked spatial patterns in food web interactions (Carlier, Riera, Amouroux, Bodiou, Desmalades & Grémare 2008; Clavier *et al.* 2014). In coastal lagoons, benthic assemblages are largely dominated by suspension-feeding bivalves (Bachelet, De Montaudouin, Auby & Labourg 2000). Because these organisms are sedentary primary consumers, they are good indicators of processes occurring at the base of the food web (Marchais *et al.* 2013). Therefore, studying the nature and the origin of food sources involved in their diet provides a spatially and temporally integrated overview of organic matter transfer between benthic and pelagic systems, and across ecosystem boundaries (i.e., between lagoons and the nearby coastal ocean).

The trophic ecology of suspension-feeding invertebrates inhabiting coastal environments has been extensively investigated over the last 20 years using indirect biomarker-based approaches. Among the most common, the analysis of bulk carbon and nitrogen stable isotopes (SI) has provided valuable insights into the origin and nature of bivalve food sources (Riera 2007; Marchais *et al.* 2013). Because primary producers typically display contrasted SI composition according to their benthic vs pelagic (France 1995) or freshwater vs marine (Riera & Richard 1996) origin, and because the SI composition of consumers reflect their source, this approach is currently the most popular to address trophic ecology issues in a variety of environments (Fry 1988; Layman, Araujo, Boucek, Hammerschlag-Peyer, Harrison, Jud, Matich, Rosenblatt, Vaudo & Yeager 2012). However, to be efficient, this method requires primary producers displaying contrasted SI composition. Although different species of planktonic microalgae can vary in their SI values (Falkowski 1991; Vuorio, Meili & Sarvala 2006), it is generally difficult to differentiate between potential diet sources that share the same habitat (Kharlamenko *et al.* 2001). Therefore, it remains a challenge for bulk SI ecology to assess the dietary contribution of different primary producers to consumers.

The analysis of fatty acids (FA) is a powerful and complementary approach, which is based on the assumption that most animals have limited ability to biosynthesize polyunsaturated FA

(PUFA) or FA of bacterial origin *de novo* (Budge, Iverson & Koopman 2006), and thus the FA composition of a consumer resembles that of its food source (Dalsgaard *et al.* 2003). Among the different FA synthesized by primary producers, some of them are considered as trophic biomarkers because they characterize specific food sources; for example, palmitoleic acid (16:1n-7) and eicosapentaenoic acid (20:5n-3) are used as biomarkers of diatoms, and steridonic acid (18:4n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3) are abundant in (dino)flagellates (Parrish *et al.* 2000; Kharlamenko *et al.* 2001; Alfaro *et al.* 2006). Therefore, it is possible to assess the contribution of specific taxonomic groups (e.g. diatoms, dinoflagellates, marine plants) in the diet of primary consumers (Kelly & Scheibling 2012a), paying attention when analyzing bivalve tissues presenting different turnover rates resulting in diverse integrating dietary information over time (e.g. digestive gland (DG) having fast turnover rate vs muscle with long turnover) (Lorrain *et al.* 2002; Dalsgaard *et al.* 2003; Nerot *et al.* 2015). Because SI can be useful in assessing food sources, in particular when using stable C and N isotopes in combination (Lorrain *et al.* 2002; Schaal, Nerot, Grall, Chouvelon, Lorrain, Mortillaro, Savoye, Brind'Amour, Paulet & Le Bris 2016) and FA can differentiate between algal, bacterial or even terrestrial sources (Kainz, Lucotte & Parrish 2002), these two approaches have been successfully used in combination to unravel trophodynamic trajectories in a variety of coastal environments (Alfaro *et al.* 2006; Jaschinski, Brepohl & Sommer 2008; Allan, Ambrose, Richoux & Froneman 2010). However, the combined use of SI and FA is based on the assumption that specific SI value or FA molecule have only one origin, which is quite unlikely in complex ecosystems. For instance, it would be impossible to characterize the precise origin (i.e. oceanic or coastal) of the diet of a suspension feeder assimilating planktonic dinoflagellates and benthic diatoms using only bulk SI and FA approaches.

Compound-specific isotope analysis (CSIA) represents an ecologically complementary alternative, where characterizing the SI composition of source-specific compounds can allow to unravel their origin. For example, CSIA has been successfully used in trophic ecology to highlight the contribution of ice algae to the diet of bivalves (Gaillard, Meziane, Tremblay, Archambault, Blicher, Chauvaud, Rysgaard & Olivier 2017), or dietary shifts in benthic invertebrates at the vicinity of finfish farming (Colombo, Parrish & Whitticar 2016).

The Ojo de Liebre lagoon (Baja California Sur, Mexico), is a 446 km² lagoon situated on the Pacific coast of Baja California hosting one of the most important bivalve fishery (in particular *Spondylus crassiquama*; Lamarck 1819) of western Mexico. This lagoon relies on a wide

diversity of local (autochthonous) and allochthonous sources, such as oceanic phytoplankton supplied to the lagoon by tide current, local phytoplankton or resuspended benthic sources, including eelgrass (*Zostera marina*) detritus.

In this context, the aim of this study was to apply three trophic biomarker-based approaches to examine spatial patterns of organic matter sources and their biochemical composition assimilated by *S. crassisquama*. We tested the hypothesis that lower oceanic phytoplankton availability in the inner part of the lagoon, which is less connected to the ocean, would result in higher reliance on local food sources. It was thus expected that SI, FA, and CSIA values in consumers located close the ocean resembled to ocean values, testing the effect of spatial diet proximity to the ocean and how far its impact is perceived inside the lagoon; whereas consumers furthest away from the ocean were isotopically and in their FA composition closer to the autochthonous diet sources highlighting the effect of local diet incorporation.

Material and methods

Sampling

The Ojo de Liebre lagoon was sampled in June 2017 at three stations along a transect (Fig. 1); Station 1: located 3.5 km outside the bay; Station 2: at 6.1 km from the mouth, inside the lagoon; and Station 3: 15.5 km inside the lagoon. Sampling depths ranged from 7 to 10 m. Stations 1 and 3 corresponded to the most outer and inner sites, respectively, where the

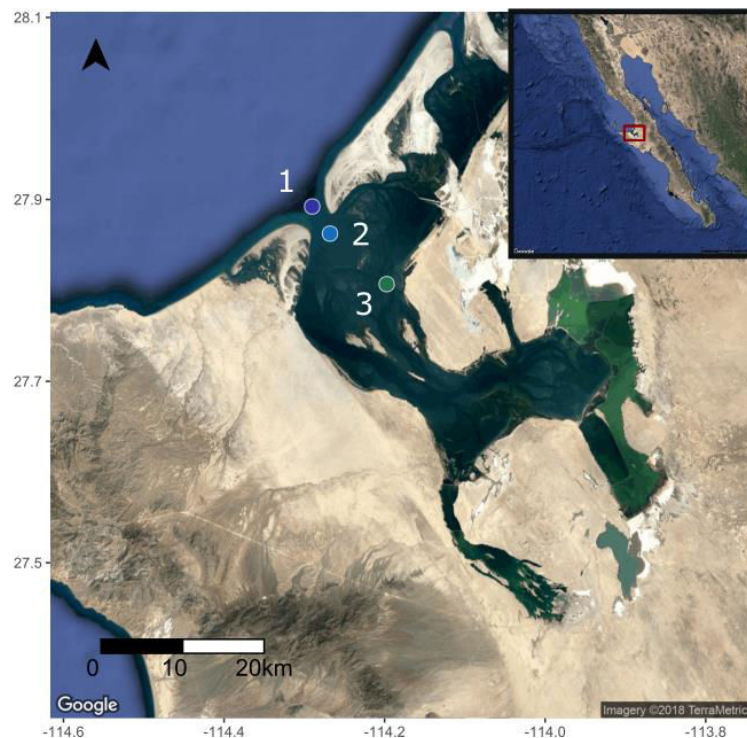


Figure 21. Location of the 3 sampling stations in the Ojo de Liebre lagoon (Baja California Sur, Mexico). Station 1 is located at 3.5 km outside the bay. Station 2 and 3 are located inside the lagoon, respectively at 6.1 km and 15.5 km from the mouth of the lagoon.

target species, *S. crasssquama*, could be found. At each station, 10 individuals of *S. crasssquama* of similar size (~12 cm of length), and potential food sources (particulate organic matter; POM, and, sediment-water interface organic matter; SOM) were collected by scuba divers. *Zostera marina* fragments, at two different degradation stages (later called fresh and detrital), were also collected from the shore at the eastern part of the sampling area. Bivalves were placed in cooler boxes with water from sampling sites at ambient temperature, while collected surface water and sediment cores and eelgrass detritus were protected from light using black plastic bags until transportation (within 3 hours) to the lab facilities at the

Northwestern Center for Biological Research (CIBNOR, Guerrero Negro, BCS). Once in the laboratory, bivalve DG and adductor muscles were dissected, packed and stored in liquid nitrogen.

Food sources (POM, SOM, and eelgrass fragments) were prepared for analysis by the following methods; a) sediment-water interface were soaked in filtered sea water (GF/F 0.7 μm), and allowed to settle. The supernatant containing fine organic particles (SOM), potentially affected by resuspension events and therefore available to benthic suspension-feeders, was filtered on pre-combusted (6 h, 450°C) GF/F filters. Four subsamples of SOM (two for SI, and two for FA analyses) were prepared for each sampling station, packed and frozen in liquid nitrogen; b) particles from surface water were filtered on pre-combusted (6 h, 450°C) GF/F filters until clogging. Immediately after filtration, filters subsamples of POM ($n = 2$ for SI, and $n = 2$ for FA analyses) were packed and frozen in liquid nitrogen immediately after filtration, and; c) large epiphytes were first removed from eelgrass fragments, which were then packed and stored in liquid nitrogen. Once at the main laboratory (CIBNOR, La Paz), all samples were stored at -80°C until further analysis.

Stable isotopes analysis

Muscles and eelgrass samples were freeze-dried (24 h) and homogenized using a ball mill. Because bivalve muscles are generally poor in lipids, lipids were not removed from muscle tissues prior to SI analysis (Lorrain *et al.* 2002). Indeed, the measured C:N ratios did not exceed 3.5, rendering lipid removal unnecessary for SI analysis (Post *et al.* 2007). Muscle tissues (~25 mg dry weight) and particles of SOM and POM (scraped off from the freeze-dried filters; ~1.5 mg dry weight) were packed in tin capsules (8x5 mm) for subsequent bulk SI analysis.

All samples were analyzed by continuous flow on a Flash EA 2000 IRMS elemental analyzer coupled to a isotope ratio mass spectrometer (IRMS; Thermo Fisher Scientific Delta V Plus). Isotopic calibration was done using international standards (IAEA-600 Caffeine, IAEA-CH-6 Sucrose and IAEA-N-2 Ammonium Sulphate). The standard deviation calculated with the acetanilide working standard (Thermo Scientific), repeatedly measured after 7 samples, was $\pm 0.1 \text{ ‰}$ ($n = 19$) for both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. Results were expressed in delta (δ) units with respect to international standards (Vienna Pee Dee Belemnite for $\delta^{13}\text{C}$ and atmospheric nitrogen for

$\delta^{15}\text{N}$), following the equation: $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N} = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}})-1] \times 10^{-3}$ (expressed in ‰), where R is $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ or $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

Fatty acid analysis

Lipid extraction

Total lipids of freeze-dried and homogenized bivalve DG and eelgrass fragments (between 0.2 and 0.4 g), and POM and SOM filter samples were extracted using chloroform/methanol (6mL; 2:1; v/v) applying a modified Folch et al. (1957) method. Samples were then sonicated at 4°C during 5 min, to ensure complete extraction of lipids. Until further analysis, all lipid extracts were stored at -20°C under nitrogen atmosphere to avoid oxidation.

Separation of neutral lipids

DG lipids were separated into neutral and polar lipids (the latter was not analyzed in the present study) following the method described elsewhere (Le Grand *et al.* 2014). In brief, an aliquot (1/6) of the total lipid extract was evaporated under nitrogen, recovered with 3 washes using chloroform/methanol (0.5 mL; 98:2; v/v) and spotted at the top of a silica gel column (40 mm x 4 mm, silica gel 60A 63-200 μm rehydrated with 6% H_2O ; 70-230 mesh). Neutral lipids (NL) were eluted using chloroform/methanol (10 mL; 98:2; v/v) and collected in glass vials containing an internal standard (2.3 μg of tricosanoic acid; C23:0). Lipid fractions were then stored at -20°C until further analyses.

Fatty acid analysis by gas chromatography

The NL fraction of DG as well as aliquots of POM, SOM and eelgrass total lipid extracts were evaporated to dryness under nitrogen. Fatty acids methyl esters (FAME) were obtained by an acidic transesterification following a modified method by (Le Grand *et al.* 2014). In brief, transesterification was performed by the addition of 0.8 mL of a H_2SO_4 /methanol mixture (3.4 %; v/v) to the dried extracts containing NL and heated at 100°C for 10 min. After cooling, hexane (0.8 mL) and distilled water saturated in hexane (1.5 mL) were added. Vials were then homogenized and centrifuged (at 738 g for 1 min at 20°C). Only the organic phase—containing FAME was kept and washed two more times with distilled water saturated in hexane (1.5 mL). At each step, the aqueous phase was discarded.

Analyses of FAME were conducted on a Varian CP8400 gas chromatograph (GC). FAME were injected and separated simultaneously on two columns with two different phase polarities: one polar (ZBWAX: 30 m x 0.25 mm ID x 0.2 μm , Phenomenex) and another apolar column

(ZB5HT: 30 m x 0.25 mm ID x 0.2 μm , Phenomenex). The GC runs followed these temperature programs: the GC oven temperature was raised to 150°C at 50°C min⁻¹, then to 170°C at 3.5°C min⁻¹, to 185°C at 1.5°C min⁻¹, to 225°C at 2.4°C min⁻¹, and finally to 250°C at 5.5°C min⁻¹ and maintained for 15 min) and equipped of two splitless injectors regulated at 220°C, and two flame-ionization detectors (280°C), using hydrogen as vector gas. FAME were then identified by comparisons of their retention times with those of commercial standards from Sigma (Supelco 37 Component FAME Mix, the PUFA No.1 and No.3, and the Bacterial Acid Methyl Ester Mix) and an in-house standard mix from marine bivalves and microalgae. The FA content (%) was expressed as the mass percentage of the total FA content.

Compound specific on Fatty acid analysis

Five bivalve samples previously analyzed for FA composition were randomly selected for compound-specific isotopic analysis. FAME were separated using a GC (Thermo Fisher Scientific GC ISOLINK TRACE ULTRA), the same apolar phase (Agilent DB5) and the same analytical program as for GC-FID analysis (see above). Each of the FA was converted into CO₂ by combustion in the ISOLINK furnace and transferred to the CONFLO IV interface and then introduced to the IRMS (Delta V Plus; Thermo Fisher Scientific). FAME were identified by comparison of their retention time with those of commercial standards and in-house standard mixtures as described above. 18:1n-9 and 18:3n-3 did coelute on the apolar column used in GC-C-IRMS analysis, and were therefore analyzed simultaneously. Fatty acids kept for $\delta^{13}\text{C}$ analyses were selected based on their abundance and detection in CSIA (i.e., with amplitudes > 800 mV).

Calibration of $\delta^{13}\text{C}$ values

The $\delta^{13}\text{C}$ values were calibrated using the F8-3 standard mixture of eight acid ethyl and methyl esters (14:0, 16:0, 18:0, and 20:0, with $\delta^{13}\text{C}$ values ranging from -26.98±0.02‰ to -30.38±0.02‰) supplied by Indiana University Stable Isotope Reference Materials, inserted before and after every 3 analytical replicates of each sample.

Correction of the contribution of carbon from transesterification

FAME analyzed here differed from the initial FA present in source material because of the addition of a methyl group derived from the methanol used in the transesterification reaction. To correct the contribution of the carbon from this additional methyl group, several free FA

(14:0, 16:0, 16:1n-7, 17:0, 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3, 18:3n-6, 20:0, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:0, 23:0, and 24:0; Sigma), were trans-esterified with the same methanol as the one used for samples. Prior to trans-esterification, the $\delta^{13}\text{C}$ values of each of those free FA were determined by using continuous flow on a Flash EA2000 elemental analyzer coupled to a Delta V Plus mass spectrometer (Thermo Fisher scientific). After trans-esterification of free FA, the $\delta^{13}\text{C}$ values of the resulting FAME were measured using the GC-C-IRMS system. Then, an average correction was calculated using the following equation: $\delta^{13}\text{C}_{\text{Methanol}} = -n * \delta^{13}\text{C}_{\text{FA}} + (n + 1) * \delta^{13}\text{C}_{\text{FAME}}$, where n is the number of carbon atoms in the free FA (Abrajano, Murphy, Fang, Comet & Brooks 1994). We were then able to calculate an average $\delta^{13}\text{C}$ value (-39.6‰) for the methyl-derived carbon based on the difference between the $\delta^{13}\text{C}$ values of the corresponding free FA and their respective FAME and we used this value to correct our FAME $\delta^{13}\text{C}$ by rearranging the above equation. Further studies found no kinetic isotope effect associated to trans-esterification (Budge *et al.* 2008; Graham, Oxtoby, Wang, Budge & Wooller 2014), thus we did not consider this aspect for $\delta^{13}\text{C}$ analysis.

Analytical error

The analytical error (consisting of the SD of 10 analyses of the C16:0 FA laboratory standard interspersed during the samples run) was 0.2 ‰. We therefore conservatively estimated our analytical precision to be $\leq 0.2\text{‰}$.

Statistical Analysis

Normality (Shapiro-Wilks test) and homoscedasticity (Bartlett-test) were tested prior to parametric or non-parametric tests. Parametric tests were applied when conditions of normally distributed data and homoscedasticity were satisfied, otherwise non-parametric tests with Bonferroni's adjustment method were performed. SI variations of bivalves muscles were compared among stations by Kruskal-Wallis (KW) tests followed by Conover-Iman multiple comparisons. Only the FA $>0.5\%$ of total FA were considered to compare the dissimilarity among stations, by a permutational variance analyses (PERMANOVA). Subsequently, a test of similarity percentages analyses (SIMPER) was carried out to assess the most discriminant FA responsible of the difference among stations ($>80\%$). Each FA accounting for $>80\%$ of dissimilarity among stations, and presenting an abundance permitting its detection in CSIA in all DG samples, was taking into account. For that, one way analysis of

variance (ANOVA) followed by Tukey's HSD, or KW tests followed by Conover-Iman multiple comparison were carried out to compare the difference of their percentage of neutral lipids, and their respective $\delta^{13}\text{C}$ values, between the individuals from the three stations. All statistical analyses and graphics were performed with the free software R (Core Team 2017), with R Version 3.4.1 (2017 06 30).

Results

Stable isotopes analyses

We observed no significant differences of bulk $\delta^{13}\text{C}$ values in bivalve muscles between the different stations (KW test, p-value > 0.05; df = 2; $\chi^2 = 2.12$). In contrast, a significant $\delta^{15}\text{N}$ difference was observed (KW test, p-value < 0.001; df = 2; $\chi^2 = 17.71$) (Figure 22). Individuals from stations 1 and 2 displayed similar $\delta^{15}\text{N}$ (8.3‰ and 8.5‰, respectively) (Figure 22), while station 3 was ^{15}N depleted (7.2‰). For logistical reasons, only two replicates of POM and SOM could be sampled per site, which could not allow to statistically compare the results for these potential food sources. However, POM displayed the same pattern as observed for bivalve muscles, with stations 1 and 2 being ^{15}N enriched compared to station 3 (from 6.5‰ and 6.9‰ for stations 1 and 2 respectively, to 4‰ at station 3) (Figure 22). The POM $\delta^{13}\text{C}$ value sampled outside the lagoon (-22.8‰) was slightly lower than at stations 2 and 3 (-21.1‰ and -20.9‰, respectively). SOM displayed quite a different spatial pattern than the one observed for POM, with station 1 being ^{15}N enriched and ^{13}C depleted ($\delta^{15}\text{N} = 7.3$ ‰, $\delta^{13}\text{C} = -14.5$ ‰) compared to the two inner stations 2 and 3 ($\delta^{15}\text{N} = 5.2$ ‰ and 4.6‰, $\delta^{13}\text{C} = -10.2$ ‰ and -13‰, respectively). Both samples of *Z. marina* were ^{13}C enriched (-10.0‰ for fresh eelgrass and -11.2‰ for

detrital eelgrass) compared to other samples. Fresh eelgrass displayed higher $\delta^{15}\text{N}$ than detrital eelgrass (5.6‰ and 1.8‰, respectively) (Figure 22).

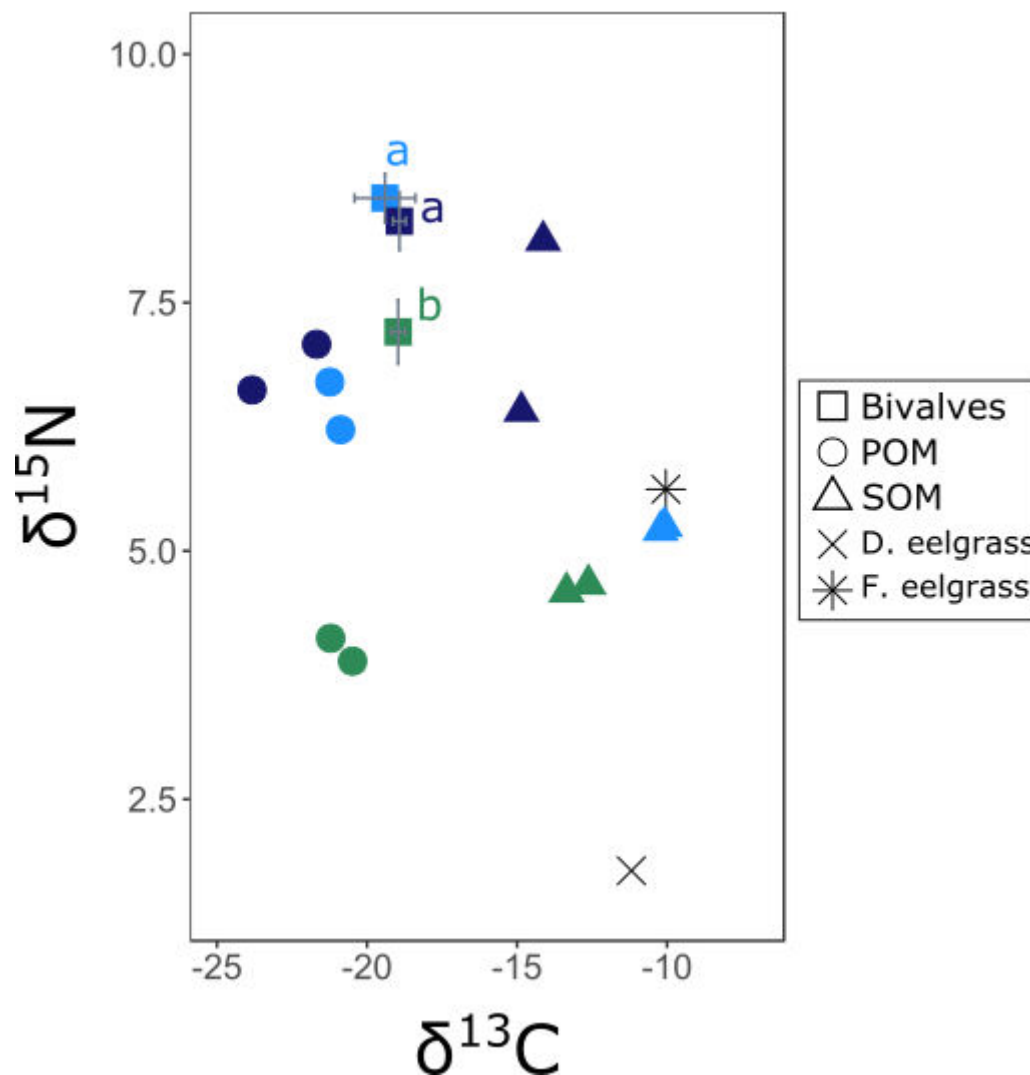


Figure 22. Stable Isotope (SI) bi-plot ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, mean values $\pm$ SD when $n > 2$) of the abductor muscles of *Spondylus crassiquama* and of its potential food sources, in June 2017, at the 3 sampled stations. Samples from station 1 are shown in dark blue, 2 in light blue, and 3 in green. Bivalves are represented by squares, POM by circles, SOM by triangles, and eelgrass by crosses (* fresh; x detrital)

Fatty acids analyses

The FA composition of neutral lipids of DG varied significantly among stations (PERMANOVA, p -value < 0.001 , $df = 2$, $F = 48.76$, $R^2 = 0.82$). Individuals from stations 1 and 2, the closest to the mouth of the bay, were characterized by higher proportions of 14:0, 16:1n-7 and the PUFA 20:5n-3 and 20:4n-6 than individuals from station 3 (ANOVA or KW tests followed by post-hoc; Table 6). The PUFA 22:6n-3 was slightly more abundant in individuals from station 1

(12.1%) than in those from station 2 (11.4%) and station 3 (10.5%) (Table 6). The DG of individuals from the most inner station in the lagoon (station 3) had significantly higher proportions of C18-FA (18:0, 18:1n-9, 18:3n-3, and 18:4n-3) and C16-FA (ANOVA or KW tests followed by post-hoc; Table 6).

Some fatty acids in POM samples presented the same spatial variations than in bivalve DG, in particular 16:1n-7 which presented higher proportions at the external station (Table 6), and 18:4n-3 which showed higher values at the inner station (Table 6). However, compared to bivalve DG, the PUFA 18:4n-3 and 20:5n-3 in POM were similar along the sampled transect (Table 6), and the 18:1n-9 content was lower at station 2 and 3 (3% and 2.8%, respectively) compared to station 1 (5.2%) (Table 6).

Table 6. Neutral lipid fatty acid (FA) composition (mean $\pm$ SD; mass % of total FA; $n = 10$) and Compound Specific Isotopic analysis (CSIA) of neutral lipid FA (mean $\pm$ SD; $\delta^{13}\text{C}$ ‰; $n = 5$) of *Spondylus crassisquama* digestive gland in June 2017, for the 3 stations (1, 2, and 3). Only the FA accounting for more than 80 % of dissimilarity between stations (SIMPER test) and presenting the greatest abundance permitting their good detection in CSIA are shown. Different letters indicate significant difference between the stations (ANOVA or KW tests followed by multiple comparison tests, at the significant level $\alpha < 0.05$). *In CSIA, 18:1n-9 and 18:1n-3 are coeluted and $\delta^{13}\text{C}$ value is presented in the same line.

	Neutral fatty Acids (%)			Compound Specific Isotopic Analysis (‰)		
	Station 1	Station 2	Station 3	Station 1	Station 2	Station 3
14:0	5.8 $\pm$ 0.6 A	6.1 $\pm$ 0.5 A	4.2 $\pm$ 0.3 B	-28.2 $\pm$ 0.2 a	-28.3 $\pm$ 0.2 a	-29.7 $\pm$ 0.3 b
16:0	21.6 $\pm$ 0.4 B	21.9 $\pm$ 0.9 B	23.9 $\pm$ 0.9 A	-27.5 $\pm$ 0.3 a	-27.1 $\pm$ 0.1 a	-29.9 $\pm$ 0.6 b
18:0	4.1 $\pm$ 0.5 B	3.9 $\pm$ 0.4 B	5.6 $\pm$ 0.5 A	-26.8 $\pm$ 0.3 a	-26.4 $\pm$ 0.2 a	-28.3 $\pm$ 0.4 b
16:1n-7	10.1 $\pm$ 0.8 A	10.5 $\pm$ 0.8 A	5.0 $\pm$ 0.2 B	-27.0 $\pm$ 0.2 b	-26.6 $\pm$ 0.1 b	-25.9 $\pm$ 0.4 a
18:1n-7	2.8 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.1	-27.5 $\pm$ 0.5	-27.2 $\pm$ 0.6	-27.8 $\pm$ 0.4
18:1n-9*	3.4 $\pm$ 0.1 B	3.3 $\pm$ 0.3 B	4.8 $\pm$ 0.4 A	-29.7 $\pm$ 0.3 a	-29.1 $\pm$ 0.2 b	-31.0 $\pm$ 0.2 c
18:3n-3*	3.4 $\pm$ 0.1 B	3.3 $\pm$ 0.1 B	5.3 $\pm$ 0.2 A			
18:4n-3	5.1 $\pm$ 0.4 B	5.4 $\pm$ 0.5 B	6.6 $\pm$ 0.4 A	-29.2 $\pm$ 0.9 a	-29.2 $\pm$ 0.6 a	-31.5 $\pm$ 1.1 b
20:4n-6	1.7 $\pm$ 0.1 A	1.6 $\pm$ 0.1 A	1.0 $\pm$ 0.1 B	-26.7 $\pm$ 0.4	-26.8 $\pm$ 0.6	-26.3 $\pm$ 1.5
20:5n-3	12.0 $\pm$ 0.3 A	11.4 $\pm$ 0.8 A	8.6 $\pm$ 1.2 B	-27.1 $\pm$ 0.3 ab	-26.9 $\pm$ 0.4 a	-27.6 $\pm$ 0.5 b
22:6n-3	12.1 $\pm$ 1.0 A	11.4 $\pm$ 0.8 AB	10.5 $\pm$ 0.9 B	-26.1 $\pm$ 0.2 a	-25.7 $\pm$ 0.4 a	-27.5 $\pm$ 0.8 b

Compound specific isotopic analyses

The $\delta^{13}\text{C}$ values of almost all selected FA of bivalve DG differed significantly among stations (ANOVA or KW tests followed by post-hoc; Table 6), with station 3 being different from stations 1 and 2, except for 20:4n-6, 20:5n-3 and 18:1n-7 (Table 6, Figure 23). However, even if the differences among stations were significant for most FA, the range of variation did not exceed 1‰ for some FA, such as 16:1n-7 (from -27‰ at the external station, to -25.9‰ at the inner station; Table 6), and 20:5n-3 at station 2 (-26.9‰) differing significantly from station 3 (-27.6‰; Table 6 and Figure 23). The variability of $\delta^{13}\text{C}$ values 18:1n-9+18:3n-3 of DG was 1.9‰ (Figure 23), ranging from -29.7‰ (station 1) to -29.1‰ (station 2), and finally to -31.0‰ (station 3; Table 6). The $\delta^{13}\text{C}$ 18:4n-3 of DG displayed the highest range of variability (2.3‰) (Figure 23), presenting $\delta^{13}\text{C}$ values from -29.2‰ at stations 1 and 2, to -31.5‰ at station 3 (Table 6). Finally, the $\delta^{13}\text{C}$ 22:6n-3 variability of DG among the stations was 1.8‰ (Figure 23) with higher $\delta^{13}\text{C}$ values at the external stations 1 and 2 (-26.1‰ and -26.9‰, respectively) to lower $\delta^{13}\text{C}$ values at the inner station 3 (-27.5‰) (Table 6). For FA with 18C

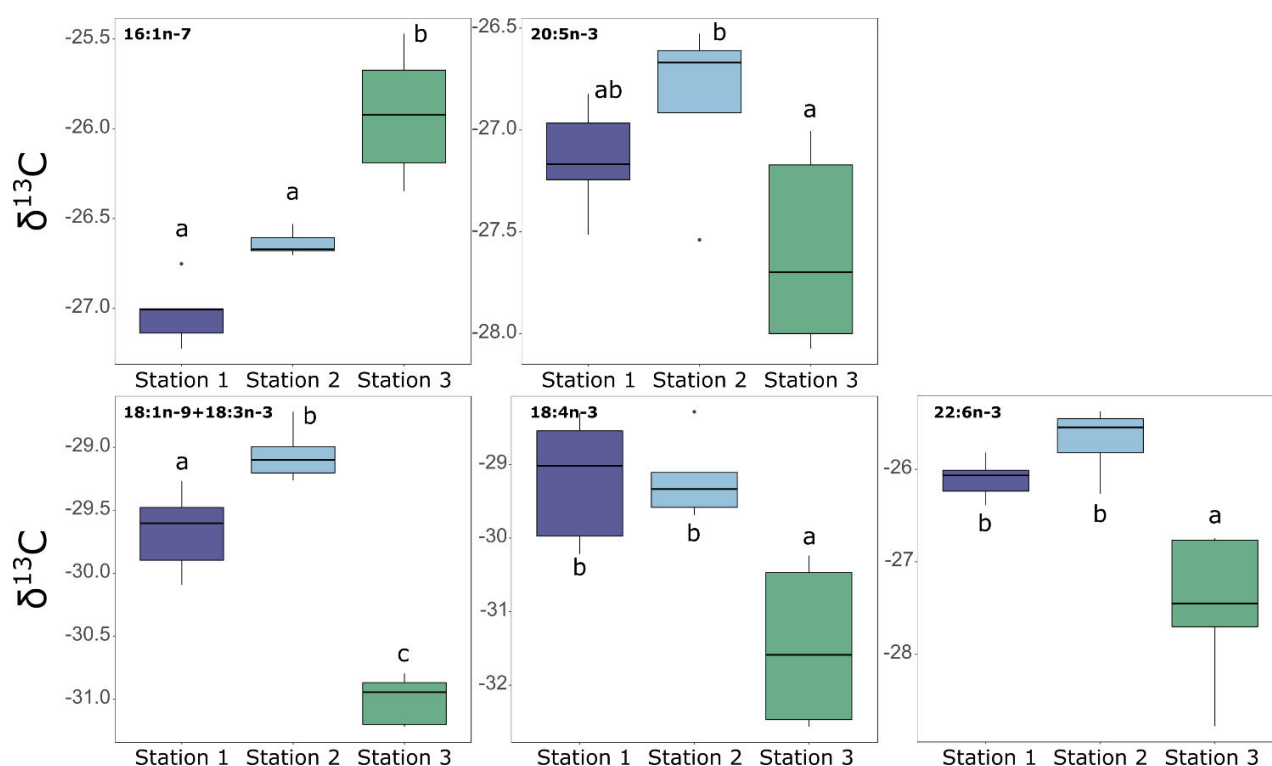


Figure 23. Box plot of $\delta^{13}\text{C}$ values (‰) of some selected neutral lipid fatty acid (FA) of *Spondylus crassisquama* digestive gland in June 2017 at each stations (1, 2, and 3). Only the FA accounting for more than 80 % of dissimilarity between stations, presented the greatest abundance permitting their good detection in CSIA, and present in all samples are shown. Different letters indicate significant difference between the stations (ANOVA or KW tests followed by multiple comparison tests, at the significant level $\alpha < 0.05$). Samples from station 1 are shown in dark blue, 2 in light blue, and 3 in green.

(18:1n-9, 18:3n-3, 18:4n-3) and 22:6n-3 of bivalve DG, samples from station 3 were always more depleted in ^{13}C compared to other stations (Figure 23).

The same trends in isotopic variability of FA were found in POM samples than in bivalve DG, with 18C and 22:6n-3 always more depleted in ^{13}C with increasing distance from the mouth of the lagoon (Table 7). For example, the $\delta^{13}\text{C}$ values of 18:4n-3 were similar at station 1 (-31.6‰) and 2 (-31.4‰) and more depleted at station 3 (-32.3‰; Table 7), and the 22:6n-3 showed $\delta^{13}\text{C}$ depleted values along the transect (from -25.6‰ and -27.5‰ at stations 1 and 2 to -34.9‰ at station 3; Table 7). Like in DG samples, both FA, 16:1n-7 and 20:5n-3 were ^{13}C enriched at the internal station (Table 7) in POM samples. Indeed, 16:1n-7 and 20:5n-3 showed respectively $\delta^{13}\text{C}$ from -26.7‰ and -29.5‰ at the external station, to -25.8‰ and -28.7‰ at the station near to the mouth, and to -25.7‰ and -27.5‰ at the inner station (Table 7).

Table 7. Total fatty acid (FA) composition (mean; mass % of total FA; n = 2) and Compound Specific Isotopic analysis (CSIA) of FA (mean; $\delta^{13}\text{C}$ ‰; n = 2) of potential food sources, for the 3 stations (1, 2, and 3). Only the FA accounting for more than 80 % of dissimilarity between stations (SIMPER test) and presenting the greatest abundance permitting their good detection in CSIA are shown. NA: Not analyzed. *In CSIA, 18:1n-9 and 18:1n-3 are coeluted and $\delta^{13}\text{C}$ value is presented in the same line.

	Fatty Acids (mass% of total lipid FA)								Compound Specific Isotopic Analysis ($\delta^{13}\text{C}$ ‰)							
	POM			SOM			Eelgrass		POM			SOM			Eelgrass	
	Station 1	Station 2	Station 3	Station 1	Station 2	Station 3	Fresh	Detrital	Station 1	Station 2	Station 3	Station 1	Station 2	Station 3	Fresh	Detrital
14:0	9.7	11.4	7.2	2.6	3.8	3.2	0.8	1.9	-26.7	-25.9	-27.7	NA	NA	NA	-18.9	-26.4
16:0	21.3	25.0	26.0	16.3	22.2	20.6	21.8	25.6	-30.5	-31.1	-34.5	-27.2	-23.6	-23.3	-17.5	-22.3
18:0	6.4	6.1	4.5	6.4	6.1	6.3	1.9	2.6	-29.0	-29.8	-30.8	-30.1	-27.7	-26.6	-16.4	-25.3
16:1n-7	6.1	5.4	5.1	7.3	12.0	8.3	0.4	1.0	-26.7	-25.8	-25.7	-23.5	-23.4	-22.2	-15.8	-17.2
18:1n-7	3.1	2.6	3.0	6.7	3.9	5.2	0.4	1.4	-23.5	-23.1	-20.9	-21.1	-20.1	-19.4	NA	NA
18:1n-9*	5.2	3.0	2.8	4.1	3.0	4.3	1.4	1.9	-28.4	-29.9	-30.8	-25.8	-24.6	-24.5	NA	NA
18:3n-3*	2.2	2.5	3.3	1.8	0.9	1.2	38.3	29.7								
18:4n-3	3.6	3.8	3.9	0.9	1.3	1.5	0.1	0.3	-31.6	-31.4	-32.3	NA	NA	NA	NA	NA
20:4n-6	0.2	0.1	0.1	0.4	0.2	0.2	0.1	0.5	NA	NA	NA	-26.0	-23.2	-23.3	NA	NA
20:5n-3	5.5	5.3	5.3	7.4	7.2	8.8	0.2	1.5	-29.5	-28.7	-27.5	-25.4	-21.2	-22.8	NA	NA
22:6n-3	7.9	7.1	4.3	5.8	2.7	3.4	0.3	0.7	-25.6	-27.5	-34.9	-25.1	-21.7	-24.4	NA	NA

Discussion

Results from this study suggest that organic matter from nearby ocean is transported into the lagoon, contributing to the primary production and to the diet of benthic filter feeders. Thanks to the use of CSIA on FA, we suggested that diatoms assimilated by bivalves have the same marine origin throughout the lagoon. Moreover, that a diversity of heterotrophic flagellates may also enter the diet of bivalves, but their origin varies according to the location within the lagoon, suggesting an influence of local processes in the diet of these consumers.

The most striking result from bulk SI analysis of bivalve muscles and POM was the significant ^{15}N enrichment observed near the entrance of the lagoon, with individuals from stations 1 and 2 displaying similar $\delta^{15}\text{N}$ values that were higher than in the inner bay. This reveals an oceanic influence, and particularly the contribution of ^{15}N oceanic inputs to the diet of bivalves near the entrance of the lagoon, but also that such dietary influence of the ocean did not extend to the innermost part of the lagoon. This oceanic influence can be explained by active wind-driven seasonal upwelling occurring outside the lagoon from April to June (Ibarra-Obando *et al.* 2001; Du *et al.* 2015). It has been suggested that water masses containing upwelled biological material could be transported into coastal lagoons of the Pacific coast of Baja California (Zaytsev 2003), promoting primary production and potentially affecting their trophic functioning. The hypothesis that upwelled waters affect the diet of bivalves inside the lagoon is based on the fact that during upwelling conditions, the biomass of large phytoplankton increases (Taylor & Landry 2018), and as upwelled nitrate is rapidly consumed by phytoplankton (O'Reilly, Hecky, Cohen & Plisnier 2002), its $\delta^{15}\text{N}$ increases. Although coastal upwelling influence on the studied lagoon was not supported by chlorophyll *a* or temperature data, such high $\delta^{15}\text{N}$ with no changes in $\delta^{13}\text{C}$ have been reported in various systems under upwelling influence worldwide (O'Reilly *et al.* 2002; Hill & McQuaid 2008; Reddin, Docmac, O'Connor, Bothwell & Harrod 2015).

The spatial differences found in the FA composition of neutral lipids in the DG of bivalves confirmed a change in the proportion and possibly in the nature of food sources with increasing distance from the mouth of the lagoon. The DG at the entrance of the lagoon (stations 1 and 2) had higher 16:1n-7 and 20:5n-3 contents when compared to individuals from the inner station (station 3), indicating a higher contribution of diatoms in their diet (Parrish *et al.* 2000; Alfaro *et al.* 2006). A previous study revealed that during the late spring, diatoms

are the dominant phytoplankton taxa found in the Northern California current (Du *et al.* 2015). The higher importance of diatoms in the diet of bivalves near the entrance of the lagoon therefore supports the influence of oceanic primary production. Individuals from the inner station had lower contents of these two FA, suggesting a dilution of oceanic inputs further into the lagoon. The importance of 22:6n-3 in DG of individuals at the external station suggests that dinoflagellates also represent an important dietary contribution of *S. crassisquama* (Parrish *et al.* 2000). This contribution decreases slightly with increasing distance from the mouth of the lagoon, being the lowest at the internal station, suggesting a decreasing contribution of dinoflagellates to this station. However, the high abundance of 18:4n-3, another dinoflagellate marker (Kharlamenko *et al.* 2001; Bachok *et al.* 2003; Nerot *et al.* 2015), at the inner station (station 3) suggests the opposite. Such conflicting information by these two dinoflagellate markers may indicate different assemblages being assimilated by bivalves in the lagoon, but such change in dietary biomarkers does not necessarily suggest any shift in contribution of dinoflagellates to the diets of these consumers. Bivalves from the inner bay were also characterized by higher C18 FA contents (18:1n-9, 18:3n-3). These FA can be characteristic of different dietary sources, such as seagrass (Kharlamenko *et al.* 2001) or heterotrophic flagellates constituting microbial food webs (Zhukova 1991). Although seagrass beds are known to be a source of dissolved organic matter (DOM; Fenton and Ritz 1988), bivalve muscles were too ^{13}C depleted as compared to seagrass $\delta^{13}\text{C}$ to be in accordance with a significant trophic contribution of *Z. marina*. Consequently, the abundance of these FA likely reflects the contribution of heterotrophic microorganisms (*i.e.* bacteria, ciliates, flagellates, dinoflagellates), relying on locally produced DOM, to the diet of bivalves. This highlights a higher diversity of food sources for bivalves at the internal station than for those submitted to oceanic influences.

Inferring diet composition based on CSIA requires FA-specific fractionation coefficients, which are not available for our species, and would require extensive laboratory experiments to be acquired (Ruess & Chamberlain 2010; Bec *et al.* 2011). Consequently, our approach did not aim to characterize the accuracy of food sources retention by bivalves, but to scrutinize the trophic spatial variability in an effort to provide evidence of a different spatial origin of the diets for this consumer (Ramos, Parrish, Quibuyen & Abrajano 2003; Van den Meersche, Middelburg, Soetaert, Van Rijswijk, Boschker & Heip 2004). Although no difference in bulk $\delta^{13}\text{C}$ values was observed in muscles of individuals from the different stations, CSIA detect the

isotopic composition of FA that may indicate source-specific differences of FA (Budge *et al.* 2008; Colombo *et al.* 2016). We observed some differences in the range of variation of FA $\delta^{13}\text{C}$ along the transect depending on biomarkers considered (diatoms vs microheterotrophs). In DG neutral lipids, diatom biomarkers (16:1n-7 and 20:5n-3) displayed the smallest range of variation among the three stations ($\leq 1\text{‰}$), which is of little ecological value. The spatial consistency in the $\delta^{13}\text{C}$ values of these diatom biomarkers suggests that diatoms assimilated by bivalves have the same oceanic origin throughout the bay. Therefore, it seems that phytoplankton of local origin (produced within the lagoon) is of relatively little dietary importance for *S. crassisquama*. The FA 18:1n-9 and 18:3n-3 were both considered to reveal the contribution of microheterotrophs (flagellates, ciliates, see above). Because these FA coeluted on the apolar column used for GC-C-IRMS analysis, they were reported jointly. Even if the three stations presented significant differences in their $\delta^{13}\text{C}$ for 18:1n-9 and 18:3n-3, stations 1 and 2 displayed very similar $\delta^{13}\text{C}$ (only differed by 0.6‰), while station 3 showed ^{13}C depleted values (1.9‰ lower than stations 1 and 2). This difference suggests that the origin of these microheterotrophs differed within the lagoon. Microheterotrophs are central elements of microbial food webs, feeding on bacteria and other small unicellular organisms, and ultimately relying on DOM (Azam, Fenchel, Field, Gray, Meyer-Reil & Thingstad 1983). The ^{13}C depletion observed at the inner station suggests a local source of DOM, which is of primary importance for bivalves in the lagoon. Although the lagoon of Ojo de Liebre hosts one of the largest eelgrass bed of the Northern Pacific (Cabello-Pasini *et al.* 2003), a seagrass-derived DOM seems unlikely because seagrass is usually ^{13}C enriched compared to other marine primary producers (Hemminga & Mateo 1996), which was also observed in the present study. The possible DOM release from the sediment is also not in agreement with $\delta^{13}\text{C}$ measured for these FA (around -24.5‰ in SOM). In fact, such ^{13}C -depleted values in coastal environments are usually associated with red algae, which can be extremely low in $\delta^{13}\text{C}$ (Raven, Johnston, Kübler, Korb, McInroy, Handley, Scrimgeour, Walker, Beardall, Vanderklift, Fredriksen & Dunton 2002). Although no extensive population of such algae was observed during sampling, it is possible that such populations exist in the inner bay, supplying a pool of dissolved organic carbon that is subsequently trophically transferred to bivalves.

Dinoflagellate FA biomarkers (18:4n-3 and 22:6n-3) had the same spatial distribution pattern as observed for biomarkers of other microheterotrophs (18:1n-9 and 18:3n-3), with a marked ^{13}C depletion at the inner station. Therefore, in contrast to diatoms, dinoflagellates entering

the diet of bivalves do not seem to be of marine origin throughout the lagoon. The similarity observed between the CSIA in microheterotrophs and dinoflagellates might suggest that the same factors affect the SI composition of these two possible food sources. In fact, although dinoflagellates are usually described as primary producers, heterotrophy is a widespread pattern in this group (Jeong, Du Yoo, Kim, Seong, Kang & Kim 2010). Based on these results, it is possible that dinoflagellates assimilated by *S. crassisquama* in the inner part of the lagoon may rely on heterotrophy, emphasizing a potentially important role of the microbial food web in this enclosed ecosystem.

Conclusion

CSIA allowed highlighting a new scale of complexity in the diet of *S. crassisquama* in the Ojo de Liebre lagoon. Although dietary diatoms retained in bivalves appeared to have the same oceanic origin throughout the lagoon, this study indicates that the heterotrophic component of bivalve diet varies spatially in the lagoon, highlighting an influence of local processes in the diet of these consumers. The combination of the three methods used here showed to be complementary, resulting in a more informative analysis of spatial feeding ecology of this and likely also other lagoons. The lower $\delta^{13}\text{C}$ observed at the most inner station could not be explained in this study, although any potential role of seagrass in providing DOM for the associated microbial food web could be discarded based on different SI data. Further research is warranted to identify how the origin of basal resources vary and support food webs in lagoons and to better understand the quantitative importance of dietary sources for bivalves.

Funding

This study was supported by the ECOS-ANUIES program (PROPHYMUS project), the "Laboratoire d'Excellence" LabexMER (ANR-10-LABX-19) and co-funded by a grant from the French government under the program "Investissements d'Avenir". MMR's PhD fellowship was provided by the French Research Ministry and Region Bretagne.

Acknowledgements

We would like to thank the contribution of the Guerrero Negro unit of CIBNOR for hosting the first steps of sample preparation after fieldwork, the LIPIDOCEAN analytical facilities for hosting all fatty acid analyses, and the Pôle Spectrométrie Océan (Clément Tanvet) for running bulk SI and CSIA analyses.

We thank the fishermen crew for the fieldwork, but also Laura Guzman for their precious help during sampling and dissections, and Dr. Elena Palacios and Dr. Kitty Arredondo Vega, for the laboratory facilities provided for the preparation of samples at the CIBNOR La Paz. We thank the Reserva de la biosfera desierto de “el Vizcaino” for their help and support in carrying out sampling for this study. Authors would like to thank Aurelien Boye for his precious help and advices about statistical analyses.

CHAPITRE 3

La composition en acides gras membranaires de branchies de bivalves provenant d'une lagune côtière reflète l'influence de facteurs trophiques et abiotiques

Margaux Mathieu-Resuge, Fabienne Le Grand, Gauthier Schaal, Salvador E. Lluch-Cota, Ilie S. Racotta, Edouard Kraffe

Ce chapitre fera l'objet d'un article à soumettre dans Conservation Physiology

1. Résumé

Il a été établi que la composition des membranes cellulaires peut être affectée par la qualité des ressources alimentaires (Delaporte *et al.* 2005; Guo, Bunn, Brett, Fry, Hager, Ouyang & Kainz 2018), et plus particulièrement par la disponibilité en acides gras polyinsaturés (AGPI) (Soudant *et al.* 1998, Pernet & Tremblay 2004). Comme les bivalves marins ne sont pas capables de biosynthétiser les AGPI, ils doivent les obtenir depuis leur alimentation (Moreno, Moreno & Brenner 1976; Wacker, Becher & Elert 2002). Chez les bivalves marins, la composition lipidique des membranes cellulaires est impliquée dans d'importants processus physiologiques (Kraffe, Soudant & Marty 2004). Leur composition en AG est influencée par des changements de températures ou autres stress abiotiques (*i.e.* oxygène, salinité) et biotiques (Pernet & Tremblay 2004; Parent, Pernet, Tremblay, Sevigny & Ouellette 2008; Munro & Blier 2012). Par conséquent, leur composition et structure en sont hautement régulées (Van Meer, Voelker & Feigenson 2008) afin d'assurer le maintien des fonctionnalités cellulaires. Or, les bivalves sont soumis à une variabilité environnementale à la fois spatiale et temporelle, qui va influencer non seulement la disponibilité mais aussi la qualité des ressources alimentaires (Levinton 1972). Les proportions en AGPI dans les cellules membranaires sont donc elles aussi soumises à des régulations physiologiques face à ces modifications de ressource trophique (Delaporte *et al.* 2005).

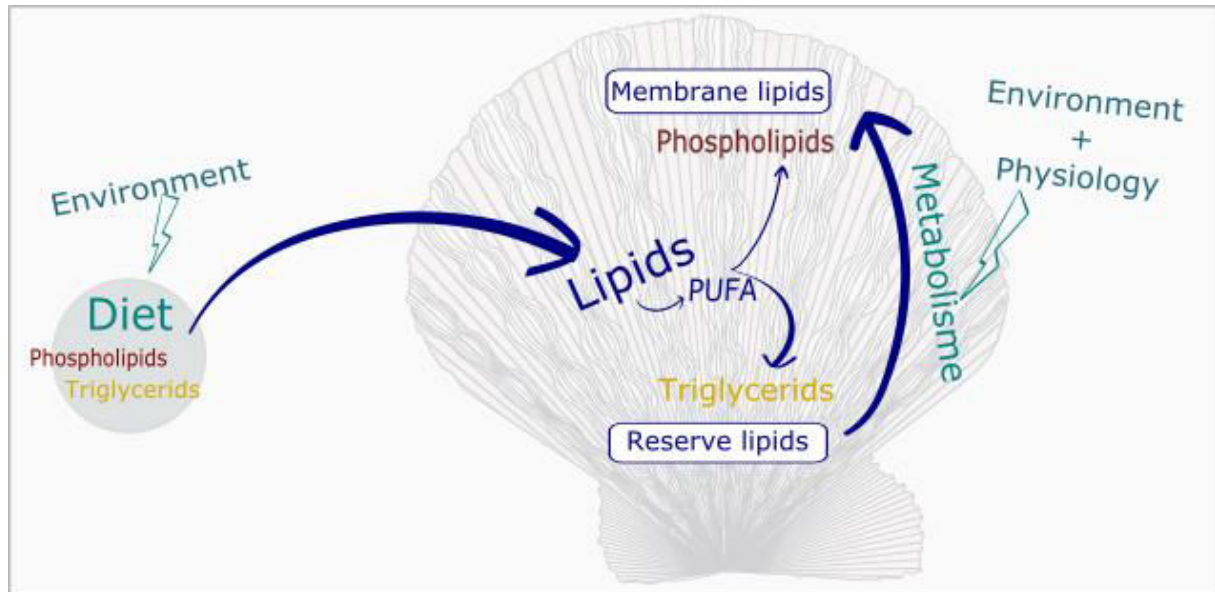
Alors que les précédents chapitres mettent en avant les disparités spatio-temporelles des ressources trophiques auxquelles sont soumises *Spondylus crassisquama*, ce chapitre se propose d'étudier l'impact de la variabilité de ces apports trophiques sur la régulation des compositions en acides gras (AG) des lipides membranaires. Pour cela, la composition des lipides membranaires des branchies a été analysée chez *Nodipecten subnodosus* et *S. crassisquama*, pour la station 1 (Chocolatero, la station la plus proche de l'entrée de la lagune) et la station 2 (Datil, la station la plus éloignée). Deux différentes périodes ont été analysées (Février et Août 2016) afin de mettre en avant des disparités physiologiques (*i.e.* période de reproduction) et environnementales (*i.e.* changements de température, de salinité, ou en oxygène dissous) auxquelles ont été soumises les individus.

La composition en lipides membranaires des branchies montre une nette influence trophique pour les deux espèces. En effet, les principaux AGPI essentiels spécifiquement accumulés dans les branchies reflètent la variabilité spatiale observée dans les lipides de réserve de la glande

digestive (GD). Cette constatation suggère l'importance des AGPI essentiels provenant de l'alimentation depuis les organes de réserve vers les tissus de structure. Toutefois, d'autres facteurs comme la variabilité environnementale et la taxonomie semblent réguler ces compositions membranaires face aux besoins physiologiques des individus. La spécificité spatiale et saisonnière de l'abondance des AG des branchies comparée à la GD pour le 22:6n-3, 20:5n-3 et 20:4n-6 révèle qu'au-delà des contributions trophiques, la composition des branchies en AG répond également aux besoins physiologiques en réponse aux variations des facteurs biotiques et abiotiques et ceci pour les deux espèces.

Une régulation contrastée entre les deux espèces a toutefois été trouvée au niveau des lipides membranaires des branchies pour les seuls AG biosynthétisés *de novo* par les bivalves : AG Non Methylen Interrupted (NMI) et leurs AG associées (22: 4n-9trans pour *N. subnodosus* et 20:1n-11 pour *S. crassissquama*) (Kraffe et al. 2004, Le Grand et al. 2011) ainsi que pour une sous-classe de phospholipides : les plasmalogènes. Ces régulations contrastées pourraient contribuer aux régulations structurelles et fonctionnelles des membranes. Les différences de régulation entre les deux espèces en particulier pour les NMI et les plasmalogènes suggèrent différentes stratégies ou capacités chez *N. subnodosus* et *S. crassissquama* pour faire face aux conditions environnementales.

La capacité de régulation de l'intégration des AG alimentaires dans les lipides membranaires, mise en évidence pour les deux espèces permettrait ainsi aux bivalves de maintenir les fonctions critiques de la membrane lorsque les facteurs biotiques varient dans leur environnement. Les ressources trophiques contrastées dans la lagune, qui se reflètent dans la composition des lipides membranaires, montrent que la variabilité des ressources alimentaires disponibles pour les bivalves dans cette lagune doit être comprise pour permettre d'appréhender les conséquences écologiques des changements de régime alimentaire dans leur environnement naturel. Les conséquences écophysiologiques en termes de capacité des espèces à faire face aux variabilités environnementales au niveau de la régulation des lipides membranaires, nécessitent également une plus grande attention.



2. Article n°3

Membrane fatty acid composition of bivalve gills in a coastal lagoon is influenced by both trophic and abiotic factors

Margaux Mathieu-Resuge^{1*}, Fabienne Le Grand¹, Gauthier Schaal¹, Salvador E. Lluch-Cota², Ilie S. Racotta², Edouard Kraffe¹

1 : Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, IUEM, F-29280, Plouzané, France

2: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, BCS, Mexico

Abstract

Bivalves are submitted to environmental variabilities (spatial and temporal) influencing physiological requirements (*i.e.* growth, reproduction, response to changes in abiotic factors) that can be concomitant with trophic resources modifications in quality and quantity. Among essential molecules that bivalves need to acquire from their diet to maintain crucial physiological functions, fatty acids such as essential polyunsaturated fatty acids (PUFA) (*e.g.* 20:4n-6, 20:5n-3, and 22:6n-3) have been described to have an important role. The present study examined the FA composition of gills membrane lipids of *Nodipecten subnodosus* and *Spondylus crassisquama* from two contrasted locations in a coastal lagoon of the Northeastern Pacific (Ojo de Liebre, Mexico) comparing two periods (February and August 2016). Spatiotemporal variations showed that PUFA composition of gills membrane lipids reflected FA compositions of reserve lipids from digestive gland (DG), highlighting a marked impact of diet on FA composition of gills. Nevertheless, the differences of abundances between both tissues suggested specific regulations of incorporation of FA in gills. Capacity of regulation of dietary FA into membrane lipids was evidenced for both species and should allow bivalves to maintain critical membrane functions when biotic factors vary in their environment. Contrasted trophic groups within the bay that were reflected in the composition of membrane lipids shows that food resources variability available for bivalves in this bay should be understood to apprehend ecological consequences of diet shifts in their natural environment.

Keywords: Bivalves – Gills – Fatty acids – Membrane lipids – Diet influences - Physiological regulation - Ecophysiology

Introduction

Marine bivalves inhabiting coastal areas are submitted to environmental fluctuations at various spatial and temporal scales. In particular, the availability of food supply (Levinton 1972; Kang, Sauriau, Richard & Blanchard 1999), induced by changes in nutrient concentrations and/or nature, impacts the growth and reproduction of bivalve species (Knauer & Southgate 1997; Soudant, Chu & Samain 2000). More specifically, it is known that the quantity but also the quality of food impacts cell membranes lipid composition in macroinvertebrates (Delaporte *et al.* 2005; Guo *et al.* 2018). Food nutritional quality depends on multiple aspects but high level of polyunsaturated fatty acids (PUFA), and in particular of essential PUFA (e.g arachidonic acid (AA) 20:4n-6; eicopentaenoic acid (EPA) 20:5n-3; and docosahexaenoic acid (DHA) 22:6n-3), are required to sustain an optimal development (Soudant, Marty, Moal, Masski & Samain 1998b; Pernet & Tremblay 2004).

Even if essential PUFA by definition cannot be biosynthesized, and marine bivalves need to obtain them from their diet (Moreno *et al.* 1976; Waldock & Holland 1984; Wacker *et al.* 2002), their proportion in cell membranes phospholipids is submitted to regulation, through preferential accumulation depending on the physiological state of individuals (i.e. growth, reproduction) (Delaporte *et al.* 2005), but also in response to changes in abiotic factors such as salinity, temperature, and pH (Hazel 1995; Hayward, Murray, Gracey & Cossins 2007). Conversely to FA of reserve lipids, which proportions mostly mirror their proportion in the diet, the composition of essential PUFA in cell membranes lipids remains under metabolic control when facing dietary changes in FA inputs (Dalsgaard *et al.* 2003), revealing physiological requirements of individuals when individuals are facing environmental changes (Hazel 1995; Hayward *et al.* 2007). Some FA can be biosynthesized from monounsaturated FA (MUFA) having or not a dietary origin. These particular FA, known as non-methylene interrupted FA (NMI), and others FA associated in mollusk bivalves (22:4n-9*trans* and 20:1n-11), are specifically linked to membrane phospholipids known as plasmalogens protect membrane functions. These FA and plasmalogen phospholipids are regulated and accumulated to contribute to maintain cell integrity and functions (Kraffe *et al.* 2004; Barnathan 2009; Le Grand, Kraffe, Marty, Donaghy & Soudant 2011b). Numerous studies have demonstrated the important role of these lipids in membrane structure-function in bivalve

gills (Kraffe *et al.* 2004; Munro & Blier 2012), and their implication in adaptation to changes in abiotic factors such as temperature (Pernet, Tremblay, Comeau & Guderley 2007).

The Ojo de Liebre lagoon (Baja California, Mexico) is one of the largest coastal lagoons in the Northeast Pacific (≈ 40 km long, ≈ 10 km wide). During the 1990s and 2000s the lagoon hosted one of the main bivalve fisheries of Mexico, targeting the pectinid *Nodipecten subnodosus* (G.B. Sowerby I, 1835) up to an historical production maximum of 157mt of scallop meat in 1999. Population of *Nodipecten subnodosus* in the Ojo de Liebre lagoon represented the unique natural population exploitable along the Pacific Coast. The management strategy appeared successful and production remained nearly constant for a decade; however, in 2011, the stocks of this species collapsed. Capture decreased from 282 Mt in 2010 to 56 Mt in 2011, leading to the closure of the fishery from this year to date (González-Ortiz *et al.* 2017). Fishing effort was then directed toward the spondylid *Spondylus crassisquama* (Lamarck, 1819), whose population had more than 20 million organisms estimated in the lagoon (Centro Regional de Investigación de Pesquera and Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, pers comm.) Although the abundance of *N. subnodosus* remains low at the lagoon scale, the two species co-occur throughout the tidal channels and the extensive eelgrass (*Zostera marina*) meadows, extremely abundant in the Ojo de Liebre lagoon (Cabello-Pasini *et al.* 2003). The reasons underlying the collapses of *N. subnodosus* stocks and subsequent reporting of fishing efforts towards *S. crassisquama* have still not been clearly explain, and may involve physiological differences in the response of these two species to environmental variability.

In previous studies investigating the trophic ecology of the bivalve species *S. crassisquama* within the lagoon of Ojo de Liebre (Baja California, Mexico), we pointed out contrasted spatial and temporal patterns, revealing the heterogeneity of dietary inputs within the bay (Chapter 1 & 2). Few studies described the variations of the abiotic factors of the lagoon. Phleger and Ewing (1962) showed high range of variability in temperature into the lagoon (from 18°C in February to 24°C in August) compare to the lower range of variability in salinity (from 34 PSU in February to 36 PSU in August).

The present work aims to evaluate how the contrasted trophic conditions and variations of abiotic factors in the environment can affect the FA composition of bivalve cell membranes, which is directly linked to functional and physiological performances. In this context of stocks collapse, individuals of *N. subnodosus* and *S. crassisquama* were studied from two contrasted locations within the lagoon of Ojo de Liebre, and the FA composition of their gills membrane

lipids was characterized at two periods, aiming to decipher the respective influences of trophic dynamics and adaptations to biotic and abiotic factors on membrane lipid composition, and highlights potential inter-specific differences in regulations of membrane lipids composition.

Material and methods

Sampling

Samplings were realized during February and August 2016 at two stations, with contrasted distances to the mouth (Figure 24) and at depth ranging from 7 to 10m. At each stations and each sampling dates, professional scuba divers took 10 individuals of *N. subnodosus* and *S. crassisquama* of length between 9 and 11 cm. Bivalves were stocked in cooler boxes full of lagoon water for transportation to the local laboratory (CIBNOR, Unidad Guerrero Negro), for dissections. Gills were sampled, packed, and stored in liquid nitrogen during transportation to the main laboratory (CIBNOR, La Paz) where samples were then stored at -80°C until lipids extractions.

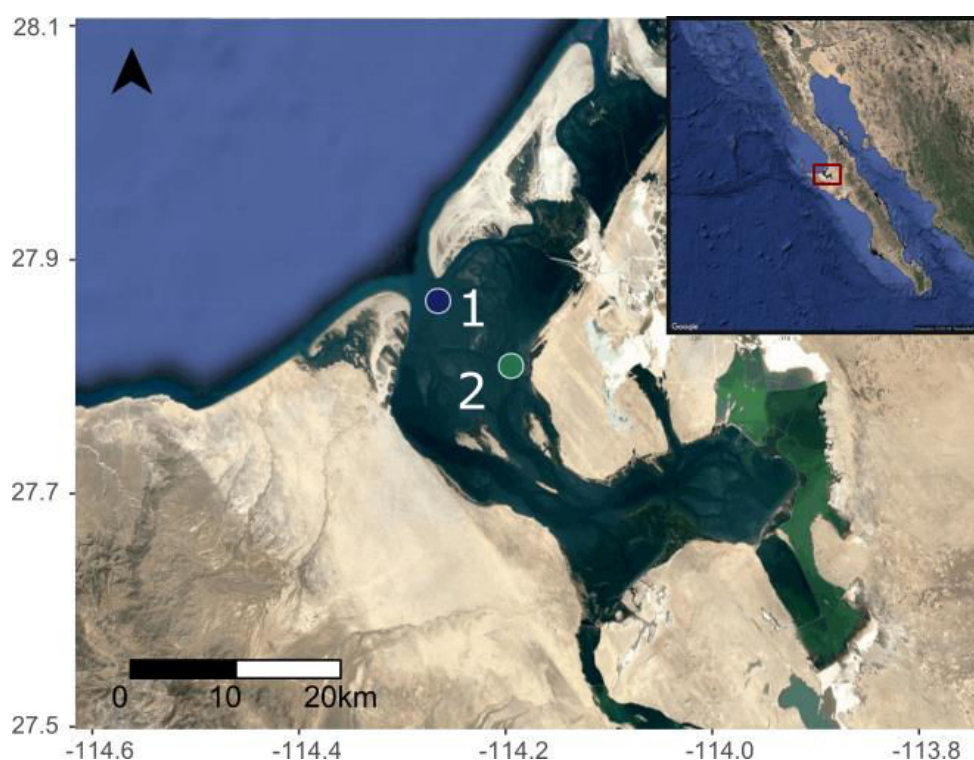


Figure 24. Location of the 2 sampling stations in the Ojo de Liebre lagoon (Baja California Sur, Mexico).

Fatty acid analysis

Lipid extraction

Bivalve gills were ground by ball milling under liquid nitrogen into a fine and uniform powder. The lipid extractions were done following a modified method of Folch *et al.*, (1957). Briefly, 0.2 at 0.4 g of tissue powder was put in glass tubes containing 6 ml of chloroform/methanol (2:1; v/v) and then sonicated 5 min at 4°C. Lipid extracts were afterward stored at -20°C under nitrogen atmosphere to prevent oxidation.

Separation of neutral and polar lipids

Samples of total lipids were divided into two fractions according to the method described by Le Grand *et al.*, (2014). For that, 1ml of gills lipid extracts was evaporated to dryness and lipids were recovered with three washings of 0.5 ml of chloroform/methanol (98:2, v/v) and deposited at the top of a silica gel micro-column (40 mm x 4 mm, silica gel 60A 63-200 µm rehydrated with 6% H₂O (70-230 mesh)). Neutral lipids were eluted with 10 ml of chloroform/methanol (98/2; v/v) and discarded. The polar lipid fraction (membrane lipids) was recovered with 20 ml of methanol and stored at -20°C for further analysis of FA composition by gas chromatography. In each fractions, 2.3 µg of an internal standard (tricosanoic acid (C23:0)) was added.

Fatty acid analysis by Gas Chromatography

Fatty acids methyl esters (FAME) and Dimethylacetals (DMA) were obtained respectively from diacylphospholipids and plasmalogens of the polar lipid fraction by an acidic transesterification (Le Croizier *et al.* 2016). For that PL fractions were first evaporated to dryness under nitrogen and transesterified for 10 min at 100°C after adding 0.8 ml of methanol/H₂SO₄ (3.4 %; v/v). After cooling and adding 0.8 ml of hexane, the organic phase containing FAME and DMA was washed three times with 1.5 ml of hexane-saturated water. At each washing, vials were shaken and centrifuged (1 min at 738g; 20°C), and aqueous phase (containing glycerol, water and acid) was eliminated.

FAME and DMA were analyzed in a Varian CP8400 gas chromatograph, equipped with two splitless injectors programmed at 220°C, and two flame-ionization detectors programmed at 280°C, with hydrogen as vector gas. Each analysis followed a program in temperature from 0°C to 150°C at 50°C min⁻¹, then to 170°C at 3.5°C min⁻¹, to 185°C at 1.5°C min⁻¹, to 225°C at 2.4°C min⁻¹, and finally to 250°C at 5.5°C min⁻¹ and maintained for 15 min. To avoid coelution problems, FAME and DMA were separated simultaneously and paralelly on two columns

presenting two different polarities, one polar (ZBWAX: 30 m x 0.25 mm ID x 0.2 μ m, Phenomenex) and one apolar (ZB5HT: 30 m x 0.25 mm ID x 0.2 μ m, Phenomenex). FAME and DMA were identified by their retention time with reference to those of commercial standards and in-house standard mixtures from marine bivalves. FA relative proportions were expressed as the mass percentage of the total FA content.

Statistical Analysis

Due to the number of zero in data sets which was always inferior to 2.5 %, Euclidean distance was applied in all statistical analyses. Only FA accounting for more than 0.5 % at one station and/or period were taken into account on statistical analysis. Normality (Shapiro-Wilks test) and homoscedasticity (Bartlett-test) were tested. For all data, conditions were not satisfied, non-parametric analyses were therefore carried out.

The differences of gills FA composition between stations (Station 1 and Station 2) were also tested by PERMANOVA. To illustrate the spatial variability of gills' PL FA composition between the two stations, principal component analyses (PCA) were performed. Only the most discriminant FA, described by a SIMPER test (>80%) were represented on PCA. Finally, to compare the fluctuation of the abundance of gills' PL FA of interest between February and August, a comparison two by two (Wilcoxon test) was done for both species, and for each stations. Only FA accounting for more than 1% in at least one station and/or period were shown on tables. All statistical analyses and graphics were performed with the free software R (Core Team 2017), with R Version 3.4.1 (2017 06 30).

Results

Spatiotemporal differences were found in the FA composition of the two species between February and August. Because significant interactions were found between periods and stations for *N. subnodosus* (PERMANOVA, p-value < 0.001, df = 1, F = 11.32, R² = 0.05) and *S. crassisquama* (PERMANOVA, p-value < 0.05, df = 1, F = 4.51, R² = 0.02), we compared spatial differences (Stations 1 and 2) at each periods.

The membrane FA composition of *N. subnodosus* gills differed significantly between stations, in February (PERMANOVA, 7.10^{-4} , df = 1, F = 4.84, R² = 0.21) and in August (PERMANOVA, p = 2.10^{-4} , df = 1, F = 22.94, R² = 0.56). The same spatial differences were observed for *S.*

crassisquama (in February, PERMANOVA, $p = 6.10^{-5}$, $df = 1$, $F = 12.84$, $R^2 = 0.43$ and in August PERMANOVA, $p = 9.10^{-5}$, $df = 1$, $F = 9.58$, $R^2 = 0.35$). For each species and at both stations we observed significant differences of FA composition of gills between sampling periods for both *N. subnodosus* (PERMANOVA, $p < 0.001$, $df = 1$, $F = 75.8$, $R^2 = 0.81$ for Station 1, $p < 0.001$, $df = 1$, $F = 97.5$, $R^2 = 0.84$ for Station 2) and *S. crassisquama* (PERMANOVA, $p < 0.001$, $df = 1$, $F = 81.8$, $R^2 = 0.83$ for Station 1, $p < 0.001$, $df = 1$, $F = 74.5$, $R^2 = 0.81$ for Station 2).

For *N. subnodosus* the total amount of SFA increased in August at both sites, from 23.9% to 25.7% and from 24.6% to 29% at Station 1 and Station 2, respectively (Table 8). A significant increase in August was also observed for *S. crassisquama*, from 18.9% to 22.5% at Station 1 and from 21.7% to 22.9% at Station 2 (Table 9). Compared to SFA, MUFA and PUFA showed more marked differences with a significant increase observed for MUFA from 9.6% to 14.5% at Station 1, and from 9.3% to 15.6% at Station 2 in February for *N. subnodosus* (Table 8) and from 11.2% to 18.2% at Station 1, and from 11.3% to 18.1% in Station 2 at the same period, for *S. crassisquama* (Table 9). PUFA decreased significantly at both sites in August, with values from 52.1% to 44.8% at Station 1 and from 51.5% to 42.5% at Station 2 for *N. subnodosus* (Table 8), and from 48.7% to 43.5% at Station 1 and from 45.4% to 40.8% at Station 2 for *S. crassisquama* (Table 9). We observed significant decreases in degree of unsaturation for summer period at both stations for both species (Table 8 and Table 9).

While differences of total SFA, MUFA and PUFA were quite similar for both species, when comparing periods or stations, specific FA showed different variations depending of the period, the site, and the species. The first axis of PCA opposed the two stations at both months (Figure 25). For both species and during both periods, individuals from Station 1 were associated to high values of essential FA 20:4n-6 (Figure 25). For both species, pairwise comparisons between periods revealed that levels of 20:4n-6 in bivalve gills from Station 1 were significantly higher during August, but was at equal levels in bivalve gills from Station 2 (Table 8 for *N. subnodosus* and Table 9 for *S. crassisquama*). At both periods, individuals from Station 2, were associated to high values of 20:5n-3 (Figure 25), however pairwise comparisons showed that only *N. subnodosus* bivalve gills from Station 1 presented higher levels in August (Table 8). For *S. crassisquama*, only individuals from Station 2 showed significant higher levels in February (Table 9). In August and for both species, individuals from Station 2 were associated to high levels of 18:4n-3, 18:3n-3 and 18:1n-9 (Figure 25 B and D). For *N. subnodosus*, pairwise comparisons between periods revealed that the three FA showed

significantly higher levels in bivalve gills from Station 2 (Table 8). We observed same significant differences for *S. crassisquama*, excepted for the 18:4n-3 which did not present significant differences at Station 2 (Table 9). Whatever the species and periods individuals from Station 1 were associated to high levels of 22:6n-3 (Figure 25), except for *N. subnodosus* in August where individuals were associated to average values (Figure 25 B). However, for both species and at both stations, pairwise comparisons revealed that 22:6n-3 was in higher proportions in bivalve gills in February (Table 9).

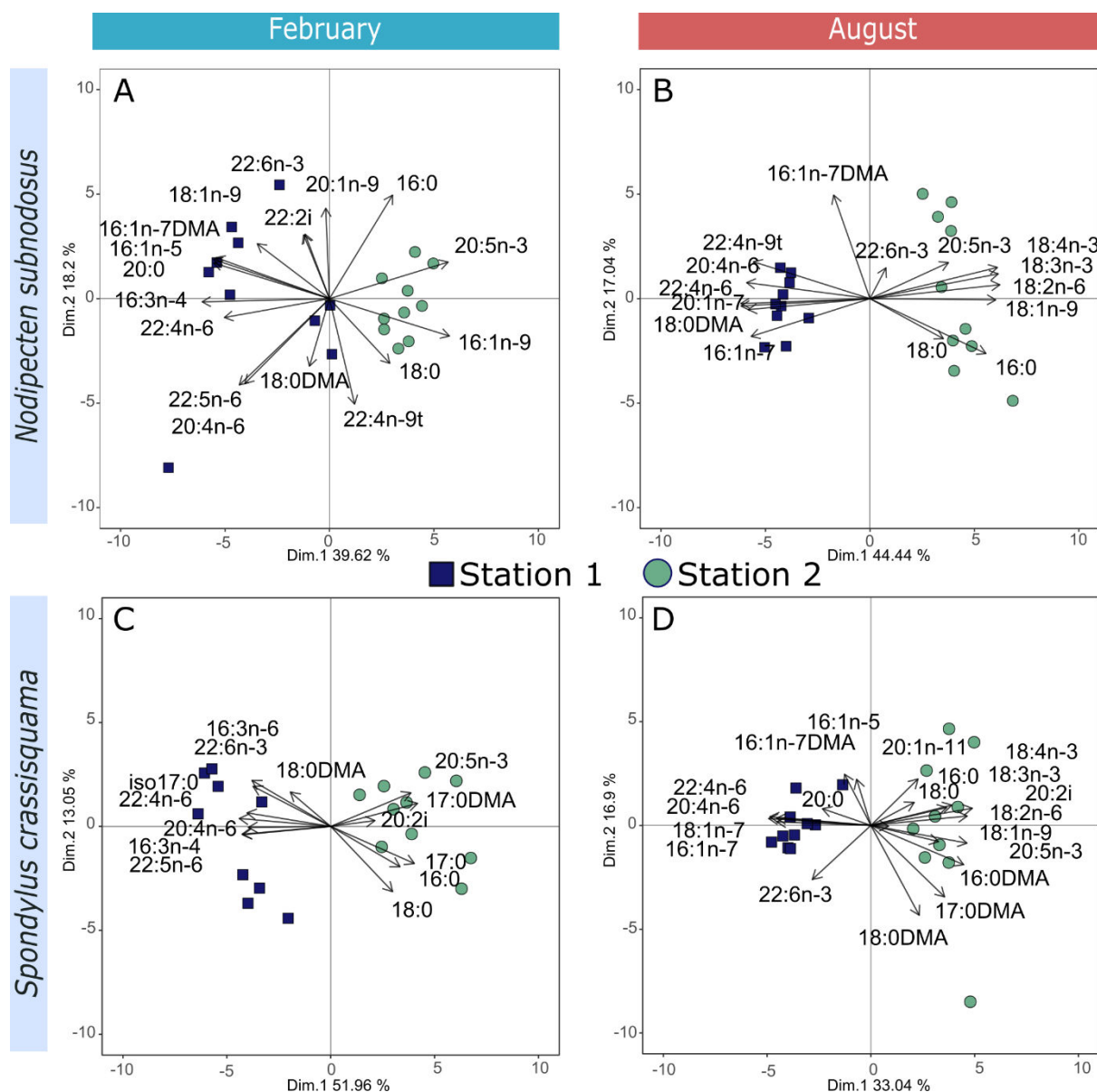


Figure 25. Principal Component analyses (PCA) of gill PL FA composition (mass %) of *N. subnodosus* and *S. crassisquama* gills in February and August. Only FA that account for > 80 % of the contribution of dissimilarity between stations in the SIMPER are shown.

Species were characterized by different modifications of non-methylene interrupted (NMI) FA. For *N. subnodosus*, total NMI FA was significantly higher in February at both sites (Table 8),

principally due to the 22:2i which was more abundant at both sites in February (from 1.0% to 1.4% at Station 2, and 0.9% to 1.6% at Station 1). The PUFA 22:4n-9t in gills of *N. subnodosus* was also in higher proportions in February at both stations. Values increased in February, from 4.2% to 5.9% at Station 1, and were almost multiplied by two at Station 2 (3.2% and 6.1%, respectively) (Table 8). The 20:1n-11 followed the same pattern, from 1.3% to 2% at Station 1, and from 1.2% to 1.6% at Station 2 (Table 8). Contrary to *N. subnodosus*, the amount of total NMI FA in *S. crasssquama* showed significant higher levels in August at both sites, from 5.4% to 6.4% at Station 1 and from 5.5% to 6.9% at Station 2 (Table 9). This higher amount was associated to the significant increase of the main NMI FA, the 20:2i which showed values from 1.9% to 2.3% at Station 1, and from 2.1% to 2.8% at Station 2 (Table 9). The MUFA 20:1n-11 followed variations of NMI FA and also increased significantly in August at both sites (from 3.2% to 5.7% at Station 1, and from 3.0% to 6.3% at Station 2) (Table 9). The amount of total dimethyl acetal (DMA) in *N. subnodosus* did not vary between February and August at Station 1, but were significantly lower in August at Station 2 (Table 8). For *S. crasssquama*, this difference between February and August was more important at both stations (13.1% vs 6.4% and 13.2% vs 8.1% at Station 1 and Station 2, respectively) (Table 9).

Table 8. PL FA composition (mean $\pm$ SD; mass %; $n = 10$) of *N. subnodosus* gills in February and August 2016, for the both stations. Only the FAs accounting for $> 1\%$ of total FA in at least one sample are shown. Different letters indicate significant difference (significant level $\alpha < 0.05$) of seasonal variations tested by a Wilcoxon test at Stations 1 and 2, respectively. SFA: saturated FA; MUFA: monosaturated FA; PUFA: polyunsaturated FA; Branched: FA [15iso+15anteiso+16iso+17iso+17anteiso].

	Station 1		Station 2	
	February 2016	August 2016	February 2016	August 2016
Σ BRANCHED	0.6 $\pm$ 0.1 b	0.9 $\pm$ 0.0 a	0.6 $\pm$ 0.1 B	1.2 $\pm$ 0.1 A
14:0	0.7 $\pm$ 0.1 b	1.4 $\pm$ 0.2 a	0.9 $\pm$ 0.1 B	1.4 $\pm$ 0.2 A
16:0	8.5 $\pm$ 0.9 b	11.3 $\pm$ 0.6 a	9.1 $\pm$ 0.3 B	14.0 $\pm$ 1.4 A
17:0	1.4 $\pm$ 0.2 b	1.5 $\pm$ 0.1 a	1.6 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.2
18:0	8.7 $\pm$ 0.8 a	6.5 $\pm$ 0.5 b	9.2 $\pm$ 0.4 A	7.0 $\pm$ 0.4 B
20:0	3.1 $\pm$ 0.6	3.4 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.1 B	3.1 $\pm$ 0.4 A
Σ SFA	23.9 $\pm$ 1.3 b	25.7 $\pm$ 0.9 a	24.6 $\pm$ 0.8 B	29.0 $\pm$ 2.5 A
16:1n-9	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0 A	0.3 $\pm$ 0.0 B
16:1n-7	0.6 $\pm$ 0.2 b	1.8 $\pm$ 0.1 a	0.5 $\pm$ 0.0 B	1.2 $\pm$ 0.1 A
16:1n-5	0.8 $\pm$ 0.4 b	2.9 $\pm$ 0.3 a	0.2 $\pm$ 0.1 B	2.9 $\pm$ 0.5 A
18:1n-9	1.8 $\pm$ 0.2 a	1.6 $\pm$ 0.8 b	1.5 $\pm$ 0.2 B	4.3 $\pm$ 0.5 A
18:1n-7	0.9 $\pm$ 0.1 b	2.0 $\pm$ 0.1 a	1.1 $\pm$ 0.1 B	2.0 $\pm$ 0.3 A
20:1n-11	1.3 $\pm$ 0.1 b	2.0 $\pm$ 0.1 a	1.2 $\pm$ 0.1 B	1.6 $\pm$ 0.2 A
20:1n-9	2.0 $\pm$ 0.2 a	1.7 $\pm$ 0.1 b	1.9 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.3
Σ MUFA	9.6 $\pm$ 0.7 b	14.5 $\pm$ 0.8 a	9.3 $\pm$ 0.3 B	15.6 $\pm$ 0.7 A
16:3n-4	0.8 $\pm$ 0.1 a	0.5 $\pm$ 0.1 b	0.4 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0
18:2n-6	0.5 $\pm$ 0.1 b	0.6 $\pm$ 0.0 a	0.5 $\pm$ 0.0 B	1.3 $\pm$ 0.1 A
18:3n-3	0.5 $\pm$ 0.1 a	0.4 $\pm$ 0.0 b	0.5 $\pm$ 0.0 B	1.2 $\pm$ 0.1 A
18:4n-3	0.5 $\pm$ 0.1 a	0.3 $\pm$ 0.0 b	0.6 $\pm$ 0.1 B	0.9 $\pm$ 0.1 A
20:4n-6	6.2 $\pm$ 0.9 b	7.4 $\pm$ 0.2 a	5.4 $\pm$ 0.3	5.2 $\pm$ 0.7
20:5n-3	4.8 $\pm$ 0.4 b	5.1 $\pm$ 0.3 a	5.9 $\pm$ 0.3	5.6 $\pm$ 0.5
22:4n-6	2.4 $\pm$ 0.2 b	2.9 $\pm$ 0.2 a	1.9 $\pm$ 0.2 A	1.3 $\pm$ 0.2 B
22:4n-9t	5.9 $\pm$ 0.6 a	4.2 $\pm$ 0.3 b	6.1 $\pm$ 0.4 A	3.2 $\pm$ 0.5 B
22:5n-6	2.7 $\pm$ 0.2 a	2.1 $\pm$ 0.1 b	2.5 $\pm$ 0.1 A	2.1 $\pm$ 0.1 B
22:5n-3	0.9 $\pm$ 0.1 a	0.8 $\pm$ 0.0 b	1.0 $\pm$ 0.1 A	0.8 $\pm$ 0.1 B
22:6n-3	20.5 $\pm$ 1.1 a	14.2 $\pm$ 0.7 b	20.0 $\pm$ 0.6 A	14.6 $\pm$ 0.9 B
Σ PUFA	52.1 $\pm$ 1.4 a	44.8 $\pm$ 1.0 b	51.5 $\pm$ 0.8 A	42.5 $\pm$ 2.1 B
16:0DMA	0.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.2
16:1n-7DMA	1.3 $\pm$ 0.7 b	3.9 $\pm$ 0.3 a	0.5 $\pm$ 0.2 B	3.7 $\pm$ 0.6 A
17:0DMA	1.0 $\pm$ 0.1 a	0.8 $\pm$ 0.1 b	1.1 $\pm$ 0.1 A	0.7 $\pm$ 0.1 B
18:0DMA	7.9 $\pm$ 0.7 a	6.2 $\pm$ 0.5 b	7.5 $\pm$ 0.7 A	4.2 $\pm$ 0.6 B
Σ DMA	11.7 $\pm$ 0.7	12.0 $\pm$ 0.3	11.6 $\pm$ 0.6 A	9.7 $\pm$ 0.9 B
20:2i	0.9 $\pm$ 0.0 a	0.8 $\pm$ 0.1 b	1.0 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1
22:2i	1.6 $\pm$ 0.1 a	0.9 $\pm$ 0.1 b	1.4 $\pm$ 0.2 A	1.0 $\pm$ 0.1 B
Σ NMI	4.1 $\pm$ 0.2 a	3.3 $\pm$ 0.1 b	4.3 $\pm$ 0.3 A	3.2 $\pm$ 0.3 B
Σ UNKNOWN	1.0 $\pm$ 0.1 b	1.1 $\pm$ 0.1 a	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1
Σ w3	27.9 $\pm$ 1.4 a	21.4 $\pm$ 0.6 b	28.9 $\pm$ 0.9 A	23.6 $\pm$ 1.3 B
Σ w6	13.9 $\pm$ 1.3 b	15.7 $\pm$ 0.4 a	12.3 $\pm$ 0.4	12.3 $\pm$ 0.9
Σ Unsaturation d°	2.6 $\pm$ 0.07 a	2.3 $\pm$ 0.0 b	2.6 $\pm$ 0.0 A	2.2 $\pm$ 0.1 B

Table 9. PL FA composition (mean $\pm$ SD; mass %; $n = 10$) of *S. crassiquama* gills in February and August 2016, for the both stations. Only the FAs accounting for $> 1\%$ of total FA in at least one sample are shown. Different letters indicate significant difference (significant level $\alpha < 0.05$) of seasonal variations tested by a Wilcoxon test at Stations 1 and 2, respectively. SFA: saturated FA; MUFA: monosaturated FA; PUFA: polyunsaturated FA; Branched: FA [15iso+15anteiso+16iso+17iso+17anteiso].

	Station 1		Station 2	
	February 2016	August 2016	February 2016	August 2016
Σ BRANCHED	1.1 $\pm$ 0.1 ^b	1.5 $\pm$ 0.2 ^a	0.9 $\pm$ 0.1 ^B	1.8 $\pm$ 0.2 ^A
14:0	0.7 $\pm$ 0.0 ^b	1.4 $\pm$ 0.2 ^a	0.8 $\pm$ 0.1 ^B	1.2 $\pm$ 0.2 ^A
16:0	6.3 $\pm$ 0.5 ^b	8.2 $\pm$ 0.6 ^a	7.0 $\pm$ 0.7 ^B	8.6 $\pm$ 1.0 ^A
17:0	1.5 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.2 ^A	1.7 $\pm$ 0.1 ^B
18:0	6.6 $\pm$ 1.4	7.2 $\pm$ 0.5	7.7 $\pm$ 0.6	7.2 $\pm$ 0.5
20:0	2.5 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.3
Σ SFA	18.9 $\pm$ 2.4 ^b	22.5 $\pm$ 1.0 ^a	21.7 $\pm$ 1.6	22.9 $\pm$ 1.4
16:1n-9	0.9 $\pm$ 0.0 ^a	0.2 $\pm$ 0.0 ^b	0.9 $\pm$ 0.1 ^A	0.3 $\pm$ 0.1 ^B
16:1n-7	0.4 $\pm$ 0.0 ^b	2.3 $\pm$ 0.3 ^a	0.5 $\pm$ 0.1 ^B	1.5 $\pm$ 0.1 ^A
16:1n-5	0.3 $\pm$ 0.0 ^b	2.4 $\pm$ 0.4 ^a	0.3 $\pm$ 0.0 ^B	2.3 $\pm$ 0.5 ^A
18:1n-9	1.3 $\pm$ 0.1 ^b	1.7 $\pm$ 0.3 ^a	1.1 $\pm$ 0.1 ^B	2.6 $\pm$ 0.3 ^A
18:1n-7	1.0 $\pm$ 0.0 ^b	2.0 $\pm$ 0.2 ^a	1.1 $\pm$ 0.0 ^B	1.5 $\pm$ 0.1 ^A
20:1n-11	3.2 $\pm$ 0.1 ^b	5.7 $\pm$ 0.2 ^a	3.0 $\pm$ 0.2 ^B	6.3 $\pm$ 0.6 ^A
20:1n-9	1.9 $\pm$ 0.2 ^b	2.2 $\pm$ 0.2 ^a	1.8 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.4
Σ MUFA	11.2 $\pm$ 0.3 ^b	18.2 $\pm$ 0.7 ^a	11.3 $\pm$ 0.3 ^B	18.1 $\pm$ 0.9 ^A
16:3n-4	1.0 $\pm$ 0.1 ^a	0.4 $\pm$ 0.1 ^b	0.7 $\pm$ 0.1 ^A	0.5 $\pm$ 0.1 ^B
18:2n-6	0.8 $\pm$ 0.0 ^b	1.4 $\pm$ 0.2 ^a	0.9 $\pm$ 0.1 ^B	1.8 $\pm$ 0.2 ^A
18:3n-3	0.5 $\pm$ 0.0 ^b	0.6 $\pm$ 0.1 ^a	0.8 $\pm$ 0.1 ^B	1.3 $\pm$ 0.2 ^A
18:4n-3	0.6 $\pm$ 0.0 ^a	0.4 $\pm$ 0.1 ^b	0.8 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2
20:4n-6	8.2 $\pm$ 0.6 ^b	9.8 $\pm$ 0.7 ^a	6.6 $\pm$ 0.6	6.8 $\pm$ 0.6
20:5n-3	4.5 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.6	6.3 $\pm$ 0.7 ^A	5.5 $\pm$ 0.8 ^B
22:4n-6	3.0 $\pm$ 0.2 ^b	3.4 $\pm$ 0.3 ^a	2.0 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.7
22:5n-6	3.4 $\pm$ 0.2 ^a	2.5 $\pm$ 0.2 ^b	2.7 $\pm$ 0.2 ^A	2.4 $\pm$ 0.3 ^B
22:5n-3	0.7 $\pm$ 0.0 ^a	0.6 $\pm$ 0.2 ^b	0.8 $\pm$ 0.1 ^A	0.7 $\pm$ 0.1 ^B
22:6n-3	21.3 $\pm$ 1.1 ^a	14.8 $\pm$ 1.0 ^b	19.4 $\pm$ 0.9 ^A	13.8 $\pm$ 1.2 ^B
Σ PUFA	48.7 $\pm$ 1.8 ^a	43.5 $\pm$ 1.9 ^b	45.4 $\pm$ 1.5 ^A	40.8 $\pm$ 1.1 ^B
16:0DMA	1.1 $\pm$ 0.2 ^a	0.4 $\pm$ 0.1 ^b	1.2 $\pm$ 0.1 ^A	0.8 $\pm$ 0.2 ^B
16:1n-7DMA	0.5 $\pm$ 0.1 ^b	3.1 $\pm$ 0.5 ^a	0.5 $\pm$ 0.1 ^B	3.1 $\pm$ 0.6 ^A
17:0DMA	2.1 $\pm$ 0.1 ^a	0.7 $\pm$ 0.1 ^b	2.6 $\pm$ 0.1 ^A	1.1 $\pm$ 0.3 ^B
18:0DMA	8.9 $\pm$ 0.8 ^a	2.2 $\pm$ 0.5 ^b	8.5 $\pm$ 0.6 ^A	3.1 $\pm$ 1.3 ^B
Σ DMA	13.1 $\pm$ 0.9 ^a	6.4 $\pm$ 1.0 ^b	13.2 $\pm$ 0.7 ^A	8.1 $\pm$ 1.4 ^B
20:2i	1.9 $\pm$ 0.1 ^b	2.3 $\pm$ 0.3 ^a	2.1 $\pm$ 0.2 ^B	2.8 $\pm$ 0.3 ^A
22:2i	1.6 $\pm$ 0.1 ^b	1.9 $\pm$ 0.2 ^a	1.4 $\pm$ 0.2 ^B	2.1 $\pm$ 0.3 ^A
Σ NMI	5.4 $\pm$ 0.2 ^b	6.4 $\pm$ 0.3 ^a	5.5 $\pm$ 0.3 ^B	6.9 $\pm$ 0.8 ^A
Σ UNKNOWN	1.7 $\pm$ 0.0 ^a	1.4 $\pm$ 0.1 ^b	2.1 $\pm$ 0.1 ^A	1.5 $\pm$ 0.1 ^B
Σ w3	28.0 $\pm$ 1.2 ^a	21.4 $\pm$ 1.4 ^b	28.4 $\pm$ 1.0 ^A	22.7 $\pm$ 1.3 ^B
Σ w6	18.5 $\pm$ 1.0 ^b	20.5 $\pm$ 1.1 ^a	15.0 $\pm$ 0.8 ^B	16.3 $\pm$ 1.2 ^A
Σ Unsaturation d°	2.6 $\pm$ 0.1 ^a	2.3 $\pm$ 0.1 ^b	2.4 $\pm$ 0.1 ^A	2.2 $\pm$ 0.1 ^B

Discussion

This study showed that *N. subnodosus* and *S. crassisquama* reflect dietary inputs in the FA composition of gills cell membranes. Important spatiotemporal modifications highlighted in the present study for membrane lipids indeed paralleled some of those described for reserve lipids (i.e. dietary lipids) in digestive gland of *S. crassisquama* (Chapter 1 and Supplementary Table 10). Nevertheless, at both periods gills membrane lipids compositions presented spatial and inter-species differences.

We found contrasted gill cell membranes FA compositions resulting from the spatial variability in dietary FA inputs. The most striking example is at Station 2, the most inner station, where 18:1n-9, 18:3n-3, and 18:4n-3 were found in higher proportions for individuals from this station only in August, and this in membrane lipids (i.e. gills) and reserve lipids (i.e. digestive gland) (Supplementary Table 10). Nevertheless, these FA present a first example of strong regulation at the level of gills membrane because membrane lipids presented much lower levels than those found in reserve lipids. Indeed, in August at Station 2, 18:1n-9, 18:3n-3 and 18:4n-3 showed values of 7.6%, 6.3% and 7.4% in the DG of *N. subnodosus*, respectively (Supplementary Table 10), whereas values found in gills of *N. subnodosus* were 4.3%, 1.2% and 0.9%. In contrast, for both species, essential PUFA such as 22:6n-3 and 20:4n-6 were found in higher proportion in gills compared to DG. The constant presence of these FA in gills suggests a selective retention from the diet of bivalves. Indeed, bivalves are not able to biosynthesize *de novo* these FA (Wacker *et al.* 2002), and need to acquire them from their diet. The high proportions of these essential FA in gills suggest that their presence derived principally from microalgae, their main origin in marine food webs, after specific transfer from DG (Delaporte *et al.* 2005; Parrish 2009). Several studies showed the indispensable roles of such PUFA in the growth of bivalves (Langdon & Waldock 1981; Knauer & Southgate 1997), but also their importance during gametogenesis (Parrish 2009). Both species showed similar spatiotemporal variations in the accumulation of 20:4n-6 and 22:6n-3 in gills. In contrast, EPA was present at higher and different proportions in DG (Supplementary Table 10), but presented almost constant levels in gills with variations comprised between 0.2 and 0.8% in species, whatever the season and station. This suggests a strong regulation of the EPA which corroborates the results of (Caers, Coutteau, Lombeida & Sorgeloos 1998; Delaporte *et al.* 2005), who found a moderate incorporation of this FA, even if present in high amounts in food

sources. Spatial and seasonal specificity of abundances in gills compared to DG for 22:6n-3, 20:5n-3 and 20:4n-6 reveals that beyond trophic inputs, the FA composition of gills also responds to physiological needs and this for both species.

FA regulation of gills membranes depends on the physiological requirements of individuals, not only determined by dietary inputs, but also by environmental variables, such as salinity, dissolved oxygen or temperature (Delaunay, Marty, Moal & Samain 1993; Soudant *et al.* 1998b; Kraffe *et al.* 2004; Parent *et al.* 2008). We know that temperature is the abiotic factor that undergoes the largest range of variation in the lagoon compare to salinity (Phleger & Ewing 1962) or to oxygen (comm. Personal, Reserva de la Biosfera El Vizcaino). We observed that the FA composition of gills membranes displayed contrasted spatial patterns, but the temporal variability was quite consistent between the two sampling sites.

An increase in the overall degree of unsaturation suggests that similar factors were driving membranes FA composition at both stations, and for both species in February and August. Several studies described the importance of temporal modifications in the membrane lipid composition of bivalves, linked to temperature changes (Pernet *et al.* 2007; Munro & Blier 2015). In February, during winter, when temperatures were at the minimum in the lagoon around 15° C (Cabello-Pasini *et al.* 2003), PUFA increased markedly compared to other FA (i.e. SFA and MUFA), principally due to the increase of 22:6n-3 and inducing an increase in the overall degree of unsaturation. Several studies revealed that while lower temperature reduce the fluidity of cell membranes, higher degrees of unsaturation contribute to maintain membrane performances at lower temperatures (Hazel 1995), and that lipid remodeling was principally induced by an accumulation of 22:6n-3 during a decrease in temperature (Pernet *et al.* 2007; Parent *et al.* 2008). Even if temperature observed in the present study were much higher than those studied in literature, adaptation vary as a function of latitude in ectothermic animals, reflecting local adaptation to environmental temperature (Pernet *et al.* 2007).

Besides, for *S. crassisquama*, a higher proportion of DMA was also found in February at both stations suggesting an increase in plasmalogens contents in membrane lipids. These higher levels of plasmalogens could be used to maintain cell integrity in response to different abiotic stresses, such as the temperature decrease, pH or salinity variations or biotic stresses (Kraffe *et al.* 2004; Le Grand *et al.* 2011b). High plasmalogen content has already been demonstrated to increase membrane fluidity, due to the non-lamellar conformation of the membrane lipids (Hazel & Williams 1990; Glaser & Gross 1994; Le Grand *et al.* 2011b). The enrichment in

plasmalogens in February could also play a key role in the prevention of membrane oxidation (Munro & Blier 2015). The vinyl-ether bond of plasmalogens is highly susceptible to oxidative cleavage and rapidly reacts and trap singlet oxygen, free-radicals and other ROS, protecting surrounding PUFA from peroxidation (Leray, Cazenave & Gachet 2002; Le Grand, Soudant, Marty, Le Goïc & Kraffe 2013). In *N. subnodosus*, DMA showed much lower differences, with no difference in DMA proportions found in Station 1 between August and February. With these considerations on plasmalogen modifications and related functions, this suggests that *S. crassisquama* would respond more accurately than *N. subnodosus*.

Another contrasted pattern of regulations at the level of membrane lipids in gills between both species was also found for NMI FA 22:4n-9t and 20:1n-11. These modifications could contribute to the structural and functional regulations of membranes as NMI FA were suggested to confer a resistance to tissues during microbial attack (Paradis & Ackman 1977), during temperature changes (Pirini, Manuzzi, Pagliarani, Trombetti, Borgatti & Ventrella 2007), and also provide protection against oxidation (Kraffe *et al.* 2004; Delaporte *et al.* 2005; Barnathan 2009; Le Grand *et al.* 2013). The 20:1n-11 and 22:4n-9trans were associated to NMI FA to confer resistance and similar functions as NMI to tissues (Kraffe, Grall, Palacios, Guerra, Soudant & Marty 2010; Le Grand *et al.* 2011b). Because NMI, 22:4n-9trans and 20:1n-11 FA were absent from bivalves potential food sources (Chapter 1 & 2), their presence in bivalves tissues is most likely explained by *de novo* synthesis. Indeed, bivalves can *de novo* synthesize NMI FA, due to an active and specific FA elongation and desaturation systems in mollusks (Zhukova 1991; Kraffe *et al.* 2004), with MUFA 18:1n-9 and 16:1n-7, precursors for the i and j series of NMI FA (Zhukova 1986, 1991). In August, the amount of 18:1n-9 in gills membrane lipids from *N. subnodosus* increased significantly at Station 2 (from 1.5% in February to 4.3% in August), but levels of both 20:2i and 22:2i did not change, highlighting an important regulation or dysregulation between precursors and NMI contents. In contrast, in *S. crassisquama* NMI FA were more abundant in August than in February at both sites. For this species, the NMI FA increased in August was principally due to higher proportions of 20:2i and 22:2i, and was related to higher proportions of n-9 MUFA (18:1n-9 and 20:1n-9) at the same period. As for plasmalogens (DMA), these differences of regulations of NMI FA between species suggest different strategies or capacities to cope with environmental conditions.

In conclusion, the present study tried to evaluate and understand how species adjusted the level of FA composition of membrane lipids in gills when facing concomitant differences in FA compositions of their diet and environmental or biotic parameters. Results showed that the FA composition of bivalve gills cell membranes is affected by both dietary inputs and environmental variability, showing specific responses between the two species studied. These results highlight the importance of FA transfers regulation between reserve tissues (neutral lipids) and cell membranes (membrane lipids). Although regulation capacity of both species was evidenced, contrasted trophic environments were reflected in the composition of cell membranes. The two species, even displaying overall comparable responses to spatiotemporal variability, did show some specificities in terms of adaptation, especially regarding plasmalogens-associated FA. The ecophysiological consequences of the differences observed in terms of the ability of species to cope with environmental variabilities at the level of membrane lipids regulations, requires also further attention.

Funding

This work was supported by the ECOS-ANUIES program (PROPHYMUS project), the "Laboratoire d'Excellence" LabexMER (grant number ANR-10-LABX-19) and co-funded by a grant from the French government under the program "Investissements d'Avenir". Mathieu-resuge PhD fellowship was provided by the French Research Ministry and Region Bretagne. We would like to thank the contribution of the Guerrero Negro unit of CIBNOR for hosting the first steps of sample preparation after fieldwork, the LIPIDOCEAN analytical facility for hosting all fatty acid analyses.

Acknowledgements

We thank the “Pepe” Jose Alfredo Saenz Arce crew for the fieldwork, but also Rosa Linda Salgado Garcia, and Laura Guzman for precious help during sampling and dissections, and Dr. Elena Palacios, for the laboratory facilities provided for the preparation of samples at CIBNOR La Paz. Finally, we thank the Reserva de la biosfera desierto de “el Vizcaino” for their help and support in carrying out sampling for this study. Authors would to thanks Aurélien Boye for his precious help in the statistic questions, bugs, and graphical realizations!

Supplementary data

Table 10. NL FA composition (mean $\pm$ SD; mass %; n = 10) of *N. subnodosus* and *S. crassisquama* gills in February and August 2016, for the both stations. Only the FAs accounting for > 1 % of total FA in at least one sample are shown. Different letters indicate significant difference (significant level $\alpha < 0.05$) of seasonal variations tested by a Wilcoxon test at Stations 1 and 2, respectively. SFA: saturated FA; MUFA: monosaturated FA; PUFA: polyunsaturated FA; Branched: FA[15iso+15anteiso+16iso+17iso+17anteiso].

	<i>Nodipecten subnodosus</i>					<i>Spondylus crassisquama</i>				
	Station 1		Station 2			Station 1		Station 2		
	February	August	February	August		February	August	February	August	
ΣBranched	2.9 $\pm$ 1.3^a	1.4 $\pm$ 0.2^b	1.7 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.3		1.4 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.1^b	1.8 $\pm$ 0.4^a	
14:0	5.6 $\pm$ 0.6 ^b	8.1 $\pm$ 0.7 ^a	5.8 $\pm$ 0.7	5.8 $\pm$ 0.5		4.8 $\pm$ 0.4 ^b	8.2 $\pm$ 1.5 ^a	4.4 $\pm$ 0.3 ^b	5.8 $\pm$ 0.9 ^a	
16:0	19.9 $\pm$ 0.8 ^b	21.9 $\pm$ 0.5 ^a	22.1 $\pm$ 2.4 ^b	25.8 $\pm$ 1.1 ^a		21.2 $\pm$ 0.6	21.1 $\pm$ 1.0	21.8 $\pm$ 1.3 ^b	24.7 $\pm$ 1.3 ^a	
17:0	1.1 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1 ^b	1.0 $\pm$ 0.1 ^a		1.3 $\pm$ 0.1 ^a	1.1 $\pm$ 0.2 ^b	1.4 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	
18:0	4.7 $\pm$ 1.7 ^a	3.4 $\pm$ 0.3 ^b	3.5 $\pm$ 0.7 ^b	4.6 $\pm$ 0.4 ^a		4.5 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.6	5.0 $\pm$ 0.7	5.2 $\pm$ 0.5	
20:0	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0 ^b	0.2 $\pm$ 0.0 ^a		0.2 $\pm$ 0.0 ^a	0.3 $\pm$ 0.1 ^b	0.2 $\pm$ 0.0 ^a	0.2 $\pm$ 0.0 ^b	
ΣSFA	32.6 $\pm$ 1.7^b	35.8 $\pm$ 0.8^a	33.1 $\pm$ 3.4^b	38.5 $\pm$ 1.6^a		33.0 $\pm$ 0.8^a	36.3 $\pm$ 2.0^b	33.7 $\pm$ 1.7^b	38.6 $\pm$ 2.0^a	
16:1n-9	0.5 $\pm$ 0.2 ^a	0.3 $\pm$ 0.0 ^b	0.5 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0		0.4 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1 ^b	0.6 $\pm$ 0.1 ^a	
16:1n-7	4.6 $\pm$ 0.5 ^b	10.6 $\pm$ 0.5 ^a	6.0 $\pm$ 0.6	5.6 $\pm$ 0.5		5.6 $\pm$ 0.3 ^b	8.8 $\pm$ 0.9 ^a	5.5 $\pm$ 0.4	5.2 $\pm$ 0.3	
16:1n-5	0.1 $\pm$ 0.1 ^b	0.3 $\pm$ 0.0 ^a	0.2 $\pm$ 0.0 ^b	0.2 $\pm$ 0.0 ^a		0.3 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	
18:1n-9	5.6 $\pm$ 1.3 ^a	4.2 $\pm$ 0.4 ^b	5.9 $\pm$ 0.7 ^b	7.6 $\pm$ 0.7 ^a		4.8 $\pm$ 0.5 ^a	4.0 $\pm$ 0.5 ^b	4.3 $\pm$ 0.6 ^b	5.2 $\pm$ 0.6 ^a	
18:1n-7	2.3 $\pm$ 0.3 ^b	3.1 $\pm$ 0.2 ^a	2.7 $\pm$ 0.3	2.8 $\pm$ 0.2		2.2 $\pm$ 0.1 ^b	2.7 $\pm$ 0.3 ^a	2.7 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 0.1	
20:1n-11	0.4 $\pm$ 0.1 ^a	0.2 $\pm$ 0.0 ^b	0.2 $\pm$ 0.1 ^b	0.2 $\pm$ 0.1 ^a		0.6 $\pm$ 0.1 ^a	0.4 $\pm$ 0.4 ^b	0.6 $\pm$ 0.1 ^b	0.7 $\pm$ 0.3 ^a	
20:1n-9	0.7 $\pm$ 0.2 ^a	0.5 $\pm$ 0.0 ^b	0.6 $\pm$ 0.1 ^b	0.7 $\pm$ 0.1 ^a		0.7 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.1 ^b	1.2 $\pm$ 0.2 ^a	
ΣMUFA	15.3 $\pm$ 2.1^b	20.5 $\pm$ 0.4^a	17.0 $\pm$ 0.6^b	19.0 $\pm$ 0.7^a		16.3 $\pm$ 0.5^b	19.0 $\pm$ 0.5^a	16.3 $\pm$ 0.7^b	17.8 $\pm$ 0.5^a	
18:2n-6	3.2 $\pm$ 0.8 ^a	2.6 $\pm$ 0.1 ^b	3.3 $\pm$ 0.3 ^b	3.7 $\pm$ 0.2 ^a		2.7 $\pm$ 0.1 ^a	2.5 $\pm$ 0.3 ^b	2.9 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.1	
18:3n-3	5.3 $\pm$ 1.2 ^a	3.4 $\pm$ 0.2 ^b	6.4 $\pm$ 0.7	6.3 $\pm$ 0.4		3.6 $\pm$ 0.1 ^a	3.1 $\pm$ 0.4 ^b	4.5 $\pm$ 0.4	4.8 $\pm$ 0.5	
18:4n-3	9.7 $\pm$ 1.1 ^a	5.0 $\pm$ 0.4 ^b	9.8 $\pm$ 1.3 ^a	7.4 $\pm$ 1.0 ^b		5.7 $\pm$ 0.8 ^a	4.8 $\pm$ 0.6 ^b	5.7 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 0.8	
20:4n-6	1.7 $\pm$ 1.0 ^b	2.1 $\pm$ 0.2 ^a	1.1 $\pm$ 0.1 ^a	0.7 $\pm$ 0.1 ^b		2.2 $\pm$ 0.1 ^a	2.0 $\pm$ 0.2 ^b	1.9 $\pm$ 0.2 ^a	1.1 $\pm$ 0.2 ^b	
20:5n-3	8.9 $\pm$ 1.4 ^b	14.2 $\pm$ 0.6 ^a	11.7 $\pm$ 2.3 ^a	7.8 $\pm$ 1.6 ^b		11.9 $\pm$ 0.4	10.8 $\pm$ 1.8	12.5 $\pm$ 0.8 ^a	6.7 $\pm$ 1.3 ^b	
22:4n-6	0.3 $\pm$ 0.2 ^a	0.1 $\pm$ 0.0 ^b	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0		0.3 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.1	
22:4n-9t	0.4 $\pm$ 0.1 ^a	0.2 $\pm$ 0.0 ^b	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0		NA	NA	NA	NA	
22:5n-6	0.6 $\pm$ 0.2 ^a	0.4 $\pm$ 0.1 ^b	0.4 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.0		0.8 $\pm$ 0.0 ^b	0.7 $\pm$ 0.1 ^a	0.7 $\pm$ 0.2 ^b	0.9 $\pm$ 0.1 ^a	
22:5n-3	0.7 $\pm$ 0.2 ^a	0.5 $\pm$ 0.0 ^b	0.5 $\pm$ 0.0 ^a	0.5 $\pm$ 0.1 ^b		0.7 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.0 ^b	1.0 $\pm$ 0.2 ^a	
22:6n-3	11.6 $\pm$ 1.1 ^a	7.4 $\pm$ 0.4 ^b	7.7 $\pm$ 1.1 ^a	6.7 $\pm$ 0.5 ^b		12.5 $\pm$ 0.6 ^a	10.2 $\pm$ 0.9 ^b	11.3 $\pm$ 0.6 ^a	9.6 $\pm$ 0.9 ^b	
ΣPUFA	47.9 $\pm$ 1.2^a	40.9 $\pm$ 1.2	46.5 $\pm$ 3.8	39.0 $\pm$ 2.3^b		46.0 $\pm$ 0.9^a	40.6 $\pm$ 2.3^b	45.7 $\pm$ 1.8^a	38.4 $\pm$ 2.3^b	
ΣDMA	0.6 $\pm$ 0.1^b	0.8 $\pm$ 0.1^a	0.9 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1		2.5 $\pm$ 0.4^a	1.5 $\pm$ 0.3^b	2.2 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.5	
ΣNMI	0.6 $\pm$ 0.3^a	0.3 $\pm$ 0.0^b	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1		0.8 $\pm$ 0.1^a	0.6 $\pm$ 0.2^b	0.9 $\pm$ 0.2^a	0.6 $\pm$ 0.1^b	
ΣUnknown	0.7 $\pm$ 0.1^b	0.6 $\pm$ 0.0^a	0.8 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.0		0.8 $\pm$ 0.1^b	1.1 $\pm$ 0.3^a	0.8 $\pm$ 0.3^b	1.1 $\pm$ 0.2^a	

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les écosystèmes côtiers, dont l'importance écologique et socio-économique est aujourd'hui indéniable (Costanza *et al.* 1997; Martínez *et al.* 2007; Seitz *et al.* 2014), se trouvent à l'interface entre les océans et les écosystèmes terrestres. Les zones côtières bénéficient de nombreuses sources de nutriments (océaniques, atmosphériques, et terrestres), et renferment ainsi les écosystèmes marins les plus productifs (Nixon 1982; Frontier, Pichod-Viale, Leprêtre, Davoult & Luczak 2008). Des variations spatiales et saisonnières de la production primaires impactent les ressources trophiques (Phillips 2005; Allan *et al.* 2010) qui conditionnent la distribution, la croissance et l'état physiologique des organismes benthiques côtiers. De par leur nature fermée et peu profonde, les lagunes côtières ont pour effet d'augmenter ces pressions sur les communautés qui y résident. Les bivalves filtreurs, composants majeurs de ces écosystèmes (Dame 1993), sont des organismes sessiles soumis aux variations environnementales (Decottignies *et al.* 2007) et s'avèrent donc de bons indicateurs de la dynamique trophique des écosystèmes lagunaires (Riera 2007; Carlier *et al.* 2007; Clavier *et al.* 2014).

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse étaient de déterminer comment la variabilité environnementale pouvait impacter à la fois les ressources trophiques mais aussi les régulations physiologiques de deux espèces de bivalves (*Nodipecten subnodosus* et *Spondylus crassisquama*) résidants dans une lagune côtière du Pacifique Nord-Est. Différents biomarqueurs trophiques (analyses en isotopes stables (IS) et composition en acides gras (AG) des lipides de réserve et en stérols) ont d'abord été utilisés afin de caractériser le régime alimentaire d'une espèce de bivalve au sein de son aire de répartition dans la lagune et à deux périodes distinctes (Chapitre 1). Ainsi, nous avons pu mettre en évidence une variation trophique saisonnière, mais aussi une distinction spatiale entre les individus se trouvant à l'entrée de la lagune et ceux en fond de lagune. Par la suite, une dernière approche quantitative d'écologie trophique (analyse isotopique sur composés spécifiques, CSIA) a été développée afin de caractériser l'origine précise des éléments nutritifs le long d'un transect comprenant une station externe à la lagune, une à l'embouchure, et une intérieure à la lagune (Chapitre 2). Enfin, après avoir décrit spatialement et temporellement le régime alimentaire des deux espèces, nous avons étudié comment (via l'étude de la composition en lipides membranaires des branchies) la variation des ressources trophiques et des facteurs abiotiques pouvaient impacter les régulations physiologiques (Chapitre 3).

1. Caractérisation trophique de la lagune

Les deux premiers chapitres de cette thèse mettent en avant l'utilité de combiner différents biomarqueurs trophiques afin de caractériser au mieux un environnement particulier. L'abondance des méthodes actuellement disponibles en écologie trophique permet d'en associer plusieurs afin que leur complémentarité offre des sources de données multiples (Majdi, Hette-Tronquart, Auclair, Bec, Chouvelon, Cognie, Danger, Decottignies, Dessier & Desvillettes 2018; Nielsen, Clare, Hayden, Brett & Kratina 2018).

a. Les apports océaniques

L'analyse des isotopes stables (IS) est un outil incontournable en écologie trophique, qu'il soit utilisé pour tracer des migrations (Rubenstein & Hobson 2004; Hobson & Wassenaar 2018), pour discriminer la contribution de chaque ressource dans le régime alimentaire d'un consommateur (Parnell, Inger, Bearhop & Jackson 2010), ou bien même pour en déterminer la position trophique au sein d'un réseau trophique (Post 2002; Quezada-Romegialli, Jackson, Hayden, Kahilainen, Lopes & Harrod 2018). Dans cette étude, les rapports isotopiques du carbone ($\delta^{13}\text{C}$) et de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) ont été mesurés dans les muscles des bivalves ainsi que dans leurs potentielles sources de nourritures, afin de comparer les différences spatiales. Quelle que soit la période échantillonnée, les résultats isotopiques reflètent les mêmes schémas spatiaux, c'est-à-dire peu de différences dans les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ entre les individus des différentes stations mais un enrichissement en ^{15}N des individus proches de l'entrée de la lagune comparé à ceux situés en fond de lagune (Chapitre 1 & 2). Ces enrichissements ont été interprétés comme étant les témoins d'entrée de masses d'eau océaniques. Si la réalité des entrées de masses d'eau océaniques dans la lagune paraissait attendue, une question importante était de savoir si elles s'étendaient à toute la lagune ou s'il était possible d'identifier une limite d'influence de ces apports dans l'alimentation des bivalves. Afin de mieux caractériser ces influences océaniques un troisième traceur isotopique tel que le soufre ($\delta^{34}\text{S}$) pourrait être appliqué pour caractériser les différentes sources et le devenir de la matière organique le long du transect (Connolly, Guest, Melville & Oakes 2004). Comme les faibles variations de la composition isotopique du carbone retrouvées dans les bivalves ne permettent pas de distinguer les producteurs primaires à la base des chaînes alimentaires, le

souffre pourrait être une solution complémentaire. En effet, son rapport isotopique ne varie pas d'un niveau trophique à l'autre (Peterson & Fry 1987), son utilisation peut donc permettre de distinguer l'origine de différents producteurs primaires, comme utilisé par (Fry 1988) pour déterminer la structure d'une chaîne trophique, ou alors par Kharlamenko et al. (2001) pour comparer les contributions de différents producteurs primaires au réseau trophique d'une communauté de *Zostera marina*. Il a été démontré que le soufre présent dans la colonne d'eau est majoritairement présent sous forme de sulfates, qui sont une source enrichie en ^{34}S ($\approx +20\text{‰}$) et dont la fixation par le phytoplancton ou les algues n'engendre qu'un faible fractionnement isotopique ($\Delta = 1$ à 2‰), alors que les sulfures présents dans les sédiments sont formés par réduction bactérienne des sulfates et sont donc plus légers et appauvries en ^{34}S ($\approx -24\text{‰}$) (Fry, Scalan, Winters & Parker 1982; Fry 2006). L'utilisation de ce traceur isotopique semble donc appropriée pour distinguer une source pélagique et/ou océanique d'une source benthique et/ou côtière comme suggéré par les résultats de cette thèse.

Les analyses en acides gras (AG), et plus particulièrement en lipides de réserve de la glande digestives (GD) et en stérols, ont montré les mêmes patrons spatiaux et temporels pour les deux espèces. Par ailleurs, les analyses en lipides de réserve ont montré une relative homogénéité spatiale sur la période de Février (Chapitre 1). En revanche sur les périodes estivales (Juin et Août) un important gradient se dessinait dans la lagune (Chapitre 1 & 2), mettant en exergue la contribution plus importante du phytoplancton d'origine océanique dans l'alimentation des individus prélevés en entrée de lagune. A l'inverse, le régime alimentaire des individus situés en fond de lagune semblait dominé par des micro-hétérotrophes issus de la production locale. Les résultats observés laissent penser que le signal océanique se dilue au fur et à mesure que la distance avec l'entrée de la lagune s'agrandit, ce qui vient appuyer l'hypothèse avancée par les analyses isotopiques, c'est-à-dire que les masses d'eau océaniques ne semblent pas influencer le fonctionnement trophique de toute la baie. Si les compositions en biomarqueurs de diatomées ($16:1n-7$ et $20:5n-3$) de la MOP ne varient pas beaucoup le long du transect (avec des différences respectives de 0.6% et 0.7% , entre les deux stations extrêmes au mois d'Août 2016), cela amène à s'interroger sur les différences de contributions entre les diatomées et les micro-hétérotrophes dans le régime alimentaire des bivalves situés aux stations les plus internes. Des approches quantitatives pourraient être développées (Iverson, Field, Don Bowen & Blanchard 2004) afin d'estimer les proportions des différentes sources dans l'alimentation des bivalves. Même si cela nécessite

des approches expérimentales pour calibrer des coefficients de modifications liées au métabolisme des AG (*i.e.* rétention sélectives des AG, descriptions des événements de bioconversion et synthèse *de novo*), les deux espèces étudiées peuvent facilement être maintenue en laboratoire afin de lier approches expérimentales et *in situ*.

Les analyses isotopiques de composés spécifiques ont aussi apporté beaucoup de précisions sur la caractérisation de l'origine des différents composés du régime alimentaire des bivalves (Chapitre 2). Si l'analyse du $\delta^{13}\text{C}$ du tissu total n'a pas permis de bien discriminer les différentes origines des sources dans le régime alimentaire des bivalves (Chapitre 1 & 2), l'analyse isotopique de composés spécifiques ciblant une molécule précise (dans ce cas, un acide gras), a permis d'apporter plus d'information. Ceci peut s'expliquer par les différences de turnover des tissus sur lesquelles ont été appliqués ces méthodes (Lorrain *et al.* 2002), les isotopes du carbone et de l'azote ont en effet été analysés dans le muscle et les analyses de CSIA sur la GD. Si le $\delta^{13}\text{C}$ des biomarqueurs de diatomées (16:1n-7, 20:5n-3) montrait des variations relativement faibles le long du transect, les compositions isotopiques des biomarqueurs de micro-hétérotrophes (22:6n-3, 18:1n-9+18:3n-3, 18:4n-3), incluant les dinoflagellés dont les capacités de mixotrophies et d'hétérotrophies sont de plus en plus largement démontrées (Seong, Jeong, Kim, Kim & Kang 2006; Jeong *et al.* 2010), étaient fortement appauvries en ^{13}C chez les individus en fond de lagune. Ces résultats suggèrent que l'ensemble des diatomées assimilées par les bivalves dans la lagune d'Ojo de Liebre ont une même origine, qui semble océanique aux vues des précédents marqueurs utilisés. Ce résultat s'oppose aux conclusions consécutives à l'analyse des rapports isotopiques du tissu total, qui semblaient indiquer que l'influence océanique était moindre au fond de lagune, et met en avant l'utilité des analyses de CSIA, en complémentarité d'autres biomarqueurs. Il semble donc que l'ensemble des diatomées de la lagune ait une origine océanique, et que la diminution de l'abondance relative des AG 16:1n-7 et 20:5n-3, observés en fond de lagune, s'explique par l'existence de la contribution d'une autre source de nourriture qui « dilue » l'importance des diatomées dans le régime alimentaire des bivalves. Des analyses quantitatives, exprimant les quantités d'acides gras en mg/g plutôt qu'en pourcentages, permettrait d'éclaircir cette hypothèse. Les micro-hétérotrophes présentent des sources diverses le long du transect, probablement d'origine océaniques aux stations proches de l'entrée et provenant de la production locale pour les individus situés en fond de lagune dont l'importance dans le régime alimentaire des bivalves est discutée ultérieurement (1.b. Caractérisation du réseau trophique microbien).

Cependant, comme expliqué dans l'introduction (cf. signature isotopique des composés spécifiques), un important biais méthodologique concernant la détermination des valeurs du fractionnement entre une source et son consommateur limite une pleine exploitation des possibilités offertes par ce biomarqueur. Ne connaissant pas la valeur de fractionnement de chaque AG, il n'a pas été possible de comparer les rapports isotopiques d'un AG entre une source et son consommateur. Cependant, des approches complémentaires (développées ultérieurement dans la discussion) peuvent être suggérées pour commencer à appréhender les différences de valeurs de fractionnement isotopiques lié à la physiologie des organismes. La co-utilisation de ces trois biomarqueurs (isotopes stables du carbone et de l'azote, acides gras de réserve et analyses isotopiques des composés spécifiques) a permis de caractériser l'étendue de l'influence des apports océaniques et leurs conséquences sur le fonctionnement trophique de la lagune. Les individus situés à l'extérieur et près de l'entrée de la lagune semblent être soumis à des variations saisonnières influencées par la dynamique saisonnière des masses d'eaux océaniques de cette région, alors que les individus en fond de lagune semblent avoir une écologie trophique plus spécifique, reflétant des processus locaux. L'importance des acides gras, communément retrouvés chez les microhétérotrophes à ces stations, suggère une importance du réseau trophique microbien, recyclant la matière organique dissoute par le biais de bactéries hétérotrophes et de leurs prédateurs unicellulaires (flagellés, ciliés). Cependant, l'utilisation conjointe de plusieurs biomarqueurs n'a pas été suffisante pour caractériser l'origine et la nature des sources basales soutenant ce réseau trophique microbien.

b. Caractérisation du réseau trophique microbien

L'association des analyses d'acides gras et de stérols (Chapitre 1) a permis de suggérer la nature des composés impliqués dans l'alimentation des bivalves dans la lagune d'Ojo de Liebre et leur variabilité spatiotemporelle. En effet, les analyses en acides gras de la GD ne montrent que peu de variations spatiales en février (Chapitre 1) et même si les compositions globales en stérols sont significativement différentes, leurs variations individuelles ne semblent pas beaucoup différencier les deux stations. En revanche, en Août des contrastes spatiaux ont été retrouvés dans les GD des bivalves. Si les individus en entrée de lagune semblent se nourrir principalement de plancton (diatomées et flagellés), ceux situés en fond de lagune ont une

alimentation plus variées. La première caractérisation de ce réseau trophique est basée sur les analyses en acides gras des lipides de réserve qui suggère que l'alimentation des individus est basée sur des flagellés dépendant de la reminéralisation bactériennes (Chapitre 1). Les analyses de stérols confirment la présence d'éléments planctoniques et suggèrent aussi que des débris de zostères entre dans le régime alimentaire des bivalves (Chapitre 1). De plus, les analyses en CSIA révèlent un appauvrissement des biomarqueurs de microhétérotrophes chez les individus en fond de lagune, soulignant une variabilité des origines de ces producteurs le long du transect. Ces points ont été abordés à la fin du chapitre concernant l'utilisation des CSIA (Chapitre 2). Si aujourd'hui aucune conclusion définitive ne peut être avancée quant à la nature et l'origine de la matière organique détritique (MOD) impliquée dans les appauvrissements en ^{13}C observés en fond de lagune, différentes hypothèses peuvent être émises.

L'importance des microhétérotrophes appauvris en ^{13}C dans le régime alimentaire des bivalves, comparé aux diatomées qui semblent pourtant être présentes aux stations en fond de lagune (Chapitre 2), pourrait s'expliquer par le fait que les bivalves se nourrissent sur deux chaînes trophiques différentes. L'une reposant sur du phytoplancton océanique en entrée de lagune (diatomées, et flagellés) et l'autre sur des microhétérotrophes impliqués dans de la reminéralisation bactérienne en fond de lagune. En effet, il a été démontré que les dinoflagellés étaient capable d'hétérotrophie (Seong *et al.* 2006; Jeong *et al.* 2010) et qu'ils se nourrissent principalement de diatomées, de bactéries et de ciliés (Hansen 1991; Sherr & Sherr 2007). La chaîne alimentaire en fond de lagune serait donc basée sur une plus grande diversité de sources, incluant non seulement des diatomées, mais également un compartiment hétérotrophe microbien, au sein duquel les interactions restent mal définies. Ces résultats démontrent que les apports océaniques (*i.e.* nutriments et/ou producteurs primaires) sont constants dans toute la baie. Mais aussi que ces apports océaniques abondants en été coïncident avec un développement de microhétérotrophes issus de la production locale (Figure 27).

Puisque les analyses en stérols révèlent la présence de Stigmastérol, on ne peut écarter définitivement la part des zostères et/ou de macroalgues dans le réseau trophique des bivalves étudiés, qui pourraient aussi être à l'origine de ces variations. Ces deux producteurs primaires sont en effet connus pour être des sources notables de Stigmastérol (Nabil & Cosson 1996; Ramírez *et al.* 2000; Lopes, Sousa, Bernardo, Andrade, Valentão, Ferreres & Mouga

2011; Santos, Vilela, Freire, Abreu, Rocha & Silvestre 2015). L'hypothèse de la présence de zostères dans le régime alimentaire de *S. crassisquama* avait pourtant été écartée par les faibles valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ observées dans les muscles des bivalves, incompatibles avec la composition des zostères, enrichie en ^{13}C (Chapitre 1 & 2). En effet, si les zostères présentent des compositions isotopiques enrichies en ^{13}C (Hemminga & Mateo 1996), de nombreuses macroalgues rouges sont caractérisées par un appauvrissement en ^{13}C (Raven *et al.* 2002), qui serait compatible avec les observations réalisées en fond de lagune. Une source macroalgale à ces composés serait donc à considérer, sans toutefois pouvoir être validée de manière définitive. En fond de lagune, les analyses de CSIA ont révélées des différences des rapports isotopiques non détectées avec les analyses du tissu total. Les analyses de composés spécifiques sur stérols pourraient apporter des précisions quant à l'origine de cette source non identifiée. Pour cela, il faudrait également pouvoir séparer les esters de stérols (correspondant aux stérols de réserve) des stérols libres (correspondant aux stérols membranaires), afin de pouvoir cibler les analyses sur la fraction des esters de stérols. Les esters de stérols, comme les acides gras de réserve, reflètent les processus alimentaire (Soudant *et al.* 1996). Pouvoir ensuite discriminer leur rapport isotopique pourrait permettre d'apporter des éléments de réponse à cette hypothèse.

Si des macroalgues et/ou zostères entrent dans la composition alimentaire des bivalves dans cette lagune, cela impliquerait également que des phénomènes de remise en suspension de la matière organique produite sont impliqués. Il a pu être observé que le Campesterol est présent dans des proportions non négligeables dans les GD des bivalves, alors qu'il est totalement absent de la MOP et présent dans la matière organique sédimentaire (MOS) (Chapitre 1). Le fait que ce stérol se retrouve dans les tissus des bivalves à des niveaux significatifs est un indice de plus mettant en avant le rôle des phénomènes de remise en suspension dans le fonctionnement trophique de la partie interne de la lagune.

Même si nous avons focalisé nos recherches sur les analyses en stérols (du fait des facilités d'analyses permises par la plateforme LIPIDOCEAN), d'autres analyses de biomarqueurs lipidiques auraient pu être mises en place. En particulier les analyses d'alkénones à longue chaînes qui sont des composés organiques hautement spécifiques de certains groupes de dinoflagellés (Schubert, Villanueva, Calvert, Cowie, Von Rad, Schulz, Berner & Erlenkeuser 1998; van der Meer, Sangiorgi, Baas, Brinkhuis, Damsté & Schouten 2008) pourraient aussi aider à discriminer les groupes taxonomiques de phytoplancton présents en fond de lagune.

Les *n*-alkanes sont eux spécifiques de groupes de macroalgues (Chevalier, Savoye, Dubois, Lama, David, Lecroart, le Ménach & Budzinski 2015) et pourraient être utile pour tracer le devenir des détritux algaux dans la MOP ou la MOS.

Au cours de cette étude, la caractérisation trophique de la lagune a souffert d'un important manque de données sur la composition des potentielles sources de nourritures. En effet, si les analyses de biomarqueurs ont pu être appliquées sur chacune des sources, leur utilisation statistique a été très limitée par le nombre de réplicats ($n < 3$). Les macroalgues, dont l'hypothèse d'une contribution a été avancée, n'ont pas été échantillonnées car très peu abondantes sur les sites d'étude. Une présence significative à l'échelle de la lagune ne peut cependant être écartée, par manque d'exploration au-delà des sites d'échantillonnage. Cette faiblesse au niveau de l'échantillonnage s'explique en partie par le fait que cette thèse s'appuyait à l'origine sur un projet de recherche de plus grande ampleur, incluant ces aspects, mais qui n'a pu finalement être financé, nous amenant à revoir à la baisse nos ambitions en termes de prélèvements de sources.

Le premier objectif aurait été de couvrir diverses zones dans la lagune, autres que les bancs échantillonnés, afin de comprendre son fonctionnement hydrodynamique, mais aussi de bien caractériser les compositions phytoplanctoniques des différentes masses d'eaux qui s'y trouvent. En effet, si les deux espèces de bivalves étudiées dans le cadre de cette thèse ne sont pas présentes au-delà de la station Datil, la plus interne, une production primaire intervenant au-delà de cette zone peut affecter l'écologie trophique des bivalves via des phénomènes de transport de détritux par courants de marée. Il était également prévu de pouvoir échantillonner hors de la lagune, particulièrement au niveau des zones de remontées d'eau profondes, situées à 200 km au Nord de la lagune (Zaytsev 2003) et ainsi de suivre la composition des masses d'eaux le long du transport. Enfin, il était prévu d'échantillonner en haute fréquence dans le but de bien suivre les variations mensuelles des masses d'eaux océaniques potentiellement influencées par l'alternance des périodes de haute intensités et de basses intensités des cycles d'upwelling décrits dans la région (Du et al. 2015).

Du fait de l'impossibilité de réaliser ce travail de terrain, un travail bibliographique a donc été réalisé pour essayer de combler aux mieux ces lacunes mais le faible nombre de données disponibles sur les caractéristiques de ce milieu n'a pas permis une caractérisation plus fine de la nature des sources de nourriture potentielles.

2. Ecophysiologie des bivalves filtreurs soumis à des variations environnementales

L'étude de l'écologie trophique des organismes marins par des approches de biomarqueurs est basée sur un certain nombre de postulats qui ne sont pas toujours vérifiés. Ces approches sont notamment basées sur deux hypothèses, d'abord sur le fait que les sources ont des compositions différentes, ainsi que sur l'idée que le traceur (lipidique ou isotopique) est conservé lors du transfert de matière le long de la chaîne trophique. Or, les résultats des analyses isotopiques sur composés spécifiques obtenus au cours de cette étude démontrent bien la nécessité de comprendre comment le signal isotopique et/ou lipidique peut être modifié lors du transfert de matière de la source au consommateur. Il semble donc primordial de comprendre non seulement comment les variations des ressources trophiques influencent l'alimentation des bivalves mais aussi quelles répercussions cela va avoir sur les régulations physiologiques des organismes et quelles répercussions les besoins physiologiques vont avoir sur la régulation des assimilations des ressources trophiques.

a. Influences trophique sur les compositions membranaires

Les cellules membranaires des bivalves sont composées de deux groupes d'AG, principalement présents sous la forme de phospholipides. On y retrouve les AG biosynthétisés (*i.e.* NMI, des acides gras monoinsaturés, AGMI), et ceux que les organismes doivent acquérir via leur alimentation car ils ne sont pas capables de les biosynthétiser (AG polyinsaturés, AGPI essentiels). Les facteurs biotiques (*i.e.* la croissance, la reproduction), et abiotiques (*i.e.* changements de température, de pH), ainsi que la disponibilité en ressources trophiques, vont influencer les régulations des deux pools d'AG membranaires (Delaporte *et al.* 2005; Hayward *et al.* 2007). La composition en acides gras des lipides membranaires est donc sous forte contrainte métabolique afin de répondre aux besoins inhérents des membranes, en termes de fonctionnalité (*e.g.* fluidité membranaire) notamment (Kraffe *et al.* 2004; Pernet *et al.* 2007; Barnathan 2009). Or, les études en physiologie des réponses des organismes aux facteurs environnementaux ont tendance à ne pas prendre en compte l'influence des variations des ressources trophiques dans les régulations physiologiques induites par

l'organisme, et inversement les écologistes décrivent des habitudes alimentaires sans prendre garde aux besoins physiologiques des organismes étudiés et des régulations qui en découlent. Dans le contexte du changement de dominance entre les deux espèces de bivalves, observé au sein de la lagune d'Ojo de Liebre depuis quelques années, il a semblé intéressant de pouvoir étudier quelles étaient les variations du régime alimentaire des bivalves, mais aussi leurs impact sur les régulations physiologiques. Dans le dernier chapitre de cette thèse, il a été démontré que la composition en acides gras membranaires des branchies était non seulement induite par les variations des facteurs abiotiques tels que le changement de température, mais aussi par les variations des ressources trophiques.

En effet, la composition en AG des lipides membranaires peut être influencée à deux niveaux (Figure 27). Le premier est le flux d'AG venant directement des ressources trophiques ingérés par l'organisme et dont la composition est influencée par la variabilité de la disponibilité dans l'environnement. Dans cette étude, les bivalves situés en entrée ou en fond de lagune présentent a priori les mêmes besoins physiologiques mais n'ont pas les mêmes compositions en lipides membranaires (Chapitre 3). Ces différences sont dues aux AG assimilés directement après ingestion de matière organique, c'est-à-dire qui n'ont pas subi de modifications, et semblent principalement être composés d'AGPI essentiels (*i.e.* 20:5n-3, 20:4n-6, 22:6n-3). Le second est le flux des lipides de réserve remobilisés pour le bon fonctionnement physiologique de l'organisme et qui est influencé à la fois par les variables environnementales et par les besoins physiologiques de l'organisme.

Dans un contexte où la nourriture n'est pas limitante, les lipides sont stockés dans des organes de réserve (*i.e.* la glande digestive pour les mollusques, le foie pour les poissons et mammifères), puis remobilisés pour la croissance, la reproduction, ou le maintien de l'organisme. Si les ressources trophiques sont suffisantes, on peut considérer que la composition en AG des lipides de réserves est une bonne approximation des ressources alimentaires utilisées par l'organisme. Cependant, si les ressources trophiques viennent à manquer, ce pool d'AG de réserve va être remobilisé afin de répondre aux besoins de l'organisme. Dans ces conditions, que l'on peut par exemple retrouver en hiver, en dehors des périodes de forte production phytoplanctonique, on peut se demander si les acides gras de réserve reflètent toujours pleinement le régime alimentaire des bivalves, ou si la remobilisation des acides gras pour combler les besoins physiologiques affecte la composition du pool de lipides de réserves de manière suffisamment importante pour rendre l'étude de sa

composition inadaptée aux travaux d'écologie trophique. Dans ce cas précis, étudier la composition des lipides totaux des organes de réserve (des lipides de réserve et des membranes) pourrait représenter une alternative plus fiable.

Les travaux de thèse de (Nérot 2011) ont mis en évidence que la variabilité spatiale des ressources alimentaires de *Pecten maximus* influençait non seulement l'écologie trophique des bivalves mais aussi leur physiologie. En effet, les compositions lipidiques des glandes digestives révélaient une différence spatiale des ressources alimentaires, alors que les analyses des compositions lipidiques des muscles ont exposé un contraste des états physiologiques des individus le long d'un transect côte-large, révélant les différentes stratégies métaboliques et reproductives adoptées par les bivalves. Ces résultats et ceux de la présente thèse mettent en avant la pertinence d'analyser différents tissus dans le but d'élargir les perspectives dans la compréhension de l'interaction des phénomènes trophiques et écophysiologiques.

A l'inverse il a été démontré qu'à partir d'un certain seuil de lipides totaux accumulés, les tissus musculaires de *Cyprinus carpio*, qui sont fortement soumis aux régulations métaboliques, pouvaient refléter l'alimentation des individus (Schultz, Koussoroplis & Kainz 2018). Il semblerait donc que si les conditions alimentaires sont satisfaisantes, le choix du tissu pour les analyses trophiques pourrait ne pas se restreindre aux tissus de réserve, ce qui faciliterait l'échantillonnage de certaines espèces à valeurs commerciales. Cependant, il n'a pas été démontré que le seuil de 60 mg.g^{-1} de poids sec de lipides totaux retrouvé dans l'étude de Schultz et al. (2018) puisse s'appliquer à toutes les espèces.

Ces différentes études montrent que les lipides membranaires ne sont pas des filtres absolus et que malgré la remobilisation sélective, ils peuvent être fortement dépendant des compositions lipidiques des ressources alimentaires, en plus des remobilisations métaboliques. Dans le but de caractériser ces flux, plusieurs perspectives peuvent être envisagées et l'une d'elles est décrite ultérieurement.

b. Apports du CSIA sur les fractionnements physiologiques

L'une des principales limites à l'utilisation des acides gras (et de tout biomarqueur moléculaire de manière générale) est l'incertitude concernant l'origine trophique ou métabolique des composés analysés chez un consommateur. Afin d'appréhender l'impact du métabolisme sur

la composition en acides gras, des mesures de fractionnements isotopiques sur des molécules d'AG lors des voies de bioconversions peuvent être envisagées. Ces mesures pourraient permettre une caractérisation à fine échelle des transferts de matière au cours de la biosynthèse. On peut distinguer deux types de fractionnement, qui seront appelés dans cette discussion « trophique » et « physiologique ».

Le fractionnement « trophique » est lié à l'ingestion d'un AG de la proie vers le consommateur (1 « Trophic FA » -Figure 26). En effet, il a été montré que les composés les plus légers sont préférentiellement assimilés (Chamberlain, Bull, Black, Ineson & Evershed 2006) mais aussi que lors de leur intégration dans les lipides du consommateur, les enzymes catalysant ces réactions pourraient, par des étapes d'hydrolyses et d'estérification, induire un fractionnement isotopiques (Bec *et al.* 2011), résultant en des valeurs de ^{13}C plus basses. Les AG provenant des lipides de réserve des GD reflètent les apports alimentaires puisqu'ils sont supposés être stockés sans modifications significatives par rapport à la nourriture (Budge *et al.* 2006) et semblent donc être sujets à ces réactions.

Le fractionnement « physiologique » peut être induit par la bioconversion de deux sortes de composés, un composé lipidique (*i.e.* AG saturé ou monoinsaturé) ou un composé non lipidiques (*i.e.* Acétyl-CoA). Dans le cas d'un précurseur non lipidique, les réactions enzymatiques d'oxydation des pyruvates en acétyl-coA engendrent une sélection prioritaires des pyruvates les plus légers (DeNiro & Epstein 1977) et donc les AG synthétisé *de novo* auront des $\delta^{13}\text{C}$ plus faibles que leurs précurseurs.

Le fractionnement « physiologique » provenant d'un précurseur lipidique résulte en des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ de l'AG incorporé plus faibles dans le consommateur que dans les proies (1 - Figure 26), alors que l'AG obtenu par bioconversion aura des valeurs plus basses (2 « Bioconvert FA »- Figure 26) que son précurseur (Monson & Hayes 1982; Bec *et al.* 2011). En effet, durant la bioconversion d'un AG, les réactions d'élongation et de désaturation vont favoriser les précurseurs les plus légers, ce qui va résulter en des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ de l'AG bioconverti plus faibles que les précurseurs alimentaires. D'après les règles du bilan massique, le pool d'AG restant chez le consommateur (3 « Metabolized FA » Figure 26) va donc être plus enrichi en ^{13}C que ceux venant de l'alimentation (Bec *et al.* 2011). Même si des études ont démontré des résultats contraires (Bec *et al.* 2011), d'autres analyses seraient nécessaires à la bonne compréhension de ces phénomènes. Les AG des lipides membranaires sont supposés être soumis aux contraintes métaboliques et physiologiques (Soudant, Van Ryckeghem,

Marty, Moal, Samain & Sorgeloos 1999), il est donc fort probable que cette fraction lipidique soit plus fortement soumise aux réactions de fractionnements physiologiques décrites

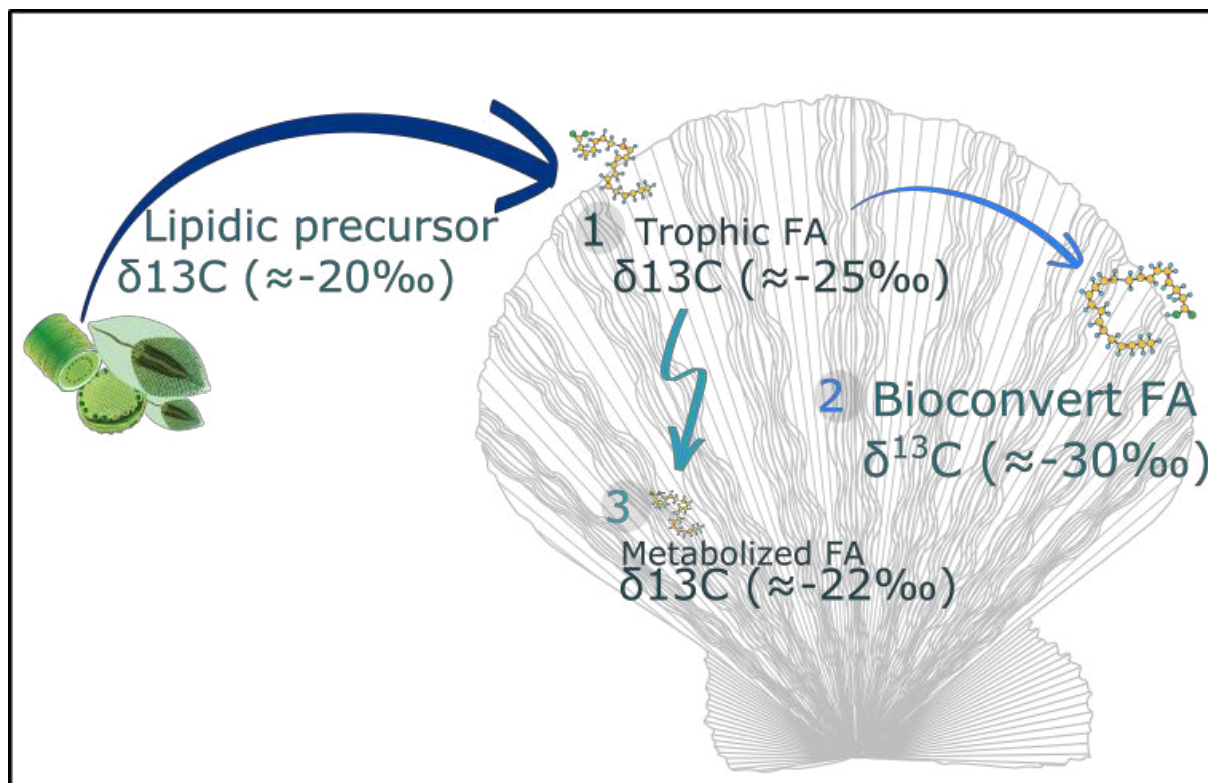


Figure 26. Illustration des valeurs de fractionnements isotopiques du carbone d'un acide gras (AG) provenant d'un précurseur lipidique chez son consommateur. Le flux (1) représente le fractionnement « trophique » du à l'ingestion d'une proie, le (2) le fractionnement « physiologique » du aux élongations et désaturations d'un acides gras afin d'obtenir un AG dit bioconverti, le (3) représente le pool restant chez le consommateur après bioconversion d'un acide gras.

précédemment.

Analyser les valeurs isotopiques après assimilation d'AG artificiellement enrichis en ^{13}C pourrait être utile afin de (1) quantifier les flux des lipides alimentaires vers les lipides de réserve et vers les lipides membranaires, puis de (2) caractériser le flux des lipides de réserve vers les lipides membranaires. Une approche expérimentale pourrait être mise en place afin de caractériser les fractionnements trophiques et physiologiques entre un producteur primaire et un consommateur primaire. Durant l'expérimentation, des bivalves pourraient être nourris avec des diatomées enrichies en ^{13}C et dont les compositions lipidiques ainsi que les valeurs en $\delta^{13}\text{C}$ de chaque AG seraient connues. Dans un premier temps, les valeurs isotopiques des AG enrichis (notamment le 16:1n-1, 16:1n-7, et 20:5n-3) seraient suivies cinétiquement dans les lipides de réserve et dans les lipides membranaires. Cette étape permettrait d'obtenir un proxy de l'incorporation des lipides alimentaires dans chacune des

fractions lipidiques. Dans un second temps, un arrêt de l'alimentation serait réalisé, afin de stimuler la remobilisation des lipides de réserves pour combler les besoins physiologiques, en termes de composition membranaire notamment. Le suivi de la composition isotopique des différents AG des pools de lipides neutres et polaires permettrait ainsi la caractérisation du fractionnement associé à cette remobilisation. Le fait de nourrir les bivalves avec une microalgues comportant différents AG enrichis pourrait aussi permettre de déterminer les coefficients de fractionnement lié à la longueur de la chaîne carbonée.

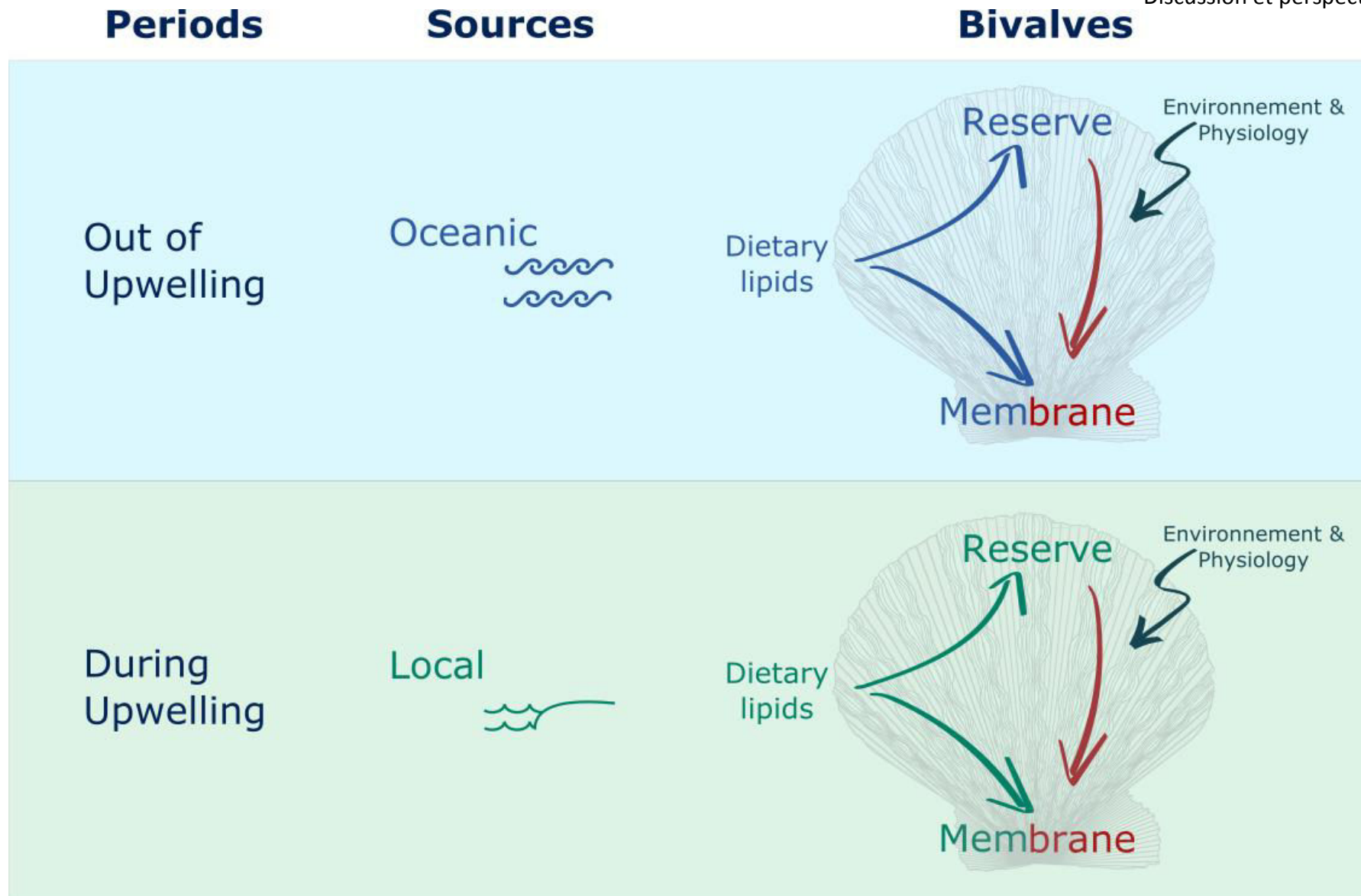


Figure 27. Schéma récapitulatif des influences saisonnières sur les ressources trophiques des bivalves en fond de lagune, et leur répercussion sur le métabolisme. Les flèches décrivent les flux de lipides ingérés et métabolisés par les bivalves, les éclairs désignent les facteurs qui peuvent influencer la régulation de ces flux.

3. Conclusion

Si les résultats obtenus dans cette étude ne permettent pas d'apporter une explication au récent déclin de *Nodipecten subnodosus*, ils éliminent l'hypothèse d'un rôle des facteurs trophiques, du fait de l'absence de différence entre les deux espèces étudiées. La lagune d'Ojo de Liebre est caractérisée par une dominance des apports océaniques à proximité de l'embouchure, alors que d'autres sources de nourriture contribuent dans la partie interne. L'importance des processus écologiques locaux met en évidence la nécessité de prendre en compte les particularités spécifiques au système étudié (production primaire locale et côtière, topographie) pour comprendre les importances relatives des apports allochtones et locaux dans le fonctionnement écologique d'une lagune.

Aussi, l'utilisation des CSIA sur AG a souligné les limites méthodologiques auxquelles fait face la communauté scientifique. Dans l'optique de pouvoir lever ces biais analytiques, il s'avère que la pleine compréhension des processus de fractionnement doit allier approches expérimentales et études *in situ*. Cette considération reste particulièrement nécessaire dans des contextes environnementaux contrastés, afin de comprendre comment les organismes font face aux variabilités environnementales.

Cette étude souligne également la complexité des processus écologiques intervenant dans les écosystèmes côtiers soumis à de multiples influences, appuyant ainsi l'importance d'allier la compréhension des facteurs trophiques avec des approches que l'on pourrait qualifier d'« écophysiologie trophique ».

BIBLIOGRAPHIE

- Abrajo TA, Murphy DE, Fang J, Comet P & Brooks JM (1994) $^{13}\text{C}^{12}\text{C}$ ratios in individual fatty acids of marine mytilids with and without bacterial symbionts. *Org Geochem* 21:611–617.
- Alfaro AC, Thomas F, Sergent L & Duxbury M (2006) Identification of trophic interactions within an estuarine food web (northern New Zealand) using fatty acid biomarkers and stable isotopes. *Estuar Coast Shelf Sci* 70:271–286.
- Allan EL, Ambrose ST, Richoux NB & Froneman PW (2010) Determining spatial changes in the diet of nearshore suspension-feeders along the South African coastline: Stable isotope and fatty acid signatures. *Estuar Coast Shelf Sci* 87:463–471.
- Altabet MA, Pilskaln C, Thunell R, Pride C, Sigman D, Chavez F & Francois R (1999) The nitrogen isotope biogeochemistry of sinking particles from the margin of the Eastern North Pacific. *Deep Sea Res Part Oceanogr Res Pap* 46:655–679.
- Arellano-Martinez M (2004) Reproduction of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* sowerby, 1835 (Bivalvia: Pectinidae) from Laguna Ojo de Liebre, B.C.S., Mexico. Available at: <http://www.biomedsearch.com/article/Reproduction-lions-paw-scallop-Nodipecten/130777657.html>. (accessed April 12, 2017).
- 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*:257–263.
- Bachelet G, De Montaudouin X, Auby I & Labourg P-J (2000) Seasonal changes in macrophyte and macrozoobenthos assemblages in three coastal lagoons under varying degrees of eutrophication. *ICES J Mar Sci* 57:1495–1506.
- Bachok Z, Mfilinge PL & Tsuchiya M (2003) The diet of the mud clam *Geloina coaxans* (Mollusca, Bivalvia) as indicated by fatty acid markers in a subtropical mangrove forest of Okinawa, Japan. *J Exp Mar Biol Ecol* 292:187–197.
- Barnathan G (2009) Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: occurrence, characterization and biological properties. *Biochimie* 91:671–678.
- Barrios-Ruiz D, Chávez-Villalba J & Cáceres-Martínez C (2003) Growth of *Nodipecten subnodosus* (Bivalvia: Pectinidae) in La Paz Bay, Mexico. *Aquac Res* 34:633–639.
- Beastall GH, Rees HH & Goodwin TW (1971) Sterols in *Porphyridium cruentum*. *Tetrahedron Lett* 12:4935–4938.
- Bec A, Perga M-E, Desvillettes C & Bourdier G (2010) How well can the fatty acid content of lake seston be predicted from its taxonomic composition? *Freshw Biol* 55:1958–1972.
- Bec A, Perga M-E, Koussoroplis A, Bardoux G, Desvillettes C, Bourdier G & Mariotti A (2011) Assessing the reliability of fatty acid-specific stable isotope analysis for trophic studies. *Methods Ecol Evol* 2:651–659.

- Braeckman U, Provoost P, Sabbe K, Soetaert K, Middelburg JJ, Vincx M & Vanaverbeke J (2012) Temporal dynamics in the diet of two marine polychaetes as inferred from fatty acid biomarkers. *J Sea Res* 68:6–19.
- Budge SM, Iverson SJ & Koopman HN (2006) Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: a primer on analysis and interpretation. *Mar Mammal Sci* 22:759–801.
- Budge SM, Wooller MJ, Springer AM, Iverson SJ, McRoy CP & Divoky GJ (2008) Tracing carbon flow in an arctic marine food web using fatty acid-stable isotope analysis. *Oecologia* 157:117–129.
- Cabello-Pasini A, Muñiz-Salazar R & Ward DH (2003) Annual variations of biomass and photosynthesis in *Zostera marina* at its southern end of distribution in the North Pacific. *Aquat Bot* 76:31–47.
- Caers M, Coutteau P, Lombeida P & Sorgeloos P (1998) The effect of lipid supplementation on growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* spat. *Aquaculture* 162:287–299.
- Carabias LJ, Provencio E, de la Maza EJ, Gutiérrez CD, Gómez CM & Sánchez SV (2000) Programa de Manejo Reserva de la Biosfera El Vizcaíno, México. Inst Nac Ecol México DF México.
- Caraveo-Patino J, Hobson KA & Soto LA (2007) Feeding ecology of gray whales inferred from stable-carbon and nitrogen isotopic analysis of baleen plates. *Hydrobiologia* 586:17–25.
- Carlier A, Riera P, Amouroux J-M, Bodiou J-Y, Desmalades M & Grémare A (2008) Food web structure of two Mediterranean lagoons under varying degree of eutrophication. *J Sea Res* 60:264–275.
- Carlier A, Riera P, Amouroux J-M, Bodiou J-Y, Escoubeyrou K, Desmalades M, Caparros J & Grémare A (2007) A seasonal survey of the food web in the Lapalme Lagoon (northwestern Mediterranean) assessed by carbon and nitrogen stable isotope analysis. *Estuar Coast Shelf Sci* 73:299–315.
- Chamberlain PM, Bull ID, Black HIJ, Ineson P & Evershed RP (2006) The effect of diet on isotopic turnover in Collembola examined using the stable carbon isotopic compositions of lipids. *Soil Biol Biochem* 38:1146–1157.
- Chauvaud L, Donval A, Thouzeau G, Paulet Y-M & Nézan E (2001) Variations in food intake of *Pecten maximus* (L.) from the Bay of Brest (France): Influence of environmental factors and phytoplankton species composition. *Comptes Rendus Acad Sci-Ser III-Sci Vie* 324:743–755.
- Chenillat F (2011) Variabilité de structure et de fonctionnement d'un écosystème de bord est: Application à l'upwelling de Californie.

- Chevalier N, Savoye N, Dubois S, Lama ML, David V, Lecroart P, le Ménach K & Budzinski H (2015) Precise indices based on n-alkane distribution for quantifying sources of sedimentary organic matter in coastal systems. *Org Geochem* 88:69–77.
- Chouvelon T, Schaal G, Grall J, Pernet F, Perdriau M, A-Pernet EJ & Le Bris H (2015) Isotope and fatty acid trends along continental shelf depth gradients: Inshore versus offshore hydrological influences on benthic trophic functioning. *Prog Oceanogr* 138:158–175.
- Clavier J, Chauvaud L, Amice E, Lazure P, Van Der Geest M, Labrosse P, Diagne A, Carlier A & Chauvaud S (2014) Benthic metabolism in shallow coastal ecosystems of the Banc d'Arguin, Mauritania. *Mar Ecol Prog Ser* 501:11–23.
- Cloern JE, Foster SQ & Kleckner AE (2014) Phytoplankton primary production in the world's estuarine-coastal ecosystems. *Biogeosciences* 11:2477–2501.
- Cloern JE & Jassby AD (2008) Complex seasonal patterns of primary producers at the land–sea interface. *Ecol Lett* 11:1294–1303.
- Colombo SM, Parrish CC & Whitticar MJ (2016) Fatty acid stable isotope signatures of molluscs exposed to finfish farming outputs. *Aquac Environ Interact* 8:611–617.
- Coma R, Ribes M, Gili J-M & Hughes RN (2001) The ultimate opportunists: consumers of seston. *Mar Ecol Prog Ser* 219:305–308.
- Connolly RM, Guest MA, Melville AJ & Oakes JM (2004) Sulfur stable isotopes separate producers in marine food-web analysis. *Oecologia* 138:161–167.
- Core Team R (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Costanza R, d'Arge R, De Groot R, Farber S, Grasso M, Hannon B, Limburg K, Naeem S, O'Neill RV & Paruelo J (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *nature* 387:253.
- Crandall JB, Teece MA, Estes BA, Manfrino C & Ciesla JH (2016) Nutrient acquisition strategies in mesophotic hard corals using compound specific stable isotope analysis of sterols. *J Exp Mar Biol Ecol* 474:133–141.
- Crespo Guerrero JM & Pelcastre AJ (2016) Organización del sector pesquero comercial ribereño en la Reserva de la Biosfera El Vizcaíno (México). *Rev Geográfica Venez* 57:236–259.
- 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.
- Dame RF (2016) Ecology of marine bivalves: an ecosystem approach. CRC press.
- Dame RF (1993) The role of bivalve filter feeder material fluxes in estuarine ecosystems. In: *Bivalve filter feeders*. Springer. pp. 245–269.

- Decottignies P, Beninger PG, Rincé Y, Robins RJ & Riera P (2007) Exploitation of natural food sources by two sympatric, invasive suspension-feeders: *Crassostrea gigas* and *Crepidula fornicata*. *Mar Ecol Prog Ser* 334:179–192.
- Delaporte M, Soudant P, Moal J, Kraffe E, Marty Y & Samain J-F (2005) Incorporation and modification of dietary fatty acids in gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 140:460–470.
- Delaunay F, Marty Y, Moal J & Samain J-F (1993) The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *J Exp Mar Biol Ecol* 173:163–179.
- DeNiro MJ & Epstein S (1977) Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science* 197:261–263.
- Desvillettes CH, Bourdier G, Amblard CH & Barth B (1997) Use of fatty acids for the assessment of zooplankton grazing on bacteria, protozoans and microalgae. *Freshw Biol* 38:629–637.
- Dray S, Chessel D & Thioulouse J (2003) Co-inertia analysis and the linking of ecological data tables. *Ecology* 84:3078–3089.
- Du X, Peterson W & O'Higgins L (2015) Interannual variations in phytoplankton community structure in the northern California Current during the upwelling seasons of 2001–2010. *Mar Ecol Prog Ser* 519:75–87.
- Evershed RP, Bull ID, Corr LT, Crossman ZM, van Dongen BE, Evans CJ, Jim S, Mottram HR, Mukherjee AJ & Pancost RD (2007) Compound-specific stable isotope analysis in ecology and paleoecology. *Stable Isot Ecol Environ Sci*:480.
- Falkowski PG (1991) Species variability in the fractionation of ^{13}C and ^{12}C by marine phytoplankton. *J Plankton Res* 13:21–28.
- Fenton GE & Ritz DA (1988) Changes in carbon and hydrogen stable isotope ratios of macroalgae and seagrass during decomposition. *Estuar Coast Shelf Sci* 26:429–436.
- Folch J, Lees M & Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509.
- Fourqurean JW & Schrlau JE (2003) Changes in nutrient content and stable isotope ratios of C and N during decomposition of seagrasses and mangrove leaves along a nutrient availability gradient in Florida Bay, USA. *Chem Ecol* 19:373–390.
- France RL (1995) Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: foodweb implications. *Mar Ecol Prog Ser* 124:307–312.
- Frontier S, Pichod-Viale D, Leprêtre A, Davoult D & Luczak C (2008) Ecosystèmes. Structure, fonctionnement, évolution. Dunod, 4ème édition, Paris.

- 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.
- Fry B, Scalan RS, Winters JK & Parker PL (1982) Sulphur uptake by salt grasses, mangroves, and seagrasses in anaerobic sediments. *Geochim Cosmochim Acta* 46:1121–1124.
- Fry B & Sherr EB (1989) $\Delta^{13}\text{C}$ measurements as indicators of carbon flow in marine and freshwater ecosystems. In: *Stable isotopes in ecological research*. Springer. pp. 196–229.
- Gaillard B, Meziane T, Tremblay R, Archambault P, Blicher ME, Chauvaud L, Rysgaard S & Olivier F (2017) Food resources of the bivalve *Astarte elliptica* in a sub-Arctic fjord: a multi-biomarker approach. *Mar Ecol Prog Ser* 567:139–156.
- Gattuso J-P, Frankignoulle M & Wollast R (1998) Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. *Annu Rev Ecol Syst* 29:405–434.
- Giner JL (1993) Biosynthesis of marine sterol side chains. *Chem Rev* 93:1735–1752.
- Giner JL & Djerassi C (1991) Biosynthetic studies of marine lipids. Biosynthesis of dinosterol, peridinosterol and gorgosterol: unusual patterns of bioalkylation in dinoflagellate sterols. *J Org Chem* 56:2357–2363.
- Giner J-L, Zhao H, Dixon MS & Wikfors GH (2016) Bioconversion of ^{13}C -labeled microalgal phytosterols to cholesterol by the Northern Bay scallop, *Argopecten irradians irradians*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 192:1–8.
- Gladyshev MI, Sushchik NN, Makhutova ON & Kalachova GS (2014) Trophic fractionation of isotope composition of polyunsaturated fatty acids in the trophic chain of a river ecosystem. In: *Doklady. Biochemistry and biophysics*. Springer Science & Business Media. p. 4.
- Glaser PE & Gross RW (1994) Plasmamembranolethanolamine facilitates rapid membrane fusion: a stopped-flow kinetic investigation correlating the propensity of a major plasma membrane constituent to adopt an HII phase with its ability to promote membrane fusion. *Biochemistry (Mosc)* 33:5805–5812.
- González-Ortiz L, Hernández-Alcántara P, Vázquez-Juárez R, Quiroz-Guzmán E, García-Garza ME & de León-González JÁ (2017) Variación espacial y temporal de la infestación de la concha por *Polydora* sp. (Spionidae: Polychaeta) sobre la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) en la laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur. *Rev Mex Biodivers* 88:845–852.
- Graham C, Oxtoby L, Wang SW, Budge SM & Wooller MJ (2014) Sourcing fatty acids to juvenile polar cod (*Boreogadus saida*) in the Beaufort Sea using compound-specific stable carbon isotope analyses. *Polar Biol* 37:697–705.

- Grall J & Chauvaud L (2002) Marine eutrophication and benthos: the need for new approaches and concepts. *Glob Change Biol* 8:813–830.
- Grall J, Le Loc'h F, Guyonnet B & Riera P (2006) Community structure and food web based on stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) analysis of a North Eastern Atlantic maerl bed. *J Exp Mar Biol Ecol* 338:1–15.
- Grangeré K, Lefebvre S & Blin J-L (2012) Spatial and temporal dynamics of biotic and abiotic features of temperate coastal ecosystems as revealed by a combination of ecological indicators. *Estuar Coast Shelf Sci* 108:109–118.
- Guo F, Bunn SE, Brett MT, Fry B, Hager H, Ouyang X & Kainz MJ (2018) Feeding strategies for the acquisition of high-quality food sources in stream macroinvertebrates: Collecting, integrating, and mixed feeding. *Limnol Oceanogr*.
- Hansen PJ (1991) Quantitative importance and trophic role of heterotrophic dinoflagellates in a coastal pelagial food web. *Mar Ecol Prog Ser* 73:253–261.
- Harris G (2008) Lagoons. In: *Ecosystem ecology*. Elsevier. pp. 296–303.
- Hayward SA, Murray PA, Gracey AY & Cossins AR (2007) Beyond the lipid hypothesis: mechanisms underlying phenotypic plasticity in inducible cold tolerance. In: *Molecular aspects of the stress response: chaperones, membranes and networks*. Springer. pp. 132–142.
- Hazel JR (1995) Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu Rev Physiol* 57:19–42.
- Hazel JR & Williams EE (1990) The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog Lipid Res* 29:167–227.
- Hemminga MA & Mateo MA (1996) Stable carbon isotopes in seagrasses: variability in ratios and use in ecological studies. *Mar Ecol Prog Ser* 140:285–298.
- Hill JM & McQuaid CD (2008) $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ biogeographic trends in rocky intertidal communities along the coast of South Africa: Evidence of strong environmental signatures. *Estuar Coast Shelf Sci* 80:261–268.
- Hobson KA & Wassenaar LI (2018) Tracking animal migration with stable isotopes. Academic Press.
- Holden MJ & Patterson GW (1991) Absence of sterol biosynthesis in oyster tissue culture. *Lipids* 26:81–82.
- Hurtado MA, Racotta IS, Arcos F, Morales-Bojórquez E, Moal J, Soudant P & Palacios E (2012) Seasonal variations of biochemical, pigment, fatty acid, and sterol compositions in female *Crassostrea corteziensis* oysters in relation to the reproductive cycle. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 163:172–183.

- Hyndes GA & Lavery PS (2005) Does transported seagrass provide an important trophic link in unvegetated, nearshore areas? *Estuar Coast Shelf Sci* 63:633–643.
- Ibarra-Obando SE, Camacho-Ibar VF, Carriquiry JD & Smith SV (2001) Upwelling and lagoonal ecosystems of the dry Pacific coast of Baja California. In: *Coastal Marine Ecosystems of Latin America*. Springer. pp. 315–330.
- Irazú CE, Pollero RJ & Brenner RR (1988) Fitosterol effect upon microsomal membrane microviscosity of the mollusc *Diplodon delodontus*. *Comp Biochem Physiol Part B Comp Biochem* 89:465–470.
- Iverson SJ, Field C, Don Bowen W & Blanchard W (2004) Quantitative fatty acid signature analysis: a new method of estimating predator diets. *Ecol Monogr* 74:211–235.
- Jaffé R, Rushdi AI, Medeiros PM & Simoneit BRT (2006) Natural product biomarkers as indicators of sources and transport of sedimentary organic matter in a subtropical river. *Chemosphere* 64:1870–1884.
- Jaschinski S, Brepohl DC & Sommer U (2008) Carbon sources and trophic structure in an eelgrass *Zostera marina* bed, based on stable isotope and fatty acid analyses. *Mar Ecol Prog Ser* 358:103–114.
- Jeong HJ, Du Yoo Y, Kim JS, Seong KA, Kang NS & Kim TH (2010) Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. *Ocean Sci J* 45:65–91.
- Kainz M, Lucotte M & Parrish CC (2002) Methyl mercury in zooplankton the role of size, habitat, and food quality. *Can J Fish Aquat Sci* 59:1606–1615.
- Kanazawa A (2001) Sterols in marine invertebrates. *Fish Sci* 67:997–1007.
- Kang CK, Sauriau P-G, Richard P & Blanchard GF (1999) Food sources of the infaunal suspension-feeding bivalve *Cerastoderma edule* in a muddy sandflat of Marennes-Oléron Bay, as determined by analyses of carbon and nitrogen stable isotopes. *Mar Ecol Prog Ser*:147–158.
- Kelly JF (2000) Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Can J Zool* 78:1–27.
- Kelly JR & Scheibling RE (2012a) Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs. *Mar Ecol Prog Ser* 446:1–22.
- Kelly & Scheibling (2012b) Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs. Available at: https://dalspace.library.dal.ca/bitstream/handle/10222/29637/Kelly_m446p001.pdf?sequence=1&isAllowed=y. (accessed May 2, 2017).
- Kerr RG & Baker BJ (1991) Marine sterols. *Nat Prod Rep* 8:465–497.

- Kharlamenko VI, Kiyashko SI, Imbs AB & Vyshkvartzev DI (2001) Identification of food sources of invertebrates from the seagrass *Zostera marina* community using carbon and sulfur stable isotope ratio and fatty acid analyses. *Mar Ecol Prog Ser* 220:103–117.
- Kim SL, del Rio CM, Casper D & Koch PL (2012) Isotopic incorporation rates for shark tissues from a long-term captive feeding study. *J Exp Biol* 215:2495–2500.
- Kjerfve B (1994) *Coastal Lagoon Processes*. Elsevier.
- Knauer J, Kerr RG, Lindley D & Southgate PC (1998) Sterol metabolism of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 119:81–84.
- Knauer J & Southgate PC (1997) Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a spray-dried freshwater microalga (*Spongiococcum excentricum*) and microencapsulated lipids. *Aquaculture* 154:293–303.
- Koussoroplis A-M, Bec A, Perga M-E, Koutrakis E, Desvillettes C & Bourdier G (2010) Nutritional importance of minor dietary sources for leaping grey mullet *Liza saliens* (Mugilidae) during settlement: insights from fatty acid $\delta^{13}\text{C}$ analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 404:207–217.
- Kraak MHS, Scholten MCT, Peeters WHM & de Kock WC (1991) Biomonitoring of heavy metals in the Western European rivers Rhine and Meuse using the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Environ Pollut* 74:101–114.
- Kraffe E, Grall J, Palacios E, Guerra C, Soudant P & Marty Y (2010) Occurrence of the cis-4, 7, 10, trans-13-22: 4 fatty acid in the family Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). *Lipids* 45:437–444.
- Kraffe E, Soudant P & Marty Y (2004) Fatty acids of serine, ethanolamine, and choline plasmalogens in some marine bivalves. *Lipids* 39:59–66.
- Langdon C & Waldock MJ (1981) The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J Mar Biol Assoc U K* 61:431–448.
- Lavaud R, Artigaud S, Le Grand F, Donval A, Soudant P, Flye-Sainte-Marie J, Strohmeier T, Strand Ø, Leynaert A & Beker B (2018) New insights into the seasonal feeding ecology of *Pecten maximus* using pigments, fatty acids and sterols analyses. *Mar Ecol Prog Ser* 590:109–129.
- Layman CA, Araujo MS, Boucek R, Hammerschlag-Peyer CM, Harrison E, Jud ZR, Matich P, Rosenblatt AE, Vaudo JJ & Yeager LA (2012) Applying stable isotopes to examine food-web structure: an overview of analytical tools. *Biol Rev* 87:545–562.
- Le Croizier G, Schaal G, Gallon R, Fall M, Le Grand F, Munaron J-M, Rouget M-L, Machu E, Le Loc'H F & Laë R (2016) Trophic ecology influence on metal bioaccumulation in marine fish: Inference from stable isotope and fatty acid analyses. *Sci Total Environ* 573:83–95.

- Le Grand F, Kraffe E, Marty Y, Donaghy L & Soudant P (2011a) Membrane phospholipid composition of hemocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 159:383–391.
- Le Grand F, Kraffe E, Marty Y, Donaghy L & Soudant P (2011b) Membrane phospholipid composition of hemocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 159:383–391.
- Le Grand F, Soudant P, Marty Y, Le Goïc N & Kraffe E (2013) Altered membrane lipid composition and functional parameters of circulating cells in cockles (*Cerastoderma edule*) affected by disseminated neoplasia. *Chem Phys Lipids* 167:9–20.
- Le Grand FL, Soudant P, Siah A, Tremblay R, Marty Y & Kraffe E (2014) Disseminated Neoplasia in the soft-shell Clam *Mya arenaria*: membrane lipid composition and functional parameters of circulating cells. *Lipids* 49:807–818.
- Lefebvre S, Harma C & Blin J-L (2009) Trophic typology of coastal ecosystems based on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ ratios in an opportunistic suspension feeder. *Mar Ecol Prog Ser* 390:27–37.
- Leray C, Cazenave J-P & Gachet C (2002) Platelet phospholipids are differentially protected against oxidative degradation by plasmalogens. *Lipids* 37:285–290.
- Levin LA, Boesch DF, Covich A, Dahm C, Erséus C, Ewel KC, Kneib RT, Moldenke A, Palmer MA & Snelgrove P (2001) The function of marine critical transition zones and the importance of sediment biodiversity. *Ecosystems* 4:430–451.
- Levinton J (1972) Stability and trophic structure in deposit-feeding and suspension-feeding communities. *Am Nat* 106:472–486.
- Levinton JS (1991) Variable feeding behavior in three species of *Macoma* (Bivalvia: Tellinacea) as a response to water flow and sediment transport. *Mar Biol* 110:375–383.
- Lodeiros C, Soria G, Valentich-Scott P, Munguía-Vega A, Cabrera JS, Cudney-Bueno R, Loor A, Márquez A & Sonnenholzner S (2016) Spondylids of Eastern Pacific Ocean. *J Shellfish Res* 35:279–293.
- Lopes G, Sousa C, Bernardo J, Andrade PB, Valentão P, Ferreres F & Mouga T (2011) Sterol profiles in 18 macroalgae of the portuguese coast. *J Phycol* 47:1210–1218.
- Lorrain A, Paulet Y-M, Chauvaud L, Savoye N, Donval A & Saout C (2002) Differential $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures among scallop tissues: implications for ecology and physiology. *J Exp Mar Biol Ecol* 275:47–61.
- Mackensen AK, Brey T, Bock C & Luna S (2012) *Spondylus crassisquama* Lamarck, 1819 as a microecosystem and the effects of associated macrofauna on its shell integrity: isles of biodiversity or sleeping with the enemy? *Mar Biodivers* 42:443–451.
- Majdi N, Hette-Tronquart N, Auclair E, Bec A, Chouvelon T, Cognie B, Danger M, Decottignies P, Dessier A & Desvillettes C (2018) There's no harm in having too much: A comprehensive toolbox of methods in trophic ecology. *Food Webs*:e00100.

- Mann KH (1982) Ecology of Coastal Waters: A Systems Approach. University of California Press.
- Mansour MP, Volkman JK, Jackson AE & Blackburn SI (1999) The fatty acid and sterol composition of five marine dinoflagellates. *J Phycol* 35:710–720.
- Marchais V, Schaal G, Grall J, Lorrain A, Nerot C, Richard P & Chauvaud L (2013) Spatial variability of stable isotope Ratios in Oysters (*Crassostrea gigas*) and primary producers along an estuarine gradient (Bay of Brest, France). *Estuaries Coasts* 36:808–819.
- Marcos JG (2005) Los pueblos navegantes del Ecuador prehispánico. Editorial Abya Yala.
- Martínez ML, Intralawan A, Vázquez G, Pérez-Maqueo O, Sutton P & Landgrave R (2007) The coasts of our world: Ecological, economic and social importance. *Ecol Econ* 63:254–272.
- Masso-Rojas A, Morales-Bojorquez E & Talavera-Mayer J (2000) La pesquería de almeja Mano de león, Baja California. Sustentabilidad Pesca Responsab En Mex Evaluacion Manejo Inst Nac Pesca Mex:349–366.
- McMahon KW, Hamady LL & Thorrold SR (2013) Ocean ecogeochemistry: a review. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 51:327–374.
- van der Meer MT, Sangiorgi F, Baas M, Brinkhuis H, Damsté JSS & Schouten S (2008) Molecular isotopic and dinoflagellate evidence for Late Holocene freshening of the Black Sea. *Earth Planet Sci Lett* 267:426–434.
- Millán-Núñez R, Ripa-Soleno E & Aguirre-Buenfil LA (1987) Preliminary study of the composition and abundance of the phytoplankton and chlorophytes in laguna Ojo de Liebre, BCS. *Cienc Mar* 13:30–38.
- Mohammady NG (2004) Total, free and conjugated sterolic forms in three microalgae used in mariculture. *Z Für Naturforschung C* 59:619–624.
- Monson KD & Hayes JM (1982) Biosynthetic control of the natural abundance of carbon 13 at specific positions within fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. Isotopic fractionation in lipid synthesis as evidence for peroxisomal regulation. *J Biol Chem* 257:5568–5575.
- Moreno JEAD, Moreno VJ & Brenner RR (1976) Lipid metabolism of the yellow clam, *Emphasis Mesodesma mactroides*: 2-Polyunsaturated fatty acid metabolism. *Lipids* 11:561.
- Munro D & Blier PU (2015) Age, Diet, and Season Do Not Affect Longevity-Related Differences in Peroxidation Index Between *Spisula solidissima* and *Arctica islandica*. *J Gerontol Ser A* 70:434–443.
- Munro D & Blier PU (2012) The extreme longevity of *Arctica islandica* is associated with increased peroxidation resistance in mitochondrial membranes. *Aging Cell* 11:845–855.

- Nabil S & Cosson J (1996) Seasonal variations in sterol composition of *Delesseria sanguinea* (Ceramiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 326:511–514.
- Napolitano GE & Ackman RG (1993) Fatty acid dynamics in sea scallops *Plactpecten magellanicus* (Gmelin, 1791) from Georges Bank, Nova-Scotia. *J Shellfish Res* 12:267–277.
- Napolitano GE, Ackman RG & Silva-Serra MA (1993) Incorporation of dietary sterols by the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin) fed on microalgae. *Mar Biol* 117:647–654.
- Nelson MM, Leighton DL, Phleger CF & Nichols PD (2002) Comparison of growth and lipid composition in the green abalone, *Haliotis fulgens*, provided specific macroalgal diets. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 131:695–712.
- Nérot C (2011) Invertébrés benthiques et biomarqueurs: témoins du fonctionnement trophique de l'écosystème côtier.
- Nerot C, Lorrain A, Grall J, Gillikin DP, Munaron J-M, Le Bris H & Paulet Y-M (2012) Stable isotope variations in benthic filter feeders across a large depth gradient on the continental shelf. *Estuar Coast Shelf Sci* 96:228–235.
- Nerot C, Meziane T, Schaal G, Grall J, Lorrain A, Paulet Y-M & Kraffe E (2015) Spatial changes in fatty acids signatures of the great scallop *Pecten maximus* across the Bay of Biscay continental shelf. Available at: http://ac.els-cdn.com.scd-proxy.univ-brest.fr/S0278434315300522/1-s2.0-S0278434315300522-main.pdf?_tid=cc01133c-2f39-11e7-8950-00000aabb0f02&acdnat=1493731274_d207b602cfd94a22be277a4effaa33b7. (accessed May 2, 2017).
- Nielsen JM, Clare EL, Hayden B, Brett MT & Kratina P (2018) Diet tracing in ecology: method comparison and selection. *Methods Ecol Evol* 9:278–291.
- Nixon SW (1982) Nutrient dynamics, primary production and fisheries yields of lagoons. *Oceanol Acta Spec Issue*:357–371.
- Olson RJ, Popp BN, Graham BS, López-Ibarra GA, Galván-Magaña F, Lennert-Cody CE, Bocanegra-Castillo N, Wallsgrove NJ, Gier E, Alatorre-Ramírez V, Ballance LT & Fry B (2010) Food-web inferences of stable isotope spatial patterns in copepods and yellowfin tuna in the pelagic eastern Pacific Ocean. *Prog Oceanogr* 86:124–138.
- O'Reilly CM, Hecky RE, Cohen AS & Plisnier P-D (2002) Interpreting stable isotopes in food webs: Recognizing the role of time averaging at different trophic levels. *Limnol Oceanogr* 47:306–309.
- Paradis M & Ackman RG (1977) Potential for employing the distribution of anomalous non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in several marine invertebrates as part of food web studies. *Lipids* 12:170–176.

- Parent G, Pernet F, Tremblay R, Sevigny J & Ouellette M (2008) Remodeling of membrane lipids in gills of adult hard clam *Mercenaria mercenaria* during declining temperature. *Aquat Biol* 3:101–109.
- Parnell AC, Inger R, Bearhop S & Jackson AL (2010) Source partitioning using stable isotopes: coping with too much variation. *PloS One* 5:e9672.
- Parrish CC (2009) Essential fatty acids in aquatic food webs. In: *Lipids in aquatic ecosystems*. Springer. pp. 309–326.
- Parrish CC (2013) Lipids in marine ecosystems. *ISRN Oceanogr* 2013.
- Parrish CC, Abrajano TA, Budge SM, Helleur RJ, Hudson ED, Pulchan K & Ramos C (2000) Lipid and phenolic biomarkers in marine ecosystems: analysis and applications. In: *Marine chemistry*. Springer. pp. 193–223.
- Patterson GW (1969) Sterols of Chlorella. III. Species containing ergosterol. *Compar Biochem Physiol*.
- Pazos AJ, Sánchez JL, Román G, Luz Pérez-Parallé M & Abad M (2003) Seasonal changes in lipid classes and fatty acid composition in the digestive gland of *Pecten maximus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 134:367–380.
- Perez V, Olivier F, Tremblay R, Neumeier U, Thébault J, Chauvaud L & Meziane T (2013) Trophic resources of the bivalve, *Venus verrucosa*, in the Chausey archipelago (Normandy, France) determined by stable isotopes and fatty acids. *Aquat Living Resour* 26:229–239.
- Pernet F & Tremblay R (2004) Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *J Exp Mar Biol Ecol* 310:73–86.
- Pernet F, Tremblay R, Comeau L & Guderley H (2007) Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. *J Exp Biol* 210:2999–3014.
- Peterson BJ & Fry B (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu Rev Ecol Syst* 18:293–320.
- Phillips NE (2005) Growth of filter-feeding benthic invertebrates from a region with variable upwelling intensity. *Mar Ecol Prog Ser* 295:79–89.
- Phleger FB & Ewing GC (1962) Sedimentology and oceanography of coastal Lagoons in Baja California, Mexico. *Geol Soc Am Bull* 73:145.
- Piretti MV, Zuppa F & Pagliuca G (1989) Anatomical distribution of sterols in the bivalve mollusc *Scapharaca inaequalvis* (Bruguière). *Comp Biochem Physiol Part B Comp Biochem* 93:819–822.

- Pirini M, Manuzzi MP, Pagliarani A, Trombetti F, Borgatti AR & Ventrella V (2007) Changes in fatty acid composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) fed on microalgal and wheat germ diets. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 147:616–626.
- Popp BN, Graham BS, Olson RJ, Hannides CC, Lott MJ, López-Ibarra GA, Galván-Magaña F & Fry B (2007) Insight into the trophic ecology of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, from compound-specific nitrogen isotope analysis of proteinaceous amino acids. *Terr Ecol* 1:173–190.
- Post DM (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83:703–718.
- Post DM, Layman CA, Arrington DA, Takimoto G, Quattrochi J & 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.
- Quezada-Romegialli C, Jackson AL, Hayden B, Kahilainen KK, Lopes C & Harrod C (2018) TRophicPosition, an R package for the Bayesian estimation of trophic position from consumer stable isotope ratios. *Methods Ecol Evol* 9:1592–1599.
- Racotta et al. IS (2003) Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten* (*Lyropecten*) *subnodosus*. Available at: http://ac.els-cdn.com.scd-proxy.univ-brest.fr/S0044848602003666/1-s2.0-S0044848602003666-main.pdf?_tid=9bcd4d78-1f8c-11e7-8d8a-00000aabb0f26&acdnat=1492007622_0c31d4c8de1484ce18199d540ffefcf1. (accessed April 12, 2017).
- Ramírez RA, Casas Valdez M, Cruz Ayala MB & Nunez Lopez RA (2000) Variación estacional de la fitoflora en la Laguna Ojo de Liebre. Available at: <http://www.scielo.org.mx/pdf/hbio/v10n2/v10n2a10.pdf>. (accessed April 12, 2017).
- Ramírez RA, Valdez MC, García SO, López RN & Ayala MC (2003) Spatial and seasonal variation of macroalgal biomass in Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, Mexico. *Hydrobiologia* 501:207–214.
- Ramos CS, Parrish CC, Quibuyen TAO & Abrajano TA (2003) Molecular and carbon isotopic variations in lipids in rapidly settling particles during a spring phytoplankton bloom. *Org Geochem* 34:195–207.
- Raven JA, Johnston AM, Kübler JE, Korb R, McInroy SG, Handley LL, Scrimgeour CM, Walker DI, Beardall J, Vanderklift M, Fredriksen S & Dunton KH (2002) Mechanistic interpretation of carbon isotope discrimination by marine macroalgae and seagrasses. *Funct Plant Biol* 29:355–378.
- Reddin CJ, Docmac F, O'Connor NE, Bothwell JH & Harrod C (2015) Coastal upwelling drives intertidal assemblage structure and trophic ecology. *PloS One* 10:e0130789.

- Richoux NB & Froneman PW (2008) Trophic ecology of dominant zooplankton and macrofauna in a temperate, oligotrophic South African estuary: a fatty acid approach. *Mar Ecol Prog Ser* 357:121–137.
- Richoux NB, Vermeulen I & Froneman PW (2014) Fatty acid profiles reveal temporal and spatial differentiation in diets within and among syntopic rocky shore suspension-feeders. *Mar Ecol Prog Ser* 495:143–160.
- Riera P (2007) Trophic subsidies of *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis* and *Crepidula fornicata* in the Bay of Mont Saint Michel (France): a $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ investigation. *Estuar Coast Shelf Sci* 72:33–41.
- 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 Sci* 42:347–360.
- Riera P & Richard P (1997) Temporal variation of $\delta^{13}\text{C}$ in particulate organic matter and oyster *Crassostrea gigas* in Marennes Oléron Bay (France): effect of freshwater inflow. *Mar Ecol Prog Ser* 147:105–115.
- Riera P, Stal LJ & Nieuwenhuize J (2002) $\delta^{13}\text{C}$ versus $\delta^{15}\text{N}$ of co-occurring molluscs within a community dominated by *Crassostrea gigas* and *Crepidula fornicata* (Oosterschelde, The Netherlands). *Mar Ecol Prog Ser* 240:291–295.
- Riosmena-Rodríguez R, Muñiz-Salazar R, López-Calderón J, Torre-Cosío J, Meling A, Talbo SL, Sage GK, Ward DH & Cabello-Pasini A (2013) Conservation status of *Zostera marina* populations at Mexican Pacific. *Adv Environ Res* 27:35–63.
- Roldan-Carillo L, Maeda-Martinez A, Mass-Rojas A & Sicard-Gonzalez M (2005) Alinity tolerance and resistance of the Pacific lion's paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and the relationships with species distribution and density in a coastal lagoon. *J Shellfish Res* 24:353–361.
- Rossi F, Herman PMJ & Middelburg JJ (2004) Interspecific and intraspecific variation of δC and δN in deposit-and suspension-feeding bivalves (*Macoma balthica* and *Cerastoderma edule*): Evidence of ontogenetic changes in feeding mode of *Macoma balthica*. *Limnol Oceanogr* 49:408–414.
- Rubenstein DR & Hobson KA (2004) From birds to butterflies: animal movement patterns and stable isotopes. *Trends Ecol Evol* 19:256–263.
- Ruess L & Chamberlain PM (2010) The fat that matters: soil food web analysis using fatty acids and their carbon stable isotope signature. *Soil Biol Biochem* 42:1898–1910.
- Ruiz-Verdugo CA, Koch V, Félix-Pico E, Beltran-Lugo AI, Cáceres-Martínez C, Mazon-Suastegui JM, Robles-Mungaray M & Cáceres-Martínez J (2016a) Chapter 29 - Scallop Fisheries and Aquaculture in Mexico. In: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Scallops, S.E. Shumway & G.J. Parsons (eds). Elsevier. pp. 1111–1125.

- Ruiz-Verdugo CA, Koch V, Félix-Pico E, Beltran-Lugo AI, Cáceres-Martínez C, Mazon-Suastegui JM, Robles-Mungaray M & Cáceres-Martínez J (2016b) Scallop Fisheries and Aquaculture in Mexico. In: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier. pp. 1111–1125.
- Santamaría Gallegos NA, Félix Pico EF, Sánchez-Lizaso JL, Palomares García JR & Mazón Suástegui M (1999) Temporal coincidence of the annual eelgrass *Zostera marina* and juvenile scallops *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842) in bahía Concepción, Mexico. National Shellfisheries Association.
- Santos SAO, Vilela C, Freire CSR, Abreu MH, Rocha SM & Silvestre AJD (2015) Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemicals. *Food Chem* 183:122–128.
- Schaal G, Nerot C, Grall J, Chouvelon T, Lorrain A, Mortillaro J-M, Savoye N, Brind'Amour A, Paulet Y-M & Le Bris H (2016) Stable isotope ratios in benthic-demersal biota along a depth gradient in the Bay of Biscay: a multitrophic study. *Estuar Coast Shelf Sci* 179:201–206.
- Schaal G, Riera P & Leroux C (2008) Trophic coupling between two adjacent benthic food webs within a man-made intertidal area: a stable isotopes evidence. *Estuar Coast Shelf Sci* 77:523–534.
- Schubert CJ, Villanueva J, Calvert SE, Cowie GL, Von Rad U, Schulz H, Berner U & Erlenkeuser H (1998) Stable phytoplankton community structure in the Arabian Sea over the past 200,000 years. *Nature* 394:563.
- Schultz S, Koussoroplis A-M & Kainz MJ (2018) Dietary Fatty-Acid Compositions Are more Strongly Reflected in Fatty than Lean Dorsal Fillets of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Lipids*.
- Seitz RD, Wennhage H, Bergström U, Lipcius RN & Ysebaert T (2014) Ecological value of coastal habitats for commercially and ecologically important species. *ICES J Mar Sci* 71:648–665.
- Seong KA, Jeong HJ, Kim S, Kim GH & Kang JH (2006) Bacterivory by co-occurring red-tide algae, heterotrophic nanoflagellates, and ciliates. *Mar Ecol Prog Ser* 322:85–97.
- Sherr EB & Sherr BF (2007) Heterotrophic dinoflagellates: a significant component of microzooplankton biomass and major grazers of diatoms in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 352:187–197.
- Shumway SE, Cucci TL, Newell RC & Yentsch CM (1985) Particle selection, ingestion, and absorption in filter-feeding bivalves. *J Exp Mar Biol Ecol* 91:77–92.
- Smaal AC & Prins TC (1993) The uptake of organic matter and the release of inorganic nutrients by bivalve suspension feeder beds. In: *Bivalve filter feeders*. Springer. pp. 271–298.

- Soudant P, Chu FLE & Samain JF (2000) Lipids requirements in some economically important marine bivalves. *J Shellfish Res* 19:605.
- Soudant P, Le Coz J-R, Marty Y, Moal J, Robert R & Samain J-F (1998a) Incorporation of microalgae sterols by scallop *Pecten maximus* (L.) larvae. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 119:451–457.
- Soudant P, Marty Y, Moal J, Masski H & Samain JF (1998b) Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 121:279–288.
- Soudant P, Marty Y, Moal J, Robert R, Quéré C, Le Coz JR & Samain JF (1996) Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture* 143:361–378.
- Soudant P, Van Ryckeghem K, Marty Y, Moal J, Samain JF & Sorgeloos P (1999) Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 123:209–222.
- Taylor AG & Landry MR (2018) Phytoplankton biomass and size structure across trophic gradients in the southern California Current and adjacent ocean ecosystems. *Mar Ecol Prog Ser* 592:1–17.
- UNESCO (no date) Sanctuaire de baleines d'El Vizcaino. Available at: <http://whc.unesco.org/fr/list/554/>. (accessed January 10, 2018).
- Valitova JN, Sulkarnayeva AG & Minibayeva FV (2016) Plant sterols: diversity, biosynthesis, and physiological functions. *Biochem Mosc* 81:819–834.
- Van den Meersche K, Middelburg JJ, Soetaert K, Van Rijswijk P, Boschker HT & Heip CH (2004) Carbon-nitrogen coupling and algal-bacterial interactions during an experimental bloom: modeling a ^{13}C tracer experiment. *Limnol Oceanogr* 49:862–878.
- Van Meer G, Voelker DR & Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112–124.
- 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.
- Villalejo-Fuerte M, Muñetón-Gómez M & Socorro D (2002) Tópicos sobre la biología de la almeja burra *Spondylus calcifer* (Carpenter, 1857). *Hidrobiológica* 12:79–81.
- Villalejo-Fuerte M, Tripp-Quezada A & García-Domínguez F (2005) Variación de los índices gonádico, de rendimiento muscular y de la glándula digestiva de *Spondylus princeps* (Gray, 1825) (Mollusca: Bivalvia) en Isla Cedros y Punta Eugenia, México. *Rev Biol Mar Oceanogr* 40:87–90.
- Volkman J (2003) Sterols in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:495–506.

- Volkman JK (1986) A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. *Org Geochem* 9:83–99.
- Volkman JK, Barrett SM, Blackburn SI, Mansour MP, Sikes EL & Gelin F (1998) Microalgal biomarkers: a review of recent research developments. *Org Geochem* 29:1163–1179.
- Volkman JK, Barrett SM, Dunstan GA & Jeffrey SW (1993) Geochemical significance of the occurrence of dinosterol and other 4-methyl sterols in a marine diatom. *Org Geochem* 20:7–15.
- Volkman JK, Revill AT, Holdsworth DG & Fredericks D (2008) Organic matter sources in an enclosed coastal inlet assessed using lipid biomarkers and stable isotopes. *Org Geochem* 39:689–710.
- Voogt PA, Florkin M & Scheer B (1972) Lipid and sterol components and metabolism in Mollusca. *Chem Zool* Ed Florkin M Scheer BT 7:245–294.
- Vuorio K, Meili M & Sarvala J (2006) Taxon-specific variation in the stable isotopic signatures ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of lake phytoplankton. *Freshw Biol* 51:807–822.
- Wacker A, Becher P & Elert E von (2002) Food quality effects of unsaturated fatty acids on larvae of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Limnol Oceanogr* 47:1242–1248.
- Waldock MJ & Holland DL (1984) Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: Polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 19:332.
- Wasowicz E & Rudzinska M (2011) Cholesterol and phytosterols. *Chem Biol Funct Asp Food Lipids*:113–134.
- Withers N (1983) Dinoflagellate sterols. *Mar Nat Prod Chem Biol Perspect* 5:87–130.
- Yamauguchi T, Koichi ITO & Mitsuo H (1986) Studies on the sterols in some marine phytoplanktons. *Tohoku J Agric Res* 37:5–14.
- Yokoyama H, Sakami T & Ishihi Y (2009) Food sources of benthic animals on intertidal and subtidal bottoms in inner Ariake Sound, southern Japan, determined by stable isotopes. *Estuar Coast Shelf Sci* 82:243–253.
- 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.
- Zaytsev (2003) Coastal upwelling activity on the Pacific shelf of the Baja California peninsula. *J Oceanogr* 59:489–502.
- Zhukova NV (1986) Biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids from [^{14}C] acetate in molluscs. *Biochim Biophys Acta BBA-Lipids Lipid Metab* 878:131–133.
- Zhukova NV (1991) The pathway of the biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in molluscs. *Comp Biochem Physiol Part B Comp Biochem* 100:801–804.

Zhukova NV & Kharlamenko VI (1999) Sources of essential fatty acids in the marine microbial loop. *Aquat Microb Ecol* 17:153–157.

Titre : Ecophysiologie trophique des bivalves *Nodipecten subnodosus* et *Spondylus crassisquama* soumis à la variabilité environnementale dans la lagune d'Ojo de Liebre (Basse Californie, Mexique)

Mots clés : Bivalves | Ecophysiologie trophique | Lagune côtière | Lipides | Acides gras | Stérols | Isotopes stables | Analyses isotopiques des composés spécifiques

Résumé : Les lagunes côtières sont des écosystèmes semi-fermés à l'interface de la terre et des océans et sous l'influence de ces deux compartiments. De par ces caractéristiques, elles sont soumises à de fortes variations spatiales et saisonnières de leurs ressources trophiques. De par leur nature fermée et peu profonde, elles vont amplifier la force des processus qui conditionnent la disponibilité des ressources alimentaires et par conséquent l'écophysiologie des organismes benthiques qui composent les assemblages associés. Ce travail de thèse se propose de caractériser l'écophysiologie trophique de deux espèces de bivalves filtreurs (*Nodipecten subnodosus* et *Spondylus crassisquama*) au sein d'une lagune du Pacific Nord-est (Basse Californie, Mexique). Une approche multi-tissus et multi-traceurs (isotopes stables, acides gras, stérols et analyse isotopique sur acides gras) a été adoptée afin de pouvoir caractériser l'écologie trophique des espèces, mais aussi leurs régulations physiologiques face aux variations environnementales. Deux facteurs clés se sont révélés largement explicatifs de la variabilité spatio-temporelle observée dans le

régime alimentaire : la période (hiver vs été) et la localisation dans la lagune par rapport à l'embouchure. L'importance des apports de phytoplancton océanique a été démontrée dans l'ensemble de la lagune, avec une contribution plus importante de diatomées océaniques notamment en période estivale pour les individus à proximité de l'embouchure. Par ailleurs, les bivalves en fond de lagune semblaient d'avantage dépendre de la matière organique locale, en particulier issue du recyclage bactérien, voire de la production des herbiers de phanérogames. Ces contrastes spatiaux se reflétaient également dans la composition des membranes cellulaires, mettant en évidence les interactions entre apports trophiques et régulations métaboliques des compositions en acides gras chez ces deux bivalves. Cette thèse présente une approche intégrée dédiée à la compréhension des variations spatiales et saisonnières des ressources trophiques d'un écosystème lagunaire, ainsi que leurs répercussions trophiques et physiologiques sur les assemblages benthiques.

Title : Trophic ecophysiology of *Nodipecten subnodosus* and *Spondylus crassisquama* bivalves submitted to environmental variability in the lagoon of Ojo de Liebre (Baja California, Mexico)

Keywords : Bivalves | Trophic ecophysiology | Coastal lagoon | Lipids | Fatty Acids | Sterols | Stable Isotopes | Compound Specific Isotopic Analyses

Abstract: Coastal lagoons are semi-enclosed ecosystems at the interface between land and ocean and under the influence of these two compartments. Owing to these characteristics these ecosystems are submitted to spatial and seasonal variations in their trophic resources. Because of their enclosed and shallow nature, lagoons amplify the intensity of processes conditioning the availability of food resources and consequently the ecophysiology of the benthic organisms which compose associated assemblages. This thesis aims to characterize the trophic ecophysiology of two species of suspension feeding bivalves (*Nodipecten subnodosus* and *Spondylus crassisquama*) within a lagoon of Northeast Pacific (Baja California, Mexico). A multi-tissue and multi-tracer approach (stable isotopes, fatty acids, sterols, and isotope analysis on fatty acids) was used in order to characterise the trophic ecology of both species, as well as their physiological regulations against environmental variations. Two key factors have been found to explain the

observed spatio-temporal variability: the period (winter vs summer), and the location in the lagoon with respect to the distance from the mouth. The importance of oceanic phytoplankton inputs has been highlighted throughout the lagoon, with a greater contribution of oceanic diatoms particularly during the summer period for individuals near the mouth. Bivalves from the inner lagoon seemed more dependent of local organic matter, in particular resulting from bacterial recycling, or even from the production of eelgrass. These spatial contrasts were also reflected in the composition of cell membranes, highlighting the interactions between trophic contributions and metabolic regulation of fatty acid composition in both bivalves. This thesis presents an integrated approach to understand spatial and seasonal variations of the trophic resources of a lagoon ecosystem, as well as their trophic and physiological repercussions on benthic assemblages.