



HAL
open science

**Utilisation des différentes sources de matière organique
par les macroinvertébrés des cours d'eau de tête de
bassin versant : Approches naturelles et
semi-expérimentales combinant les isotopes stables et les
transferts trophiques d'acides gras et stérols**

Tiphaine Labeled-Veydert

► **To cite this version:**

Tiphaine Labeled-Veydert. Utilisation des différentes sources de matière organique par les macroinvertébrés des cours d'eau de tête de bassin versant : Approches naturelles et semi-expérimentales combinant les isotopes stables et les transferts trophiques d'acides gras et stérols. Ecosystèmes. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UCFAC115 . tel-04049052

HAL Id: tel-04049052

<https://theses.hal.science/tel-04049052>

Submitted on 28 Mar 2023

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.

Université Clermont Auvergne & CNRS

Thèse de Doctorat

Spécialité

Gestion de l'environnement – Écologie des environnements aquatiques

Présentée par

Tiphaine Labeled-Veydert

Dans l'attention d'obtenir le grade de *Docteur d'Université*

Utilisation des différentes sources de matière organique par les macroinvertébrés des cours d'eau de tête de bassin versant :

*Approches naturelles et semi-expérimentales combinant les
isotopes stables et les transferts trophiques d'acides gras et stérols*

Soutenance : 17 juin 2021

Membre du jury

Frédéric Santoul *MCF - Université de Toulouse*

Rapporteur

Christine Dupuy *PR - Université de La Rochelle*

Rapporteuse

Nabil Majdi *Junior PR - Université de Bielefeld (Allemagne)*

Rapporteur

Hélène Masclaux *MCF - Université de Bourgogne*

Examinatrice

Clarisse Mallet *MCF - Université Clermont Auvergne*

Examinatrice

Christian Desvillettes *PR - Université Clermont Auvergne*

Directeur de thèse

Résumé :

Dans les cours d'eau de tête de bassin versant, les macroinvertébrés exercent une fonction essentielle dans les flux de matières et d'énergie allant des sources organiques basales au maillon trophique supérieur que constitue la faune piscicole. Leur développement dépend d'un nombre restreint de sources organiques d'origine allochtone (litière de feuilles) ou autochtone (microalgues benthiques et bryophytes). L'environnement forestier et les ripisylves arborées de ces petits cours d'eau engendrent un apport prépondérant de carbone détritique allochtone habituellement considéré comme étant la base du fonctionnement de l'écosystème selon le RCC (*river continuum concept*). Cependant, le concept décrit par le RPM (*riverine productivity model*) et des études récentes mettent en avant l'importance de la production primaire autochtone et en particulier celle des diatomées, qui paraissent apte à soutenir la production secondaire grâce à une qualité nutritionnelle nettement supérieure à celle du matériel détritique. Dans ce contexte, ce travail de thèse avait pour objectif d'étudier les relations trophiques qui s'établissent entre les principales sources basales et une sélection de macroinvertébrés inféodés aux cours d'eau de tête de bassin versant. L'accent a été mis sur l'importance que pouvait représenter les producteurs primaires et plus particulièrement les microalgues benthiques dans le fonctionnement trophique de ces milieux, en assurant notamment la couverture en molécules essentielles (acides gras polyinsaturés et stérols). Dans un premier temps, au cours d'une expérimentation menée en mésocosmes, nous avons étudié chez le racleur, *Rhithrogena semicolorata* et le broyeur, *Gammarus pulex*, l'utilisation des ressources organiques disponibles en présence ou pas de biofilms autotrophes. Grâce à une approche reposant sur les isotopes stables ($\delta^{13}\text{C}$ & $\delta^{15}\text{N}$) des organismes, des acides gras et des stérols, nous avons pu démontrer que les microalgues (diatomées) étaient assimilées par les deux espèces et leur consommation avait un caractère essentiel chez *Rhithrogena semicolorata* en lien avec l'apport en acides gras essentiels (20:5 ω 3 et 20:4 ω 6). Dans le cas de *Gammarus pulex*, la consommation de microalgues était non-essentielle en présence de litière de feuilles peu récalcitrantes, mais favorisait la croissance somatique. Dans un second temps, un suivi saisonnier a été entrepris sur un ruisseau forestier de moyenne montagne (Massif Central). Au début du printemps, grâce à un modèle de mélange bayésien (SIAR) nous avons mis en évidence que l'essentiel de l'énergie reçu par neuf taxons de macroinvertébrés (de guildes trophiques différentes) provenait majoritairement des biofilms épilithiques, des bryophytes et de fines particules détritiques benthiques. L'utilisation des signatures isotopiques du carbone des acides gras (AICS, $\delta\text{C}^{13}_{\text{AG}}$), a permis de montrer que les acides gras courants (16:0, 18:1 ω 9, 18:2 ω 6 et 18:3 ω 3) étaient amenés à proportion des différentes sources organiques assimilées par les invertébrés. En revanche, les acides gras essentiels (20:4 ω 6 et 20:5 ω 3) provenaient des sources autochtones, obtenus par l'intermédiaire de différentes stratégies alimentaires, tel que l'omnivorie. La poursuite de ce suivi en été et en automne, mais sur un nombre plus réduit de macroinvertébrés (cinq) est venue confirmer les observations faites au printemps. Les biofilms épilithiques et épixyliques étaient toujours à l'origine des acides gras essentiels et notamment du 20:4 ω 6 et du 20:5 ω 3 assimilés par les différents taxons de macroinvertébrés, indépendamment de leur guildes trophiques. De plus, il a pu être démontré que si les bryophytes et les fines particules détritiques constituaient une source d'alimentation non négligeable, les litières de feuilles récalcitrantes issues de la hêtraie environnante étaient peu assimilées par les macroinvertébrés broyeurs. Enfin l'étude du transfert des stérols, que ce soit en conditions naturelles ou au cours de l'expérience menée en mésocosme nous amène à penser qu'il n'existe pas de réelle contrainte nutritionnelle liée à ces composés vis-à-vis des espèces de macroinvertébrés analysées.

Abstract:

In headwater streams, macroinvertebrates play an essential role in the flow of matter and energy from basal organic sources to the upper trophic level (fish fauna). Macroinvertebrate's development depends on a limited number of basal sources from allochthonous leaf litter to autochthonous primary production (benthic microalgae and bryophytes). The riparian forest and tree cover of these small streams produce a substantial input of allochthonous detrital carbon, which is regarded as the basis for ecosystem functioning according to the RCC (river continuum concept). However, the concept outlined by the RPM (riverine productivity model) and recent studies tend to emphasise the importance of autochthonous primary production and particularly that of diatoms, which appear to be able to sustain secondary production thanks to its nutritional quality that is clearly higher than that of detrital material. In this context, the aim of this phd-thesis was to study the trophic relationships between the main basal sources and a selection of macroinvertebrates typical of headwater streams. The focus was on the importance of primary producers and benthic microalgae, in the trophic functioning of these environments, in particular by providing essential molecules (polyunsaturated fatty acids and sterols). First, in a mesocosm experiment, we studied the use of available organic resources by the scraper, *Rhithrogena semicolorata* and the shredder, *Gammarus pulex*, in the presence or absence of autotrophic biofilms. By using an approach based on stable isotopes analysis ($\delta^{13}\text{C}$ & $\delta^{15}\text{N}$) of bulks, fatty acids and sterols, we demonstrated that microalgae (diatoms) were assimilated by both species and their ingestion was essential to *Rhithrogena semicolorata* in relation to the supply of essential fatty acids (20:5 ω 3 and 20:4 ω 6). For *Gammarus pulex*, the feeding on microalgae was not essential when leaf litter was not recalcitrant but promoted a higher somatic growth. In a second time, a seasonal monitoring was undertaken on a mid-mountain forested stream (Massif Central, France). In early spring, using a Bayesian mixture model (SIAR), we observed that most of the energy assimilated by nine macroinvertebrate taxa (of different trophic guilds) originated from epilithic biofilms, bryophytes and fine benthic detritus particles. Using stable carbon isotope signatures of fatty acids (CSIA, $\delta\text{C}^{13}_{\text{FA}}$), we showed that current fatty acids (16:0, 18:1 ω 9, 18:2 ω 6 and 18:3 ω 3) were supplied in proportion to the different organic sources assimilated by invertebrates. In contrast, the essential fatty acids (20:4 ω 6 and 20:5 ω 3) were derived from autochthonous sources and obtained through different feeding strategies, such as omnivory. The follow-up during summer and autumn, but on a smaller number of macroinvertebrate taxa (five), confirmed the observations from the spring. Epilithic and epixylic biofilms were still the source of essential fatty acids and notably 20:4 ω 6 and 20:5 ω 3 assimilated by the different macroinvertebrate taxa, irrespective of their usual trophic guild. Furthermore, we demonstrated that although bryophytes and fine detrital particles were significant food sources, the recalcitrant leaf litter from the adjacent beech forest was little assimilated by macroinvertebrate shredders. Lastly, the analysis of sterol transfer, both under natural conditions and during the mesocosm experiment, suggested that no nutritional constraints linked to these compounds occurred among all the macroinvertebrate species analysed.

Sommaire

Abréviations en français et anglais	1
INTRODUCTION	5
Les cours d'eau de têtes de bassin versant	7
Ressources organiques basales : matière organique allochtone et autochtone	7
Les litières de feuilles	10
La production primaire autochtone.....	12
Matières organiques allochtone et autochtone : deux sources imbriquées	13
Diversité des macroinvertébrés et fonctionnement trophique	13
La qualité nutritionnelle des ressources allochtones et autochtones	16
Aspects stoechiométriques de la qualité nutritionnelle.....	17
Qualité nutritionnelle et composés lipidiques essentiels	17
Les acides gras essentiels	17
Les stérols	21
OBJECTIFS ET PLAN DE THESE	25
Objectifs.....	25
Organisation du manuscrit.....	27
CHAPITRE 1	29
1.1 Conditionnement et traitement du matériel biologique.....	32
1.1.1 Les litières de feuilles et la MOPF.....	32
1.1.2 Les Biofilms.....	33
1.1.3 Les Bryophytes	33
1.1.4 Les Macroinvertébrés.....	33
1.2 Démarche analytique	34
1.2.1 Analyse des isotopes stables du carbone (δC^{13}) et de l'azote (δN^{15})	34
Détermination des valeurs de δC^{13} et de δN^{15}	36
1.2.2 Modèles de mélange.....	36
1.2.3 Analyse des compositions en Acides Gras des échantillons	37
Extraction des lipides totaux – Séparation des classes de lipides.....	39
Dérivation, séparation et identification/quantification des acides gras	39
Contrôle et confirmation des identifications par GC-MS	44
1.2.4 Analyse des compositions en Stérols des échantillons	44
Obtention et préparation des stérols.....	44
Identification et quantification des stérols	46
1.2.5 Analyse isotopique des acides gras et des stérols	48
Détermination des valeurs de δC^{13} des échantillons d'acides gras et de stérol	49

CHAPITRE 2	51
2.1 Préambule.....	54
Présentation du site et précisions méthodologiques.....	54
Déroulement de la phase expérimentale	56
Résumé de l'étude	58
2.2 Articles soumis (dans Freshwater Biology).....	61
Introduction	62
Materials and methods.....	64
Results	69
Discussion.....	80
Conclusion	84
Acknowledgment.....	84
Data availability statement	84
References.....	85
Supporting information	88
 CHAPITRE 3	 99
3.1 Préambule.....	102
Présentation du site et précisions méthodologiques.....	102
Choix et présentation du site	102
Site de prélèvement.....	102
Choix des macroinvertébrés à étudier	103
Résumé de l'étude	107
3.2 Article soumis (dans Hydrobiologia)	108
Introduction	109
Methods	111
Results	117
Discussion.....	128
Acknowledgments	133
References.....	134
Supplemental information	140
 CHAPITRE 4	 147
4.1 Préambule.....	149
Présentation du site et précisions méthodologiques.....	149
Résumé de l'étude	151
4.2 Article en préparation.....	152
Introduction	152
Matériels et méthodes.....	154
Résultats	160
Discussion.....	175
Conclusion	182
Informations supplémentaires	183

CHAPITRE 5	197
5.1 Préambule.....	199
Présentation de l'étude	199
Résumé de l'étude	200
5.2 Article en préparation.....	201
Introduction	201
Matériels et méthodes.....	202
Résultats	205
Discussion et conclusion.....	212
Informations supplémentaires	217
CHAPITRE 6	219
6.1 Synthèse des résultats et discussion générale.....	221
Approche expérimentale en conditions semi-naturelles.....	222
Structure trophique, position trophique et régimes alimentaires des macroinvertébrés en milieu naturel à travers les saisons	223
Contribution des sources allochtones et autochtones à la matière organique assimilée par les macroinvertébrés	226
Qualité nutritionnelle et apport en acides gras et stérols des différentes sources basales en ruisseau forestier de tête de bassin versant	227
Acides gras	227
Importance des stérols.....	228
Origine et transferts trophiques des acides gras et stérols	230
Acides gras	230
Stérols.....	231
6.2 Conclusions	233
6.3 Perspectives	234
Références bibliographiques	237
Annexe	255
Remerciements	259

Abréviations en français et anglais

Abréviations

AG	Acide gras
AGE	Acide gras essentiel
AICS	Analyse isotopique de composé-spécifique
AGMI	Acide gras monoinsaturé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AGS	Acide gras saturé
ARA	Acide arachidonique
COD	Carbone organique dissous
CPG	Chromatographie à phase gazeuse
EMAG	Ester méthylique d'acide gras
EPA	Acide eicosapentaénoïque
FFG	Groupes fonctionnels trophiques
MOF	Matière organique fine
MOBF	Matière organique benthique fine
MOPF	Matière organique particulaire fine
TMS	Triméthylsilyle

Abbreviations

CPOM	<i>Coarse particulate organic matter</i>
CSIA	<i>Compound specific isotope analysis</i>
FA	<i>Fatty acid</i>
FAME	<i>Fatty acid methyl ester</i>
FBOM	<i>Fine benthic organic matter</i>
FFG	<i>Functional feeding groups</i>
FPOM	<i>Fine particulate organic matter</i>
GC	<i>Gas chromatography</i>
GC-MS	<i>Gas chromatography mass spectrometry</i>
LC-PUFA	<i>Long-chain polyunsaturated fatty acid</i>
MUFA	<i>Monounsaturated fatty acid</i>
NL	<i>Neutral lipid</i>
PL	<i>Polar lipid</i>
PLFA	<i>Polar lipid fatty acid</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acid</i>
NLFA	<i>Neutral lipid fatty acid</i>
SFA	<i>Saturated fatty acid</i>
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
TMS	<i>Trimethylsilyle</i>

**Introduction,
Objectifs et plan de thèse**

Sommaire : Introduction, Objectifs et plan de thèse

INTRODUCTION	5
Les cours d'eau de têtes de bassin versant.....	7
Ressources organiques basales : matière organique allochtone et autochtone	7
Les litières de feuilles.....	10
La production primaire autochtone	12
Matière organique allochtone et autochtone : deux sources imbriquées.....	13
Diversité des macroinvertébrés et fonctionnement trophique.....	13
La qualité nutritionnelle des ressources allochtones et autochtones	16
Aspects stoechiométriques de la qualité.....	17
Qualité nutritionnelle et composés lipidiques essentiels	17
Les acides gras essentiels.....	17
Les stérols.....	21
OBJECTIFS ET PLAN DE THESE	25
Objectifs	25
Organisation de thèse.....	27

INTRODUCTION

Les hydrosystèmes représentent 0,0009 % de l'hydrosphère mondiale (Groombridge & Jenkins, 1998). Malgré cette proportion très modeste par rapport aux océans (~ 97,5 %) et lacs (~ 0,013 %), il n'en demeure pas moins que les cours d'eau de la planète constituent une mosaïque d'écoulements d'environ 263 bassins hydrographiques qui couvrent 45,3% de la surface des continents (Veyret-Mekdjian & Dubois, 2002). Ils ont donc un rôle primordial dans le maintien de la vie terrestre et constituent le principal contributeur sédimentaire avec un débit spécifique solide de plus de 15 000 millions de tonnes/ha/an (Wetzel, 2001). Associés aux autres écosystèmes d'eau douce, les systèmes fluviaux abritent au minimum 100000 espèces animales et végétales décrites, représentant environ 6 % des espèces connues (Dudgeon *et al.*, 2006). Historiquement depuis le début de l'holocène, les cours d'eau fournissent aux humains d'immenses services. Tout d'abord couloirs de circulation et sources d'alimentation (pêche), ils sont devenus des voies commerciales, puis dans les plaines alluviales se sont concentrées les principales activités économiques et un grand nombre de métropoles (Paris-Seine, Cologne-Rhin etc..). Dans les pays de l'OCDE, ces activités ont impacté à plusieurs niveaux et de manière durable les hydrosystèmes avec une liste de dégradations physiques, chimiques et biologiques. A titre d'exemple en Europe, plus de 6000 barrages fragmentent les bassins hydrographiques et des 20 plus grands cours d'eau européens, et seule la Dvina du Nord (Russie) est encore totalement libre (Tockner *et al.*, 2009). En réaction, certains gouvernements se sont dotés d'un corpus réglementaire plus ou moins ambitieux visant à limiter la dégradation des milieux (loi sur l'eau de 1992 en France) puis à reconquérir la qualité écologique des cours d'eau (Directive-cadre sur l'eau DCE 2000 en Europe ; CWR 2015 aux Etats-Unis). En parallèle, le nombre d'études scientifiques dédiées au fonctionnement écologique et hydro-morphologique des cours d'eau s'est considérablement accru depuis les années 1970 (Lhéritier, 2012). La majorité de ces recherches a toutefois été consacrée, jusqu'au tournant des années 2000, aux cours d'eau d'ordre élevé correspondant aux secteurs de piémont et de plaine alluviale. Les petits cours d'eau ou ruisseaux présents à l'amont des bassins versants des milieux tempérés ont fait l'objet d'un nombre plus faible d'ouvrages scientifiques. La base de données SUDOC (Système universitaire de documentation) indique l'existence de dix fois plus de documents scientifiques traitant spécifiquement des rivières et fleuves que des ruisseaux (Lhéritier, 2012). Ce centrage prépondérant sur l'aval des bassins versants est en partie lié à l'importance sociétale de ces secteurs qui ont tendance à concentrer les efforts de surveillance et de restauration de la qualité des masses d'eau (Onema, 2015). Il suffit pour s'en convaincre de regarder les limites de sensibilité de certains indicateurs (DCE), comme l'IPR (Indice-Poisson-Rivière) et l'IBMR (Indice-Biologique Macrophyte-Rivière) peu applicables aux petits cours

d'eau de moyenne altitude. Ces ruisseaux de moyenne montagne ont longtemps été considérés comme étant en bon état, voire en très bon état (au sens de la DCE), alors qu'ils ont pu être de longue date altérés par des pratiques sylvicoles et agricoles inadaptées. Les cours d'eau de tête de bassin versant représentent pourtant, près de 75% du linéaire du réseau hydrographique en France (Onema, 2015). Ils participent à la régulation du flux hydrique, au contrôle (lorsqu'ils ne sont pas dégradés) des flux d'azote et de phosphore et ont une fonction écologique importante, notamment en hébergeant des espèces rares (moule perlière, écrevisse à pattes-blanches, trichoptères des genres *Thremma* ou *Drusus* etc.) (Richardson, 2019). Fort heureusement depuis une quinzaine d'années, le nombre d'études scientifiques portant sur ces milieux est en nette augmentation, prenant en compte la structure des biocénoses et la compréhension des processus fonctionnels qui s'y déroulent (Finn *et al.*, 2011). Le développement de ces recherches est devenu indispensable pour accorder une plus grande reconnaissance à ces cours d'eau pour leurs services écosystémiques et la valeur unique de leurs habitats (Gomi *et al.*, 2002; Richardson, 2019).

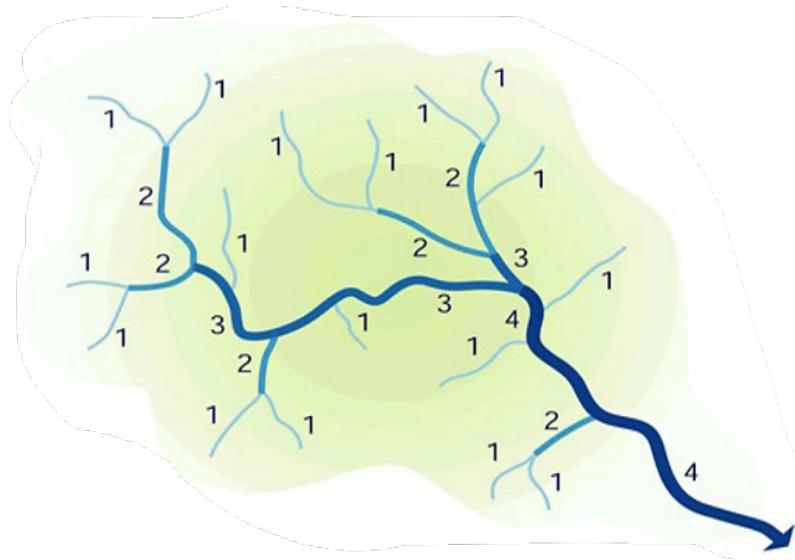


Fig. 1. Ordination de Strahler (1957) en tête de bassin versant.

Cette représentation est un exemple de la hiérarchisation des cours d'eau la plus utilisée. Tout écoulement permanent qui n'a pas d'affluent se voit attribuer la valeur 1. Puis, tout écoulement d'ordre $n+1$ sera issu de la confluence de deux écoulements d'ordre n .

(Image : Environmental Protection Agency 2009).

Les cours d'eau de têtes de bassin versant

Le terme de cours d'eau de têtes de bassin versant varie selon les approches et selon les régions de la planète. Dans l'hémisphère nord (Downing *et al.*, 2012), on considère que ce sont les cours d'eau dont le rang de Stralher est inférieur ou égal à 3 (Figure 1). Meyer *et al.* (2007) proposent, quant à eux, de se limiter aux ruisseaux d'ordre 1 et 2 ce qui semble avoir convaincu certaines Agences de l'Eau en France qui y ajoutent un critère de pente supérieur à 1%, mais localement adaptable (Agence Eau L-B/SDAGE 2016-2021). Richardson (2019) les définit comme les tout premiers cours d'eau permanents du réseau hydrographique.

L'étroitesse de leur lit et la topographie du bassin versant, font de ces ruisseaux une zone de transfert de l'eau. Ils représentent ainsi 50 à 70 % de l'alimentation des cours d'eau d'ordre supérieur (Alexander *et al.*, 2007). Ils sont intégrés dans le concept de *continuum* fluvial (Vannote *et al.*, 1980; voir Figure 2) où ils caractérisent les secteurs amonts de l'écosystème lotique avec un fonctionnement particulier. En effet pris dans leur globalité, ces ruisseaux sont des écosystèmes aquatiques hétérotrophes (Cummins *et al.*, 1973; Vannote *et al.*, 1980) dans le sens où le ratio **P/R** (**P**roduction primaire brute / **R**espiration des communautés) est inférieur à 1. Les apports en matière détritique végétale d'origine allochtone y sont ainsi prépondérants en tant que source d'énergie, tandis que la production primaire dans le lit du cours d'eau est le plus souvent limitée (Wallace & Webster, 1996). Dans les milieux tempérés, ces ruisseaux ont cependant des faciès d'écoulements assez variés, de même que les types de végétations présentes sur les rives. Ces paramètres varient suivant l'altitude et le relief. En altitude à l'étage alpin la ripisylve est réduite ou absente (cf. Photos 1), les ressources autochtones peuvent alors être prépondérantes et complétées par les apports des plantes herbacées des rives (Niedrist & Füreder, 2017). A moyenne altitude, en dessous de l'étage sub-alpin les cours d'eau de tête de bassin versant sont généralement forestiers (cf. Photos 1) ou du moins présentent une ripisylve arborée bien développée (Lhéritier, 2012).

Ressources organiques basales : matière organique allochtone et autochtone

La présence d'une ripisylve décidue et dense le long des cours d'eau de moyenne altitude entraîne un ombrage important, limitant et sélectionnant les organismes autotrophes (Wallace *et al.*, 1997). Elle produit en revanche une abondante litière de feuilles mortes à l'automne (Benfield, 1997), qui dans les ruisseaux forestiers peut se prolonger jusqu'au printemps, par des apports latéraux de paquets de litières du sol balayé par le vent (Hoover *et al.*, 2011).

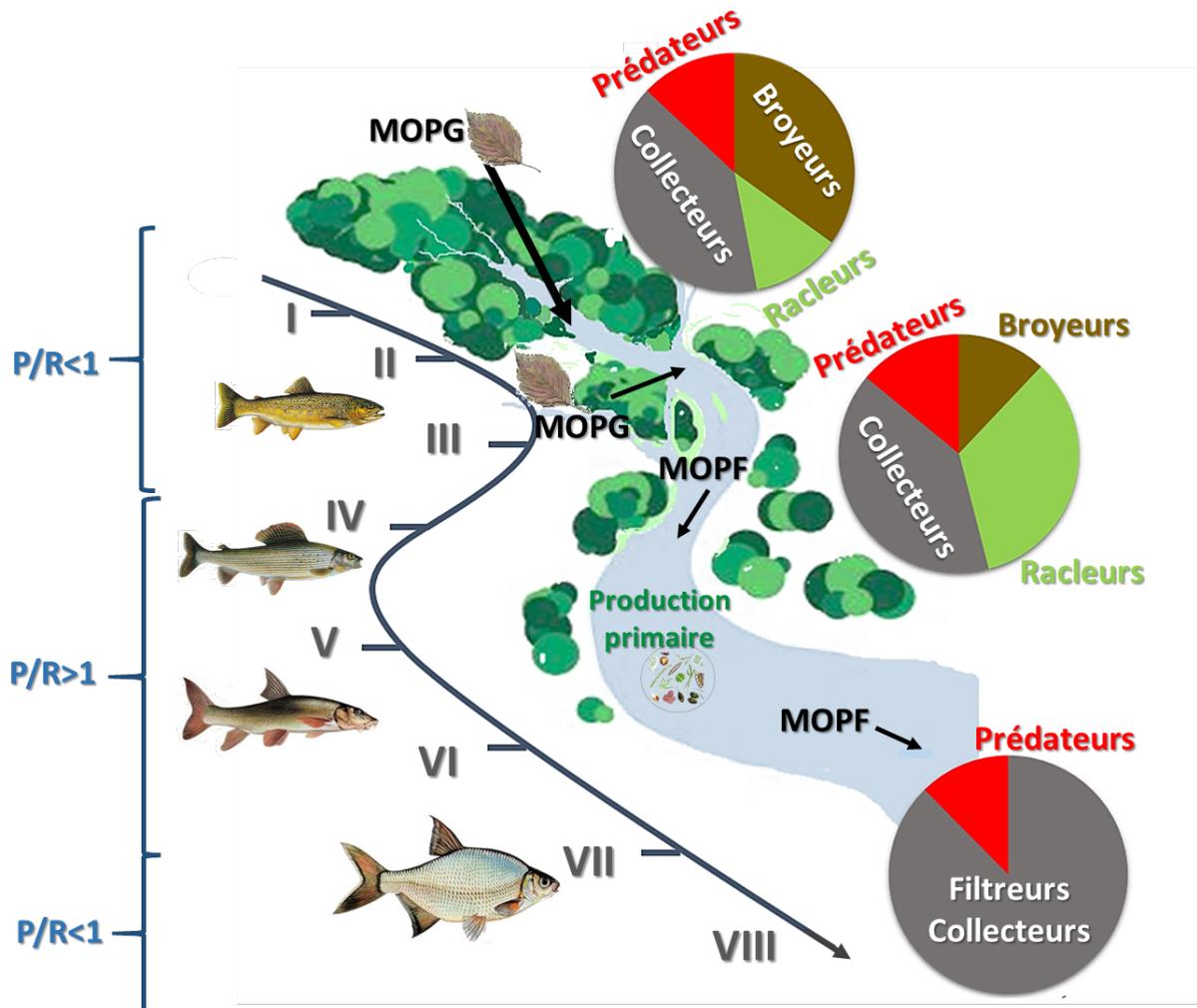
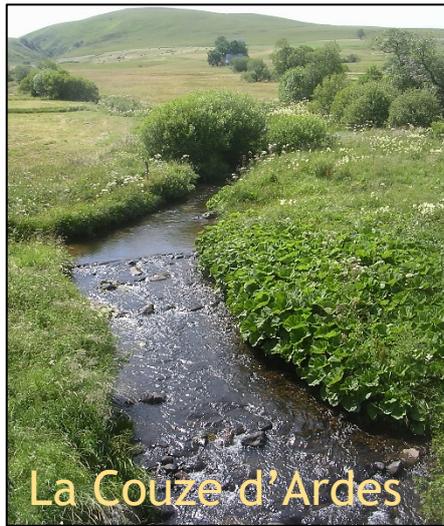


Fig. 2. Concept de *continuum* fluvial. « River Continuum Concept » (RCC) de Vannote et al., 1980.

Ce concept fait le lien entre d'un côté le gradient longitudinal des facteurs abiotiques fonctions de l'hydromorphologie et d'un autre côté les stratégies trophiques des consommateurs et la dynamique des sources de matière organique, en termes d'apport, de transport, de stockage, et d'utilisation par les macroinvertébrés classés en groupes fonctionnels selon Cummins (1975).



Photos 1. Diversité des ruisseaux de tête de bassin versant.

L'Espiaube dans les Pyrénées (65) avec une ripisylve absente – La Couze d'Ardes sur le plateau volcanique du Cézallier (63) avec une ripisylve très réduite – Le Nauzon dans le Limousin (87) avec sa ripisylve arborée plus ou moins entretenue – La Faye dans une gorge boisée (hêtres et résineux) du Livradois-Forez (63).

Les litières de feuilles

La quantité de litière tombant annuellement dans ces milieux peut être de l'ordre de 600 g.m⁻² (Benfield, 1997) et constitue plus de 80% du flux de carbone (Hall Jr *et al.*, 2001). Une partie est exportée en aval par le courant et le reste est retenu en fonction de la morphologie du lit et de l'hydrologie (Richardson *et al.*, 2009). La litière végétale restante rentre dans un processus de décomposition/fragmentation bien documentée (Figure 3), débutant par une phase abiotique de lessivage des composés hydrosolubles (polyphénols) et suivi par une phase de colonisation (ou conditionnement) par les micro-organismes, les bactéries et les hyphomycètes (Baldy *et al.*, 1995). A l'heure actuelle les hyphomycètes sont considérés comme les acteurs dominants de la décomposition de ces tissus végétaux, convertissant 15 à 25 % du matériel détritique en biomasse fongique (Gessner & Chauvet, 1994; Methvin & Suberkropp, 2003). Le matériel foliaire envahit de mycélium est ramolli et enrichit en azote et phosphore (Gulis *et al.*, 2006). Il est alors propice à la fragmentation et à la consommation par divers macroinvertébrés déchiqueteurs (Gessner *et al.*, 1999). Ces derniers réduisent progressivement les débris foliaires (soit la Matière Organique Particulaire Grossière, *engl.* : CPOM) en petits fragments (Figure 3) et excrètent des sous-produits (Graça, 2001) ; l'ensemble constituant la matière organique particulaire fine (soit MOPF, *engl.* : FPOM). Une partie de la MOPF se dépose au niveau du benthos et le reste est emporté vers l'aval (Mills *et al.*, 2003). La décomposition s'accompagne également de la libération de composés dissous et notamment de carbone organique dissouts (COD) (Gessner *et al.*, 1999). De nombreux paramètres interviennent dans la décomposition de ces litières (abondance et structure des paquets de feuilles, phénologie, paramètres physico-chimiques de l'eau) mais parmi les principaux, on trouve la qualité initiale de l'espèce végétale et le caractère mono ou plurispécifiques des apports (Lecerf *et al.*, 2007). Les litières sont, en effet, plus ou moins récalcitrantes en fonction de leur teneur en composés réfractaires (lignine) ou de leur décomposition lente (cellulose) (Webster & Benfield, 1986; Tank *et al.*, 2010). Leur vitesse de décomposition est d'ailleurs directement liée à leur qualité. Le hêtre (*Fagus sylvatica*) et le chêne rouvre (*Quercus robur*) à feuilles récalcitrantes s'opposent à l'aulne (*Alnus glutinosa*) ou au frêne (*Fraxinus excelsior*) à feuilles rapidement dégradées (Elosegi *et al.*, 2018). Lorsque plusieurs variétés de litières séjournent dans l'eau, celle de hêtre semble servir uniquement d'habitat et non de source de nourriture pour certains macroinvertébrés (par exemple le Trichoptère *Potamophylax* ; Sanpera-Calbet *et al.*, 2009).

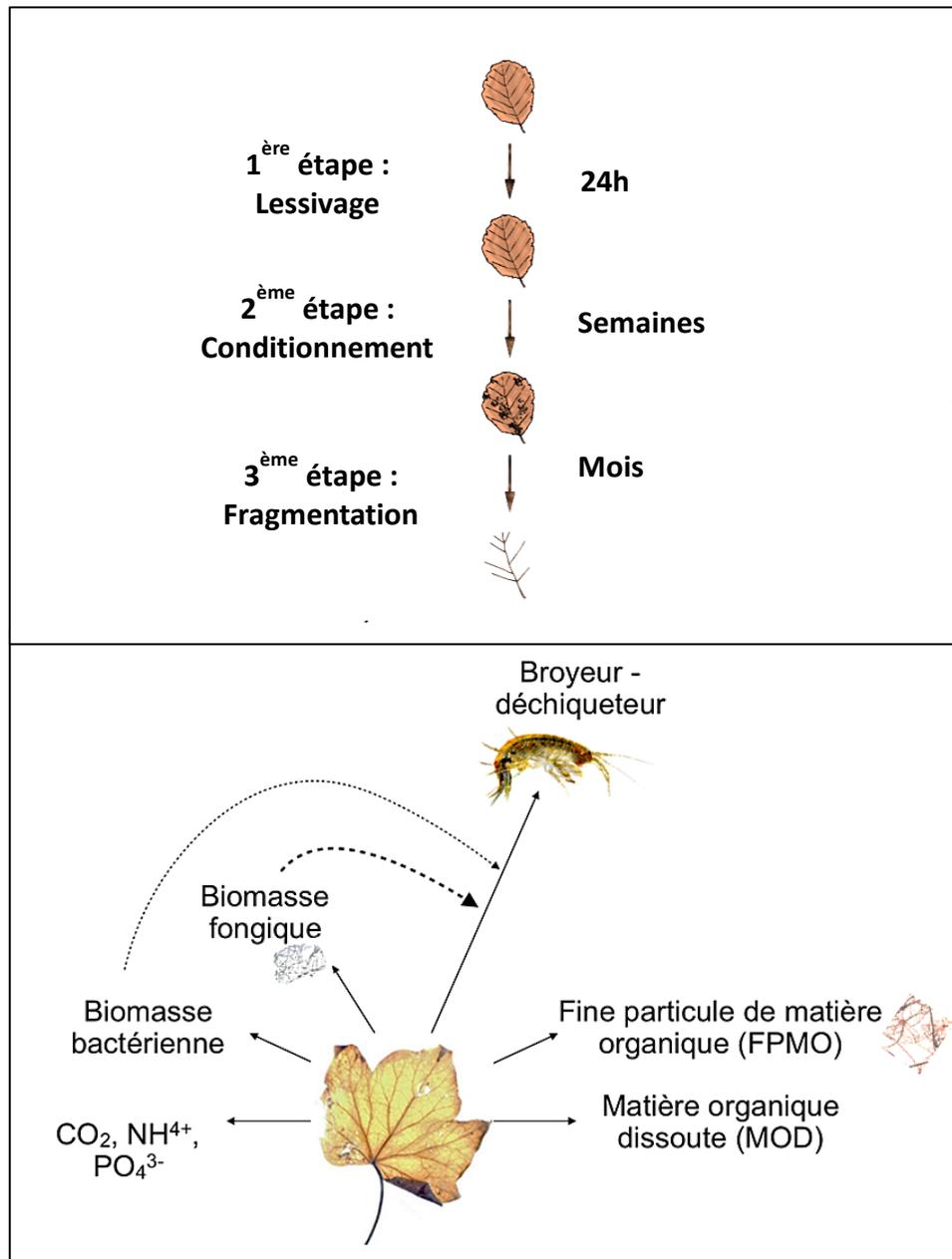


Fig. 3. Processus de dégradation des feuilles mortes constituant les litières végétales et devenir des constituants foliaires dans les ruisseaux. (a) Les différentes étapes de la décomposition d'une feuille en ruisseau et (b) Devenir du matériel foliaire et de ses sous-produits lors de la dégradation. Les flèches en pointillées soulignent le phénomène de facilitation liée au conditionnement microbien

(adapté d'après Gessner, 1999).

La production primaire autochtone

Dans les cours d'eau de tête de bassin la production primaire liée à l'hydrosystème est uniquement assurée par des organismes benthiques. Il s'agit tout d'abord de microalgues constituant des biofilms en association avec des bactéries, des mycètes, des particules détritiques fines, des protistes hétérotrophes et des micro-invertébrés méiofauniques (Baattrup-Pedersen *et al.*, 2020). Potentiellement, les biofilms peuvent se développer sur n'importe quel support immergé, qu'il soit minéral (galets, blocs) ou organique (bois mort), y compris sur la face supérieure des paquets de litière (Lamberti, 1996). Les microalgues dominantes sont des espèces adaptées à l'altitude, aux températures basses et au manque de luminosité (Rosemond *et al.*, 2000). Ce sont des diatomées (*Achnantheidium*, *Melosira*, *Gomphonema*, *Achnanthes*, *Cymbella* etc.), des chlorophytes le plus souvent filamenteuses et des cyanobactéries assez spécifiques comme le genre *Chamaesiphon* (Biggs, 1996; Aigner *et al.*, 2018). Les biofilms épilithiques ont été particulièrement étudiés. Ils sont principalement sous le contrôle du phosphore réactif soluble (PRS) et de la luminosité disponible (Hill *et al.*, 2001). Cependant l'azote total et le phosphore total, provenant du bassin versant sous influence anthropique ou non, demeurent prépondérant dans leur développement saisonniers (Dodds & Smith, 2016). Souvent négligées (Rott *et al.*, 2006), les algues macroscopiques constituent aussi une part de la production primaire *in situ*. Fixées sur des substrats stables et minéraux, il s'agit principalement de rhodophytes (*Audouinella*, *Batrachospermum*) et de chrysophycées de petites tailles (*Hydrurus*), parfois localement abondantes (Klaveness, 2017; Niedrist & Füreder, 2017). Biofilms et algues benthiques peuvent se développer tout au long de l'année, **mais c'est au début du printemps, avant l'émergence des feuilles, qu'une forte poussée se produit sous l'effet d'une plus grande disponibilité de lumière et de PRS** (Hill *et al.*, 2001). **A cette période la quantité d'algues épilithiques semble avoir un effet positif sur la croissance des invertébrés** (Hill *et al.*, 2010). Enfin, les bryophytes (mousses et hépatiques) peuvent en termes de biomasse représenter l'essentiel de la production primaire, bien qu'il soit difficile de faire la part entre les espèces strictement aquatiques et les espèces amphibies (Glime, 2017). Les mousses servent d'habitat (Turunen *et al.*, 2020) et ont été signalées comme source d'alimentation dans les anciennes études d'hydrobiologie (Berthélemy & Lahoud, 1981) avant de retomber quelque peu dans l'oubli, considérées comme négligeables. Ceci est probablement à mettre en relation avec les molécules répulsives (Éthyl amyl cétones, acides gras acétyleniques) produites par certaines bryophytes pour se défendre contre les insectes terrestres et pouvant les rendre impropres à la consommation (Haines & Renwick, 2009). **Ces conclusions ont été un peu hâtivement généralisées aux milieux aquatiques** (Parker *et al.*, 2007), **mais depuis une dizaine d'années un petit nombre de travaux sont revenus sur la question et considèrent que**

les mousses des petits cours d'eau ont un rôle dans le flux d'énergie du réseau trophique, qui mériterait d'être mieux compris (Dangles, 2002; Torres-Ruiz *et al.*, 2007; McWilliam-Hughes *et al.*, 2009). Finalement la production primaire nette dans les cours d'eau forestiers ou à ripisylve développée représenterait environ 30% du flux de carbone vers les macroinvertébrés (Rosenfeld & Roff, 1991).

Matières organiques allochtone et autochtone : deux sources imbriquées

Ainsi le fonctionnement des cours d'eau de tête de bassin semble dépendre d'apports par « pulses » saisonniers, c'est-à-dire, une arrivée massive de feuilles mortes en automne et un pic de production primaire au printemps avant la reprise de la végétation. Ces deux ressources s'avèrent en réalité étroitement connectées (Danger *et al.*, 2013). Les composés dissous libérés par le lessivage des litières dans l'eau et des berges, agissent directement ou indirectement sur le développement des bactéries et des microalgues (Franklin *et al.*, 2020). Le développement d'un feutrage de microalgues sur les feuilles immergées produit un effet attractif ou « *priming effect* » vis-à-vis des consommateurs qui, selon le contexte environnemental, peut accélérer la décomposition de la litière de feuilles (Halvorson *et al.*, 2019). En outre, la croissance des biofilms épilithiques est favorisée par la rétention et le métabolisme de fines particules de matières organiques piégées dans la matrice polysaccharidique et provenant des fragments de feuilles en décomposition (Roche *et al.*, 2016). Il n'y a donc pas de raison de séparer totalement ces deux sources basales l'une de l'autre, car leurs influences respectives sur le fonctionnement des cours d'eau de tête de bassin semblent se chevaucher.

Diversité des macroinvertébrés et fonctionnement trophique

Au sein d'un petit cours d'eau d'altitude la diversité α de macroinvertébrés peut être faible, mais la diversité β (entre ruisseaux d'un même petit bassin versant ou entre petits bassins versants) peut induire une forte diversité γ à l'échelle régionale du grand bassin versant des rivières d'ordre supérieurs (Clarke *et al.*, 2008). A l'exception de la rare lamproie de planer (*Lampetra planeri*), les consommateurs primaires dans ces milieux sont tous des invertébrés, mollusques et annélides mais principalement des arthropodes (crustacés et insectes). En tant qu'unicques consommateurs des ressources basales, ils jouent un rôle essentiel dans l'affectation du flux d'énergie soit localement vers des espèces de poisson à intérêt patrimonial soit vers l'aval via les phénomènes de dérivation ou d'exportation de la MOPF issue de la fragmentation des litières (Wallace & Webster, 1996). Les macroinvertébrés sont répartis dans des groupes fonctionnels trophiques (*FFG : Fonctionnal Feeding Group*)

redéfinis par Cummins en 2018, principalement basés sur la structure et les adaptations des pièces buccales : déchetiseurs (ou broyeurs), racleurs (ou brouteurs), collecteurs et prédateurs. Les déchetiseurs sont principalement des amphipodes du genre *Gammarus*, des petits plécoptères *Leuctridae* et *Nemouridae* et plusieurs genres de trichoptères, *Sericostoma*, *Chaetopteryx*, *sf. Limnephilinae*, etc. Ces déchetiseurs utilisent les litières conditionnées par les hyphomycètes comme habitat et principale source d'alimentation (Wallace & Webster, 1996; Dangles & Guérol, 2001 ; Figure 4). Les racleurs présentent des adaptations morpho-anatomiques (aplatissement dorso-ventral ou présences de ventouses) en plus de spécialisations marquées des appendices buccaux qui leur permettent d'exploiter les biofilms et donc une partie de la production primaire (Cummins, 2018). Ce sont principalement des larves d'éphéméroptères *Heptageniidae* et de petits gastéropodes *Ancylidae* dans les secteurs de tête de bassin. A côté de ces deux groupes fonctionnels se trouvent les collecteurs (Figure 4), une guildes assez diverse d'invertébrés utilisant comme ressource les débris de matière organiques fine (MOF). Ces derniers sont récoltés activement par de minuscules coléoptères (*Elmidae*), de divers plécoptères et des éphéméroptères *Baetidae*. La MOF peut être mélangée à du sédiment et récupérée par des « *deposit-feeders* » comme les diptères chironomes, (e. g. *Diamesinae* ; Niedrist & Füreder, 2017). Certains collecteurs vont se spécialiser sur la MOF dérivante dans la colonne d'eau et logiquement leur abondance sera d'autant plus importante que la distance aux sources s'élève (Richardson, 2019). En tête de bassin, il s'agit presque uniquement de diptères filtreurs *Simuliidae* et d'un petit nombre de trichoptères *Philopotamidae* et *Hydropsychidae* à filet de soie récupérateur (Clarke *et al.*, 2019). Les bivalves Unionoïdes (*Margaritifera margaritifera*) ont quant à eux pratiquement disparus (Young *et al.*, 2001).

Ces trois groupes fonctionnels constituent le second niveau trophique (Füreder *et al.*, 2003) et soutiennent un troisième niveau trophique (Cugno & Robinson, 2017) constitué de prédateurs invertébrés représentés principalement par des trichoptères du genre *Rhyacophila* divers plécoptères *Perloidea*, des Platyhelminthes (planaires) et *Hirudinea* (sangues). En sommet de chaîne se trouvent les stades juvéniles (≤ 3 ans) de la truite fario (*Salmo trutta fario*) accompagnés ou non, du chabot (*Cottus gobio*), deux espèces invertébrées patrimoniales (Lagarrigue *et al.*, 2001). **Si ces groupes fonctionnels ont un aspect pratique et sont utilisés dans les méthodes de suivis DCE des cours d'eau, ils ont souvent été discutés car, dans de nombreuses situations et particulièrement dans les ruisseaux forestiers ou d'altitude, ces pré-assignations se sont révélées un peu trop schématiques** (Mihuc & Minshall, 1995; Mihuc, 1997). Les classifications fonctionnelles résultent, en effet, principalement d'études sur des rivières de piémont (\geq ordre 4) et leur prise en compte dans les milieux d'altitude peut conduire à des interprétations erronées de l'utilisation des ressources organiques (Dangles & Guérol, 2001; Niedrist & Füreder, 2017). Ainsi malgré leur

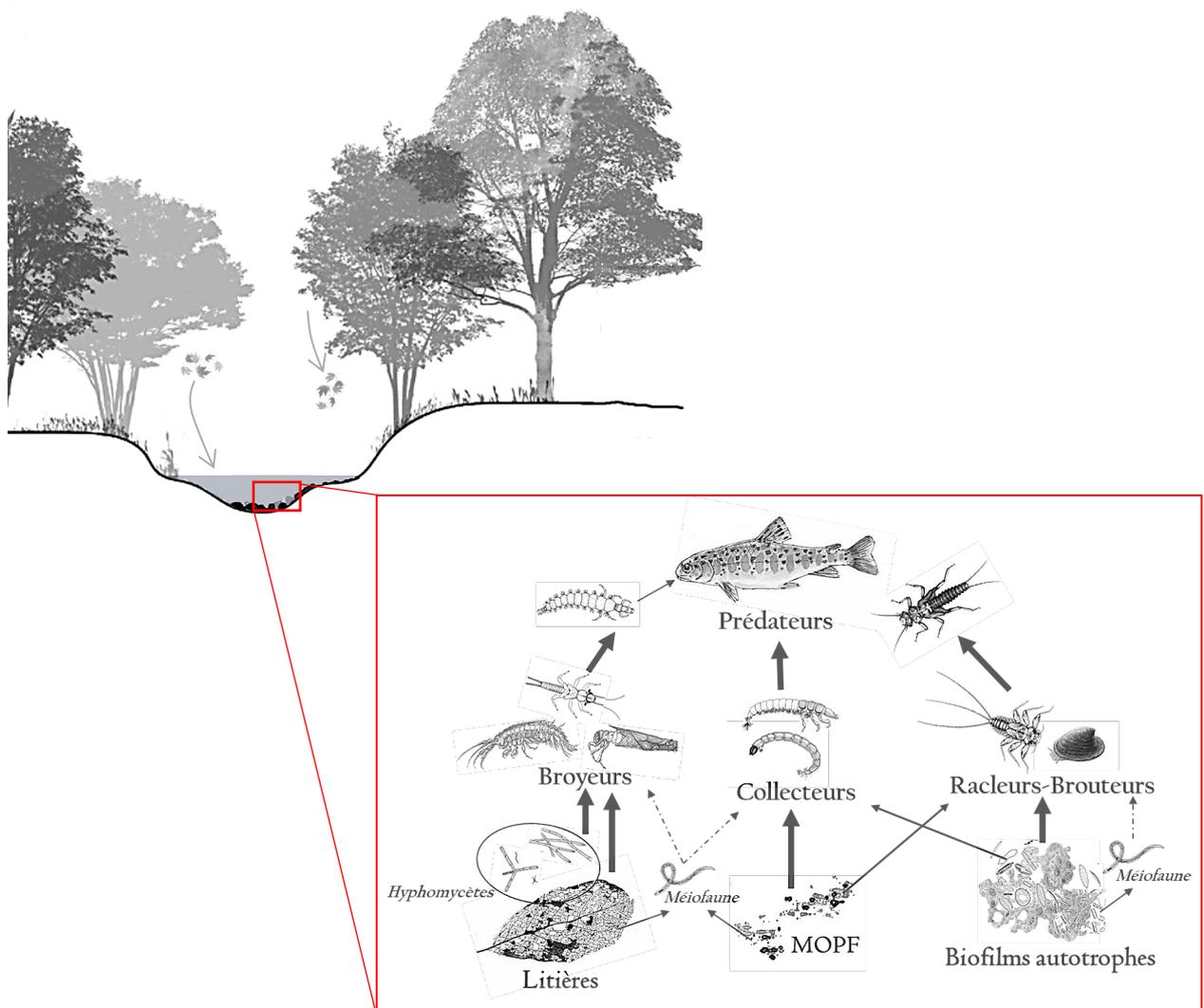


Fig. 4. Réseau trophique simplifié dans un ruisseau de tête de bassin à ripisylve arborée.

Les flèches indiquent les liens trophiques entre les organismes du milieu lotique. L'épaisseur des flèches représentent la proportion de contribution de la proie au consommateur.

FFG « officiel », les éphémères *Baetis alpinus* (collecteurs) ou *Rhithrogena* (racleurs-brouteurs) ont pu être souvent détectées, respectivement, comme algivores ou détritivores (McShaffrey & McCafferty, 1988; Füreder *et al.*, 2003). De même, un bon nombre d'espèces de plécoptères du genre *Nemouroidea*, rangés dans les déchiqueteurs, présente des contenus digestifs très variés qui vont bien au-delà de la simple exploitation de la litière (Dumont & Verneaux, 1976; McShaffrey & McCafferty, 1988; Bottová *et al.*, 2013; Feeley & Kelly-Quinn, 2015). **Les cours d'eau de tête de bassin versant sont des environnements plus contraints et plus instables** (Ceola *et al.*, 2013) que les secteurs avals riches en habitats diversifiés (Amoros & Petts, 1993). **Les macroinvertébrés semblent y adopter des comportements alimentaires opportunistes omnivores** (Dangles & Guérol, 2001; Maiolini & Silveri, 2005; Felten *et al.*, 2008). L'ingestion complémentaire de matériel animal par certains consommateurs primaires y a bien été documentée (Lancaster *et al.*, 2005; V Felten *et al.*, 2008; Niedrist & Füreder, 2017) ainsi que la probable assimilation de micro-invertébrés méiofauniques ingérés en même temps que du biofilm ou du matériel foliaire conditionné (Majdi & Traunspurger, 2017). **Cette plasticité alimentaire pourrait résulter de compromis comportementaux vis-à-vis des ressources disponibles, de manière à essayer de maximiser les gains en nutriments tout en réduisant les coûts liés à la recherche, l'exploitation et l'assimilation de la nourriture.** Ces phénomènes sont particulièrement étudiés chez les insectes terrestres (Le Gall & Behmer, 2014) et assez peu dans les milieux lotiques (Flores *et al.*, 2014). La qualité nutritionnelle des ressources pourrait jouer un rôle prépondérant. Ainsi Frost *et al.* (2005 & 2006) ont démontré que **certains déchiqueteurs cherchaient à compenser les limitations en nutriments en augmentant leur taux d'ingestion, mais surtout en se nourrissant sélectivement de ressources ayant des propriétés nutritives plus élevées que le matériel organique détritique.**

La qualité nutritionnelle des ressources allochtones et autochtones

Si la quantité d'énergie disponible à la base des réseaux trophiques est le facteur clef du fonctionnement des écosystèmes (Lindeman, 1942), l'efficience du transfert de cette énergie dépend de paramètres comme la longueur de chaîne ou la qualité nutritionnelle des ressources basales puis des différents niveaux trophiques (Dickman *et al.*, 2008). Les petits ruisseaux forestiers sont particulièrement intéressants de ce point de vue, puisqu'ils sont susceptibles de recevoir de grandes quantités de matières végétales de faible qualité avec parallèlement un développement limité de la production primaire considérée comme de bien meilleure qualité nutritionnelle, du moins en ce qui concerne les biofilms (Guenet *et al.*, 2010). En plus de l'ingestibilité et de la digestibilité de la ressource, les qualités chimiques et

biochimiques sont cruciales dans l'évaluation de sa qualité nutritionnelle (Ruess & Müller-Navarra, 2019).

Aspects stœchiométriques de la qualité nutritionnelle

Les macroinvertébrés ont des besoins précis en différents éléments chimiques (C, N, P, Ca, Mg, K, etc.) afin de maintenir la stabilité de leur composition individuelle élémentaire (principe de l'homéostasie, Elser *et al.*, 2000). Ainsi, les groupes fonctionnels (FFG) ont tendance à se distinguer du point de vue de cette composition élémentaire, les prédateurs ayant par exemple une teneur en N plus élevée que les autres groupes (Evans-White *et al.*, 2005). Les consommateurs primaires peuvent être soumis à des contraintes stœchiométriques en fonction des sources alimentaires disponibles (Frost *et al.*, 2006). Les litières surtout riches en C, peuvent induire des déséquilibres en N et P en fonction du degré de résorption des nutriments foliaires par l'arbre, avant l'abscission (Brant & Chen, 2015). En revanche, la colonisation des feuilles par les hyphomycètes permet de diminuer les rapports C/P et C/N en faveur des besoins des macroinvertébrés (Evans-White *et al.*, 2005; Danger *et al.*, 2013). Les biofilms autotrophes sont plus intéressants que les litières de ce point de vue, les microalgues ont des rapports C/P et C/N naturellement faibles (Hessen *et al.*, 2002), mais qui peuvent varier en fonction de l'éclairage, du PRS et des nitrates dissous ainsi que du stade de croissance et de la composition taxonomique des biofilms (Hillebrand & Sommer, 1999).

Qualité nutritionnelle et composés lipidiques essentiels

Un très grand nombre d'études entreprises dans les milieux océaniques et lacustres ont montrés que les teneurs en composés biochimiques essentiels des ressources peuvent influencer directement la croissance et la reproduction des consommateurs et, par conséquent, les relations trophiques (Ruess & Müller-Navarra, 2019). En dépit d'un intérêt grandissant pour le rôle et la biodisponibilité des vitamines et des acides aminés (Guisande *et al.*, 2003), les principaux composés qui ont reçu l'attention des chercheurs sont les acides gras (AG) et les stérols (Müller-Navarra, 2008).

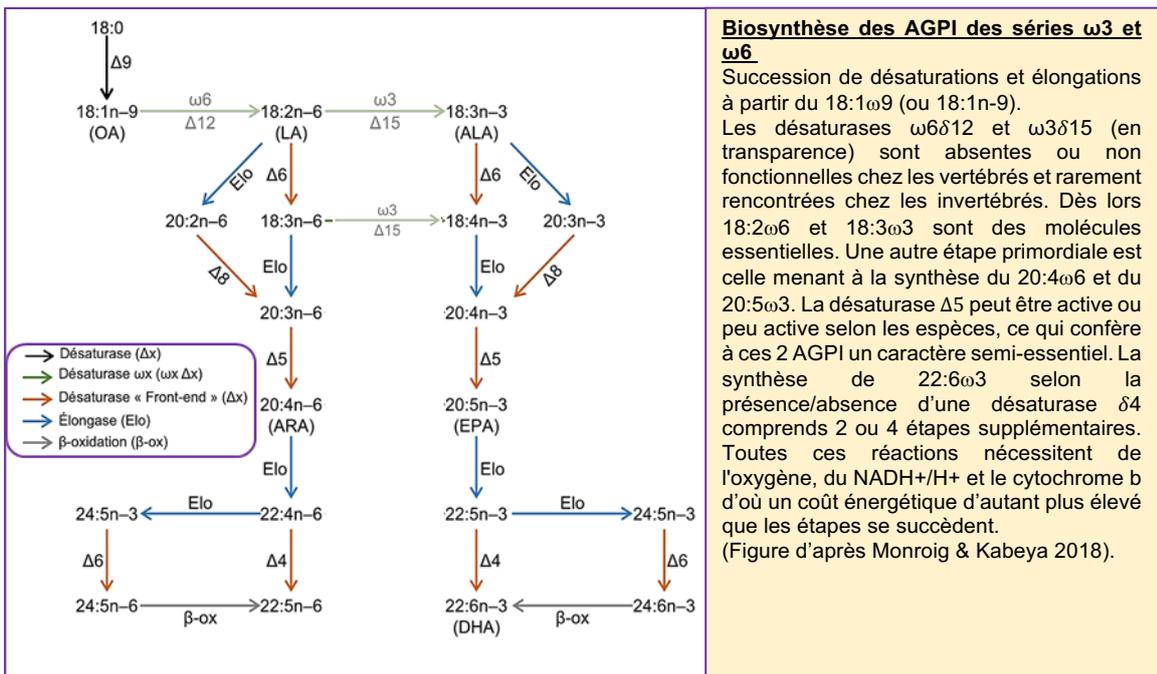
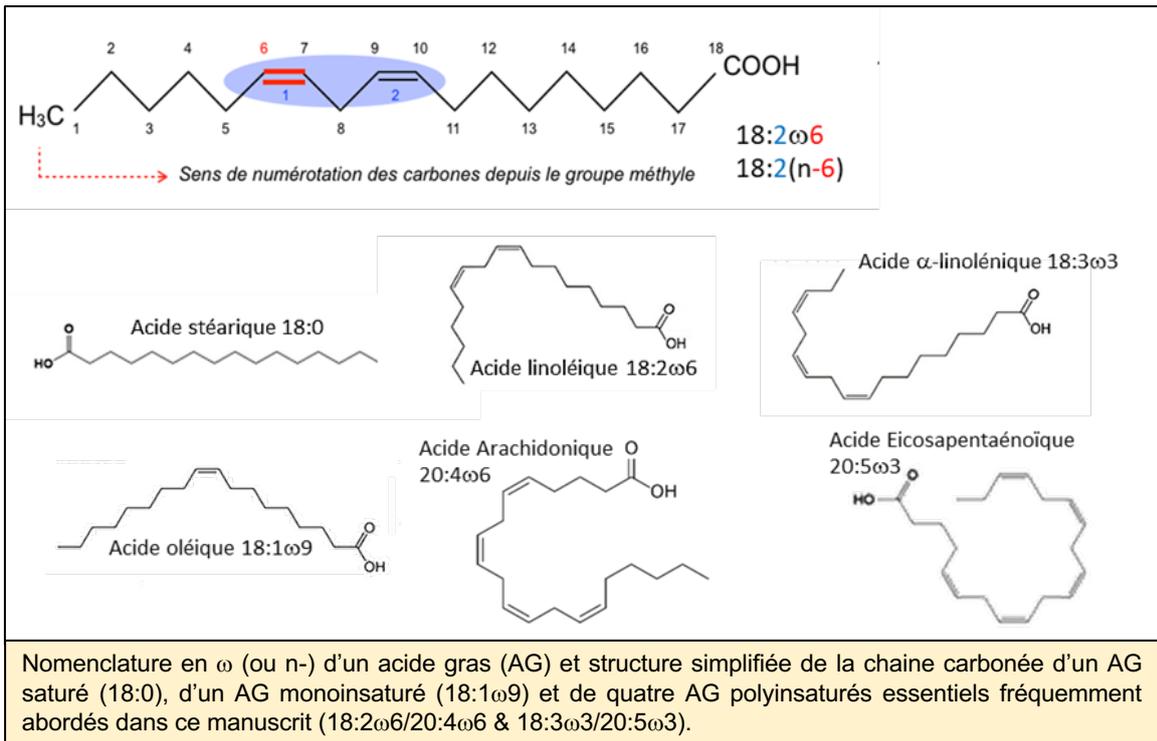
Les acides gras essentiels

Parmi les AG, seuls les acides gras polyinsaturés (AGPI) des séries $\omega 3$ et $\omega 6$ (Encadré 1) ont un caractère essentiel ou semi-essentiel pour les espèces animales (Tocher *et al.*, 2019). Reposant sur un nombre élevé d'études *in situ* ou expérimentales, il existait un consensus pour considérer les AG 18:3 $\omega 3$ et 18:2 $\omega 6$ comme ayant un strict caractère

essentiel, car non synthétisables par les animaux (Tocher *et al.*, 2019), du fait de l'absence des enzymes désaturases $\omega 6 \Delta 12$ et $\omega 3 \Delta 15$ opérant sur les désaturases (Monroig & Kabeya, 2018). Cependant depuis deux années, les gènes codant pour ces désaturases de même que leur activité ont pu être mis en évidence chez un tout petit nombre d'espèces d'invertébrés (parmi les cnidaires, les nématodes, les annélides, les rotifères, les céphalopodes, les gastéropodes et les copépodes), remettant partiellement en cause le caractère strictement essentiel du 18:3 $\omega 3$ et du 18:2 $\omega 6$ dans le monde animal (Kabeya *et al.*, 2018; Garrido *et al.*, 2019). L'aspect essentiel des autres AGPI, les longs $\omega 3$ et $\omega 6$ (20:5 $\omega 3$, 22:6 $\omega 3$ et 20:4 $\omega 6$), dépend de facteurs phylogénétiques, ordres et/ou familles, partageant des besoins assez proches mais susceptibles d'être considérablement modifiés par le milieu où l'espèce a évolué ainsi que son régime alimentaire (Hulbert & Abbott, 2012).

En se limitant aux milieux aquatiques uniquement, seul un petit nombre d'espèces modèles (Truite arc-en-ciel, *Danio rerio*, *Daphnia psp.* etc..) ou à forte valeur ajoutée (la plupart des animaux élevés en aquaculture, les espèces patrimoniales) ont fait l'objet d'études expérimentales permettant de déterminer précisément leurs besoins physiologiques en AGPI (Arts *et al.*, 2001; Hulbert & Abbott, 2012). Il est bien évidemment illusoire de pouvoir connaître ces besoins pour chaque espèce animale. On admet donc que l'aspect essentiel des AGPI (cf. Encadré 1) repose sur le fait que ce sont des composés dont la nature bioactive a un effet positif significatif sur le développement d'un organisme (ou tout autre réponse biologique) et pas nécessairement dû à une incapacité à les synthétiser en quantité suffisante (Tocher *et al.*, 2019). De même pour des espèces qui ont des capacités importantes de biosynthèse des longs AGPI (Salmonidés, crevettes pénéides), les recherches menées en aquaculture ont clairement démontré qu'apporter ces composés dans leur nourriture améliorerait leur croissance et leur fécondité (Tocher *et al.*, 2000; Glencross & Smith, 2001; Morais *et al.*, 2015). **Si les compositions en AG des macroinvertébrés des cours d'eau sont assez bien connues**, notamment celles des arthropodes (Ghioni *et al.*, 1996; Torres-Ruiz *et al.*, 2007; Descroix *et al.*, 2010), **aucune étude expérimentale n'a à ce jour été conduite pour évaluer précisément les besoins en AGPI $\omega 3$ et $\omega 6$ des principaux taxons rencontrés**. Les auteurs s'intéressant au transfert et au rôle de ces molécules dans les réseaux trophiques lotiques (Guo *et al.*, 2017; Torres-Ruiz & Wehr, 2019), s'appuient donc sur les données et conclusions issues des recherches sur les insectes terrestres (Sørensen, 2012) et/ou de l'aquaculture des crustacés et mollusques (Xu, Zhang, *et al.*, 2017). Les AG 18:3 $\omega 3$ et 18:2 $\omega 6$ sont donc considérés comme essentiels et le 20:5 $\omega 3$ (ou EPA) et le 20:4 $\omega 6$ (ou ARA) comme semi-essentiels car nécessitant un apport alimentaire substantiel permettant de couvrir les besoins métaboliques des invertébrés (Ruess & Müller-Navarra, 2019).

Encadré 1 : les Acides gras polyinsaturés



Principales fonctions physiologiques des AG Polyinsaturés ω 6 et ω 3

→ Abondant dans les phospholipides membranaires ils participent aux maintiens de la fluidité membranaire et assurent sa perméabilité sélective et son adaptation au froid.

→ 22:6 ω 3 et/ou 20:5 ω 3 (suivant les taxons et les milieux) sont très concentrés dans les tissus nerveux (œil composé des lépidoptères par ex) – Les déficiences entraînent des problèmes cognitifs et de vision chez les vertébrés et probablement chez les arthropodes.

→ Le 18:2 ω 6, le 20:4 ω 6 et le 20:5 ω 3 sont les précurseurs d'hormones tissulaires telles que les eicosanoïdes, qui servent de médiateurs dans les processus inflammatoires, la réponse immunitaire ou la croissance cellulaire chez les crustacés et les insectes. Le 18:3 ω 3 est un précurseur de phéromones, d'attractants et de répulsifs chez l'insecte.

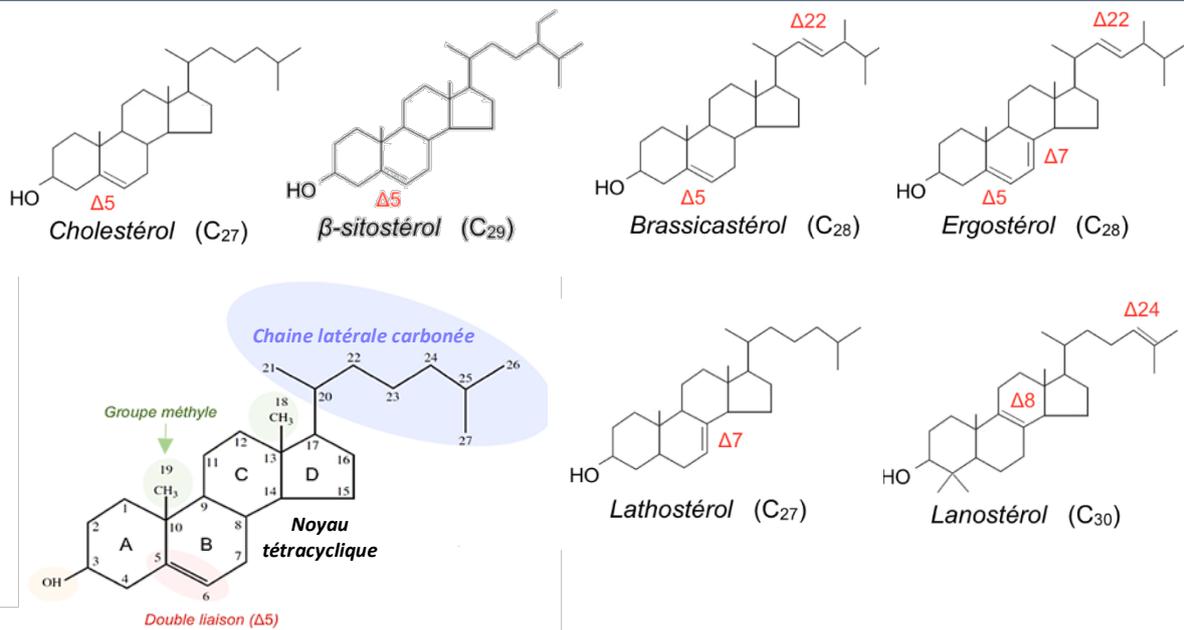
Les 20:4 ω 6, 20:5 ω 3 et 22:6 ω 3 alimentaires améliorent la croissance, le développement (pupaison) et la reproduction chez les cladocères, copépodes, décapodes et lépidoptères. Le 18:2 ω 6, 20:4 ω 6 et le 18:3 ω 3 évitent les malformations alaires puis sont catabolisés lors du vol nuptial. *Références* : Vance & Vance (2002) ; Sorensen (2012) ; Hulbert & Abbott (2012) ; Wiktorowska-Owczarek et al. (2015) ; Stanley & Kim (2019) ; Ruess & Müller-Navarra (2019).

Le 22:6 ω 3 (ou DHA) semble n'avoir d'importance que pour les *Gammaridae*, ces amphipodes ayant conservé des profils d'AGPI proches de ceux de leur ancêtres marins (Biandolino & Prato, 2006). Dès lors, les sources organiques allochtones et autochtones des cours d'eau n'auront pas la même valeur nutritionnelle (Brett *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018). **Les feuilles d'arbres** et les angiospermes en général **contiennent du 18:3 ω 3 et du 18:2 ω 6 mais sont dépourvues de longs AGPI** (Mueller *et al.*, 2012). **Le conditionnement microbien ne modifie pas leurs profils car les bactéries des litières ne contiennent pas d'AGPI** (Desvilettes *et al.*, 1997; Torres-Ruiz & Wehr, 2010) et **les hyphomycètes synthétisent uniquement des AGPI courts** (18:3 ω 3 et 18:2 ω 6/18:3 ω 6 ; Funck *et al.*, 2015). **La litière est donc considérée comme une ressource de faible qualité nutritionnelle lipidique, étant carencée en 20:5 ω 3 et 20:4 ω 6** (Lau *et al.*, 2009; Brett *et al.*, 2017). **En revanche, les microalgues et les algues benthiques sont de meilleure qualité** de ce point de vue, **en raison de leurs fortes teneurs en AGPI et en particulier ceux à longue chaîne (20:5 ω 3, 22:6 ω 3 et 20:4 ω 6)** (Webb-Robertson *et al.*, 2011; De Andrade Tomaz *et al.*, 2012; Taipale *et al.*, 2013; Klaveness, 2017). Il semble que pour les macroinvertébrés consommateurs primaires, les diatomées des biofilms soient une source majeure d'AGPI, y compris pour des taxons plutôt spécialisés sur l'exploitation des litières (Torres-Ruiz *et al.*, 2010; Twining *et al.*, 2017). **Cependant si l'assimilation d'AGPI provenant de microalgues épilithiques est indéniable de la part de racleurs comme les *Heptageniidae* et de certains déchiqueteurs tels que *Gammarus fossarum* (Kühmayer *et al.*, 2020), seul Crenier et ses collaborateurs (2017) ont pu démontrer que les longs AGPI des diatomées, avaient un effet positif sur le taux de croissance des juvéniles de *Gammarus fossarum*.** Il faut de plus tenir compte du fait que les taxons algaux diffèrent sensiblement dans leur composition en AG essentiels et auront ainsi une qualité nutritionnelle variable. Si les diatomées des biofilms sont en effet riches en 20:5 ω 3 et contiennent de petites quantités de 22:6 ω 3 et 20:4 ω 6 (Napolitano, 1999), les chlorophytes et les cyanobactéries en sont dépourvues se limitant à des AGPI à 18 atomes de carbone (Taipale *et al.*, 2013). Quant aux formes algales pluricellulaires avec thalle, elles appartiennent aux rhodophytes ou aux chrysophytes et sont intéressantes (mais peu étudiées) sur le plan nutritionnel car relativement riches en 20:5 ω 3 et 20:4 ω 6 (Lang *et al.*, 2011; Klaveness, 2017).

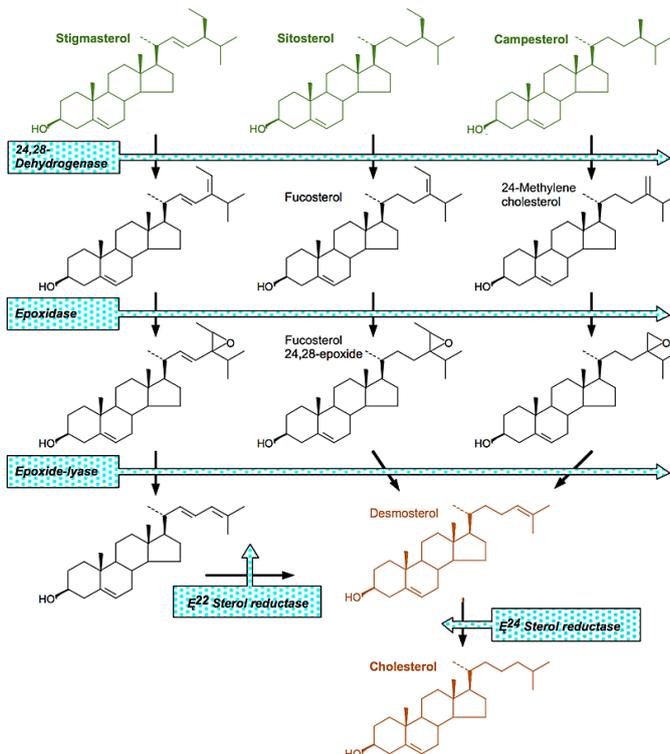
Les stérols

L'auxotrophie des stérols est très fréquente chez les invertébrés (Lafont *et al.*, 2012) et **aucune des différentes espèces d'arthropodes étudiées à ce jour n'a montré de capacité à synthétiser *de novo* le cholestérol** (Perry *et al.*, 2019). Par conséquent, **les arthropodes** (Encadré 2) **doivent directement obtenir du cholestérol à partir de leur nourriture ou le bioconvertir par désalkylation d'un stérol analogue d'origine alimentaire** (Behmer, 2017). Dans les cours d'eau, les sources basales vont uniquement apporter des phytostérols aux consommateurs primaires (Mondy *et al.*, 2014). En plus de leur concentration variable, ces phytostérols peuvent différer sur le plan stéréochimique et donc plus ou moins convenir aux exigences des invertébrés si l'on se réfère aux observations faites chez les cladocères lacustres (Martin-Creuzburg & Von Elert, 2004). Cependant aucune étude n'a été entreprise dans ce sens chez les macroinvertébrés à l'exception des travaux de Mondy *et al.* (2014) portant sur l'isopode *Proasellus meridianus* et de Gergs *et al.* (2015) portant sur l'amphipode *Gammarus roeselii*. Il ressort de ces travaux et de ceux effectués sur les insectes terrestres phytophages (Behmer, 2017) que les stérols en $\Delta 7$ sont moins adaptés que les stérols en $\Delta 5$ et pour certaines espèces, totalement inutilisables. **L'adéquation des phytostérols diminue d'autant que la stéréochimie du noyau tétracyclique diffère de celle du cholestérol** (par exemple : double liaison en $\Delta 8$, $\Delta 7$ ou $\Delta 4$) et elle s'affaiblit encore plus si un groupe alkyle est positionné en C24 sur la chaîne latérale carbonée (Lafont *et al.*, 2012; Behmer, 2017). **Ces résultats suggèrent que les variations d'apport en stérols alimentaires pourraient être particulièrement importantes pour les macroinvertébrés consommateurs primaires.** Cependant, les litières de feuilles d'arbre contiennent des phytostérols en $\Delta 5$, très majoritairement du β -sitostérol puis du stigmastérol et en moindre mesure, du campestérol (Nguyen-Tu *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2017). Les microorganismes vont apporter des stanols, résultant de la réduction d'une partie du β -sitostérol ou du stigmastérol, et massivement de l'ergostérol (stérol en $\Delta 5,7$) caractéristique du développement des hyphomycètes (Rieley *et al.* 1991; Weete *et al.*, 2010). **Les litières de feuilles semblent donc fournir aux consommateurs déchiqueteur des stérols de qualité.** En effet le β -sitostérol est en général aisément converti en cholestérol par la plupart des espèces d'arthropodes étudiées (Lafont *et al.*, 2012) et l'ergostérol peut-être substituable au β -sitostérol, notamment chez les crustacés (Martin-Creuzburg & Von Elert, 2004; Mykles 2010). Les microalgues vont se caractériser par une diversité plus élevée de phytostérols avec bon nombre d'isomères et d'épimères. Si les phytostérols ubiquistes β -sitostérol, stigmastérol ou campestérol sont généralement abondants, d'autres composés sont détectés mais variables suivant les taxons, tels que du fucostérol/isofucostérol, du brassicastérol/épibrassicastérol et des stérols en $\Delta 7$ sans intérêt nutritionnel (chondrillastérol, fungistérol) (Martin-Creuzburg & Merkel, 2016).

Encadré 2 : les Stérols



Structure du cholestérol (Alcool tétracyclique à 27 carbones et à noyau stérane avec double liaison en $\Delta 5$) et exemples de stérols en $\Delta 5$ et $\Delta 5,7$ (utilisables chez les arthropodes pour synthétiser le cholestérol) et de deux stérols en $\Delta 7$ et $\Delta 8$ (plus ou moins appropriés selon les espèces étudiées à l'heure actuelle).



Voies métaboliques de la désalkylation de 3 phytostérols courants (chez l'insecte). La réaction complexe nécessite plusieurs enzymes pour passer de **phytostérols $\Delta 5$** en **C28/C29** au **desmostérol (C27)** puis au produit final le **cholestérol (C27)**. Cette série de suppression de carbones et de réduction des doubles liaisons est aussi opérante chez les crustacés. Cependant, à partir de stérols en $\Delta 7$ ou $\Delta 8$ il faut supprimer ces doubles liaisons et surtout en introduire une en $\Delta 5$ → étape limitante ou pas selon les insectes étudiées (adapté de Lafont et al. 2017 – Ecdysteroid chemistry and biochemistry).

Principales fonctions des stérols et du cholestérol chez les arthropodes

L'absence de squalène-synthétase (et/ou d'autres enzymes) rend les arthropodes incapables à la synthèse *de novo* du cholestérol. Celui-ci est alors produit à partir de stérols alimentaires compatibles.

→ Le cholestérol est le précurseur indispensable de la synthèse des ecdystéroïdes chez les crustacés et les insectes. Il est converti en 7-dehydrocholestérol puis en divers variants (selon les taxons) de l'ecdysone, l'hormone de mue. Chez certains hémiptères le cholestérol ne peut pas être bioconverti à partir de phytostérols et une autre hormone de mue la makistéron-A est produite à partir de 24-méthylène cholestérol. On ignore si cela peut se produire chez certains ordres d'insectes aquatiques.

→ Le cholestérol est un insert membranaire. Il module la fluidité des membranes en agissant sur les acides gras des phospholipides qu'il écarte ou regroupe selon l'état plus ou moins fluide de la membrane. Les arthropodes peuvent utiliser des stérols alimentaires comme inserts membranaires complémentaires mais plus leur stéréochimie s'éloigne du cholestérol moins ils semblent convenir.

→ La substitution d'une partie des phytostérols en $\Delta 5$ ou de l'ergostérol par du cholestérol dans l'alimentation des crevettes d'élevage a peu d'effet sur la survie mais améliore leur croissance et les gains en protéines. En revanche la suppression complète du cholestérol peut affecter la survie des stades juvéniles. Les besoins semblent spéci-spécifiques avec des rapports entre les phytostérols et des rapports entre cholestérol et phytostérols variables.

Réfs : Teshima et al. (1989) ; Mykles (2010) ; Pilorget et al. (2010) ; Lafont et al. (2017) ; Behmer (2017) ; Perry et al. (2019).

Au premier abord, les biofilms autotrophes des cours d'eau n'offrent donc pas de stérols réellement supérieurs à celles des feuilles conditionnées, bien que de petites concentrations en cholestérol ont été reportées chez les diatomées et certains taxons de chlorophytes benthiques (Cranwell *et al.*, 1990; Randhir *et al.*, 2020). Dans ce cas et en fonction de la composition taxonomique des microalgues des biofilms, un apport direct de cholestérol, pourrait permettre un gain de croissance chez les consommateurs primaires si l'on se réfère aux données expérimentales issues de l'aquaculture des crustacés décapodes (Teshima *et al.*, 1989; Mykles 2010). Enfin les profils de stérols des algues à thalle d'eau douce sont très peu connus, exception faite des rhodophytes du genre *Porphyridium* riches en cholestérol et donc potentiellement d'intérêt (Durmaz *et al.*, 2007).

OBJECTIFS ET PLAN DE THESE

Objectifs

Ainsi dans les ruisseaux de tête de bassin des régions tempérées, les consommateurs invertébrés doivent obtenir de l'énergie et des nutriments à partir d'un nombre restreint de sources de matière organique, ces dernières pouvant être d'origine allochtone ou autochtone. Si le RCC (*river continuum concept*, Vannote *et al.*, 1980) insiste sur le caractère prépondérant des sources de matières organiques allochtones dans ces secteurs amonts, le concept alternatif du RPM (*riverine productivity model* ; Thorp & DeLong, 1994) met, quant à lui, en exergue l'importance de la production autochtone phototrophe considérée comme plus assimilable que le matériel détritique. Ces deux concepts s'achoppent sur la prise en compte de la qualité nutritionnelle des différentes sources disponibles et sur l'aspect paradoxal que représentent, d'un côté des apports massifs de matériel détritique de médiocre qualité nutritionnelle (Hall *et al.*, 2001) et de l'autre, une production primaire autochtone faible (équivalente à environ 7% des apports annuels de carbone allochtone) mais de haute qualité nutritionnelle (Ziegler & Lyon, 2010). Ce paradoxe souligné par de nombreux auteurs (Lau *et al.*, 2009; Tank *et al.*, 2010; Brett *et al.*, 2017) a également été observé dans d'autres écosystèmes aquatique, tels que les lacs humiques et les annexes fluviales, où les apports en matière organique allochtone sont très élevés (Berggren *et al.*, 2015). Les résultats des recherches entreprises dans ces milieux montrent une importante assimilation de carbone allochtone de la part de microcrustacés planctoniques dès lors que leur couverture en nutriments essentiels est assurée par l'ingestion complémentaire de microalgues riches en AGPI et acides aminés particuliers (Solomon *et al.*, 2011; Masclaux *et al.*, 2013; Taipale *et al.*, 2014). En milieu lotique, les études effectuées très récemment ont aussi tendance à aller dans ce sens (Torres-Ruiz & Wehr, 2019). Toutefois le caractère essentiel de la consommation régulière de microalgues par divers macroinvertébrés a rarement pu être démontré, à l'exception des données obtenues par Crenier *et al.* (2017) Confrontés à ces litières de feuilles de qualité nutritionnelle variable et aux biofilms épilithiques à développement fluctuant et saisonnier, les macroinvertébrés des ruisseaux de tête de bassin paraissent développer des stratégies nutritionnelles compensatoires. Elles reposent sur deux modes de comportement, l'omnivorie sensu stricto et le recours à l'ingestion de microalgues benthiques, l'un n'étant pas exclusif de l'autre (Lancaster *et al.*, 2005). L'omnivorie intra guildes est un phénomène complexe qui tend à stabiliser le réseau trophique, mais qui permet aussi de faire face à des périodes de limitation en nourriture (Lancaster *et al.*, 2005; Wootton, 2017). L'ingestion de microalgues, surtout pour les taxons spécialisés sur le matériel détritique, semble permettre la

couverture en AGPI et éventuellement en cholestérol ou stérols à condition toutefois qu'il y ait une biomasse algale suffisante (Kühmayer *et al.*, 2020) et disponible aux périodes clefs de leur développement.

Dans ce contexte, l'objectif général de mon travail de thèse consacré aux cours d'eau de tête de bassin était de confirmer l'importance de la production primaire autotrophe vis-à-vis de l'état nutritionnel de macroinvertébrés appartenant à des groupes fonctionnels différents. J'ai ainsi souhaité évaluer :

1) Si l'accès à des diatomées benthiques améliore réellement la croissance et la survie de taxons caractéristiques des ruisseaux de tête de bassin, en lien avec un apport nutritionnel en AGPI à longue chaîne (20:5 ω 3 / 20:4 ω 6) et éventuellement en stérols.

2) Si ces nutriments essentiels bénéficient à la majorité des guildes trophiques de macroinvertébrés (déchiqueteurs, filtreurs/collecteurs, racleurs) y compris les prédateurs et s'ils influencent la structure des réseaux trophiques.

3) Dans quelle mesure les apports et les besoins en AGPI à longue chaîne et en stérols pouvaient varier au cours de l'année en fonction de l'ombrage induit par la ripisylve et les pics saisonniers de litière et de production primaire autochtone.

Organisation du manuscrit

Après l'exposé des différentes approches méthodologiques utilisées au cours de mes travaux (**Chapitre I**), les principaux résultats que j'ai obtenus seront présentés dans les **chapitres II, III, IV et V**.

Le **Chapitre II** est une étude expérimentale menée sur le déchetiqueur *Gammarus pulex* et le racleur-brouteur *Rhithrogena semicolorata* appartenant à deux familles particulièrement abondantes dans les ruisseaux d'altitude du Massif Central. Il s'agit d'un article soumis pour publication dans le journal *Freshwater Biology* et intitulé « **Microalgal food sources largely improve macroinvertebrates growth in detritus based-headwater streams: Evidences from an instream experiment** ». Dans cet article nous nous sommes interrogés sur l'utilisation des principales sources basales par ces macroinvertébrés, lorsque la production primaire est facilement accessible ou, à l'opposé, nettement réduite dans les secteurs à fort couvert arboré à la fin du printemps. Nous avons émis l'hypothèse qu'un accès limité aux AGPI à longue chaîne pourrait constituer une contrainte trophique pour ces deux espèces, dont l'importance dépend probablement de leur groupe fonctionnel (FFG) et de leur stade de développement. De plus si contrainte il y a, celle-ci devrait se manifester par des effets sur la croissance et éventuellement la survie des individus n'ayant pas eu accès aux biofilms autotrophes. Ainsi, nous avons réalisé une expérience dans des conditions semi-naturelles, en installant de petits canaux de plexiglass dans un ruisseau artificiel et en les exposants soit à la lumière naturelle, soit à l'obscurité. Les deux macroinvertébrés ont été placés dans ces canaux en présence de biofilms épilithiques et de litières conditionnées selon les deux situations d'exposition. Nous avons utilisé les signatures isotopiques stables du carbone et de l'azote et une approche statistique bayésienne afin de déterminer la contribution de chaque source de matière organique au régime alimentaire des deux espèces sélectionnées. L'origine des nutriments essentiels (AGPI et stérols) a été tracée grâce à l'analyse isotopiques des composés spécifiques (AICS, *engl.* : CSIA).

Le **chapitre III** est un article proposé pour publication dans la revue *Hydrobiologia*, il s'intitule « **Early spring food resources and the trophic structure of macroinvertebrates in a small headwater stream as revealed by bulk and fatty acid stable isotope analysis.** ». L'objectif principal était de caractériser, au début du printemps avant la reprise de la végétation, les liens trophiques qui s'établissent entre les différentes sources organiques et les principaux taxons de macroinvertébrés d'un petit cours d'eau forestier (ordre 1) situé en moyenne montagne. J'ai formulé l'hypothèse selon laquelle les consommateurs primaires, ainsi que les invertébrés prédateurs dépendaient à la fois des sources allochtones et des sources autochtones, mais que les microalgues épilithiques étaient prépondérantes pour assurer la couverture des besoins en AGPI essentiels. De plus en liaison avec les observations

récentes de Torres-Ruiz & Wehr (2019), j'ai souhaité prendre en compte l'importance éventuelle des bryophytes aquatiques comme ressource autochtone et source alternative d'AGPI à longue chaîne. Les liens trophiques entre les sources basales et les principaux consommateurs (neuf taxons sélectionnés au total) ont été déterminés à l'aide des signatures isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$). L'origine et le transfert d'un certain nombre d'AG, dont les AGPI essentiels, ont été évalués en s'appuyant sur une analyse isotopique des composés spécifiques (AICS).

Les recherches entreprises sur ce petit ruisseau d'ordre 1 situé dans le massif des monts Dore ont été poursuivies et sont présentées en français dans les **Chapitre IV et V**, sous la forme de futurs articles. Les relations trophiques et le transfert des composés essentiels ont été analysés à trois dates clefs de l'année, le début du printemps (en avril période avec un couvert végétal non développé), l'été (en juillet avec un fort ombrage induit par une dense ripisylve de hêtres) et l'automne (en novembre, après la chute des feuilles). Les objectifs majeurs étaient d'évaluer les changements éventuels d'utilisation des sources basales en fonction de leur disponibilité saisonnière chez cinq espèces de macroinvertébrés de FFG différents. **Dans le chapitre IV**, l'accent a été mis sur la provenance et la dynamique des AG dans le réseau trophique et ses variations saisonnières possibles. **Dans le chapitre V**, ce sont les stérols qui ont été plus particulièrement analysés, afin d'appréhender les éventuelles limitations nutritionnelles saisonnières que chaque source basale pourrait présenter vis-à-vis des cinq espèces d'invertébrés sélectionnées.

Après l'exposé de ces chapitres le présent manuscrit se termine par une **discussion générale, ainsi que les conclusions et perspectives qui découlent de mon travail**, le tout constituant **le dernier chapitre (VI)**.

Chapitre 1

Approches méthodologiques

Sommaire Chapitre 1

1.1	Conditionnement et traitement du matériel biologique	32
1.1.1	Les litières de feuilles et la MOPF	32
1.1.2	Les Biofilms	33
1.1.3	Les Bryophytes.....	33
1.1.4	Les Macroinvertébrés.....	33
1.2	Démarche analytique.....	34
1.2.1	Analyse des isotopes stables du carbone (δC^{13}) et de l'azote (δN^{15}).....	34
	Détermination des valeurs de δC^{13} et de δN^{15}	36
1.2.2	Modèles de mélange	36
1.2.3	Analyse des compositions en Acides Gras des échantillons	37
	Extraction des lipides totaux – Séparation des classes de lipides	39
	Dérivation, séparation et identification/quantification des acides gras.....	39
	Contrôle et confirmation des identifications par GC-MS	44
1.2.4	Analyse des compositions en Stérols des échantillons.....	44
	Obtention et préparation des stérols	44
	Identification et quantification des stérols	46
1.2.5	Analyse isotopique des acides gras et des stérols	48
	Détermination des valeurs de δC^{13} des échantillons d'acides gras et de stérol	49

1 Chapitre 1

Approches méthodologiques

Je présente ici l'ensemble de la méthodologie commune aux quatre études réalisées dans le cadre de ma thèse afin d'éviter les redondances dans les articles et chapitres. Les procédés méthodologiques propres à chaque étude seront précisés dans les préambules des chapitres III à V.

1.1 Conditionnement et traitement du matériel biologique

Quelle que soient les études entreprises, nous avons toujours travaillé sur le même matériel biologique à l'exception des bryophytes, prélevées uniquement en milieu naturel sur le ruisseau d'Anglard. Il s'agissait de la litière de feuilles, de la Matière Organique Particulaire Fine (MOPF soit les particules organiques détritiques entre 1 mm et 0.25 mm), du biofilm épilithique et des macroinvertébrés.

Nous avons bénéficié de deux laboratoires de terrain pour traiter nos échantillons dans des délais très courts : la station biologique de l'UCA à Besse St-Anastaise (63) et le Conservatoire National du Saumon Sauvage (CNSS) à Chanteuges (43). Les analyses ultérieures (biochimie, etc..) ont été effectuées dans notre UMR (LMGE).

1.1.1 *Les litières de feuilles et la MOPF*

Les feuilles de litière sont récupérées manuellement et placées dans des glacières remplies d'eau pour le transport. Au laboratoire de terrain, les feuilles sont rincées délicatement plusieurs fois à l'eau claire, afin d'éliminer les fins débris minéraux et organiques et les éventuels microinvertébrés méiofauniques. Les feuilles sont réparties en lots homogènes et congelées à -80°C au LMGE dans l'attente des analyses.

Au laboratoire de terrain la MOPF est récupérée par tamisage du matériel fin déposé dans les bacs de tri et de séparation des lots de macroinvertébrés prélevés (voir ci-après). Il s'agit donc de la MOPF entraînée dans les filets Surber au cours de la récolte des macroinvertébrés dans le ruisseau d'Anglard (Chapitres III à V) ou de la MOPF accumulée dans les mésocosmes de plexiglass utilisés au cours de l'expérience en conditions semi-naturelles (Chapitre II). La MOPF est concentrée sur filtre GF/C (Wathman™, $\varnothing = 47\text{mm}$) en plusieurs lots conservés à -80°C au LMGE.

1.1.2 Les Biofilms

En milieu naturel, les biofilms sont échantillonnés par brossage de galets prélevés au hasard puis rincés à l'eau du cours d'eau. Chaque galet est photographié à côté d'un réglet-étalon afin de déterminer ultérieurement la surface brossée grâce à un analyseur d'image (Image J-Fiji, version 2.0.0-rc68). En conditions semi-naturelles (Chapitre II), le biofilm est récupéré sur des carreaux de céramique de surface connue.

Les biofilms en suspension sont ensuite filtrés sur 250 µm. Des sous-échantillons sont fixés au formol (5%) et au lugol afin de dénombrer et déterminer ultérieurement les taxons microbiens présents. Au laboratoire, le reste des biofilms est concentré sur filtre GF/F (Wathman™, ø = 47mm) préalablement chauffé à 450°C et sont conservé à -80°C.

1.1.3 Les Bryophytes

Seules les mousses immergées du ruisseau d'Anglard ont été collectées. Au laboratoire de terrain, les plants de mousses sont soigneusement rincés à l'eau claire, afin d'éliminer les matières fines agrégées et les éventuels microinvertébrés. Ils sont ensuite regroupés en lots homogènes et placés à -80°C dans l'attente des analyses.

1.1.4 Les Macroinvertébrés

En conditions semi-naturelles (Chapitre II), les deux espèces étudiées *Gammarus pulex* et les nymphes de *Rhithrogena* sont récupérées dans les mésocosmes de plexiglass. Sur le ruisseau d'Anglard (Chapitre III, IV et V), la récolte des macroinvertébrés a été effectuée à l'aide de filets Surber (maille de 250 µm) sur un linéaire comprenant les différents faciès d'écoulement et microhabitats du site (Chapitre III). Dans les deux cas, les échantillons sont placés dans des glacières remplies d'eau fraîche et les traitements au laboratoire de terrain débutent au maximum dans la demi-heure suivante.

Les macroinvertébrés sont alors triés et identifiés (voir détails dans les chapitres correspondants) dans des bacs d'eau froide et répartis par taxon dans de petits récipients de plastique. Différents lots sont ainsi constitués et ceux destinés à l'examen des tubes digestifs (8 à 10 individus par taxon) sont fixés à l'alcool 70% le plus rapidement possible. La détermination des contenus digestifs a été effectuée suivant la technique de Felten *et al.* (2008) exposée dans l'Encadré 3. Tous les lots de macroinvertébrés prévus pour les analyses biochimiques sont laissés à jeun à 4°C pendant une nuit afin d'éliminer la majeure partie du contenu digestif. Ensuite, les macroinvertébrés de chaque taxon sont répartis en triplicat de

cinq à sept individus dans des tubes Eppendorf®, instantanément congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C.

1.2 Démarche analytique

1.2.1 Analyse des isotopes stables du carbone (δC^{13}) et de l'azote (δN^{15})

Que ce soit en milieu terrestre ou dans les écosystèmes aquatiques l'analyse des isotopes stables est devenue un outil analytique polyvalent qui peut s'appliquer à des études de physiologie, d'utilisation des ressources alimentaires, de caractérisation des niches trophiques et d'estimations des réseaux et niveaux trophiques (Middelburg, 2014). Les isotopes stables du carbone et de l'azote sont les plus utilisés pour appréhender les flux de matière et d'énergie et approcher la structure des réseaux trophiques. Ainsi, les rapports isotopiques du carbone (δC^{13}) des producteurs primaires se reflètent dans les tissus des animaux consommateurs, puis ceux des consommateurs le seront à leur tour dans les tissus des prédateurs ; le tout en tenant compte, à chaque étape, d'un fractionnement lié aux processus biochimiques (enrichissement de 0,8 à 1,1‰ en C^{13} par rapport à la nourriture). Les rapports isotopiques de l'azote (δN^{15}) peuvent être utilisés pour estimer la position trophique d'un consommateur puisque ces rapports isotopiques s'enrichissent en N^{15} de 1,1 à 3,4‰ par rapport aux sources de nourriture (Middelburg, 2014). Des sources basales, aux consommateurs et finalement aux prédateurs, l'azote et le carbone circulent donc de concert et leur analyse est en général couplée. En cours d'eau, l'analyse isotopique peut permettre une estimation de l'origine (benthique, autochtone, allochtone) du carbone transféré à un invertébré et de la distance de cet invertébré par rapport sources basales du réseau trophique. Elle offre ainsi une image de la nourriture réellement assimilée (Majdi *et al.*, 2018).

Encadré 3 : Analyse des Contenus Digestifs (Felten et al., 2008)

L'examen des contenus digestifs permet une observation un instantanée de l'alimentation des individus à un niveau d'identification taxonomique élevé, permettant de compléter les données issues de l'analyse isotopique.

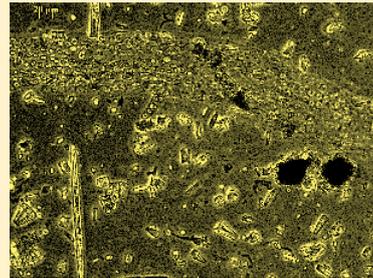
Dans une coupelle avec un peu d'eau distillée, le tube digestif de chaque individu a été extrait du reste du corps à l'aide d'outils de microdissection. Le contenu du tube digestif est ensuite dispersé sur une lame de microscope dans une goutte d'eau. Après montage entre lame et lamelle, il est examiné au microscope optique à épifluorescence sous différents grossissements (X20, X100, X400). La surface approximative relative (%), représentée par les différents *items* identifiés a été estimée à partir de l'observation de plusieurs champs ramenés à la surface totale approximativement couverte par le contenu digestif.

Pour le chapitre II, les analyses ont été effectuées par Vincent Felten (UMR LIEC, Univ Lorraine), pour les autres chapitres elles ont été effectuées par mon directeur de thèse et moi-même.

Les résultats sont présentés sous formes de fréquence d'occurrence (%) et d'abondance relative (%) en termes de surface approximative de chaque item dans les contenus digestifs.



Tube digestif d'*Odontocercus albicorne*
(observé à la loupe binoculaire)



Contenu digestif avec vue d'un champ
(x400) par microscope optique à
épifluorescence (ZEISS)

Détermination des valeurs de δC^{13} et de δN^{15}

Elles ont été réalisées en triplicats sur les lots d'échantillons de feuilles (3 à 3,2 mg MS), filtres GF/F de biofilms, bryophytes (3 à 3,2 mg MS) et de macroinvertébrés (1 à 1,2 mg MS). Après dessiccation à l'étuve à 60°C pendant 48h, ils ont été réduits en poudre fine, pesés et scellés dans une capsule d'étain. Les analyses ont été effectuées par le laboratoire SINLAB de l'Université du Nouveau-Brunswick (Canada) sur un analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse (Delta Plus – Conflo II et IV ou Delta Plus XP – Conflo III, Thermo Finnigan®).

Les valeurs obtenues sont normalisées par rapport aux échantillons de référence de l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique (IAEA). Ainsi les compositions isotopiques, exprimées en ‰, sont issues de la différence entre les rapports isotopiques de l'échantillon considéré et de l'échantillon de référence standard : un fossile de Bélemnite (*Belemnitella americana*) des formations calcaires de Pee-Dee (USA) pour le carbone et l'azote atmosphérique pour l'azote selon les formules suivantes (Jardine *et al.*, 2003) :

$$\text{Pour le carbone : } \delta^{13}C_{\text{échantillon}} = \left(\frac{{}^{13}C_{\text{échantillon}}}{{}^{12}C_{\text{échantillon}}} - \frac{{}^{13}C_{\text{standard}}}{{}^{12}C_{\text{standard}}} \right) \times 1000$$

$$\text{Pour l'azote : } \delta^{15}N_{\text{échantillon}} = \left(\frac{{}^{15}N_{\text{échantillon}}}{{}^{14}N_{\text{échantillon}}} - \frac{{}^{15}N_{\text{standard}}}{{}^{14}N_{\text{standard}}} \right) \times 1000$$

Le laboratoire SINLAB certifie une précision de mesure de 0,2 ‰.

1.2.2 Modèles de mélange

Ils permettent d'estimer les proportions des différentes sources basales assimilées par un consommateur primaire ou les proportions des différentes proies assimilées par un prédateur, à condition de connaître assez précisément les sources et les proies potentielles (Phillips & Koch, 2002). Les modèles classiques de mélange reposant sur des systèmes d'équation à deux inconnues n'offrent pas la possibilité d'analyser plus de trois sources (Phillips *et al.*, 2014). Les modèles reposant sur les inférences Bayésiennes s'avèrent plus performants en prenant en compte les incertitudes liées à chaque valeur isotopique ainsi que celles liées à l'estimation des proportions de contribution de plusieurs sources pour un consommateur donné. Parmi les programmes développés sous R (MixSIAR model, SIAR), nous avons choisi la version récente de SIAR, soit le package SimmR (Stable Isotope Mixing Model in R) de Phillips *et al.* (2014) d'après Parnell *et al.* (2010). SimmR utilise un algorithme MCMC (méthode Monte-Carlo par chaînes de Markov) qui permet la prise en compte de la variabilité des sources et des consommateurs ainsi que les facteurs d'enrichissement

trophique. Nous avons entré dans le modèle une valeur d'enrichissement en carbone lourd ($\Delta\delta C^{13}$) de $0,5 \pm 1,3 \text{ ‰}$ et une valeur de $2,3 \pm 0,18 \text{ ‰}$ pour l'azote lourd ($\Delta\delta N^{15}$). Il s'agit des valeurs préconisées par McCutchan et collaborateurs (2003) pour les invertébrés consommateurs primaires.

1.2.3 Analyse des compositions en Acides Gras des échantillons

L'analyse des AG est un des outils les plus utilisés dans les milieux aquatiques pour étudier les relations consommateurs-producteurs primaires, ainsi que pour retracer l'origine et le transfert de la matière organique dans les réseaux trophiques (Majdi *et al.*, 2018). Si l'importance des AGPI a déjà été présentée dans l'introduction de mon manuscrit, les AG peuvent également être employés en tant que biomarqueurs et traceurs de ces transferts (Desvilettes *et al.*, 1997; Dalsgaard *et al.*, 2003). La méthode repose sur l'identification d'AG spécifiques chez les producteurs primaires ou chez les proies et qui ne sont pas synthétisées par les consommateurs ou les prédateurs ciblés (Tableau 1.1, ci-contre). La détection de ces AG spécifiques dans les lipides des consommateurs (ou des prédateurs) permet de mettre en évidence les voies de transfert. En raison de la diversité de profils d'AG des différents taxons de microalgues marines et lacustres, cette méthode a été particulièrement employée pour analyser les relations zooplancton-matière organique particulaire ou zooplancton-poissons planctonophages (Ruess & Müller-Navarra, 2019). Les travaux de Torres-Ruiz *et al.* (2007), Descroix *et al.* (2010) et de Masclaux *et al.* (2011) ont montré que cette approche analytique était également adaptée aux milieux lotiques avec entre autre la possibilité d'utiliser des rapports d'AG pour améliorer l'interprétation des résultats (par exemple, le rapport 16:1 ω 7/16:0 pour caractériser le transfert des AG de diatomées). Les analyses sont réalisées sur l'ensemble de nos échantillons : feuilles de litière, biofilms, MOPF, bryophytes (ruisseau d'Anglard uniquement) et chaque taxon de macroinvertébrés. Les échantillons congelés en triplicats sont lyophilisés, pesés afin d'estimer la masse sèche (MS) et broyés à l'aide d'un pilon PTFE.

Tab. 1.1. Acides gras d'intérêts présents dans les sources basales des cours d'eau.

Groupes	Acides gras	Caractéristiques	Références
Plantes Supérieures (Litière)	AGS _{C24-C30}	Biomarqueur	Mills et al. 2003 Torrez-Ruiz & Wehr 2010
	AGS _{C21-C29}	Biomarqueur	
	18:2 ω 6	Abondant	
	18:3 ω 3	Abondant	
Bryophytes	AGPI _{C16}	Abondant	Dembitsky 1993 Torres-Ruiz et al. 2007 Torres-Ruiz & Wehr 2019 Klavina 2018
	18:2 ω 6	Abondant	
	18:3 ω 3	Abondant	
	20:4 ω 6	Abondant	
	20:5 ω 3	Abondant	
	AGPI _{C22}	Abondant	
Hyphomycètes	18:1 ω 9	Abondant	Arce-Funk et al. 2015
	18:2 ω 6	Abondant	
	18:3 ω 3	Abondant	
Bactéries hétérotrophes	AG _{C15-C17}	Abondant	Caudales et al. 2000 Dasglaard et al. 2003 Torres-Ruiz et al. 2007
	AGS ramifié (iso et antéiso)	Biomarqueur	
	AGS cyclo	Biomarqueur	
Cyanobactéries	18:1 ω 7	Abondant	Von Elert et al. 2001
	16:0	Abondant	
Diatomées (Bacillariophyceae)	16:1 ω 7	Abondant	Desvillette et al. 1997 Napolitano et al. 1999 Descroix et al. 2010 Taipale et al. 2013
	14:0	Abondant	
	16:0	Abondant	
	16:1 ω 7	Abondant	
	16:2 ω 4	Biomarqueur	
	16:2 ω 7	Biomarqueur	
	16:3 ω 4	Biomarqueur	
	16:4 ω 1	Biomarqueur	
20:5 ω 3	Abondant		
	16:1 ω 7/16:0	Élevé (~1)	
Chlorophytes (Chlorophyceae)	16:0	Abondant	Ahlgren et al. 1992 Napolitano 1999 Taipale et al, 2013
	18:1 ω 9	Abondant	
	16:2 ω 6	Biomarqueur	
	16:3 ω 3	Biomarqueur	
	16:4 ω 3	Biomarqueur	
	18:2 ω 6	Abondant	
	18:3 ω 3	Abondant	
Rhodophytes (Florideophyceae, <i>Audouinella hermanii</i>)	20:5 ω 3	Abondant	Torres-Ruiz et al. 2007
Chrysophycées (Chrysophyceae, <i>Hydrurus foetidus</i>)	14:0	Abondant	Klaveness 2017
	18:2 ω 6	Abondant	
	18:3 ω 3	Abondant	
	18:4 ω 3	Abondant	
	20:3 ω 6	Abondant	
	20:5 ω 3	Abondant	
	22:6 ω 3	Abondant	

Extraction des lipides totaux – Séparation des classes de lipides

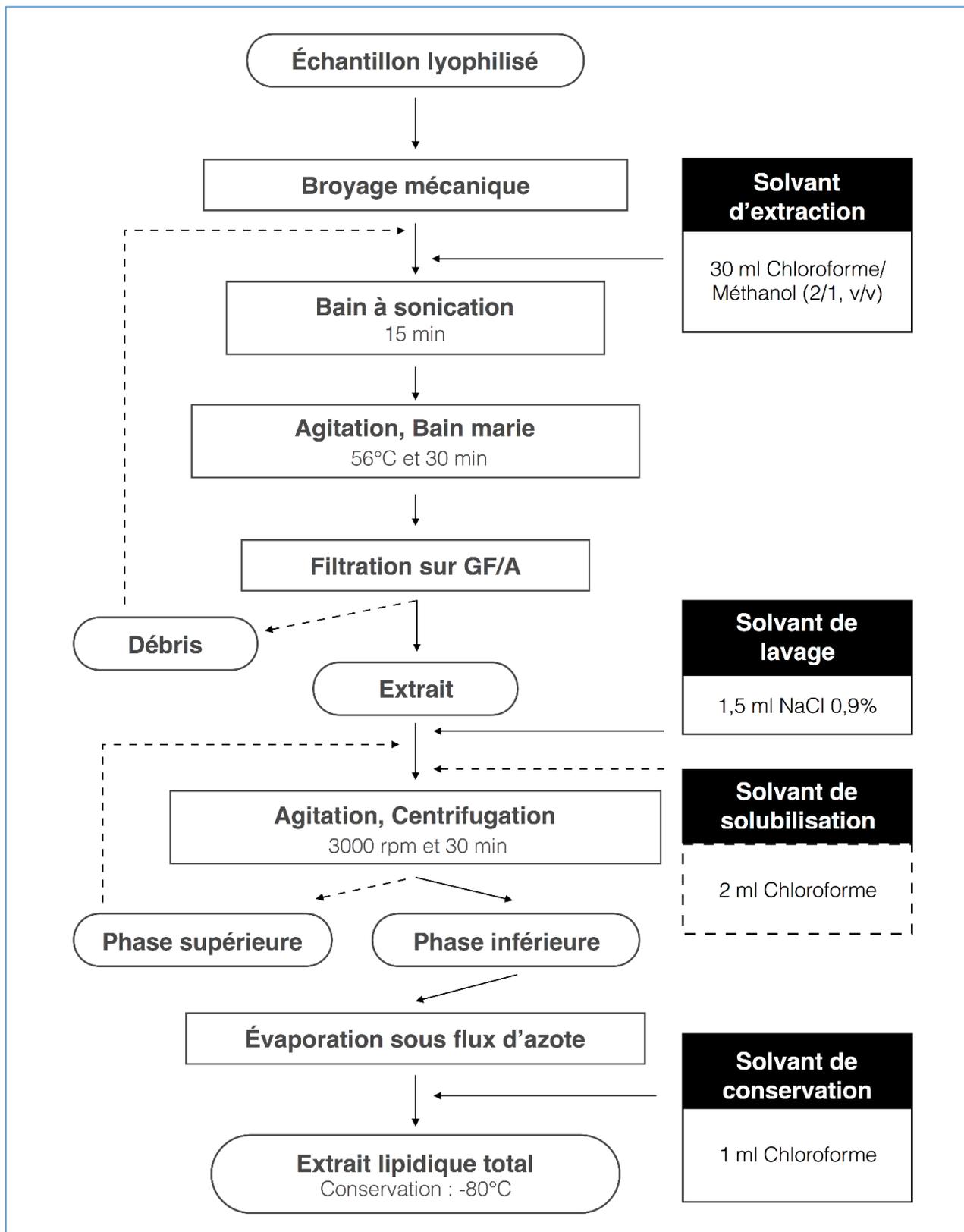
L'extraction des lipides totaux est réalisée sur les broyats d'échantillon selon une optimisation de la méthode de Folch *et al.* (1987) proposé par Desvillettes *et al.*, (1994). Le protocole est décrit en détail dans l'Encadré 4. L'extrait de lipides totaux obtenus est conservé dans 1ml de chloroforme *HPLC* grade à -80°C. En ce qui concerne les échantillons de macroinvertébrés uniquement, les lipides totaux sont repris pour être séparés en lipides polaires et lipides neutres par chromatographie sur colonne de silice (SPE Strava NH2, Phenomenex®) (cf. Encadré 5.). Cette séparation est importante pour obtenir, d'une part les AG constituant les lipides de réserves (lipides neutres) principalement issus de l'alimentation, et d'autre part les AG des phospholipides membranaires (lipides polaires) dont la composition est régulée au niveau cellulaire afin d'adapter la fluidité des membranes plasmiques. Le maintien des structures membranaires peut ainsi nécessiter la synthèse *de novo* d'AG ou de dérouter des AGPI (20:5 ω 3, 22:6 ω 3) des lipides neutres vers les lipides polaires, d'où la nécessité de prendre en compte ces deux catégories de lipides pour une analyse fine des transferts d'AG.

Dérivation, séparation et identification/quantification des acides gras

La dérivation des AG en esters méthyliques d'acides gras (EMAG) est la technique la plus employée pour obtenir des composés volatils pouvant être séparés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Les EMAG ont été préparés par trans-estérification directe des lipides totaux et des lipides neutres et polaires en présence d'un catalyseur acide (H₂SO₄). Le détail de la méthode (Koussoroplis, 2010) est présenté dans l'Encadré 6.

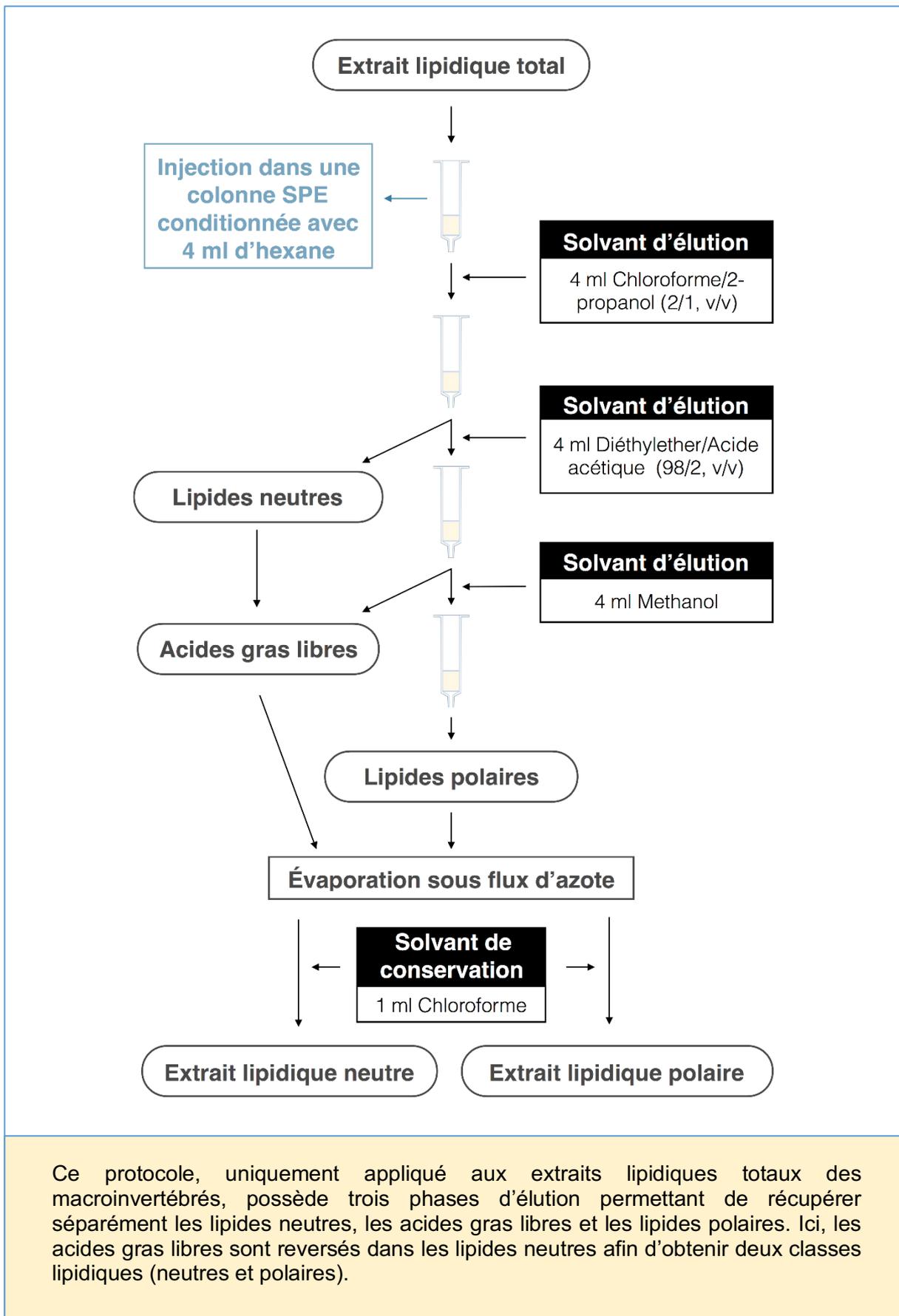
Les EMAG sont ensuite injectés dans un CPG Agilent technologies 6850 (Network GC system, USA) piloté par le logiciel « Instruments GC6850 data analysis » (Agilent Technologies®) qui réalise l'intégration des pics (Encadré 7). L'identification des EMAG (et donc des AG) est réalisée par comparaison avec des mélanges d'EMAG connus issus du commerce (Sigma-Aldrich®, Supelco® et Larodan ®Inc.) ou préparés au laboratoire. Ils sont injectés régulièrement dans le CPG en tant que contrôles. Les EMAG sont quantifiés grâce à deux étalons internes (le 13:0 et le 23:0) ajoutés avant la dérivation des AG, permettant ainsi d'estimer les éventuelles pertes durant la trans-estérification acide.

Encadré n°4 : Protocole d'extraction des lipides totaux



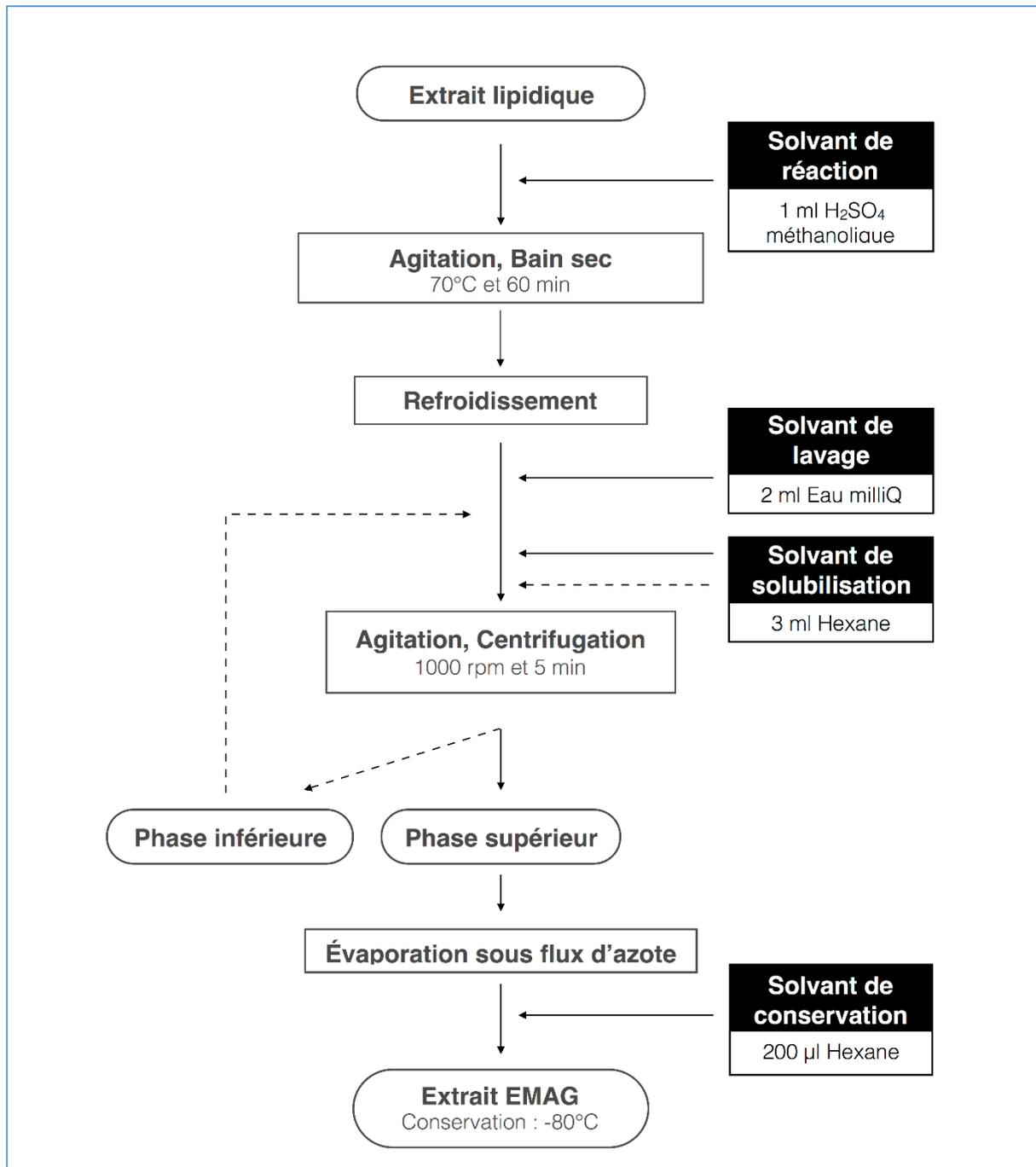
Ce protocole adapté de Folch *et al.* (1957) a été amélioré au sein du LMGE avec une seconde extraction des débris et une seconde solubilisation de la phase aqueuse (phase supérieure), dans le but d'optimiser le rendement d'extraction.

Encadré n°5 : Séparations des Classes Lipidiques

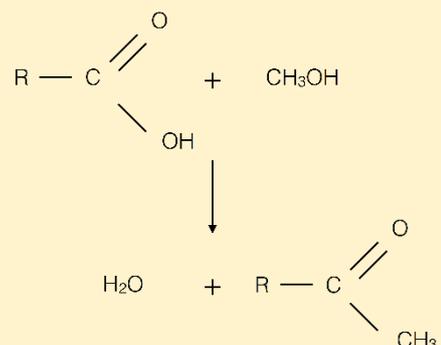


Ce protocole, uniquement appliqué aux extraits lipidiques totaux des macroinvertébrés, possède trois phases d'éluion permettant de récupérer séparément les lipides neutres, les acides gras libres et les lipides polaires. Ici, les acides gras libres sont reversés dans les lipides neutres afin d'obtenir deux classes lipidiques (neutres et polaires).

Encadré n°6 : Protocole de méthylation des acides gras



Ce protocole permet de transformer un acide gras (R-COOH) en un Ester Méthylique d'Acide Gras (EMAG, R-COCH₃), présentant une meilleure résolution en GC (voir ci-contre)



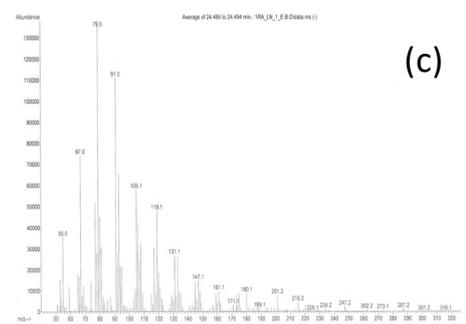
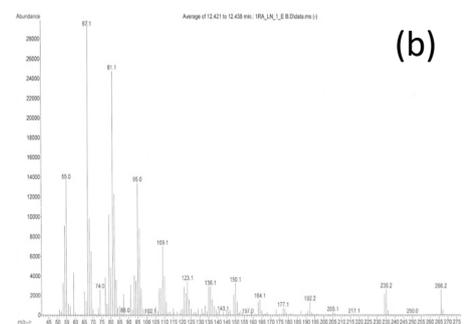
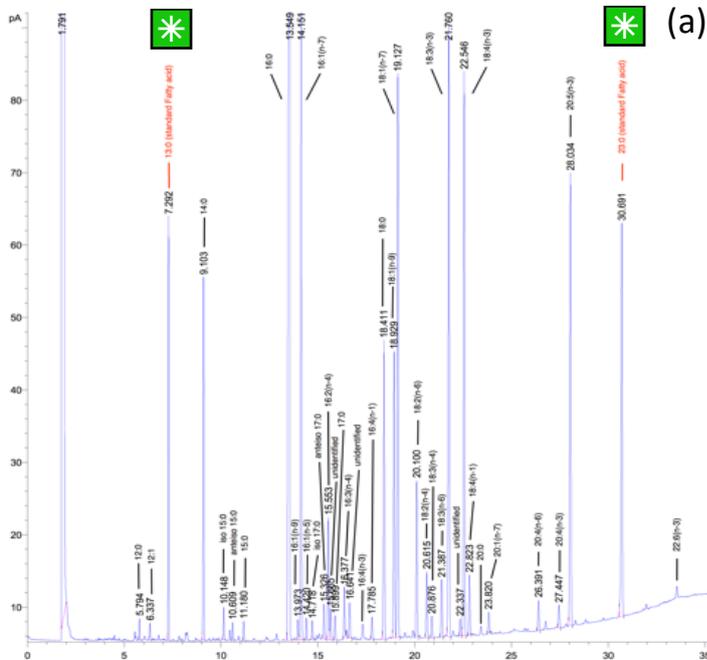
Encadré n°7 : Séparation et identification/quantification des acides gras

Les EMAG sont injectés sur un GC-FID et un GC-MS (Agilent Technologies 6850 Network GC system et Agilent Technologies 5975B VL MSD, USA) et sont séparés par le mode opératoire suivant :

- **Colonne capillaire :** Agilent J&W GC column DB-WAX (L = 30m, ϕ = 0.250mm, épaisseur du film = 0.25 μ m, phase stationnaire polaire = polyéthylène glycol, température maximale = 250°C).
- **Injecteur :** Mode SPLIT (1:10)
- **Volume d'injection :** 1 μ l
- **Gaz vecteur :** Hélium à flux constant (1 ml/min)
- **Condition de température :** Injecteur = 250°C, détecteur = 260°C
- **Programmation des températures du four :** 150°C - 250°C à 3°C/min, 250°C maintenue 15min

Ci-dessous : exemple d'un profil chromatographique en GC-FID (a) des lipides neutres de *Baetis lutheri* (Éphéméroptère, *Baetidae*) avec l'identification de chaque pic et présentation des spectres de masse associés du 16:2 ω 4 (biomarqueur des diatomées) (b) et du 20:5 ω 3 (AGPI essentiel) (c).

 : Étalons internes : 13:0 et 23:0



Contrôle et confirmation des identifications par GC-MS

L'analyse de matrices lipidiques extraites d'échantillons issus du milieu naturel, amène inévitablement à se trouver en présence d'AG mal ou non identifiés mais aussi d'autres molécules organiques (alcool gras, alcanes, phénols etc..) principalement présentes dans le matériel foliaire ou détritique. Pour chacun de nos échantillons en triplicat, un extrait d'EMAG a été injecté dans un CPG couplé à un spectromètre de masse (Agilent Technologies® system 5975B VL MSD). Chaque AG ou molécule carbonée inconnue a été identifié par son spectre de masse par comparaison aux spectres de la banque de données NIST17, à l'aide du logiciel MSD Chem-Station®. Le site web « lipidhome » (<https://www.lipidhome.co.uk/>) s'est également avéré précieux dans l'identification des spectres. En cas de doute persistant, la molécule a été classée comme non identifiée (NI) ou éliminée (composés issus du relargage ou « *bleeding* » de la phase stationnaire de la colonne du CPG).

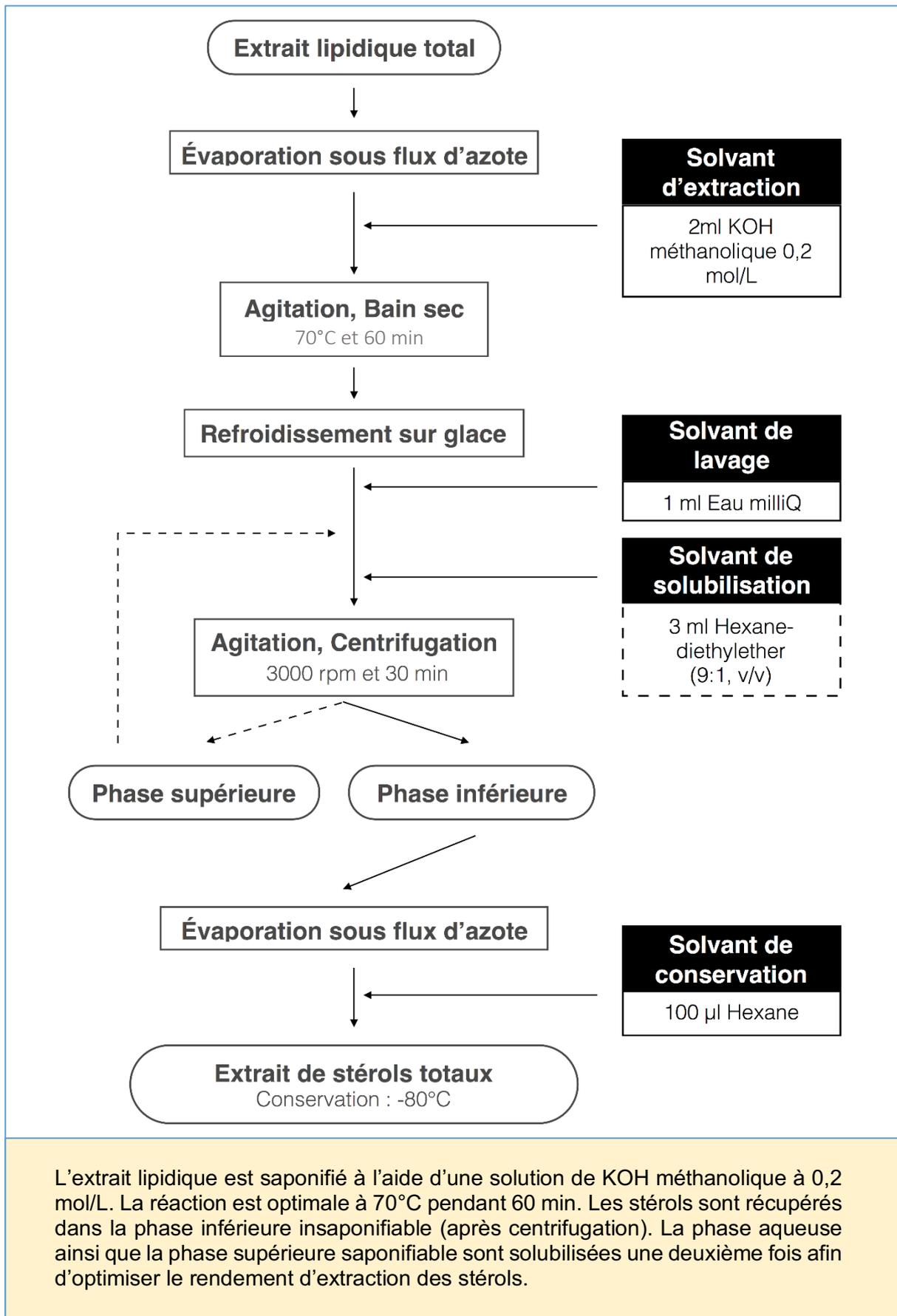
1.2.4 Analyse des compositions en Stérols des échantillons

L'importance des stérols pour les invertébrés a été précisée dans l'introduction de ce travail. Leur intérêt en tant que biomarqueurs ou traceurs des flux de matière est assez variable, car les invertébrés consommateurs primaires vont chercher à convertir l'essentiel des phytostérols alimentaires en cholestérol et ne vont conserver que peu de ces phytostérols (Martin-Creuzburg & Merkel, 2016). Cependant, ces stérols résiduels peuvent s'avérer intéressants pour caractériser l'ingestion de certaines sources basales complétant ainsi les données issues des profils d'AG (Taipale *et al.*, 2016).

Obtention et préparation des stérols

Les stérols sont obtenus à partir des lipides totaux extraits selon le protocole décrit précédemment. Les échantillons sont simplement indépendants de ceux destinés à l'analyse des AG. L'extrait de lipides totaux est saponifié afin de ne récupérer que la phase insaponifiable renfermant les stérols et à partir de laquelle ils seront purifiés. Ensuite, ils sont dérivés en composés silylés volatils (tri-méthyl-silyl-stérols ou stérols-TMS) pour être analysés en chromatographie à phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Cette méthode détaillée dans l'Encadré 8 à 10 est celle de Martin-Creuzburg *et al.* (2009) et de Vera (2005).

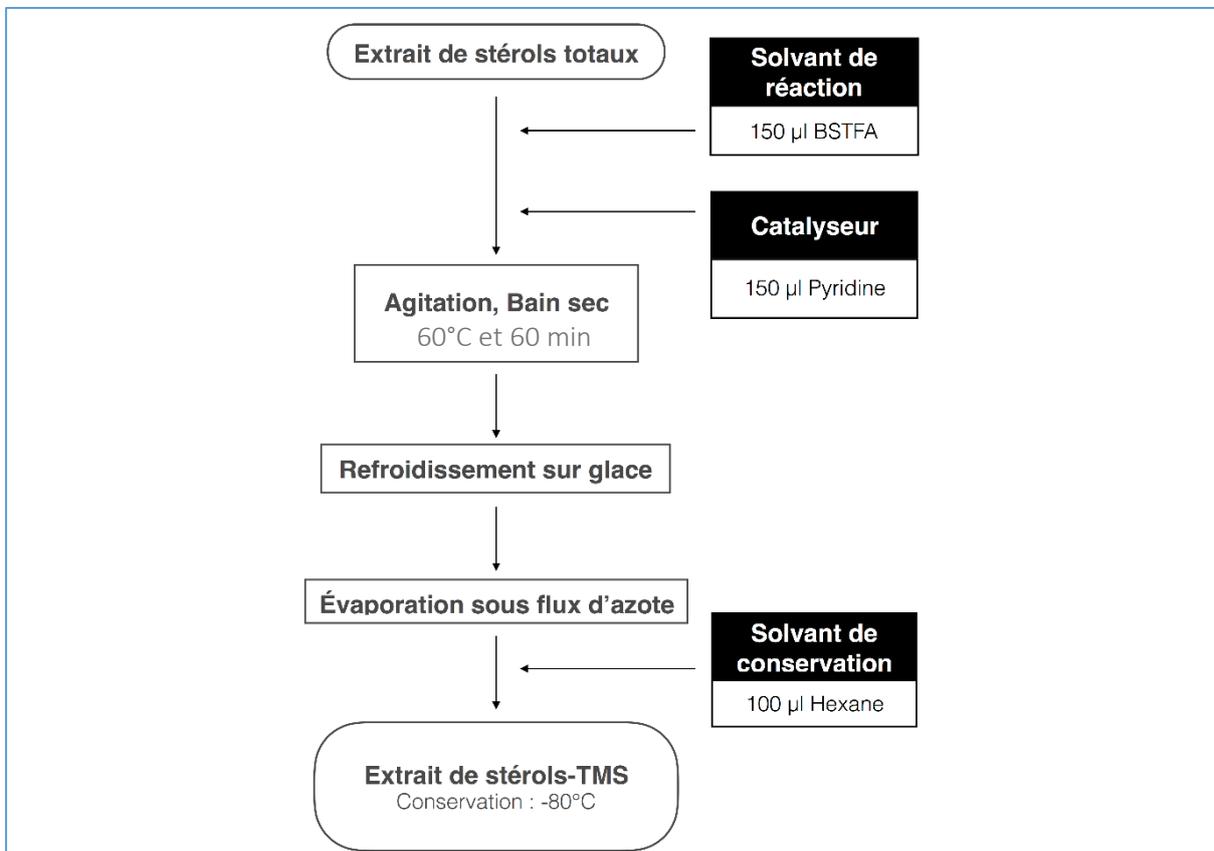
Encadré n°8 : Extraction des stérols à partir d'un extrait lipidique



Identification et quantification des stérols

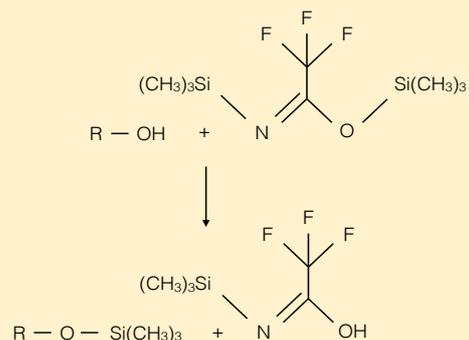
L'intégration des pics de stérol-TMS a été effectuée avec le logiciel Agilent Technologies « MSD ChemStation® ». Comme pour les AG nous avons utilisé la banque de données NIST17 pour l'identification des spectres de masse et un lot de différents stérols-TMS standards (Sigma-Aldrich) a permis d'identifier les plus courants (campestérol, β -sitostérol, cholestérol, etc..). De plus, ces standards de stérols-TMS ont été utilisés pour élaborer des gammes d'étalons externes de concentrations différentes, nécessaires à la quantification de chaque stérol présent dans un échantillon naturel. Chaque quantité estimée a été réajustée, à l'aide d'un étalon interne, le 5- α -cholestane ajouté lors de l'extraction des lipides totaux.

Encadré n°9 : Silylation



Les stérols sont dérivés pour une meilleure discrimination des pics lors de leur passage au GC-MS. Cette dérivation est une silylation entre la fonction alcool (-OH) du stérol et la fonction triméthylsilyl $-(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ du BSTFA (voir ci-contre).

La Pyridine est le catalyseur additionné pour maximiser la réaction qui se réalise à 60°C pendant 60 min.

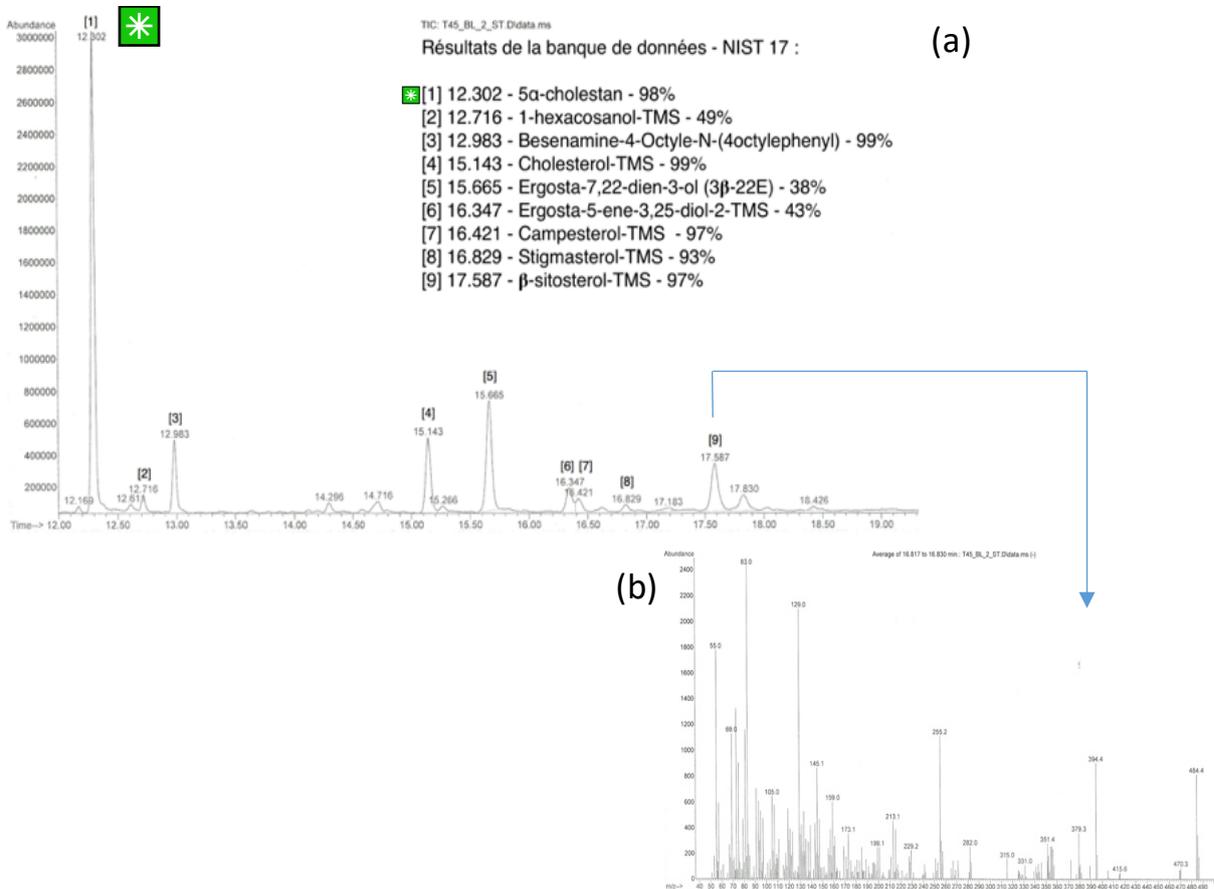


Encadré n°10 : Séparation et identification des stérols

Les stérols-TMS sont injectés sur un GC-MS (Agilent Technologies 6850 Network GC system et Agilent Technologies 5975B VL MSD, USA) et sont séparés selon le mode opératoire suivant :

- **Colonne capillaire :** Agilent J&W GC column HP-5MS (length 30m, diameter 0.250mm and film 0.25 μ m, phase stationnaire = (5% phenyl)-methylpolysiloxane, température maximale = 325°C
- **Injecteur :** Mode SPLIT (1:10)
- **Volume d'injection :** 2 μ l
- **Gaz vecteur :** Hélium à flux constant (1 ml/min)
- **Condition de température :** Injecteur = 325°C, détecteur = 325°C
- **Programmation des températures du four :** 150°C maintenue 1min
150- 280°C à 15°C/min
280-320 à 2°C/min

Ci-dessous en (a), un profil chromatographique des stérol-TMS d'un biofilm épilithique avec identification des pics et leur degré de sureté d'identification (base de données NIST17). En (b), spectre de masse associé pour le stigmastérol. L'étalon interne était le 5 α -cholestan (✱), additionné au moment de l'extraction des lipides totaux.



1.2.5 Analyse isotopique des acides gras et des stérols

L'Analyse Isotopique des Composés Spécifiques (AICS ou *engl.* : *CSIA*) par GC-C-IRMS (*Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry*) mise au point au milieu des années 1990 permet de combiner l'utilisation des biomarqueurs organiques et l'analyse isotopique du carbone des biomarqueurs (Hayes, 2001). Appliquée aux AG et sous certaines conditions, elle offre la possibilité de remédier au manque de spécificité de certains AG en déterminant leur composition isotopique, à condition que les organismes les produisant aient des signatures de δC^{13} bien distinctes (Bec *et al.*, 2011). Le même raisonnement vaut pour les stérols, bien qu'ils aient fait l'objet de très peu d'analyses de ce type (Treignier *et al.*, 2009). A l'origine, l'idée centrale de l'AICS appliquée à l'étude des réseaux trophiques sous entendait que les nutriments essentiels (AGPI ou Stérols) enregistraient un fractionnement isotopique minime lors d'une transition trophique puisqu'ils étaient censés connaître peu de transformation lors des processus de digestion et d'intégration dans les tissus. Or à l'heure actuelle, il est bien démontré qu'il existe un fractionnement incompressible en défaveur du C^{13} allant de 0,4‰ à 4‰ au cours du transfert trophique des stérols (Treignier *et al.*, 2009) et des AG, AGPI compris (Bec *et al.*, 2011; Gladyshev *et al.*, 2014). Il existe, en outre, une variabilité intermoléculaire des valeurs de δC^{13} au sein d'un même organisme qui peut être relativement élevée, puisqu'elle est liée aux carbones utilisés pour synthétiser des AG *de novo* ou pour allonger des AG alimentaires (Twining *et al.*, 2020). Ceci posé lorsque les sources organiques basales sont bien séparées et présentent des rapports isotopiques suffisamment éloignés, l'AICS permet d'élucider des voies de transfert ou de révéler un découplage entre l'origine de composés essentiels et l'origine de la matière organique dans son ensemble (ou bulk) assimilée par divers consommateurs (Koussoroplis *et al.*, 2010). En milieu lotique, les feuilles d'arbres en raison de la photosynthèse en C3 ont des signatures de $\delta C^{13} < -30‰$ ce qui les distinguent de la production primaire autochtone et notamment des diatomées (photosynthèse analogue au type CAM) qui présentent des signatures plus enrichies en C^{13} , de l'ordre de -25‰ (Middelburg, 2014). L'AICS peut donc s'appliquer avec des chances raisonnables de succès dans ces milieux. Nous avons donc choisi de l'employer afin de mieux discriminer l'origine des AG essentiels et des stérols chez les consommateurs invertébrés, mais également afin de compléter et d'affiner les résultats issus des analyses isotopiques de l'organisme entier.

Détermination des valeurs de $\delta^{13}C$ des échantillons d'acides gras et de stérol

L'AICS a été réalisée sur les EMAG et les stérols-TMS des échantillons des chapitres II et III. Les analyses ont été effectuées par le laboratoire Stable Isotope Facility (SIF) du département des sciences végétales de l'Université Davis en Californie (UC-Davis, USA). Cependant, nous avons auparavant défini avec le Dr Yarnes responsable de la plateforme analytique :

- Le degré de précision analytique voulu,
- Les colonnes chromatographiques à utiliser (phase identique aux nôtres)
 - Type FFAP pour les EMAG soit une DB-FATWAX
 - Type apolaire pour les stérols-TMS soit une DB-5ms Ultra Inert

Connaissant les programmations de températures des CPG utilisés par le Dr Yarnes, nous avons pu : (i) vérifier avec notre spectromètre de masse l'absence d'erreur d'identification de composés, (ii) identifier ceux que le laboratoire SIF avait classé comme inconnus avec leur valeur de $\delta^{13}C$. Les EMAG ou les stérols-TMS ont été injectés dans un chromatographe Trace GC 1310 Ultra (Thermo Electron®) couplé à un spectromètre de masse - analyseur de ratio isotopique Thermo Finnigan MAT 253 IRMS via un GC IsoLink II à interface de combustion. La combustion des composés s'est déroulée à 1000°C avec un catalyseur NiO/CuO, afin de libérer leurs carbones.

Une fois les valeurs de fractionnement des EMAG et des stérols-TMS reçues et les vérifications d'identification effectuées, ces valeurs ont été corrigées afin de tenir compte du fractionnement qui s'est déroulée lors de la phase de dérivation des AG et des stérols.

La valeur de $\delta^{13}C$ des AG est donc calculée avec la formule suivante :

$$\delta^{13}C_{AG} = \frac{[(n + 1) \times \delta^{13}C_{EMAG} - \delta^{13}C_{MeOH}] - 1}{n}$$

Où $\delta^{13}C_{AG}$ correspond à la valeur recherchée de l'AG avant la méthylation, $\delta^{13}C_{EMAG}$ à la valeur obtenue pour son ester méthylique, $\delta^{13}C_{MeOH}$ à la valeur de fractionnement du méthanol utilisé pour méthyler l'AG et n représente le nombre d'atomes de carbone de l'AG en question.

La valeur de $\delta^{13}\text{C}$ des stérols est calculée différemment avec la formule suivante :

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{stérol}} = \frac{[(nC_{\text{stérol-TMS}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{stérol-TMS}}) - (3 \times \delta^{13}\text{TMS})]}{nC_{\text{stérol}}}$$

Ou $\delta^{13}\text{C}_{\text{stérol}}$ représente la valeur recherchée du stérol, $\delta^{13}\text{C}_{\text{stérol-TMS}}$ et $\delta^{13}\text{C}_{\text{TMS}}$ les valeurs respectivement obtenues de $\delta^{13}\text{C}$ du stérol-TMS et du BSTFA utilisé pour la silylation et qui introduit 3 atomes de carbone, n est le nombre d'atomes de carbone du stérol en question et de son stérol-TMS correspondant.

Chapitre 2

**Importance des biofilms autotrophes vis-à-vis de la croissance
des macroinvertébrés des ruisseaux de moyenne montagne :
approche expérimentale**

Sommaire : Chapitre 2

2.1	Préambule	54
	Présentation du site et précisions méthodologiques.....	54
	Déroulement de la phase expérimentale	56
	Résumé de l'étude	58
2.2	Articles soumis (dans Freshwater Biology)	61
	Introduction	62
	Materials and methods.....	64
	Results	69
	Discussion.....	80
	Conclusion	84
	Acknowledgment.....	84
	Data availability statement	84
	References.....	85
	Supporting information.....	88

2 Chapitre 2

Importance des biofilms autotrophes vis-à-vis de la croissance des macroinvertébrés des ruisseaux de moyenne montagne : approche expérimentale

2.1 Préambule

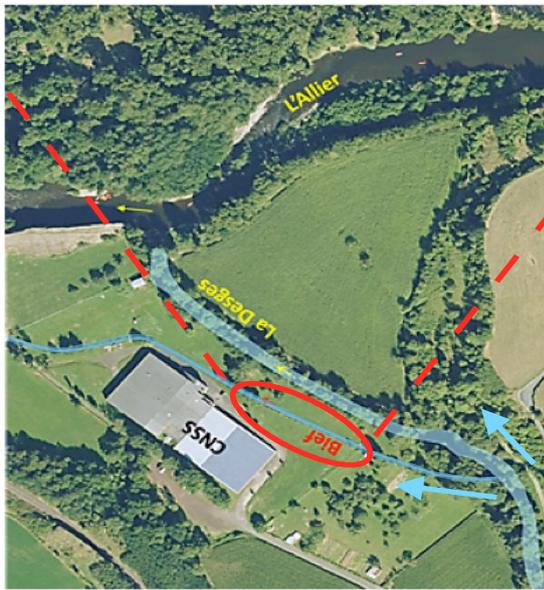
Les travaux de recherche présentés dans ce chapitre ont été financés par le projet EC2CO (INSU-CNRS) *IFODPSYLO* 2018-2019. L'étude a été menée en collaboration avec l'UMR 7360 (LIEC) de l'université de Lorraine.

Présentation du site et précisions méthodologiques

L'expérimentation et le pré-traitement des échantillons ont été effectués sur le site du Conservatoire National du Saumon Sauvage (CNSS) situé à Chanteuges (Haute-Loire, 43) en bordure de la confluence de la rivière Desges et du fleuve Allier. Le CNSS a mis à notre disposition une salle expérimentale avec congélateur, une chambre froide et leur bief artificiel, issu d'une prise d'eau à débit contrôlable de la Desges.

Les mésocosmes ont été installés dans le bief. Il s'agissait de six canaux de plexiglass transparent (L = 1,25 m ; larg = 0,25 m ; h = 0,20 m) munis de trappes d'entrée et de sortie d'eau (maille de 250 μm) et d'une trappe dorsale de manipulation pouvant être équipée d'un piège à émergence. Trois mésocosmes ont été exposés à la lumière naturelle et trois ont été placés à la pénombre sous une bâche opaque tendue de part et d'autre des berges du bief (Photos 2.1). Aux levés et couchers du soleil, une faible luminosité (lumière incidente rasante) a pu occasionnellement parvenir aux mésocosmes par l'amont ou l'aval de la bâche, le bief étant orienté Est-Ouest.

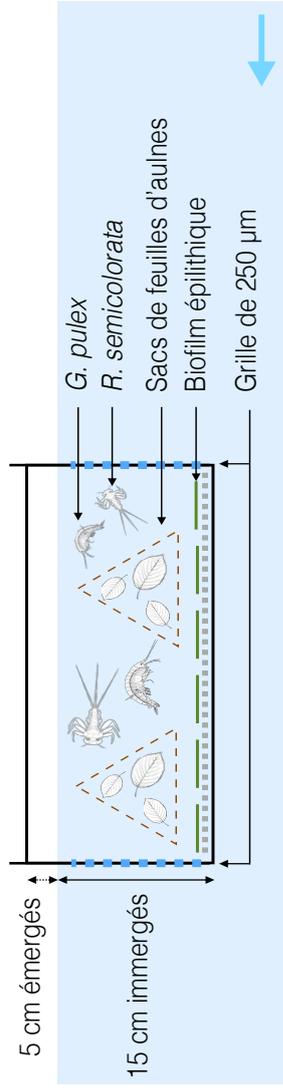
La qualité de l'eau du bief (donc celle de la Desges) a été contrôlée pendant la durée de l'expérience (normes AFNOR- sous traitée à CARSO-CAE®). Ce cours d'eau qui a un bassin versant de 140 km² à Chanteuges est de très bonne qualité biologique (au sens DCE), mais oscille entre « bonne » et « très bonne » pour les teneurs en phosphore et nitrates (SAGE Ht-Allier) (Tableau 2.1)



Condition Obscurité
Absence de lumière naturelle



Condition Lumière
Présence de lumière naturelle



Photos 2.1. Site du CNSS et du bief avec les mésocosmes installés.

Tab. 2.1. Concentrations en N et P de l'eau du bief pendant l'expérience.

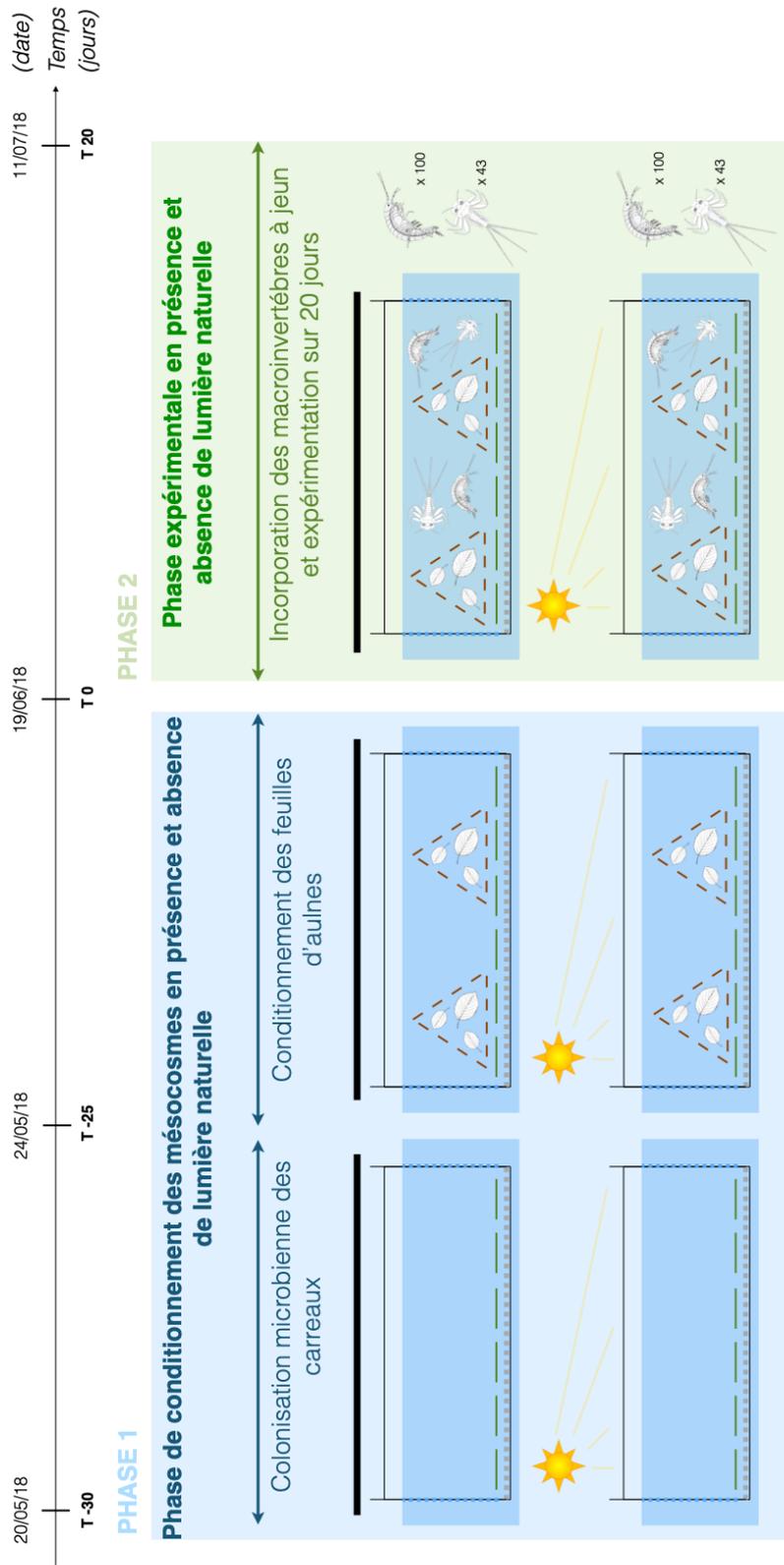
Les conditions sont faiblement mésotrophes selon la classification de Dodds & Smith (2016)

Dodds & Smith, 2016				Desges (bief du CNSS)			
Variable (unit)	Oligotrophic	Mesotrophic	Eutrophic	19.06.2018	03.07.2018	11.07.2018	Moyenne
Total N ($\mu\text{g/l}$)	<700	700-1500	>1500	677-718	722-763	722-763	707-748
Total P ($\mu\text{g/l}$)	<25	25-75	>75	28	29	27	28

Déroulement de la phase expérimentale

L'expérience s'est déroulée en deux phases (Figure 2.1). Une première phase de 35 jours qui a débuté par la mise place de carreaux de céramique dans les mésocosmes, permettant d'amorcer le développement des biofilms (sous lumière naturelle ou à l'obscurité). Les feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) ont été ajoutées au bout de 10 jours, regroupées dans 4 sacs à grosse maille (1 mm) contenant chacun 6 g (MS) de feuilles sèches récoltées l'automne précédent. Le fond des mésocosmes, sous les carreaux de céramiques, a été préalablement recouvert d'un lit de gravier de quartz d'aquariophilie pour servir de refuge aux futurs invertébrés. Après 25 jours supplémentaires, le conditionnement des litières et le développement des biofilms autotrophes a été jugé suffisant pour démarrer la phase 2 de suivi du développement des deux macroinvertébrés.

Nous avons choisi deux taxons abondants et représentatifs des ruisseaux de tête du bassin versant de la Desges, le broyeur/déchiqueteur *Gammarus pulex* (Crustacé Amphipode, f. *Gammaridae*) et le racleur/brouteur *Rhithrogena semicolorata* (Ephéméroptères, f. *Heptageniidae*). Les caractéristiques de ces deux arthropodes sont présentées dans l'annexe 1. Ils ont été récoltés sur un ruisseau affluent et sur la partie haute de la Desges. Nous avons constitué six lots homogènes de 100 gammares (L_{corps} : 4 à 6 mm) et de 43 larves-nymphes de *Rhithrogena* toutes aux derniers instars de développement ($5 \text{ mm} < L_{\text{corps sans les cerques}} < 7 \text{ mm}$). Les lots ont été placés dans les mésocosmes et l'expérience s'est déroulée du 20 juin au 11 juillet. Le protocole d'entretien, le suivi et les prélèvements sont exposés dans la section *Materials and methods* de l'article ci-après.



Condition Obscurité



Condition Lumière



Fig.2.1. Déroulement de l'expérience en mésocosme en 35 jours avec deux phases distinctes pour la condition expérimentale en obscurité et en lumière.

Résumé de l'étude

1. Dans les ruisseaux forestiers de tête de bassin versant, les ressources organiques de faible abondance comme les microalgues épilithiques ont un rôle majeur en raison de leur teneur en longs acides gras polyinsaturés (AGPI) indispensables au développement des macroinvertébrés. Sachant que certains groupes de microalgues contiennent également des stérols en adéquation avec les besoins nutritionnels des invertébrés, il est nécessaire de s'interroger sur l'utilisation des différentes ressources basales par les consommateurs primaires lorsque la production primaire est limitée par le couvert végétal, tel qu'en période estivale.

2. Dans cette étude nous avons cherché à comprendre comment, en période de développement accru (fin du printemps), deux espèces communes de macroinvertébrés (*Gammarus pulex* et *Rhithrogena semicolorata*) utilisaient les ressources organiques disponibles en fonction d'un accès limité ou non à des biofilms épilithiques autotrophes. L'accent a été mis sur l'origine du carbone et des lipides essentiels (AGPI, stérols) assimilés par les deux espèces et sur l'effet de ces composés sur leur survie et leur croissance. Pour cela une expérience a été conduite sur un bief de cours d'eau à l'aide de petits mésocosmes exposés, soit à la lumière naturelle, soit à l'obscurité.

3. En présence de biofilms autotrophes (mésocosmes exposés à la lumière), les deux espèces ont connu une croissance significativement plus élevée que dans les mésocosmes placés à l'obscurité. Chez *R. semicolorata*, la survie des nymphes et les taux d'émergences des imagos ont été positivement affectés par l'accès aux biofilms autotrophes.

4. Grâce à l'analyse des isotopes stables ($\delta^{13}\text{C}$ & $\delta^{15}\text{N}$) et l'utilisation d'un modèle de mélange SIAR, il a été démontré qu'en conditions d'obscurité les deux macroinvertébrés avaient les mêmes positions trophiques et assimilaient du carbone d'origine détritique, principalement sous formes de fines particules végétales issues de feuilles de litière dégradées. En condition d'exposition à la lumière, 78 % du carbone assimilé par les nymphes de *R. semicolorata* provenait de biofilms autotrophes et le restant de fines particules organiques (MOPF). *G. pulex* obtenait à parité, l'essentiel de son carbone à partir des MOPF et des biofilms, la litière n'étant qu'une source d'alimentation secondaire.

5. Les résultats des analyses isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$) menées sur les acides gras et les stérols (AICS), ont permis de montrer que le racleur *R. semicolorata* dépendaient totalement des biofilms autotrophes pour la couverture de ses besoins en acides gras et stérols

alimentaires. Le manque de longs AGPI (20:5 ω 3 & 20:4 ω 6) disponibles en quantité suffisante est apparu comme une contrainte écologique majeure lorsque ces éphéméroptères étaient confrontés, en conditions d'obscurité, à l'absence de biofilm autotrophe suffisamment développé.

6. Les résultats obtenus étaient plus contrastés pour le broyeur *G. pulex*. Les sources détritiques étaient quantitativement importantes pour ces amphipodes en termes d'approvisionnement en carbone et en stérols, quelque-soit les conditions testées. Concernant qualité nutritionnelle, les microalgues semblaient être une source d'alimentation complémentaire plutôt collectée dans la fraction déritique fine, mais cependant essentielle pour couvrir une grande partie de leurs besoins en 20:5 ω 3 & 20:4 ω 6.

2.2 Article soumis (dans *Freshwater Biology*)

Title: Microalgal food sources greatly improve macroinvertebrate growth in detritus-based headwater streams: Evidence from an instream experiment

Authors: Tiphaine Labeud-Veydert¹, Michael Danger^{2,3,4}, Vincent Felten², Alexandre Bec¹, Martin Laviale², Maria Cellamare⁵, Christian Desvillettes¹

¹ Université Clermont Auvergne, UMR CNRS 6023, Laboratoire Microorganisme, Génome, Environnement, Impasse Amélie Murat, 63170 Aubière

² Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, France

³ Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France

⁴ LTER-Zone Atelier Moselle, Metz, France

⁵ Phyto-Quality, Paris, France

Key words: Headwater streams, Nutritional quality, Compound-Specific Stable Isotopes, Epilithic biofilms, *Gammarus pulex*, *Rhithrogena semicolorata*

Introduction

In temperate regions, stream invertebrates obtain energy from a limited number of organic sources defined as allochthonous (e.g. leaf litter from riparian vegetation) or autochthonous (epilithic and periphytic biofilms) (Allan & Castillo, 2007). The dynamics of organic matter sources in the overall functioning of a whole ecosystem can be represented by two models: the river continuum concept (RCC: Vannote et al., 1980), which emphasizes the predominance of allochthonous terrestrial sources, and the riverine productivity model (RPM: Thorp & DeLong, 1994), which stresses the importance of autochthonous phototrophic production, which is easier to assimilate than detrital material (Thorp et al., 2006). However, in forested headwater streams, the RPM is *a priori* countered by the amount of litter falling annually into the streambed. This constitutes more than 80% of the instream carbon flow (Hall et al., 2001), while autochthonous primary production remains low, rarely exceeding 7% of the annual supply of allochthonous carbon (Ziegler & Lyon, 2010). While leaf litter, and organic particles resulting from its degradation, is the predominant food source in headwater streams (Collins et al., 2016), it is considered to be of poor nutritional quality (Danger, 2020). This paradox, highlighted by many authors (see in Tank et al., 2010), must be tempered by the characteristics of the tree species producing the leaf litter (Foucreau et al., 2015). Nitrogen-fixing species, such as black alder, offer amino acid-rich leaves that are rapidly colonised by microbial decomposers (Côté & Dawson, 1986) and appear to cover the protein requirements of most macroinvertebrate shredders. However, one of the major limitations of leaf litter nutritional value is the lack of long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) 20:5 ω 3, 20:4 ω 6 (Torres-Ruiz et al., 2007; Brett et al., 2017) and the questionable digestibility of leaf cuticles, where the majority of potential essential phytosterols are embedded (Ren et al., 2017). While microorganisms that colonize submerged leaves increase their nutritional quality by reducing stoichiometric imbalances (Danger et al., 2013), they do not increase LC-PUFAs levels, which remain limited to the presence of 18:2 ω 6 and 18:3 ω 3 compounds (Torres-Ruiz et al., 2007). Ergosterol produced by litter hyphomycetes can also be used to produce cholesterol by macroinvertebrates (Martin-Creuzburg & Merkel, 2016), although its dealkylation is poorly documented in streams (Mondy et al., 2014). Over the last decade, studies of numerous aquatic invertebrate species have highlighted the importance of dietary LC-PUFAs (20:5 ω 3, 20:4 ω 6) for their survival, somatic growth and reproduction (Ahlgren et al., 2009; Aguilar et al., 2012; Guo et al., 2016a; Crenier et al., 2017). 20:4 ω 6 and 20:5 ω 3 are considered "essential nutrients" in the sense that their bioactive nature has a positive effect on invertebrate growth or other biological responses (Tocher et al., 2019). The capacity of macroinvertebrates to synthesize LC-PUFAs in rivers has not been widely studied, but is considered to be limited (Torres-Ruiz et al., 2019). LC-PUFAs are absent from riparian

vegetation, and are particularly abundant in aquatic primary producers such as epilithic diatoms in headwater streams (Cashman et al., 2013; Honeyfield & Maloney, 2015). Knowing that diatoms can also contain sterols in sufficient nutritional quantity for some aquatic invertebrates (Gergs et al., 2015), microalgae can be considered as a high nutritional quality resource. Macroinvertebrates are therefore expected to recover most of their essential lipid compounds, or even most of their carbon, from microalgae (Brett et al., 2017). As a result, it has been shown that several species of stream invertebrates consume and assimilate algae (Torres-Ruiz et al., 2007; Guo et al., 2018). Consumption of EPA-rich microalgae can improve somatic growth in both invertebrate shredders and grazers (Guo et al., 2016a; Crenier et al., 2017), provided there is sufficient algal biomass (Kühmayer et al., 2020). This last condition is important because shading can severely limit biofilm growth, in turn limiting invertebrate access to sufficient levels of LC-PUFAs (Hill et al., 2001; Honeyfield & Maloney 2015). It is therefore necessary to question the utilisation of resources when primary production is temporally limited or markedly reduced in forested streams (Alberts et al., 2018; Torres-Ruiz et al., 2019). It can be hypothesized that most of the carbon and fatty acids (FA), or even sterols, are derived from microalgae when epilithic biofilms and/or litter biofilms are well developed. This hypothesis was recently confirmed by Kühmayer et al., (2020). If biofilms are limited, allochthonous sources would be more important in terms of carbon supply, with microalgae being a secondary food source. Limited access to LC-PUFAs could then become a trophic constraint for macroinvertebrates, the importance of which probably depends on their functional feeding group (FFG) and stage of development.

In this context, the aim of our study was to evaluate the use of allochthonous and autochthonous organic sources by two macroinvertebrates species commonly found in temperate headwater streams, and belonging to contrasted FFGs: the amphipod shredder *Gammarus pulex* and the scraper-grazer *Rhithrogena (semicolorata)*-group Heptageniidae). An experiment was carried-out in early summer in semi-natural conditions, using instream mesocosms placed either under natural light or dark conditions thereby enabling the development of autotrophic or heterotrophic biofilms, respectively. Our main objectives were 1) to understand the origin of carbon and essential lipids (LC-PUFAs, sterols) assimilated by the two species according to their access or not to autotrophic biofilms, and then 2) to assess the impact of essential lipids on their growth and development. We used stable isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) and a Bayesian statistical approach to distinguish the relative contributions of organic matter sources to the bulk carbon assimilated by both species. Assuming that $\delta^{13}\text{C}$ values differ sufficiently between organic sources, it is possible to reveal the relative influence that different sources have on the assimilated diet of consumers (Caroll et al., 2016). To trace the origin of PUFAs and sterols, we used stable compound-specific isotope analysis (CSIA).

Materials and methods

Experimental devices and procedures

The experiment was performed from 20 June to 11 July 2018 on a reach of the Desges River, a fourth-order stream located in the French Massif Central (Alt: 511m; 45°4'43.84"N - 3°31'55.57"E). The reach (depth: 0.5 m; width: 1.40 m) was equipped with a sluice gate to control flow rate. Six small mesocosms were installed in the reach: three were exposed to natural light whereas the other three were kept in the dark using an opaque tarp stretched across the reach. The reach water quality was monitored during the survey using AFNOR guidelines (AFNOR, 1990). Its physico-chemical characteristics were as follows: pH = 7.2, Silicate = $11.4 \pm 0.4 \text{ mg.L}^{-1}$, $P_{\text{total}} = 28 \pm 1 \mu\text{g.L}^{-1}$ and $N_{\text{total}} = 725 \pm 25 \mu\text{g.L}^{-1}$. Data loggers (HOBO™) were used to record the level of light and the temperature inside the flumes and in the reach every hour throughout the experiment.

The mesocosms, manufactured by AOT-Plastics® (Thiers, France), comprise a plexiglass flume (LxWxH: 1x0.25x0.25m) fitted with two movable grids (mesh sizes: 250 μm) for water inlet and outlet and a dorsal hatch that can be fitted with an emergence trap. For our experiments, the bottom of the flume was covered with quartz gravel for invertebrate shelter and ceramic tiles (10 ×10 cm) were placed on the gravel to allow autotrophic (light conditions, LC) or heterotrophic (dark conditions, DC) biofilm to develop over a period of three weeks. Four coarse-meshed litter bags (mesh size 10 mm), each containing 6 grams of dry Alder leaves (*Alnus glutinosa*; harvested the previous fall) were also implanted in each flume to be microbially-conditioned over the three-week period.

On the day before the start of the experiment, *Gammarus pulex* were collected from a small tributary of the Desges river and *Rhitrogena semicolorata* nymphs were collected from the upstream part of the Desges river. The macroinvertebrates were separated into six groups containing 100 *G. pulex* of homogeneous size ($4.94 \pm 0.99 \text{ mm}$) and 43 *R. semicolorata* nymphs in similar stages with developing wing pads. At T0, a batch of 100 *G. pulex* and 43 *R. semicolorata* was introduced into each mesocosm. Maintenance of the flumes was carried out every two days and *R. semicolorata* emerged imagos were counted every three days.

Sampling

Sampling of basal sources was carried out at the beginning (T0: June 20) and at the end (T20: July 9) of the experiment. For each replicate, leaf material in the flume was removed from two litter bags and rinsed to remove fine debris and potential micro-invertebrates. Sub-samples of leaf material were used for lipid and stable isotope analysis and stored at -80°C . The fine shredded leaf debris were sieved through a stack of filters with different mesh sizes,

yielding the fine particulate organic matter FPOM (fraction 0.10 to 2 mm). FPOM was concentrated on a GF/A filter and frozen at -80°C prior to further analysis. In each replicate flume, ceramic tiles were taken at random and scraped with a toothbrush in order to recover the biofilm microorganisms. During the experiment, a biofilm gradually developed on the plexiglass walls in LC only and was collected from a 169 cm² wall surface on each LC flume. The biofilms were divided into sub-samples, half of which was filtered on GF/F filters and frozen at -80°C prior to further analyses, and the other half fixed with a lugol solution for microalgae identification and enumeration.

At T₀, an initial batch of macroinvertebrates, similar to those introduced into the plexiglass flumes, was kept for analysis. One subsample of 30 *G. pulex* or *R. semicolorata* was fixed in 70% ethanol to determine initial size measurements. Three triplicates of 10 *G. pulex* and 5 *R. semicolorata* were frozen at -80°C prior for lipid and stable isotope analysis (SIA). At the end of the experiment (T₂₀), all the invertebrates were collected from each flume, counted and separated into sub-samples. Depending on the number of survivals, *G. pulex* (DC: 3x8; LC: 3x10) and *R. semicolorata* (DC: 3x4; LC: 3x4) were fixed in 70% ethanol to determine their respective final sizes and gut contents. In both tested conditions the remaining macroinvertebrates were kept for 24 hours in filtered reach water to empty their digestive tracts, divided into triplicates of 3 to 5 individuals each, and frozen at -80°C prior to SIA and lipid analysis.

Survival and macroinvertebrate growth analysis

Survival was calculated from living invertebrates collected at the end of the experiment minus sampled individuals or emerged subimagos (in the case of *R. semicolorata*). *G. pulex* were photographed under a stereomicroscope (×6 to ×40 magnification) in their curved state. Length was recorded from the base of the first antenna to the base of the telson using SigmaScan Image Analysis Version 5.000 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA; linear state = 0.88 × curved state [mm]; $r^2 = 0.98$). Total body length of *R. semicolorata* (not including cerci) was measured under a stereomicroscope.

Basal sources

Leaf mass remaining in each bag (n=4) was weighed and compared to the initial mass placed in the litter bags. Leaf litter decomposition rates (k) in both treatments were estimated using an exponential model ($m_t = m_0 \times e^{-kt}$), where m_t is the leaf mass remaining at t (T₂₀) and m_0 is the initial leaf mass. The counting of biofilm microalgae and taxonomic identification were undertaken using an inverted microscope following the Utermöhl method. Cell measurements

were carried out using a digital camera and an image analyser software (Zen 2, Zeiss) and the results were expressed in terms of biovolume ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{cm}^{-2}$).

Macroinvertebrate diet analysis

The diet composition of both species at the end of the experiment was determined by gut content analyses using the method of Felten et al. (2008). Briefly, foregut contents were placed into a drop of water on microscope slides, homogenized, then examined at different magnifications from 100x to 400x to assess the approximate percentage by area of the six items recorded : (i) animal matter, (ii) FPOM (fine amorphous detritus lacking well-defined cellular structure), (iii) diatoms, (iv) filamentous algae, (v) CPOM (coarse particulate organic matter: mainly leaf detritus with brownish palisade cell layers), and (vi) small mineral particles.

Bulk stable isotope analysis

All samples for bulk stable carbon and nitrogen isotope analysis were oven-dried at 60°C for 24h-48h, then ground, homogenized, and weighed in a tin capsule. Samples were prepared in triplicate for each condition and injected into a Carlo Erba NC2500 Elemental Analyzer linked to a Finnigan Delta Plus Mass spectrometer. Isotopic ratios were presented as δ values (‰) expressed relative to the atmospheric N_2 and Vienna PeeDee Belemnite for nitrogen and carbon, respectively. Analytical precision (based on the standard deviation of replicates of internal standards) was never $> 0.4\text{‰}$ and 0.23‰ for nitrogen and carbon respectively.

Lipid analysis: FA and sterols

All samples were freeze-dried before lipid analysis. The FA composition was determined from total lipids (TL) for basal organic matter sources and from neutral lipids (NLFA) and polar lipids (PLFA) for *G. pulex* and *R. semicolorata* nymphs. Lipids were extracted and when necessary fractionated using pre-packed silica columns (SPE Strata NH2 Phenomenex®) following the methods described by Koussoroplis et al. (2010). FAs from lipid extracts were converted into FA methyl-esters (FAME) by acid-catalyzed transesterification (Koussoroplis et al., 2010). FAME were separated and analyzed using an Agilent 6850 gas chromatograph equipped with a J&W DB-WAX capillary column (Agilent, 30 m \times 0.25 mm). Individual FAME were identified by comparing retention times with certified commercial standard mixtures and quantified using 13:0 and 23:0 as internal standards. The identification of all peaks was confirmed or refined using an Agilent 6850 GC coupled to a 5975B Agilent Mass Spectrometer. FAME Spectra separated with a DB wax column were identified using our own spectrum library and the reference libraries and databases available (NIST/NBS;

lipidhome). Analysis of the sterols was undertaken using total lipid extracts obtained from the macroinvertebrate samples and from basal sources. Lipids were saponified with 0.2 mol.L⁻¹ methanolic KOH. Then, the unsaponifiable material was extracted with hexane - diethyl ether, following the detailed procedure of Gergs et al. (2015). After derivatization by silylation, sterol TMS ethers were analyzed by GC-MS using an Agilent 6850 GC coupled to a 5975B Agilent mass spectrometer and equipped with a J&W HP-5MS (Agilent, 30 m × 0.25 mm) capillary column. Each sterol was identified by its mass spectrum and quantitation was carried out using 5 α -cholestane as an internal standard and calibration curves generated for our different laboratory standard sterols.

Compound-Specific Isotope Analysis (CSIA)

The stable carbon isotope signatures ($\delta^{13}\text{C}$ values) of FAME and sterol TMS ethers were determined using a Thermo Trace 1310 GC interfaced with a Thermo Finnigan MAT 253 IRMS via a GC IsoLink II combustion interface. FAME were separated using an Agilent DB-FATWAX capillary column (30m x 0.25mm ID x 0.25 mm film) while sterol TMS ethers were separated in a nonpolar DB-5ms capillary column (60m x 0.25mm ID x 1 mm film). All the isotope values were reported using the δ notation relative to the Vienna PeeDee Belemnite (VPDB) reference standard. The measured $\delta^{13}\text{C}$ values were corrected by isotopic mass balance for contributions of carbon incorporated during derivatization of FA and sterols. FAME $\delta^{13}\text{C}$ values were corrected using the formula:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}} = \frac{[(n + 1) \times \delta^{13}\text{C}_{\text{FAME}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{MeOH}}] - 1}{n}$$

where $\delta^{13}\text{C}_{\text{FAME}}$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{MeOH}}$ are the $\delta^{13}\text{C}$ values of the measured fatty acid methyl ester and methanol used during methylation, respectively. $\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}$ represents the FA $\delta^{13}\text{C}$ before its methylation, and n is the number of carbon atoms in the non-methylated FA.

Sterol $\delta^{13}\text{C}$ values were corrected using the formula:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{sterol}} = \frac{[nC_{\text{sterolTMS}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{sterolTMS}}] - (3 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{TMS}})}{nC_{\text{sterol}}}$$

where $\delta^{13}\text{C}_{\text{sterolTMS}}$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{TMS}}$ are the $\delta^{13}\text{C}$ values of the measured sterol TMS ether ester and BSTFA used during silylation, respectively. $\delta^{13}\text{C}_{\text{sterol}}$ represents the sterol $\delta^{13}\text{C}$ before its silylation, and n is the number of carbon atoms in the sterol and its sterol TMS counterpart.

Data analysis

All statistical analyses were carried out using Rstudio and open source R packages (Version 1.1.456 – © 2009-2018 RStudio, Inc.). The normality and homoscedasticity of the data were tested with the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. In case of rejection, data were log-transformed. If further rejection occurred, non-parametric tests were used. Diets and performance parameters of both macroinvertebrate species were compared between treatments using a proportion test (prop.test Z) while growth parameters were compared with a Mann-Whitney U-Test. Biochemical compound data (FA, sterols, $\delta^{13}\text{C}$ values) were analyzed between and within during treatments. Depending on the data distribution, a Mann-Whitney U-Test or a Student t-test was applied to compare paired samples. A one way- ANOVA followed by post hoc multiple comparison (Pairwise) test was used to compare several samples. The significance level was set at $p < 0.05$.

A Bayesian mixing model was used to estimate the proportion of basal sources contributing to the assimilated diet of *G. pulex* and *R. semicolarata* in both tested conditions. Simmr, an update (Parnell & Inger, 2016) of the SIAR model initially formulated in R by Parnell et al. (2010), was selected. The Simmr package uses JAGS (Just Another Gibbs Sampler) a program for analysis of Bayesian hierarchical models using Markov Chain Monte Carlo (MCMC) simulations. It takes into account isotope signatures and isotope fractionation, includes standard deviation uncertainty and a fractionation correction to assess the contribution of the most likely basal source. Fractionation factors recommended for lower trophic consumers (Majdi et al., 2012) were used. The expected trophic enrichment factor during assimilation of basal sources was set at 0.5 ‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and a value of 2.3‰ was used for $\delta^{15}\text{N}$ (McCutchan et al., 2003).

Concerning total FA, NLFA, and PLFA, the similarities between each basal source and the two macroinvertebrates were analyzed using a Hierarchical Principal Component Classification (Husson et al., 2010). The hierarchical clustering performed on the principal components of the PCA was based on the mean $\delta^{13}\text{C}$ values of all FA and sterols using Euclidean distances.

Results

Environmental conditions

Temperatures remained stable during the whole experiment with an amplitude of less than 0.5°C between flumes exposed to light (LC: 13.90 ± 1.87°C) and those kept in the dark (DC:13.46 ± 1.54°C). The average amount of light cast on the bottom of the flumes at solar noon (illuminance) were 2 and 5500 lux in DC and LC, respectively.

Macroinvertebrate performances: Survival, emergence and growth

After the 20 days of exposure, survival rates of *G. pulex* were close to 50% and were similar in the two tested conditions (Table 1), whereas survival of *R. semicolorata* nymphs was significantly higher in LC (by 53%; prop-test $p < 0.01$). Growth rates of macroinvertebrates were significantly enhanced when reared in LC, by 60% for *G. pulex* (Student t-test $p < 0.001$) and by 400 % for *R. semicolorata* ($p < 0.01$; Table 1). Emergence rates of *R. semicolorata* subimagos were also significantly higher in LC (by 91%; prop-test $p < 0.05$).

Food sources: Leaf litter decomposition and biofilm development

Alder decomposition rates was unaffected by light condition and remaining leaf litter after 20 days of exposure was about 25% of the initial mass (Table 2). Total biofilms biomass developed on tiles were stable during the experiment (similar at T0 and T20: *see supporting information 1*) and systematically higher in LC compared to DC (T20: $499 \times 10^6 \pm 102 \times 10^6$ vs $12 \times 10^6 \pm 8 \times 10^6 \mu\text{m}^3 \cdot \text{cm}^{-2}$, $p < 0.001$ -Student t-test; Table 2). A strong biofilm development was observed at T20 on flume walls only in LC, representing $330 \times 10^6 \pm 103 \times 10^6 \mu\text{m}^3 \cdot \text{cm}^{-2}$ with diatoms accounting for only 31% and chlorophytes being dominant (62%). On the LC tiles, the community was largely dominated by diatom species ($585 \times 10^6 \pm 274 \times 10^6 \mu\text{m}^3 \cdot \text{cm}^{-2}$) accounting for 89% of the total biovolume, with other taxa being chlorophytes and cyanobacteria (Table 2). In the DC flumes, very few diatoms were enumerated in the tile biofilms and their mean biovolumes were 48 times lower than in LC conditions ($12 \pm 8 \times 10^6 \mu\text{m}^3 \cdot \text{cm}^{-2}$). More details are available in the additional files (*see supporting information 1*).

Table 1 Survival rate, emergence rate, final size and daily growth rate of the two macroinvertebrates reared under dark conditions (DC) and light conditions (LC). (Prop.test was used for survival and emergence rates and a Mann-Whitney test for size parameters, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.001$; ***: $p < 0.0001$; ns: not significant).

Analysis	Species	T20 - DC	T20 - LC	<i>p</i>
		mean ± sd	mean ± sd	
Survival rate (%)	<i>G. pulex</i>	48.3 ± 12.5	55.7 ± 5.7	ns
	<i>R. semicolorata</i>	36.0 ± 4.9	55.0 ± 1.3	**
Emergence rate (%)	<i>R. semicolorata</i>	9.3 ± 0.0	17.8 ± 5.9	*
Sizes (mm) and daily growth rate (mm.d ⁻¹)	<i>G. pulex</i>			
	Total body length (TBL)	6.118 ± 0.767	6.739 ± 0.867	***
	Daily growth rate (DGR)	0.010 ± 0.007	0.016 ± 0.008	***
	<i>R. semicolorata</i>			
	Total body length (TBL)	7.116 ± 1.068	9.949 ± 1.863	**
	Daily growth rate (DGR)	0.005 ± 0.007	0.025 ± 0.013	**

Table 2 Main characteristics of basal sources sampled at the end of the experiment in dark (DC) and light conditions (LC) including: 1) remaining litter biomass (ash-free dry mass-AFDM) and litter decomposition rates (*k*) calculated from the start of the survey; 2) the biovolumes of tile biofilm and wall biofilm; 3) the amounts of Saturated Fatty Acid (SFA), Mono-unsaturated Fatty Acids (MUFA) and Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) detected in each basal source. Values are mean ± SD. (Student *t*-test, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.001$; ns: not significant).

Samples	Analysis	T20 - DC	T20 - LC	<i>p</i>
Leaf litter	AFDM (mg)	1.40 ± 0.08	1.52 ± 0.17	ns
	Decomposition rate (<i>k</i>)	0.030 ± 0.001	0.028 ± 0.003	ns
Tile biofilm	Diatoms (x10 ⁶ μm ³ .cm ²)	12 ± 8	449 ± 75	**
	Chlorophyta (x10 ⁶ μm ³ .cm ²)	0	25 ± 28	-
	Cyanobacteria (x10 ⁶ μm ³ .cm ²)	0	24 ± 21	-
Wall biofilm	Diatoms (x10 ⁶ μm ³ .cm ²)		104 ± 75	-
	Chlorophyta (x10 ⁶ μm ³ .cm ²)		206 ± 97	-
	Cyanobacteria (x10 ⁶ μm ³ .cm ²)		19 ± 23	-
Tile biofilm	SFA (μg.mg ⁻¹ DM)	4.35 ± 2.23	7.84 ± 0.99	ns
	MUFA (μg.mg ⁻¹ DM)	1.48 ± 0.78	4.81 ± 0.22	**
	PUFA (μg.mg ⁻¹ DM)	0.25 ± 0.18	3.24 ± 0.32	***
Wall biofilm	SFA (μg.mg ⁻¹ DM)		10.01 ± 5.01	-
	MUFA (μg.mg ⁻¹ DM)		4.42 ± 2.80	-
	PUFA (μg.mg ⁻¹ DM)		2.14 ± 1.64	-
Leaf litter	SFA (μg.mg ⁻¹ DM)	5.80 ± 0.31	6.21 ± 0.29	ns
	MUFA (μg.mg ⁻¹ DM)	1.37 ± 0.11	1.44 ± 0.36	ns
	PUFA (μg.mg ⁻¹ DM)	1.10 ± 0.27	0.81 ± 0.16	ns
FPOM	SFA (μg.mg ⁻¹ DM)	2.43 ± 0.07	4.27 ± 0.87	*
	MUFA (μg.mg ⁻¹ DM)	0.27 ± 0.04	1.04 ± 0.27	**
	PUFA (μg.mg ⁻¹ DM)	0.06 ± 0.04	0.43 ± 0.08	**

Gut content of macroinvertebrates

CPOM and FPOM (Figure 1) were the main items found in *G. pulex* and *R. semicolorata* gut content (representing more than 80%), followed by diatoms. In the gut content of *G. pulex* and *R. semicolorata* from LC, diatoms were significantly more represented to the detriment of CPOM (about - 65% and - 40% for CPOM, 0.5 to 10% and 0.5 to 20% for diatoms, respectively; Figure 1). For the diet of *G. pulex*, significantly higher FPOM and filamentous algae were also observed in LC (33 and 3.60 %, respectively), revealing a change in feeding habits (from shredder to collector – grazer, see Felten et al., 2008). *R. semicolorata* ingested significantly more CPOM in DC than in LC (prop test $p < 0.01$). Finally, animal preys were only found in *G. pulex*.

Bulk stable isotope analysis and basal source assimilation

In both treatments and at each sampling date (T0 and T20), the isotope signatures of leaf litters (Figure 2) were similar ($\delta^{13}\text{C}$: $-30 \pm 0.8 \text{ ‰}$ and $\delta^{15}\text{N} < 0$; $p = 0.51$ and $p = 0.78$ respectively) and consistent with the reported values for sources of terrestrial organic matter in rivers (-32‰ to -28‰) (Rasmussen, 2010). Compared to leaf litter, the biofilms were enriched in both isotopes and their signatures differed depending on the conditions tested. A temporally stable $\delta^{13}\text{C}$ of $-28 \pm 0.2\text{‰}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of $2 \pm 0.6\text{‰}$ was registered in DC whereas in LC, $\delta^{13}\text{C}$ signatures were enriched and increased from $-24.5 \pm 0.5 \text{ ‰}$ (T0) to $-20.95 \pm 0.4\text{‰}$ at T20 (Figure 2). In LC, $\delta^{13}\text{C}$ values recorded in the wall biofilm (T20) were much higher ($-14.14 \pm 0.6\text{‰}$). At T20, FPOM (small leaf particles and microorganisms) showed $\delta^{13}\text{C}$ values ($-29.01 \pm 0.1 \text{ ‰}$) similar to those of leaf litter and biofilm in DC and intermediate between leaf litter and biofilm in LC ($-25.30 \pm 2.3\text{‰}$). In both conditions FPOM $\delta^{15}\text{N}$ signatures were the highest recorded (about 3.1‰).

Just before the macroinvertebrates were placed in the flumes (T0), they exhibited similar $\delta^{13}\text{C}$ values ($-25.9 \pm 1.3\text{‰}$) but highly significant differences in $\delta^{15}\text{N}$ values ($p < 0.001$) (*G. pulex*: $6.0 \pm 0.2\text{‰}$; *R. semicolorata*: $3.7 \pm 0.3\text{‰}$; Figure 2). At T20, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures did not differ significantly between the two species in DC ($\delta^{15}\text{N}$: $4.02 \pm 0.8\text{‰}$ vs $3.84 \pm 0.4 \text{ ‰}$, $p = 0.8$; $\delta^{13}\text{C}$: $-26.31 \pm 0.3\text{‰}$ vs $26.4 \pm 0.2\text{‰}$, $p = 0.7$). In LC, the $\delta^{13}\text{C}$ values of *R. semicolorata* were sharply enriched ($-16.30 \pm 0.6\text{‰}$, close to the wall biofilm $\delta^{13}\text{C}$ signatures, while $\delta^{15}\text{N}$ values remained unchanged throughout the survey (about 4‰). In LC, *G. pulex* were depleted in $\delta^{13}\text{C}$ compared to *R. semicolorata* ($-23.2 \pm 0.9\text{‰}$), but enriched compared to *G. pulex* in DC ($-26.31 \pm 0.3\text{‰}$). Finally, *G. pulex* $\delta^{15}\text{N}$ signature decreased from $6.0 \pm 0.2\text{‰}$ (T0) to $4.3 \pm 0.6\text{‰}$ (T20) (Figure 2).

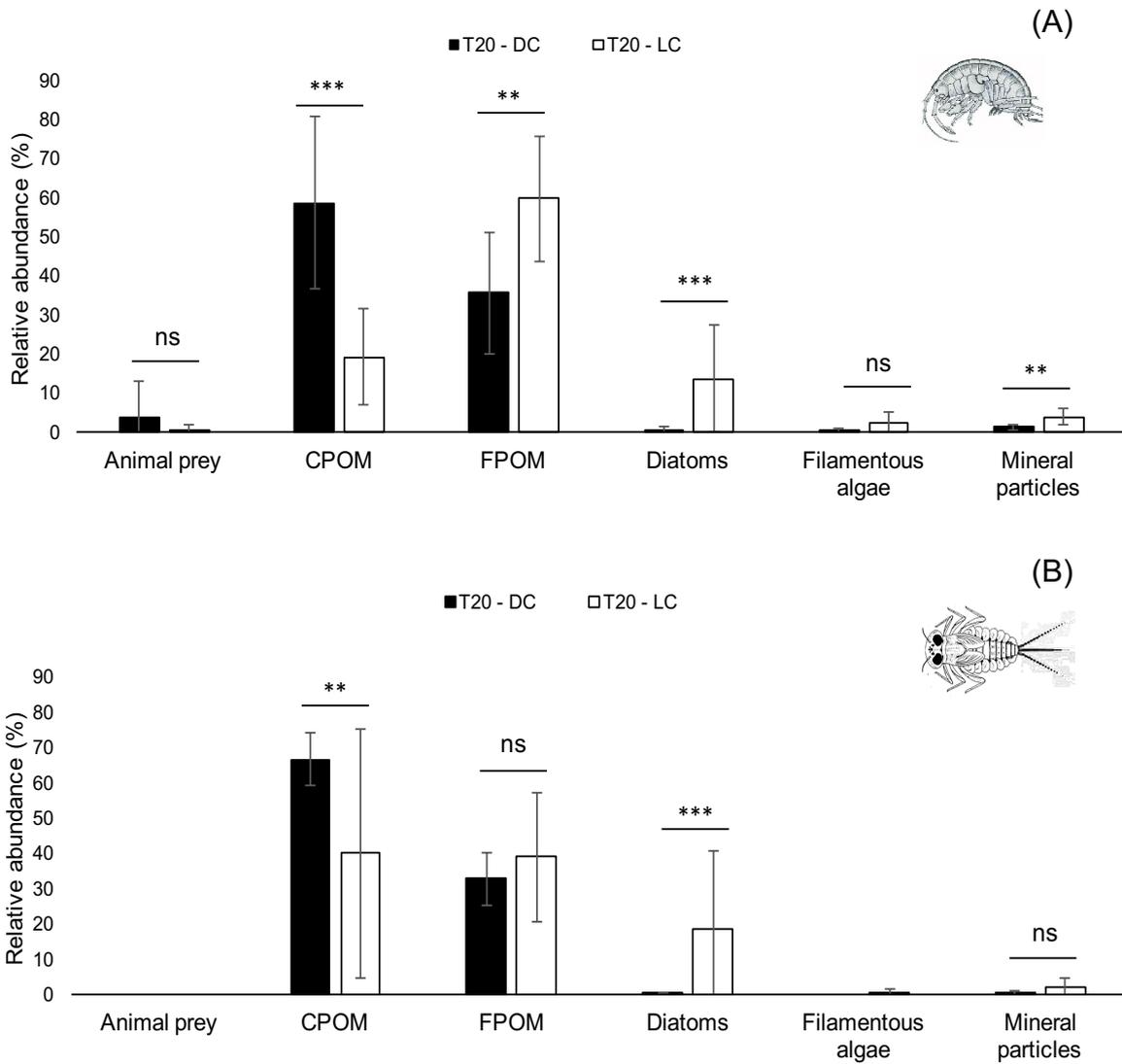


Figure 1 Proportion (mean \pm SD) of the food items observed at T20 in *G. pulex* (A) and *R. semicolorata* (B) reared in DC treatment (dark) and LC treatment (light). Histogram bars represent the percentage by area of each item recorded in each slide field for all individuals. (Prop.test, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.0001$; ns: not significant).

Dietary assimilation from basal sources differed markedly in the two treatments (Figure 2). The SIAR mixing model output showed similar basal source proportions assimilated in DC (T20) for *R. semicolorata* and *G. pulex*, with higher contributions of FPOM (35.1% to 35.6%, respectively) and biofilm (36.7% to 40.4%) prevailing over leaf litter (28.2% to 24.0%). In LC, *R. semicolorata* nymphs derived over 64.6% of their isotopic signature from biofilm developed on flume walls (Figure 2). The remainder was derived equally from tile biofilm (13.8%), FPOM (12.7%) and leaf litter (8.9%). *G. pulex* derived 30.9% of their diet from FPOM and 27.9% from tile biofilm, respectively. The remainder consisted of 21.2% from leaf litter and 19.9% from the wall biofilm.

Changes in the amounts of NLFA and PLFA of the two macroinvertebrates and hierarchical clustering of FA mean $\delta^{13}\text{C}$ values in lipid class.

Throughout the experiment, no significant changes were observed in the total concentrations of *G. pulex* NLFA and PLFA or between the two treatments (Figure 3). In contrast, *R. semicolorata* nymphs showed similar total PLFA concentrations over time and in both treatments but accumulated significantly higher amounts of NLFA (99.75 ± 11.6 vs 24.3 ± 1.99 $\mu\text{g} \cdot \text{mg DM}^{-1}$, ANOVA $p < 0.05$) when reared in LC. This higher storage of NLFA was related to a significantly greater accumulation of saturated fatty acids (SFA), Mono-unsaturated fatty acids (MUFA) and PUFA (Figure 3), a feature not observed in nymphs from DC for which a decreasing trend was observed throughout the experiment, although it was not significant. In *G. pulex* the amounts of SFA, MUFA, and PUFA remained fairly constant between treatments, except for the significantly higher amount of PUFA in *G. pulex* NLFA in LC conditions (15.64 ± 2.67 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{DM}$) compared to DC conditions (6.78 ± 2.70 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{DM}$) (ANOVA $p < 0.05$). These higher concentrations of PUFA in both LC species were related to the significantly higher PUFA concentrations observed in LC basal food sources, in the wall biofilms (2.14 ± 1.64 $\mu\text{g} \cdot \text{mg DM}^{-1}$), the tile biofilms (3.24 ± 0.32 $\mu\text{g} \cdot \text{mg DM}^{-1}$ vs 0.25 ± 0.18 $\mu\text{g} \cdot \text{mg DM}^{-1}$ $p < 0.001$) and to a lesser extent in FPOM (0.43 ± 0.08 $\mu\text{g} \cdot \text{mg DM}^{-1}$ vs 0.06 ± 0.04 $\mu\text{g} \cdot \text{mg DM}^{-1}$ $p < 0.01$).

Hierarchical Clustering on Principal Components performed on the average $\delta^{13}\text{C}$ values of all the FAs and sterols detected made it possible to relate the two macroinvertebrate lipids to the basal sources (Figure 4). For DC, 4 clusters were identified: i) cluster II grouped *G. pulex* isotope signatures (NLFA, PLFA and sterols) with FPOM signatures, ii) cluster III grouped *R. semicolorata* NLFA and PLFA isotope signatures with tile biofilm signatures, while iii) cluster I contained only leaf litter, and iv) cluster IV only contained *R. semicolorata* sterols (Figure 4). In LC, five clusters were identified (Figure 4) : i) cluster IV grouped isotope signatures of *R. semicolorata* NLFA and PLFA with tile biofilm signature, ii) cluster V grouped

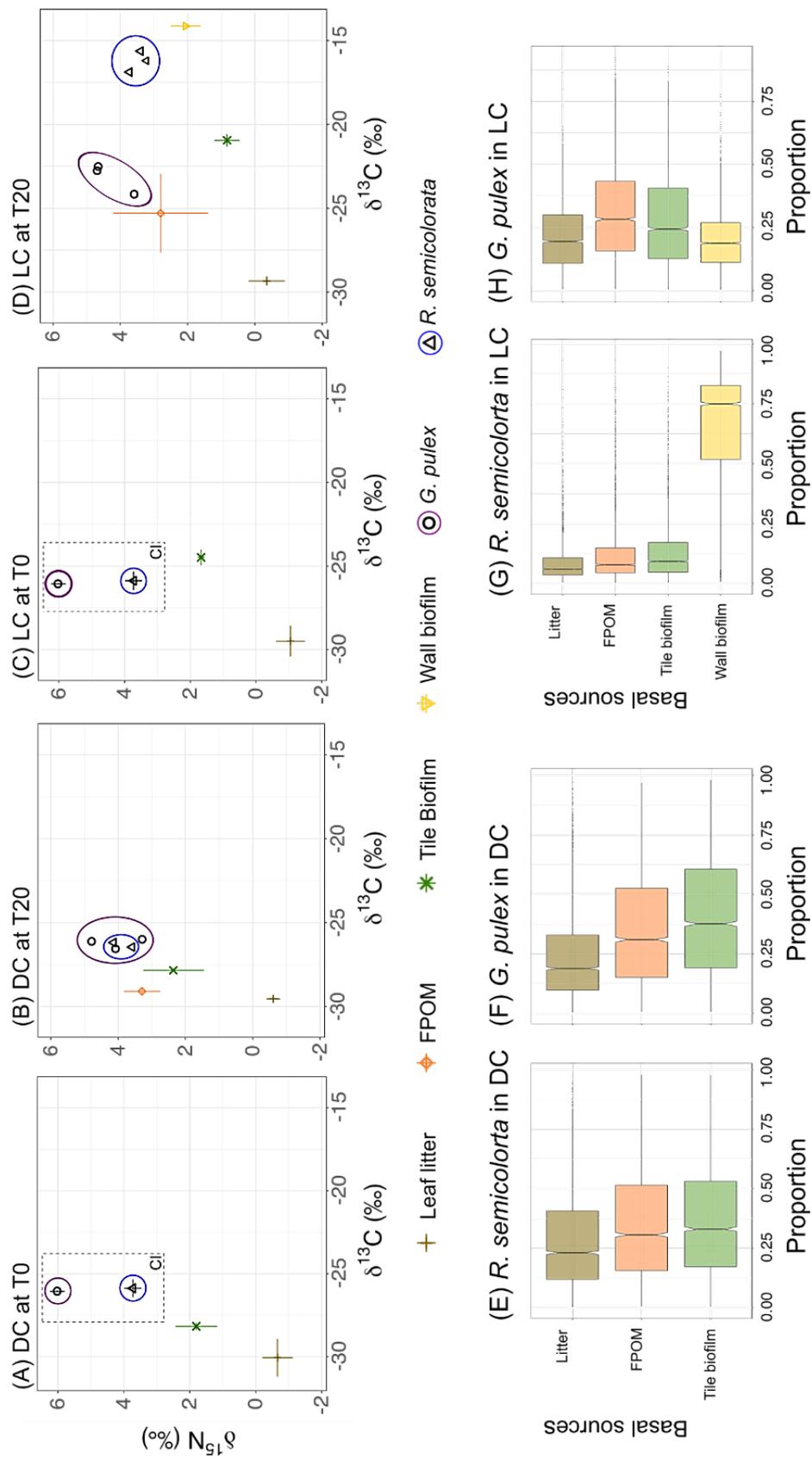


Figure 2 Stable isotope Analysis
Upper Illustrations: $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ biplot showing the basal sources (mean \pm SD) and individual values of *G. pulex* (orange circles) and *R. semicolorata* (blue circles) according to the Bayesian isotope mixing models (SIAR) in dark conditions at T0 (A) and T20 (B) and in light conditions at T0 (C) and T20 (D). Collected individuals (CI) at T0 are shown for information in the box with a dotted line.
Lower Illustrations: Dietary composition of *R. semicolorata* (E, G) and *G. pulex* (F, H) according to the Bayesian mixing models (SIAR) in dark conditions (E, F) and light conditions (G, H) at T20. Boxplots represent 95% and 50% credible intervals of basal source proportion (%) assimilated by each macroinvertebrate. Each Boxplot includes the median, the 25th and 75th quartiles of posterior distribution.

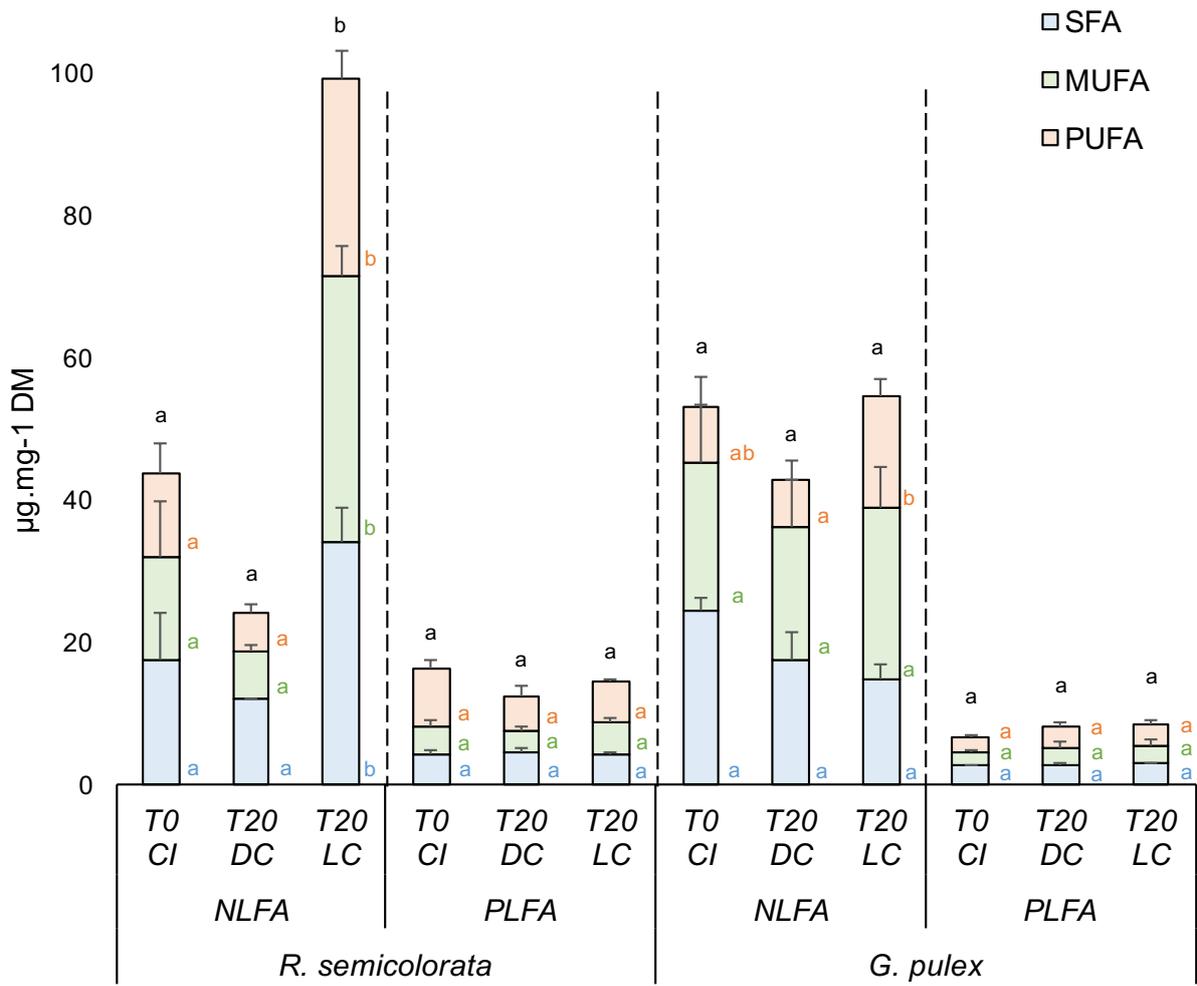


Figure 3 Changes in Neutral Lipid Fatty Acids (NLFA) and Polar Lipid Fatty Acids (PLFA) including Saturated Fatty Acid (SFA), Monounsaturated Fatty Acids (MUFA) and Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) from the two macroinvertebrates species at T0 (CI: Collected individuals) and at T20 (DC: Dark conditions - LC: Light Conditions). Values are mean \pm SD. Significant differences (one-way ANOVA with $p < 0.05$) are indicated by different letters within a same FA category.

isotope signatures of *R. semicolorata* sterols with the wall biofilm signature (both clusters were connected at higher Euclidian distances), iii) cluster II grouped *G. pulex* sterol signatures with FPOM signatures, iv) cluster III grouped isotope signatures of *G. pulex* NLFA and PLFA (clusters II and III were connected at higher Euclidian distances), while v) cluster I contained only leaf litter (Figure 4).

Differences in isotopic signatures of FAs

The complete list and details of FAs detected in lipids from basal sources and macroinvertebrates are available as Supporting Information 2 and 3 with the tables S1 (basal sources), S2 (*R. semicolorata*), and S3 (*G. pulex*). In addition, all the available $\delta^{13}\text{C}$ values of FAs are listed as additional information (Tables S4 to S5). To better illustrate the effect of the two conditions tested on the origin and transfer of FAs, we focused on the $\delta^{13}\text{C}$ signatures of several FAs of interest: i) on abundant 16:0 and 18:1 ω 9; ii) on selected diatom markers (exclusive: 16:2 ω 4 and 16:4 ω 1; non-exclusive but overabundant: 16:1 ω 7; iii) and on essential PUFAs (18:3 ω 3, 18:2 ω 6) and LC-PUFAs (ARA: 20:4 ω 6, EPA:20:5 ω 3) (see Table 3).

In LC conditions, all FA $\delta^{13}\text{C}$ values were depleted in leaf litter (-33.47‰ to -29.19‰), with the exception of ARA (-26.82‰) which was more enriched in ^{13}C (Table 3). In line with bulk $\delta^{13}\text{C}$ signatures, FA $\delta^{13}\text{C}$ signatures were highly enriched in tile and wall biofilms (-23.22‰ to -17.46‰) and the ^{13}C enrichment was significant compared to leaf litter FAs (ANOVA $p < 0.05$). In contrast, no statistical difference was found in the FA $\delta^{13}\text{C}$ signatures between the two biofilms (Table 3). FA signatures in FPOM tended to be intermediate between, typically a 18:2 ω 6 $\delta^{13}\text{C}$ value identical to the litter's 18:2 ω 6 and an EPA $\delta^{13}\text{C}$ value identical to those in the biofilms. $\delta^{13}\text{C}$ values in *Rhithrogena* NLFA and PLFA were markedly enriched in ^{13}C (-23.64‰ to -19.55‰) and significantly higher than those in gammarids NLFA and PLFA (-30.51‰ to -24.53‰) (ANOVA $p < 0.05$), except for 16:4 ω 1 and EPA (Table 3). We found no statistical difference between the ^{13}C values of 18:1 ω 9, 18:2 ω 6, ARA (-21.56 to -21.94‰), 18:3 ω 3 and EPA (-22.29 to -21.92‰) in *Rhithrogena* NLFA and PLFA and both biofilms (ANOVA $p > 0.05$). In *G. pulex*, the ^{13}C contents of 18:2 ω 6 and ARA were similar to those in litter and FPOM except for ARA from PLFA which was ^{13}C depleted (-28.62 \pm 0.10‰). 18:3 ω 3 and EPA $\delta^{13}\text{C}$ values in *G. pulex* (-25.33‰ to -26.05‰) were similar to those in FPOM (ANOVA $p > 0.05$). Finally, similar trends were observed for 16:0, 16:1 ω 7 and 18:1 ω 9, with close values of ^{13}C for *G. pulex* and FPOM, and for *Rhithrogena* and biofilms. Conversely, 16:4 ω 1 was significantly depleted in ^{13}C in both macroinvertebrates (-22.56‰ to -22.37‰), compared to the two biofilms (-19.43‰ to -17.46‰). This was also the case for 16:2 ω 4, except for *Rhithrogena* NLFA (-21.28 \pm 0.19‰), where the observed difference with the tile biofilm (-17.92 \pm 2.57‰) was not significant.

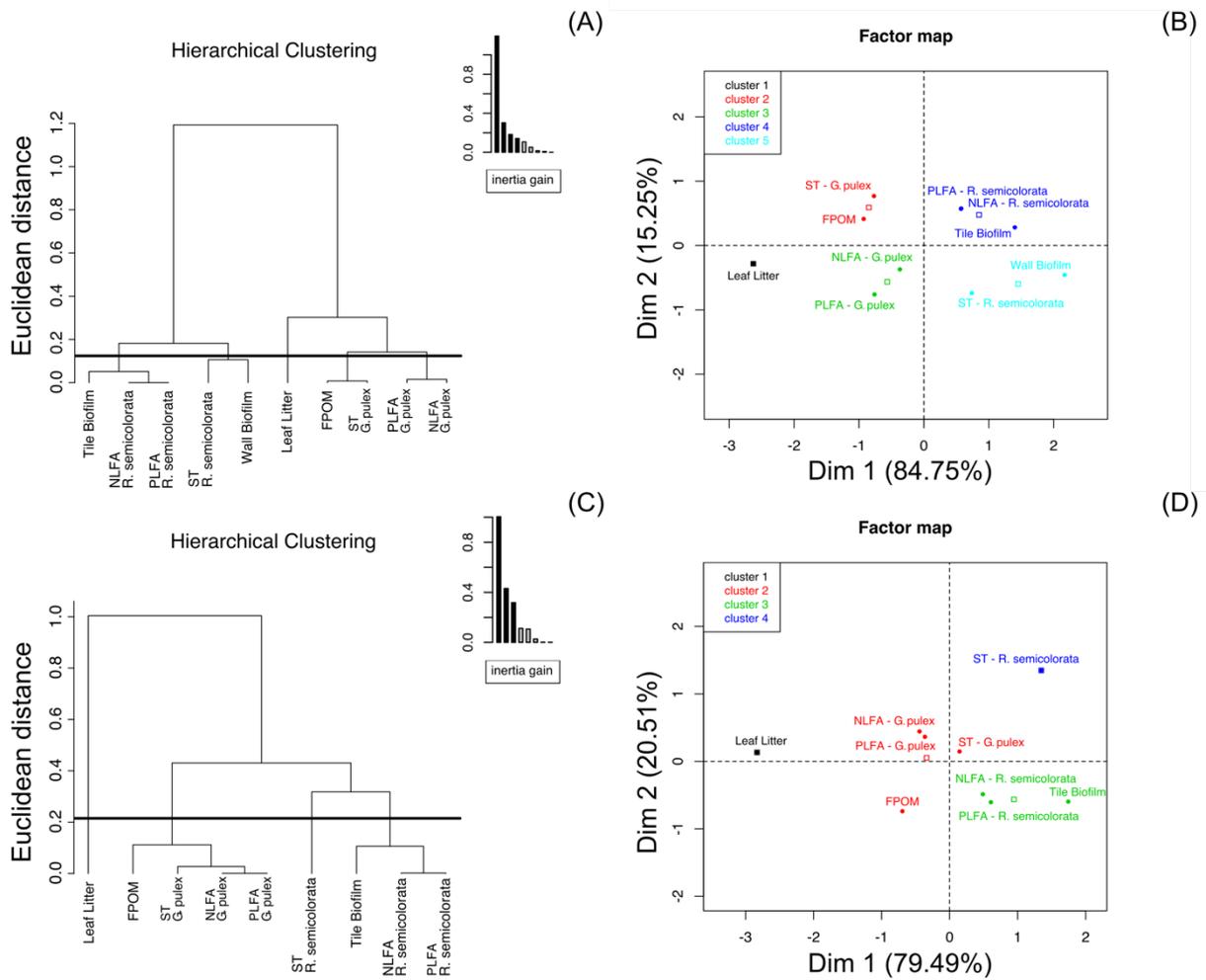


Figure 4 Hierarchical Clustering on Principal Components based on the mean $\delta^{13}\text{C}$ values of all fatty acids and sterols detected in basal sources and the two macroinvertebrate lipids. On the right: clusters on the maps induced by the first two principal components; On the left: hierarchical trees. In the upper part of the figure are the data from the LC treatment (A, B) and in the lower part the data from the DC treatment (C, D).

Table 3 $\delta^{13}\text{C}$ values of the selected fatty acids and sterols in basal sources and in *G. pulex* and *R. semicolorata* under Light Conditions or Dark Conditions. Significant differences (one-way ANOVA with $p < 0.05$) are indicated by different letters. NLFA: Neutral lipid fatty acids ; PLFA: Polar lipid fatty acids.

Dark conditions	Leaf litter	FPOM	Tile biofilm	NLFA		PLFA	NLFA		PLFA
				<i>R. semicolorata</i>	<i>G. pulex</i>		<i>R. semicolorata</i>	<i>G. pulex</i>	
16:0	-33.58 ± 0.01 a	-30.77 ± 2.04 ab	-28.64 ± 0.65 b	-30.64 ± 0.61 ab	-30.77 ± 2.99 ab	-30.88 ± 0.26 ab	-30.91 ± 0.16 ab	-30.40 ± 0.25 a	-30.30 ± 1.01 a
16:1 ω 7	-29.56 ± 0.30 a	-28.80 ± 3.95	-30.59 ± 0.49 a	-29.79 ± 0.09 a	-30.25 ± 3.08 a	-29.83 ± 0.08 b	-30.44 ± 0.05 b	-30.41 ± 0.11 b	-30.58 ± 0.77 b
18:1 ω 9	-30.85 ± 1.53 ab	-29.16 ± 1.00 ab	-27.70 ± 0.13 a	-30.41 ± 0.11 b	-30.58 ± 0.77 b	-29.83 ± 0.08 b	-30.44 ± 0.05 b	-31.15 ± 0.90 a	-30.75 ± 0.81 a
18:2 ω 6	-30.99 ± 0.35 a	-31.14 ± 1.19 a	-30.79 ± 0.21 a	-31.15 ± 0.90 a	-30.75 ± 0.81 a	-32.94 ± 0.44 b	-30.53 ± 0.41 a	-32.45 ± 0.45 ab	-32.33 ± 0.54 ab
18:3 ω 3	-33.80 ± 0.04 ac	-29.96	-30.27 ± 3.30 b	-32.45 ± 0.45 ab	-32.33 ± 0.54 ab	-35.71 ± 0.25 c	-33.21 ± 1.07 ac	-29.82 ± 0.67 ab	-28.89 ± 0.60 a
20:4 ω 6				-29.82 ± 0.67 ab	-28.89 ± 0.60 a	-30.64 ± 0.29 b	-29.83 ± 0.15 ab	-28.63 ± 0.08 b	-30.64 ± 0.29 b
20:5 ω 3		-24.42	-30.18 ± 0.89 a	-28.63 ± 0.08 b	-27.36 ± 0.95 c	-30.44 ± 0.30 d	-29.77 ± 0.28 ad		

Light conditions	Leaf litter	FPOM	Tile biofilm	Wall biofilm	NLFA		PLFA	NLFA		PLFA
					<i>R. semicolorata</i>	<i>G. pulex</i>		<i>R. semicolorata</i>	<i>G. pulex</i>	
16:0	-33.47 ± 0.31 a	-25.71 ± 0.69 b	-21.81 ± 0.42 b	-22.08 ± 2.05 b	-19.76 ± 0.49 d	-21.70 ± 0.50 c	-27.39 ± 1.33 be	-19.55 ± 0.16 bc	-19.57 ± 0.53 bc	
16:1 ω 7	-29.19 ± 0.16 a	-21.31 ± 1.37 b	-18.68 ± 0.98 c	-19.12 ± 2.65 bc	-19.55 ± 0.16 bc	-19.57 ± 0.53 bc	-24.59 ± 0.54 d	-21.55 ± 1.22 b	-21.56 ± 0.44 c	
18:1 ω 9	-30.00 ± 2.06 a	-25.89 ± 1.25 b	-23.49 ± 0.56 bc	-22.72 ± 0.82 c	-21.55 ± 1.22 b	-21.56 ± 0.44 c	-27.60 ± 0.15 b	-21.28 ± 0.19 b	-23.40 ± 0.71 a	
16:2 ω 4	-28.14	-23.25 ± 1.40 a	-17.92 ± 2.57 b	-17.72	-21.28 ± 0.19 b	-23.40 ± 0.71 a	-24.14 ± 1.17 a	-22.37 ± 0.79 b	-22.47 ± 1.01 b	
16:4 ω 1			-19.43 ± 1.83 a	-17.46	-22.37 ± 0.79 b	-22.47 ± 1.01 b	-22.56	-22.98 ± 0.29 b	-23.64 ± 0.38 b	
18:2 ω 6	-30.89 ± 0.35 a	-29.69 ± 5.00 a	-21.57 ± 2.97 b	-21.32 ± 3.06 b	-22.98 ± 0.29 b	-23.64 ± 0.38 b	-30.51 ± 1.81 a	-23.19 ± 0.53 bc	-23.24 ± 0.30 bc	
18:3 ω 3	-33.30 ± 3.96 a	-25.12 ± 4.45 bd	-23.22 ± 0.93 bc	-19.61 ± 1.66 c	-23.19 ± 0.53 bc	-23.24 ± 0.30 bc	-27.77 ± 0.12 d	-21.64 ± 0.36 b	-21.94 ± 0.48 b	
20:4 ω 6	-26.82	-26.42 ± 2.46 a	-20.69 ± 0.70 b		-21.64 ± 0.36 b	-21.94 ± 0.48 b	-28.00 ± 0.58 ac	-22.29 ± 0.28 bc	-21.92 ± 0.10 bc	
20:5 ω 3	-32.70 ± 0.23 a	-23.56 ± 2.23 bc	-19.41 ± 1.71 b	-23.18 ± 3.10 bc	-22.29 ± 0.28 bc	-21.92 ± 0.10 bc	-26.05 ± 0.75 c			

Dark conditions	Leaf litter	FPOM	Tile biofilm	NLFA		PLFA
				<i>R. semicolorata</i>	<i>G. pulex</i>	
cholesterol	-34.83 ± 0.11 a	-34.01 ± 1.24 a	-27.48 ± 0.33 b			-29.86 ± 0.98 c
campesterol	-33.03 ± 0.23 a	-33.16 ± 0.82 a	-30.21 ± 0.93 b			-29.76
β -sitosterol	-30.36 ± 0.25 a	-30.62 ± 0.41 ab	-30.86 ± 0.16 ac			-31.58 ± 0.65 c

Light conditions	Leaf litter	FPOM	Tile biofilm	Wall biofilm	NLFA	
					<i>R. semicolorata</i>	<i>G. pulex</i>
cholesterol	-33.77 ± 0.08 a	-32.11 ± 1.56 a	-25.12 ± 0.72 b	-23.69 ± 0.63 b	-23.43 ± 1.40 b	-29.31 ± 0.80 c
campesterol	-30.83 ± 2.79 a	-27.29 ± 1.79 a	-23.06 ± 1.65 b	-20.65 ± 1.43 b		-27.95
β -sitosterol	-29.98 ± 0.18 a	-29.77 ± 0.39 a	-23.76 ± 1.60 b	-19.31 ± 0.51 c		-32.22

In DC treatment, there was little contrast in FA $\delta^{13}\text{C}$ values between basal sources (Table 3). Leaf litter tended to have the most depleted values (-33.80 ‰ to -29.56 ‰), but only 16:0 and 18:3 ω 3 $\delta^{13}\text{C}$ values were significantly enriched in tile biofilm (-28.64 ‰; -30.27 ‰) compared to litter (-33.58 ‰; -33.80 ‰) (ANOVA $p < 0.05$). FA $\delta^{13}\text{C}$ signatures in FPOM were identical to those in tile biofilm except for EPA. Overall, FA $\delta^{13}\text{C}$ signatures of *G. pulex* and *R. semicolorata* NLFA and PLFA differed little (Table 3). Identical $\delta^{13}\text{C}$ values were found for 16:1 ω 7 18:1 ω 9 and 18:2 ω 6, except in *G. pulex* NLFA where 18:2 ω 6 had a more depleted value (-32.94 \pm 0.44‰; ANOVA $p < 0.05$). 16:0 exhibited similar $\delta^{13}\text{C}$ values for both macroinvertebrate (-30.91 ‰ to -30.64 ‰) and FPOM (-30.77 \pm 2.04‰). 18:3 ω 3 $\delta^{13}\text{C}$ values in *Rhithrogena* (-32.45‰; -32.33‰) were not significantly different than those in FPOM and biofilm (-29.96 ‰; -30.27 ‰) and those in leaf litter (-33.80 \pm 0.04 ‰). More depleted than in *Rhithrogena*, 18:3 ω 3 values in *Gammarus* NLFA (-35.71 \pm 0.25 ‰) and PLFA (-33.21 \pm 1.07 ‰) were similar to those of litter (ANOVA $p > 0.05$). EPA $\delta^{13}\text{C}$ contents in *G. pulex* (-30.44 ‰ to -29.77 ‰) were depleted compared to *R. semicolorata* (-28.63 ‰ to -27.36 ‰) (ANOVA $p < 0.05$) but similar to the values in tile biofilm. In both species, EPA $\delta^{13}\text{C}$ values in NLFA and PLFA were enriched (from +3.8‰ to +5.2‰) compared to their respective 18:3 ω 3 values. No significant difference was found in ARA $\delta^{13}\text{C}$ signatures for the two macroinvertebrates' NLFA and PLFA (-30.64 ‰ to -28.82 ‰) (ANOVA $p > 0.05$).

Differences in isotopic signatures of the main sterols

The complete list of sterols detected in the samples and their $\delta^{13}\text{C}$ signatures are available as supporting information (Tables S6 and S7). Due to low amounts or traces of phytosterols detected in macroinvertebrates, reliable isotope fractionation values were only obtained for campesterol, β -sitosterol and cholesterol in both species, values that are reported in table 3. In DC treatment, isotopic signatures of β -sitosterol were similar in all basal sources (-30.86 ‰ to -30.36 ‰) and significantly depleted in *G. pulex* (-31.58 \pm 0.65 ‰; ANOVA $p < 0.05$) and probably in *R. semicolorata* (only one value: -31.39 ‰). The campesterol in *G. pulex* had a $\delta^{13}\text{C}$ value close to that found in biofilm (-27.48 \pm 0.33 ‰) which was more enriched (ANOVA $p < 0.05$) than that in litter and FPOM (-33.16 ‰ to -33.03 ‰). The $\delta^{13}\text{C}$ value for cholesterol was significantly higher in biofilm (-27.48 \pm 0.33‰; ANOVA $p < 0.05$) than in litter and FPOM, and the $\delta^{13}\text{C}$ values in *G. pulex* and *R. semicolorata* were intermediate (-29.86 ‰ to -30.38 ‰).

In LC conditions, the sterol $\delta^{13}\text{C}$ values were markedly enriched in biofilms (table 3), especially in the wall biofilm (-23.67‰ to -19.0 ‰). The $\delta^{13}\text{C}$ content of sterols in FPOM and litter was similar (-33.77 ‰ to -27.29 ‰) and significantly depleted compared to biofilms (ANOVA $p < 0.05$). As observed for FAs, $\delta^{13}\text{C}$ values in *Rhithrogena* sterols were enriched (-

23.81‰ to -22.86 ‰) and similar to those in both biofilms for cholesterol (-23.43 ± 1.4 ‰) and campesterol, but only to tile biofilm for β-sitosterol (table 3). In gammarids, the δ¹³C value for cholesterol (-29.31 ± 0.80 ‰) was significantly more depleted than in *Rhitrogena* and intermediate between cholesterol signatures in biofilms and those in litter and FPOM. *G. pulex* δ¹³C values of campesterol and β-sitosterol were likely more depleted than in *Rhitrogena* and either similar to those of FPOM or litter, or more depleted in the case of β-sitosterol.

Discussion

Our study highlights the importance that different sources of organic matter may have on the development of macroinvertebrates from different FFG. In flumes placed in the dark, the near-absence of an autochthonous source of organic matter seemed to be a major trophic constraint for both species. At the end of the experiment, and despite having distant biological traits, *Rhitrogena* nymphs and *Gammarus* were found to have the same trophic positions and similar stable carbon isotope compositions. The results of the SIAR mixing model did not indicate any difference in the origin of the assimilated carbon in the two species. Carbon was of detrital origin, from fine particles derived from litter fragmentation (FPOM), and from tile biofilm. This biofilm was predominantly heterotrophic, although rare diatoms may have remained, explaining its slight enrichment in ¹³C compared to FPOM (Risse-Buhl et al 2011). In flumes left in light conditions, both species had access to an important source of autochthonous organic matter and the origin of assimilated carbon was more consistent with their FFG. According to results recently observed in another Heptageniidae species, *Ecdyonurus* sp. (Kühmayer et al., 2020), our results showed that more than 78% of *Rhitrogena*'s carbon was derived from autochthonous organic matter, tile biofilm and wall biofilm, as indicated by the SIAR mixing model and *Rhitrogena*'s ¹³C-enriched signatures. The remainder came from FPOM, which was confirmed by the presence of leaf detritus particles in the digestive tracts, a feature already observed in *Rhitrogena* (McShaffrey & McCafferty, 1988). Under light conditions, *Gammarus pulex* derived most of its carbon from FPOM and tile biofilm, with litter being only the third most important food source. This lower importance of leaf litter in the amphipod isotope signatures was not expected but must be related to the plasticity of their feeding behavior (Felten et al., 2008). The absence of well-developed autotrophic biofilms affected the performance of our two macroinvertebrates reared in the dark, in particular the *Rhitrogena* nymphs. In headwater streams, the quality of the food resources can be as limiting as their availability to consumers (Florès et al., 2014) and this quality is likely linked to the importance of autochthonous primary production, as reported in several studies (Torres-Ruiz et al., 2007; Guo et al., 2016b). The content of essential lipid compounds in biofilm

microalgae is found to have the greatest influence on nutritional quality (Crenier et al., 2017; Twining et al., 2017; Guo et al., 2018; Torres-Ruiz & Wehr, 2019). In freshwater, essential life history traits such as growth rate, fecundity rate and survival of many planktonic and benthic invertebrates depend on the nutritional supply of essential PUFAs (Ruess & Müller-Navarra, 2019) and phytosterols that can be bioconverted into cholesterol (Martin-Creuzburg & Merkel, 2016). In line with these studies, our results highlight that access to these lipids from autotrophic biofilms has impacted some of the life history traits of our two species.

When *Rhitrogena* nymphs had access to well-developed autotrophic biofilms, all of their performances (survival and emergence rates, growth parameters) were significantly higher than those of their congeners reared in the dark. While PLFA levels were not statistically different between nymphs from the two treatments, the LC mayflies accumulated huge amounts of NLFA ($99.75 \pm 11.6 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{DM}$). Knowing that in insects most of the NLFA are in the form of Triacylglycerols (TAG) (Arrese & Soulages, 2010) this represents approximately $112 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1} \text{DM}$ of TAG. Such concentrations are among the highest observed in the last instars of *R. semicolorata* nymphs from small mountain streams (mean: $60 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1} \text{DM}$; max: $\sim 118 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1} \text{DM}$; see in Winkelmann & Koop, 2007). In contrast, our dark-reared nymphs contained only $24.30 \pm 2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{DM}$ of NLFA, representing approximately $27.5 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1} \text{DM}$ of TAG, consistent with the lowest values reported by Winkelmann & Koop (2007). We found that the mean $\delta^{13}\text{C}$ signature of the FA pool in *Rhitrogena* NLFA was indeed derived from the wall biofilm, which is in line with Kühmayer et al. (2020), who also observed that *Ecdyonurus* sp. acquired its FAs primarily from microalgae. During the last weeks before emergence of *Rhitrogena semicolorata*, energy obtained from food is used to maximize growth with the remainder is stored as TAG and glycogen or used for egg maturation by female nymphs (Canavoso et al., 2001; Winkelmann & Koop, 2007). Thus, the amount of lipids stored is intended to cover energy needs during the mating period and depends largely on the quantity and quality of available food resources (Winkelmann & Koop, 2007). While the nymphs certainly fulfilled their FA requirement in the presence of autotrophic biofilms, the lipid and nutritional needs of dark-reared nymphs were certainly not met. DC *Rhitrogena* derived most of their NLFAs from detrital biofilm and it is likely that they ingested large amounts of detrital particles to compensate for the absence of microalgae-rich biofilms. This compensatory feeding behaviour seems similar to that observed in caddisfly larvae facing poor quality food (Florès et al. 2014). Our results, therefore, clearly underline the importance of lipid supply from microalgae during the development period preceding the emergence of a grazer heptageniid species. Regarding gammarids, access to autotrophic biofilms allowed a significantly higher growth when reared under light conditions. In crustaceans, growth rate is indeed highly dependent on the nutritional supply of lipid compounds, such as LC-PUFAs (Müller-Navarra et al., 2000; Aguilar et al., 2012) or cholesterol precursor D5-sterols (Gergs et

al., 2015). Our results also indicated that NLFA were derived from FPOM in gammarids from both conditions tested. The lack of effect on survival rates and NLFA concentrations in *G. pulex* may be related to the ability of gammarids to cover basic metabolic needs with leaf debris from good quality litter such as the alder leaves used in our study (Little & Altermatt, 2019). On the other hand, microalgae attached to leaf fragments in FPOM could explain the better growth rate observed under light conditions. Diatoms developing on conditioned leaves were proven to be indispensable for *Gammarus fossarum* growth, a closely related species (Crenier et al., 2017). In addition, Kühmayer and co-authors (2020), using a recalcitrant litter (*Fagus sylvatica*), highlighted that carbon and LC-PUFAs from microalgae were more readily available for gammarids.

CSIA allowed us to establish the origin of the essential PUFAs and selected FAs as well as the major detected sterols. Under light conditions, the strong differences observed in isotope fractionation between FAs from basal sources helped to compensate for the uncertainties resulting from the variations in FA fractionation during metabolization processes in consumers, which is one of the limitations of this analytical method (Bec et al., 2011; Gladyshev et al., 2012; Twining et al., 2020). In *Rhitrogena*, the high ^{13}C -enrichments observed in PUFA, 16:0, 18:1 ω 9 and the two selected diatom markers (16:1 ω 7, 16:4 ω 1) followed those observed in the two autotrophic biofilms. Undoubtedly, the enriched $\delta^{13}\text{C}$ values of EPA and 18:3 ω 3 in the nymphs NL indicate that such PUFA were originated from biofilms. We may thus suggest that EPA in *Rhitrogena* was directly derived from diatoms in tile biofilms and 18:3 ω 3 rather from the microalgae in wall biofilm. The same applies for other FAs and ω 6 PUFAs although it was not possible to determine the autotrophic biofilm from which these compounds highly enriched in ^{13}C originated. FAs in *Gammarus pulex*, may have a more diverse origin. As in *Rhitrogena*, 16:4 ω 1 was incorporated from diatoms of both biofilms with a slight depletion. This confirms that microalgae were indeed assimilated by *G. pulex*. However, with a mean $\delta^{13}\text{C}$ signature of -30.50 ‰ (in NLFA) and -29.50 ‰ (in PLFA), 18:2 ω 6 did not originate from biofilms but from FPOM. On the other hand, 18:3 ω 3 could partly come from microalgae given its ^{13}C enriched signature in PLFA. ARA and EPA were depleted in ^{13}C relative to FPOM and enriched relative to their 18C-FA precursors, so these LC-PUFA signatures were likely modified by the amphipod's metabolic activity, with part of the EPA probably being bioconverted into 22:6 ω 3, a LC-PUFA absent from basal sources but detected in *G. Pulex* (see supporting tab. S3). Under dark conditions, differences in FA $\delta^{13}\text{C}$ values among basal sources did not exceed 2.7‰, confirming the near-absence of ^{13}C -enriched microalgae in the flumes. In *Gammarus* and *Rhitrogena*, 18:3 ω 3 and 18:2 ω 6 from both lipid classes were of exclusively detrital origin. The constraint imposed by the lack of sufficient microalgae acted on ARA and EPA levels in both species, which were significantly lower than under light conditions

(see supporting information 3 with tab. S2 and S3). ARA originated from the bioconversion of 18:2 ω 6 as did EPA from 18:3 ω 3, despite residual traces of EPA in FPOM. Both PUFAs were indeed enriched in ^{13}C relative to their precursors, which is consistent with an input of heavy carbon atoms during 18:2 ω 6 and 18:3 ω 3 elongation process (Hayes, 2001; Gladyshev et al., 2012). In our opinion, the need to synthesize 20:4 ω 6 and 20:5 ω 3 is likely the main reason for the lower performance observed in both species under dark conditions. Indeed, work examining penaeid shrimp development reported that both dietary ARA and EPA were important to their survival and development (Merican & Shim, 1996). Growth was generally better when combinations of ARA and EPA were provided in the diet, limiting their energy-intensive synthesis (Glencross et al., 2002). In addition, dietary EPA or ARA improves the reproductive performance of several crustacean species (Schlotz et al., 2013; Ginjupalli, et al., 2015). Sterol deficiency may also have serious consequences on the life cycle of gammarids (Gergs et al., 2015) and most likely on that of aquatic insects, based on observations made on terrestrial species (Behmer, 2017). Under light conditions, the isotopic signatures of dietary campesterol and β -sitosterol detected in both macroinvertebrates were unequivocal. Those highly enriched in ^{13}C were derived from biofilm microalgae in *Rhithrogena*, while those depleted in ^{13}C originated from FPOM in *G. pulex*. Low levels of cholesterol were detected in both autotrophic biofilms and we do not know whether this was sufficient to cover the needs of *Rhithrogena*. The isotopic signatures being close, it cannot be excluded that a substantial part of the mayfly cholesterol came from microalgae, since this sterol can be abundant in certain species of benthic diatoms (Jaramillo-Madrid et al., 2019). However, the occurrence of its immediate precursor (desmosterol) in *Rhithrogena* (supporting tab. S7) may suggest that the synthesis of cholesterol from dietary sterols also occurred. We also think that *Gammarus* has rather dealkylated dietary β -sitosterol to produce cholesterol. The depleted signature of its residual β -sitosterol and its enriched ^{13}C cholesterol seem to point to this (Hayes, 2001). Under dark conditions, the high abundance of β -sitosterol in detrital resources makes it the probable precursor of cholesterol synthesis in both macroinvertebrates where desmosterol was also detected. Finally, our results suggest that in the presence of alder leaf fragments, sterol nutritional constraints were limited for both species. Campesterol and β -sitosterol belong to Δ^5 phytosterols that are readily dealkylated by arthropods (Martin-Creuzburg et al., 2014; Behmer, 2017). Under light conditions, the ability to produce cholesterol by some benthic diatoms adds to the nutritional value of autotrophic biofilms. However, further studies are needed because sterol metabolism has been little studied in aquatic insects.

Conclusion

Our study clearly indicated that autochthonous food sources were important in meeting the biochemical requirements for LC-PUFAs of both macroinvertebrates in late spring. When in their last instars, *Rhitrogena* are highly dependent on biofilm microalgae from which they derive most of their carbon in addition to essential FAs such as ARA and EPA and a few dietary cholesterol. Fine particles of allochthonous matter were only a secondary food source for *Rhitrogena* nymphs. Limitation of LC-PUFAs appears to be a major ecological constraint for grazers Heptageniidae in headwater streams when feeding is solely on leaf detrital particles due to epilithic biofilms being reduced by shading. For *Gammarus pulex*, our experiment highlights that detrital food sources remain quantitatively important in terms of supply of carbon and sterols. This might be even more important when fine particles come from tree species known for the palatability of their leaf litter (Little & Altermatt, 2019). Microalgae collected in the fine detrital fraction may have usually been considered as an anecdotal complementary food but appear here of paramount nutritional importance to meet a large part of the amphipods' LC-PUFA needs. This also underlines the importance of fine particles of organic matter. Their exact composition in allochthonous detrital fragments and autochthonous photosynthetic material should be investigated in greater detail when studying headwater streams as well as their relative contribution to food webs.

Acknowledgment

We thank the CNSS (Conservatoire National du Saumon Sauvage, Chanteuges, France) for the provision of the reach and daily technical assistance. We also thank Ms. Frances Van Wyk de Vries for the improvement of the English text. This project was funded by EC2CO (INSU-CNRS) IFODPSYLO 2018-2020.

Data availability statement

Data are available from authors upon reasonable request.

References

- Aguilar, V., Racotta, I.S., Goytortúa, E., Wille, M., Sorgeloos, P., Civera, R., & Palacios, E. (2012) The influence of dietary arachidonic acid on the immune response and performance of Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at high stocking density. *Aquac. Nutr.* 18: 258–271.
- Ahlgren, G., Vrede, T., & Goedkoop, W. (2009) Fatty acid ratios in freshwater fish, zooplankton and zoobenthos—are there specific optima? In, *Lipids in aquatic ecosystems*. Springer, pp. 147–178.
- Alberts, J.M., Fritz, K.M., & Buffam, I. (2018) Response to basal resources by stream macroinvertebrates is shaped by watershed urbanization, riparian canopy cover, and season. *Freshw. Sci.* 37: 640–652.
- Allan, J.D. & Castillo, M.M. (2007) *Stream ecology: structure and function of running waters* Springer Science & Business Media.
- Arrese, E.L. & Soulages, J.L. (2010) Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55: 207–225.
- Bec, A., Perga, M., 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.
- Behmer, S.T. (2017) Overturning dogma: tolerance of insects to mixed-sterol diets is not universal. *Curr. Opin. Insect Sci.* 23: 89–95.
- Brett, M.T., Bunn, S.E., Chandra, S., Galloway, A.W.E., Guo, F., Kainz, M.J., ... & Wehr J.D. (2017) How important are terrestrial organic carbon inputs for secondary production in freshwater ecosystems? *Freshw. Biol.* 62: 833–853.
- Caroll, T.M., J.H. Thorp, & K.A. Roach. (2016). Autochthony in karst spring food webs. *Hydrobiologia* 776: 173-191.
- Canavoso, L.E., Jouni, Z.E., Karnas, K.J., Pennington, J.E., & Wells, M.A. (2001) Fat metabolism in insects. *Annu. Rev. Nutr.* 21: 23–46.
- Cashman, M.J., Wehr, J.D., & Truhn, K. (2013) Elevated light and nutrients alter the nutritional quality of stream periphyton. *Freshw. Biol.* 58: 1447–1457.
- Collins, S.M., Kohler, T.J., Thomas, S.A., Fetzer, W.W., & Flecker, A.S. (2016) The importance of terrestrial subsidies in stream food webs varies along a stream size gradient. *Oikos* 125: 674–685.
- Côté, B. & Dawson, J.O. (1986) Autumnal changes in total nitrogen, salt-extractable proteins and amino acids in leaves and adjacent bark of black alder, eastern cottonwood and white basswood. *Physiol. Plant.* 67: 102–108.
- Crenier, C., Arce-Funck, J., Bec, A., Billoir, E., Perrière, F., Leflaive, J., Guérol, F., Felten, V. & Danger, M. (2017) Minor food sources can play a major role in secondary production in detritus-based ecosystems. *Freshw. Biol.* 62: 1155–1167.
- Danger, M., Arce Funck, J., Devin, S., Heberlé, J. & Felten, V. (2013) Phosphorus content in detritus controls life history traits of a detritivore. *Funct. Ecol.* 27: 807-815
- Danger, M. (2020) Ecological stoichiometry in detritus-based ecosystems with a special focus on forested headwater streams. *Limnetica* 39 : 339-352
- Felten, V., Tixier, G., Guérol, F., De Crespin De Billy, V., & Dangles, O. (2008) Quantification of diet variability in a stream amphipod: Implications for ecosystem functioning. *Fundam. Appl. Limnol.* 170: 303–313.
- Florès, L., Larrañaga, A., & Elozegi, A. (2014) Compensatory feeding of a stream detritivore alleviates the effects of poor food quality when enough food is supplied. *Freshw. Sci.* 33: 134–141.
- Foucreau, N., Piscart, C., Puijalón, S. & Hervant F. (2015) Effects of rising temperature on a functional process: consumption and digestion of leaf litter by a freshwater shredder. *Fundam. Appl. Limnol.* 187: 295-306
- Gergs, R., Steinberger, N., Beck, B., Basen, T., Yohannes, E., Schulz, R., & Martin-Creuzburg, D. (2015) Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses reveal sterol metabolic constraints in an

- aquatic invertebrate. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29: 1789–1794.
- Ginjupalli, G.K., Gerard, P.D., & Baldwin, W.S. (2015) Arachidonic acid enhances reproduction in *Daphnia magna* and mitigates changes in sex ratios induced by pyriproxyfen. *Environ. Toxicol. Chem.* 34: 527–535.
- Gladyshev, M.I., Sushchik, N.N., Kalachova, G.S., & Makhutova, O.N. (2012) Stable isotope composition of fatty acids in organisms of different trophic levels in the Yenisei River. *PLoS One* 7: e34059.
- Glencross, B.D., Smith, D.M., Thomas, M.R., & Williams, K.C. (2002) The effect of dietary n-3 and n-6 fatty acid balance on the growth of the prawn *Penaeus monodon*. *Aquac. Nutr.* 8: 43–51.
- Guo, F., Bunn, S.E., Brett, M.T., Fry, B., Hager, H., Ouyang, X., & Kainz, M.J. (2018) Feeding strategies for the acquisition of high-quality food sources in stream macroinvertebrates: Collecting, integrating, and mixed feeding. *Limnol. Oceanogr.* 63: 1964–1978.
- Guo, F., Kainz, M.J., Valdez, D., Sheldon, F., & Bunn, S.E. (2016a) High-quality algae attached to leaf litter boost invertebrate shredder growth. *Freshw. Sci.* 35: 1213–1221.
- Guo, F., Kainz, M.J., Sheldon, F., & Bunn, S.E. (2016b) The importance of high-quality algal food sources in stream food webs—current status and future perspectives. *Freshw. Biol.* 61: 815–831.
- Hall Jr, R.O., Likens, G.E., & Malcom, H.M. (2001) Trophic basis of invertebrate production in 2 streams at the Hubbard Brook Experimental Forest. *J. North Am. Benthol. Soc.* 20: 432–447.
- Hayes, J.M. (2001) Fractionation of carbon and hydrogen isotopes in biosynthetic processes. *Rev. Mineral. Geochem.* 43: 225–277.
- Hill, W.R., Mulholland, P.J., & Marzolf, E.R. (2001) Stream ecosystem responses to forest leaf emergence in spring. *Ecology* 82: 2306–2319.
- Honeyfield, D.C. & Maloney, K.O. (2015) Seasonal patterns in stream periphyton fatty acids and community benthic algal composition in six high-quality headwater streams. *Hydrobiologia* 744: 35–47.
- Husson, F., Josse, J., & Pagès, J. (2010) Analyse de données avec R - Complémentarité des méthodes d'analyse factorielle et de classification. 42èmes Journées de Statistique, 2010, Marseille, France, France. inria-00494779: 1-7.
- Jaramillo-Madrid, A.C., Ashworth, J., Fabris, M., & Ralph, P.J. (2019) Phytosterol biosynthesis and production by diatoms (Bacillariophyceae). *Phytochemistry* 163: 46–57.
- 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.
- Kühmayer, T., Guo, F., Ebm, N., Battin, T.J., Brett, M.T., Bunn, S.E., Fry, B. & Kainz, M.J. (2020) Preferential retention of algal carbon in benthic invertebrates: Stable isotope and fatty acid evidence from an outdoor flume experiment. *Freshw. Biol.* 65: 1200-1209.
- Little, C.J. & Altermatt, F. (2019) Differential resource consumption in leaf litter mixtures by native and non-native amphipods. *Aquat. Ecol.* 53: 151–162.
- Majdi, N., Tackx, M., & Buffan-Dubau, E. (2012) Trophic positioning and microphytobenthic carbon uptake of biofilm-dwelling meiofauna in a temperate river. *Freshw. Biol.* 57: 1180–1190.
- Martin-Creuzburg, D. & Merkel, P. (2016) Sterols of freshwater microalgae: Potential implications for zooplankton nutrition. *J. Plankton Res.* 38: 865–877.
- Martin-Creuzburg, D., Oexle, S., & Wacker, A. (2014) Thresholds for Sterol-Limited Growth of *Daphnia magna*: A Comparative Approach Using 10 Different Sterols. *J. Chem. Ecol.* 40: 1039–1050.
- McCutchan Jr, J.H., Lewis Jr, W.M., Kendall, C., & McGrath, C.C. (2003) Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos* 102: 378–390.
- McShaffrey, D. & McCafferty, W.P. (1988) Feeding Behavior of *Rhithrogena pellucida* (Ephemeroptera:Heptageniidae). *J. North Am. Benthol. Soc.* 7: 87–99.
- Merican, Z.O., Shim, K.F., 1996. Qualitative requirements of essential fatty acids for juvenile

- Penaeus monodon*. *Aquaculture* 147 (3), 275–291.
- Mills, G.L., McArthur, J.V., & Wolfe, C.P. (2003) Lipid composition of suspended particulate matter (SPM) in a southeastern blackwater stream. *Water Res.* 37: 1783–1793.
- Mondy, N., Grossi, V., Cathalan, E., Delbecq, J.P., Mermillod-Blondin, F., & Douady, C.J. (2014) Sterols and steroids in a freshwater crustacean (*Proasellus meridianus*): Hormonal response to nutritional input. *Invertebr. Biol.* 133: 99–107.
- Müller-Navarra, D.C., Brett, M.T., Liston, A.M., & Goldman, C.R. (2000) A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature* 403: 74–77.
- Parnell, A. & Inger, R. (2016) Simmr: a stable isotope mixing model. *R Packag. version 0.3*. R.
- Parnell, A.C., Inger, R., Bearhop, S., & Jackson, A.L. (2010) Source partitioning using stable isotopes: Coping with too much variation. *PLoS One* 5: 1–5.
- Rasmussen, J. B. (2010), Estimating terrestrial contribution to stream invertebrates and periphyton using a gradient-based mixing model for $\delta^{13}\text{C}$. *J. Anim. Ecol.* 79: 393–402.
- Ren, X., He, T., Chang, Y., Zhao, Y., Chen, X., Bai, S., ... & She G. (2017) The genus *Alnus*, a comprehensive outline of its chemical constituents and biological activities. *Molecules* 22: 1383.
- Risse-Buhl, U., Trefzger, N., Seifert, A.-G., Schönborn, W., Gleixner, G., & Küsel, K. (2012) Tracking the autochthonous carbon transfer in stream biofilm food webs. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79: 118–131.
- Ruess, L. & Müller-Navarra, D. (2019) Essential biomolecules in food webs. *Front. Ecol. Evol.* 7: 269.
- Schlotz, N., Ebert, D., & Martin-Creuzburg, D. (2013) Dietary supply with polyunsaturated fatty acids and resulting maternal effects influence host–parasite interactions. *BMC Ecol.* 13: 1–11.
- Tank, J.L., Rosi-Marshall, E.J., Griffiths, N.A., Entekin, S.A., & Stephen, M.L. (2010) A review of allochthonous organic matter dynamics and metabolism in streams. *J. North Am. Benthol. Soc.* 29: 118–146.
- Thorp, J.H. & DeLong, M.D. (1994) The riverine productivity model: an heuristic view of carbon sources and organic processing in large river ecosystems. *Oikos* 70: 305–308.
- Thorp, J.H., Thoms, M.C., & DeLong, M.D. (2006) The riverine ecosystem synthesis: biocomplexity in river networks across space and time. *River Res. Appl.* 22: 123–147.
- Tocher, D.R., Betancor, M.B., Sprague, M., Olsen, R.E., & Napier, J.A. (2019) Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA: bridging the gap between supply and demand. *Nutrients* 11: 89.
- Torres-Ruiz, M. & Wehr, J.D. (2019) Complementary information from fatty acid and nutrient stoichiometry data improve stream food web analyses. *Hydrobiologia* 847: 629–645.
- Torres-Ruiz, M., Wehr, J.D., & Perrone, A.A. (2007) Trophic relations in a stream food web: importance of fatty acids for macroinvertebrate consumers. *J. North Am. Benthol. Soc.* 26: 509–522.
- Twining, C.W., Josephson, D.C., Kraft, C.E., Brenna, J.T., Lawrence, P., & Flecker, A.S. (2017) Limited seasonal variation in food quality and foodweb structure in an Adirondack stream: Insights from fatty acids. *Freshw. Sci.* 36: 877–892.
- Twining, C.W., Taipale, S.J., Ruess, L., Bec, A., Martin-Creuzburg, D., & Kainz, M.J. (2020) Stable isotopes of fatty acids: current and future perspectives for advancing trophic ecology. *Philos. Trans. R. Soc. B* 375: 20190641.
- Vannote, R.L., Minshall, G.W., Cummins, K.W., Sedell, J.R., & Cushing, C.E. (1980) The river continuum concept. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 130–137.
- Winkelman, C. & Koop, J.H.E. (2007) The management of metabolic energy storage during the life cycle of mayflies: a comparative field investigation of the collector-gatherer *Ephemera danica* and the scrapper *Rhithrogena semicolorata*. *J. Comp. Physiol.* 177: 119–128
- Ziegler, S.E. & Lyon, D.R. (2010) Factors regulating epilithic biofilm carbon cycling and release with nutrient enrichment in headwater streams. *Hydrobiologia* 657: 71–88.

Supporting information

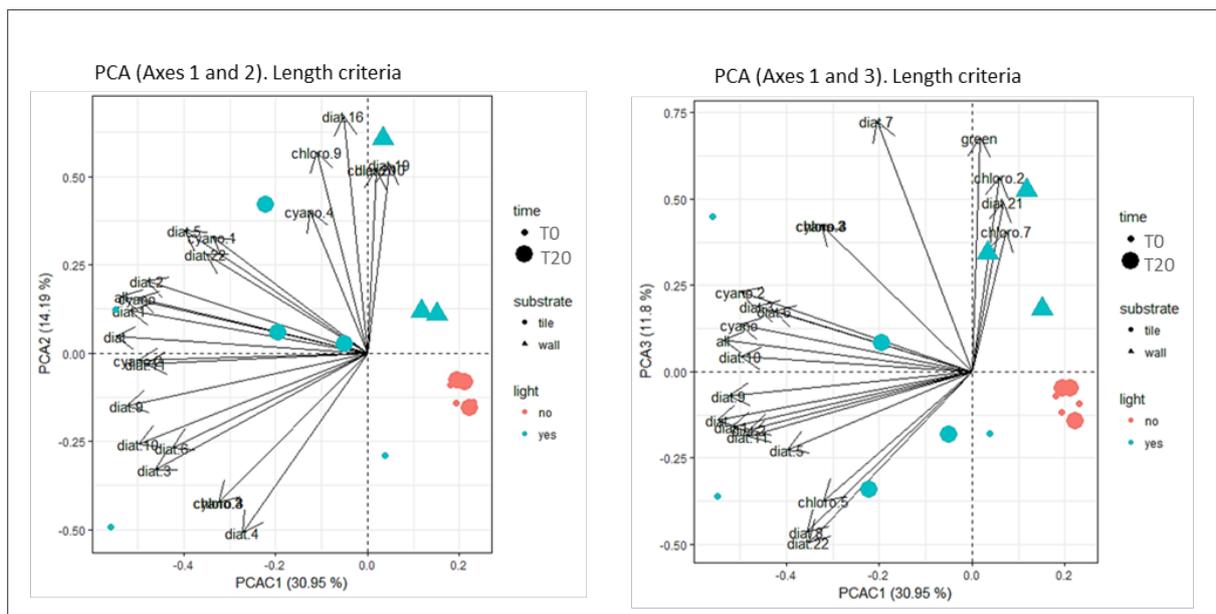
Supporting information 1: Algal biovolume in biofilms, and diversity for both conditions

The biofilm communities on tiles at both T0 and T20 were strongly dominated by diatoms (in LC and DC: 91 and 100% of the total bio-volume, respectively) with mainly adnate/prostrate and erected life forms), but on T20-LC flume walls, diatoms accounted for only 31%, with mainly erected lifeforms. In LC, chlorophytes (e.g. *Characium sp.* and Chaetophorales) and cyanobacteria, (mainly Synechococcales and *Chamaesiphon sp.*) represented 5% each of the total biovolume on the tiles, but, in LC flume walls only, filamentous chlorophytes (e.g. *Oedogonium sp.* and *Ulothrix sp.*) accounted for 63% and cyanobacteria represented 3% of the total biovolumes.

PCA performed on the biofilm community shows on the first axis 1 (30.95% of total variation), the influence of light conditions on tile community structure, with LC on the left of the factorial plan due to its high diatom content and DC on the right with its weak diatom contents. The third axis (11.8% of total variation), discriminates the biofilm community structure on the basis of chlorophytes and separates biofilm communities from the flume walls (at the top, with higher chlorophyte proportions and on the right with lower diatom contents) and from the tiles (below, with lower chlorophyte proportions).

LIGHT CONDITIONS					
	Dates	Total	Diatoms	Chlorophytes	Cyanobactéries
Tiles Biofilms	T0	658±328 *	585±274 †	25±20	48±36
	T20	499±102 †	449±75 #	25±28	24±21
Wall Biofilms	T20	330±103	104±75	206±97	19±23
DARK CONDITIONS					
	Dates	Total	Diatoms	Chlorophytes	Cyanobactéries
Tiles Biofilms	T0	27±14 *	27±14 †	-	-
	T20	12±8 †	12±8 #	-	-
Tiles Biofilms	None	-	-	-	-

Table: Composition of biofilm primary producer community in the flumes exposed under light or dark conditions. Data (mean±SD) are in biovolumes: $\times 10^6 \mu\text{m}^3 \cdot \text{cm}^{-2}$. Values with the same symbol are significantly different between the two conditions (student -t test, $p < 0.05$).



Principal component analysis based on the taxonomic composition of biofilms, exposure conditions, substrates (tiles or wall) and dates.

Supporting information 2: FA profiles in basal sources at the end of the experiment (T20).

Alder litters

Few significant differences were found between the FA profiles of the two leaf litters (Table S1). The dominant FAs were saturated fatty acids (SFA), with mainly 16:0 and long-chain fatty acids (22:0, 24:0, 26:0, 28:0) particularly abundant in both litters. These long-chain fatty acids (LCSFA) are characteristic of leaf cuticle lipids (Mueller et al., 2012). The MUFA amounts were similar in the two litters and classically dominated by 16:1 ω 7, 16:1 ω 5, 18:1 ω 9 and 18:1 ω 7. PUFA profiles of the leaf litter, on the other hand, were very different for the two treatments, with the exception of 18:2 ω 6. PUFA that are naturally absent from alder leaves (Mueller et al., 2012), such as 16:3 ω 3, 16:2 ω 4 and 20:4 ω 6, were only detected in the LC treatment (Table S1). 20:5 ω 3, which is normally absent from terrestrial vegetation, was found in both litters, but in significantly higher concentration in LC (0.12 ± 0.05 vs 0.04 ± 0.01 $\mu\text{g.mg DM}^{-1}$; t-test $p < 0.05$). Finally, the ubiquitous PUFA 18:3 ω 3 was found in smaller quantities in the litter exposed to light (0.15 ± 0.04 vs 0.45 ± 0.13 $\mu\text{g.mg DM}^{-1}$; t-test $p < 0.05$).

Biofilms

In biofilm developed on tiles, a significantly higher amount of total FA was found in LC (16.52 ± 1.11 vs 6.09 ± 3.20 $\mu\text{g.mg DM}^{-1}$). A high number of marked differences were observed between the tile biofilms in DC and LC conditions (Table S1). For SFA and MUFA, significantly higher amounts of 16:0, 14:0 and 16:1 ω 7 were found in LC biofilm (t-test, $p < 0.05$), being between 5 to 10 times more concentrated in LC than in DC. Only three PUFA were detected in DC biofilm; 18:2 ω 6 in amounts relatively close to those observed in LC tile biofilm, and low levels of 18:3 ω 3 (0.04 ± 0.02 $\mu\text{g.mg DM}^{-1}$) and 20:5 ω 3 (0.08 ± 0.06 $\mu\text{g.mg DM}^{-1}$), 6 to 10 times lower than those found in LC biofilm (t-test, $p < 0.05$; Table S1). In contrast, we recorded nine additional PUFA found only in the LC biofilm. These were mainly the essential 20:4 ω 6 (0.11 ± 0.06 $\mu\text{g.mg DM}^{-1}$), and the PUFA 16:2 ω 4, 16:3 ω 4, 16:4 ω 1, all diatom biomarkers (Taipale et al., 2013) and all present in significant quantities (0.17 to 0.63 $\mu\text{g.mg DM}^{-1}$). The level of 20:5 ω 3 (or EPA) was 0.56 ± 0.25 $\mu\text{g.mg DM}^{-1}$. EPA also originated from diatoms, while the presence of 16:2 ω 6 and 16:3 ω 3 was related to chlorophytes in the LC biofilm (Desvillettes et al., 1997; Taipale et al., 2013). Iso and anteiso 15:0 and 17:0 were either more abundant or present only in the LC biofilm. This set of branched FA can be related to various bacterial species, usually Gram+ bacteria (Webb-Robertson et al., 2010). There were very few differences in FA composition between the wall and tile biofilms in light conditions (Table S1), although the wall biofilm did not contain 26:0, 28:0 and anteiso 17:0, probably due to a lower retention of detrital particles.

FPOM

In LC flumes, FPOM contained more total FA than in DC flumes (5.98 ± 1.24 vs 2.91 ± 0.08 $\mu\text{g.mg DM}^{-1}$) (Table S1). Overall, FPOM FA profiles reflected the influence of FA originating from leaf litter fragments and biofilm as well as from bacterial activity. LCSFA characteristic of leaves were identified in FPOM from both treatments, but were more abundant under light conditions (t-test $p < 0.05$). Both FPOM contained bacterial branched FA in relatively similar concentrations. As observed for tile biofilms, the main difference between the two FPOM was in the levels of PUFA and/or FA generally synthesized by diatoms. Thus FPOM in DC contained only the two essential PUFA, 18:3 ω 3 and 18:2 ω 6, in similarly low quantities relative to FPOM in LC (0.01 to 0.05 $\mu\text{g.mg DM}^{-1}$). In LC, FPOM also contained EPA (0.15 ± 0.03 $\mu\text{g.mg DM}^{-1}$), 18:4 ω 3 and the microalgae markers 16:2 ω 6, 16:3 ω 4 (0.11 ± 0.03 $\mu\text{g.mg DM}^{-1}$), 16:4 ω 3 (Table S1). Finally, between four and seven times more 14:0 (0.49 ± 0.15 vs 0.11 ± 0.03 $\mu\text{g.mg DM}^{-1}$) and 16:1 ω 7 (0.53 ± 0.20 vs 0.07 ± 0.05 $\mu\text{g.mg DM}^{-1}$) were found in LC FPOM as a result of active lipid synthesis in diatoms associated with leaf fragments.

Table S1 FA composition of Total Lipids extracted from basal sources sampled in the flumes installed under dark conditions (DC) and light conditions (LC) at the end of the experiment (T20). Data are in $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ DM (mean \pm SD). Other fatty acids are: Hexadecanoic acid 3-hydroxy-methyl ester, Octadecanoic acid 3-hydroxy-methyl ester and fatty acids co-eluting with impurities. (Statistical analysis: student t-test between DC and LC, *: $p < 0.05$).

Fatty acids	Leaf litter - <i>A. glutinosa</i>			Fine particulate organic matter			Tile biofilm			Wall biofilm	
	DC	LC	<i>p</i>	DC	LC	<i>p</i>	DC	LC	<i>p</i>	DC	LC
SFA											
10:0							0.13 \pm 0.11			-	
12:0	0.08 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	<i>ns</i>	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	<i>ns</i>	0.12 \pm 0.08	0.08 \pm 0.02	<i>ns</i>	0.09 \pm 0.04	
14:0	0.40 \pm 0.05	0.41 \pm 0.03	<i>ns</i>	0.11 \pm 0.03	0.49 \pm 0.15	*	0.35 \pm 0.20	1.50 \pm 0.23	*	1.28 \pm 0.81	
15:0	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.00	<i>ns</i>	0.02 \pm 0.00	0.05 \pm 0.01	*	0.16 \pm 0.09	0.16 \pm 0.03	<i>ns</i>	0.15 \pm 0.09	
16:0	2.14 \pm 0.21	2.10 \pm 0.17	<i>ns</i>	0.61 \pm 0.14	1.26 \pm 0.37	*	1.95 \pm 0.87	4.37 \pm 0.91	*	6.46 \pm 3.05	
17:0	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.00	<i>ns</i>	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	<i>ns</i>		0.11 \pm 0.02	-	0.06 \pm 0.04	
18:0	0.43 \pm 0.05	0.41 \pm 0.05	<i>ns</i>	0.29 \pm 0.14	0.41 \pm 0.12	<i>ns</i>	1.01 \pm 0.51	0.34 \pm 0.13	<i>ns</i>	0.92 \pm 0.52	
20:0	0.64 \pm 0.21	0.79 \pm 0.03	<i>ns</i>	0.13 \pm 0.03	0.22 \pm 0.06	<i>s</i>	0.12 \pm 0.10	0.05 \pm 0.02	<i>ns</i>	0.09 \pm 0.04	
21:0	0.08 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	<i>ns</i>	0.02 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	<i>ns</i>					
22:0	0.93 \pm 0.18	1.14 \pm 0.10	<i>ns</i>	0.26 \pm 0.06	0.43 \pm 0.07	*	0.19 \pm 0.14	0.16 \pm 0.04	<i>ns</i>	0.23 \pm 0.11	
24:0	0.35 \pm 0.03	0.40 \pm 0.02	<i>ns</i>	0.23 \pm 0.03	0.35 \pm 0.02	*	0.17 \pm 0.10	0.27 \pm 0.14	<i>ns</i>	0.19 \pm 0.10	
25:0	0.07 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	<i>ns</i>	0.04 \pm 0.00	0.06 \pm 0.00	*					
26:0	0.15 \pm 0.03	0.16 \pm 0.05	<i>ns</i>	0.20 \pm 0.01	0.26 \pm 0.02	*		0.09 \pm 0.04	-		
28:0	0.19 \pm 0.10	0.24 \pm 0.07	<i>ns</i>	0.31 \pm 0.06	0.37 \pm 0.03	<i>ns</i>		0.10 \pm 0.05	-		
Branched FA											
i 15:0	0.16 \pm 0.02	0.14 \pm 0.01	<i>ns</i>	0.05 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	<i>ns</i>	0.09 \pm 0.02	0.18 \pm 0.03	*	0.08 \pm 0.04	
i 16:0				0.03 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	<i>ns</i>					
i 17:0	0.08 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	<i>ns</i>	0.05 \pm 0.01	0.08 \pm 0.03	<i>ns</i>		0.19 \pm 0.04	-	0.17 \pm 0.06	
a.i 15:0				0.01 \pm 0.00	0.07 \pm 0.02	*	0.06 \pm 0.03	0.21 \pm 0.05	*	0.28 \pm 0.18	
a.i 17:0				0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	<i>ns</i>		0.05 \pm 0.05	-		
MUFA											
16:1 ω 9				0.02 \pm 0.01	0.11 \pm 0.02	*	0.36 \pm 0.25	0.57 \pm 0.08	<i>ns</i>	0.37 \pm 0.23	
16:1 ω 7	0.26 \pm 0.01	0.65 \pm 0.39	<i>ns</i>	0.07 \pm 0.05	0.53 \pm 0.20	*	0.38 \pm 0.15	3.53 \pm 0.46	*	2.27 \pm 1.53	
16:1 ω 5	0.38 \pm 0.08	0.30 \pm 0.01	<i>ns</i>	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	<i>ns</i>	0.03 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	*	0.07 \pm 0.05	
18:1 ω 11										0.19 \pm 0.13	
18:1 ω 9	0.48 \pm 0.11	0.29 \pm 0.07	<i>ns</i>	0.12 \pm 0.04	0.16 \pm 0.03	<i>ns</i>	0.53 \pm 0.38	0.28 \pm 0.13	<i>ns</i>	0.62 \pm 0.38	
18:1 ω 7	0.20 \pm 0.04	0.20 \pm 0.06	<i>ns</i>	0.04 \pm 0.00	0.07 \pm 0.01	*	0.19 \pm 0.03	0.35 \pm 0.14	<i>ns</i>	0.90 \pm 0.49	
20:1 ω 9											
22:1 ω 9					0.02 \pm 0.00	-					
22:1 ω 7					0.04 \pm 0.01	-					
24:1 ω 9					0.09 \pm 0.02	-					
PUFA											
16:2 ω 6					0.01 \pm 0.00	-		0.24 \pm 0.06	-	0.07 \pm 0.04	
16:2 ω 4		0.03 \pm 0.02	-					0.42 \pm 0.04	-	0.10 \pm 0.10	
16:3 ω 4					0.11 \pm 0.03	-		0.63 \pm 0.07	-	0.14 \pm 0.16	
16:3 ω 3		0.06 \pm 0.02	-					0.24 \pm 0.08	-	0.13 \pm 0.10	
16:4 ω 3					0.04 \pm 0.01	-					
16:4 ω 1								0.17 \pm 0.04	-	0.09 \pm 0.08	
18:2 ω 7								0.03 \pm 0.01	-	0.05 \pm 0.04	
18:2 ω 6	0.48 \pm 0.11	0.34 \pm 0.09	<i>ns</i>	0.05 \pm 0.04	0.05 \pm 0.02	<i>ns</i>	0.13 \pm 0.10	0.26 \pm 0.08	<i>ns</i>	0.35 \pm 0.26	
18:3 ω 6		0.02 \pm 0.00	-					0.03 \pm 0.02	-	0.03 \pm 0.03	
18:3 ω 3	0.45 \pm 0.13	0.15 \pm 0.04	*	0.01 \pm 0.00	0.03 \pm 0.02	<i>ns</i>	0.04 \pm 0.02	0.45 \pm 0.16	*	0.64 \pm 0.45	
18:4 ω 3	0.02 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	*		0.03 \pm 0.01	-		0.09 \pm 0.02	-	0.15 \pm 0.07	
20:4 ω 6		0.06 \pm 0.02	-					0.11 \pm 0.06	-	0.03 \pm 0.04	
20:5 ω 3	0.04 \pm 0.01	0.12	0.05	*			0.15 \pm 0.03	-	0.08 \pm 0.06	0.56 \pm 0.25	*
22:6 ω 3										0.36 \pm 0.30	
Other fatty acids	0.69 \pm 0.02	0.59 \pm 0.11	<i>ns</i>	0.16 \pm 0.05	0.24 \pm 0.03	<i>ns</i>		0.63 \pm 0.21	-	0.36 \pm 0.16	
Total $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ DM	8.83 \pm 0.65	9.04 \pm 0.63	<i>ns</i>	2.91 \pm 0.07	5.98 \pm 1.24	*	6.09	3.20	16.52 \pm 1.11	*	16.94 \pm 9.50

Supporting information 3: FA profiles in both macroinvertebrates at the end of the experiment (T20).

PLFA

Very few differences were observed between the PLFA profiles for the two species in the conditions tested (Tables S2 & S3). In *R. semicolorata*, EPA and 20:4 ω 6 (or ARA) levels were similar (t-test, $p > 0.05$) in DC and LC (EPA: 1.80 ± 0.63 vs 2.08 ± 0.23 $\mu\text{g}\cdot\text{mg DM}^{-1}$; ARA: 0.62 ± 0.16 vs 0.45 ± 0.03 $\mu\text{g}\cdot\text{mg DM}^{-1}$). A similar observation was made for *G. pulex*, for which the levels of ARA and EPA were 0.51 ± 0.08 and 0.70 ± 0.16 $\mu\text{g}\cdot\text{mg DM}^{-1}$ respectively in DC and 0.47 ± 0.10 and 0.97 ± 0.23 $\mu\text{g}\cdot\text{mg DM}^{-1}$ respectively in LC. This is in agreement with previous research considering PLFA in freshwater macroinvertebrates (Suschik et al., 2003 ; Descroix et al., 2008). Overall macroinvertebrates try to maintain their homeostatic balance in cell membranes between saturated and unsaturated compounds. The main difference observed concerns *R. semicolorata*, which in LC conditions contained higher 16:1 ω 7 levels (t-test $p < 0.05$) and low amounts of 16:2 ω 4, 16:3 ω 4, with 16:4 ω 3 lacking in nymphs in DC conditions (Table S2).

NLFA

NLFA of the two species were modified differently under the two treatments (Table S2 and S3). While the changes were dramatic in *R. semicolorata*, they were only moderate in *G. pulex*. In gammarids reared under LC, concentrations of 18:3 ω 3, ARA (0.96 ± 0.19 $\mu\text{g}\cdot\text{mg DM}^{-1}$) and EPA (3.41 ± 0.46 $\mu\text{g}\cdot\text{mg DM}^{-1}$) were significantly higher (t-test, $p < 0.05$; Table S3). Microalgae markers (16:2 ω 4, 16:3 ω 4 and 16:4 ω 1 for diatoms ; 16:2 ω 6, 16:3 ω 3 and 16:4 ω 3 for chlorophytes) were only found in *G. pulex* from LC flumes (Table S3). In line with the NLFA accumulation, *R. semicolorata* from LC exhibited significantly higher concentrations of the most important FA than their counterpart in DC (t-test $p < 0.05$). Thus the FA mainly synthesized by diatoms have been detected in LC nymphs with concentrations 4 to 5 times higher (14:0: 3.45 ± 0.26 $\mu\text{g}\cdot\text{mg DM}^{-1}$; EPA: 9.34 ± 1.08 $\mu\text{g}\cdot\text{mg DM}^{-1}$) or 10 times higher (16:1 ω 7: 20.34 ± 3.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mg DM}^{-1}$) than DC levels (Table S2). Similarly , only *R. semicolorata* under LC accumulated substantial amounts of microalgae markers (16:2 ω 4, 16:3 ω 4 and 16:4 ω 1, 16:3 ω 3 and 16:4 ω 3). Significantly higher levels of PUFA such as 18:2 ω 6, 18:3 ω 3 and ARA were also detected in *R. semicolorata* in LC (t-test $p < 0.05$). Lastly, both species, independent of the treatment, contained bacterial branched FA (iso/anteiso and cyclo forms) related to the assimilation of detrital material (Descroix et al., 2008).

Table S2 Neutral lipid fatty acids (NLFA) and Polar lipid fatty acids (PLFA) extracted from *Rithrogena semicolorata* at the end of the experiment (T20 - DC: Dark conditions - LC: Light Conditions). Data are in $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ DM (mean \pm SD). FA at the limit of detection threshold are indicated as trace (*tr*). Other fatty acids: fatty acids co-eluting with impurities. (Statistical analysis: Student t-test between LC and DC, *: $p < 0.05$).

Fatty acids	Neutral lipid fatty acids			Polar lipid fatty acids		
	T20 - DC	T20 - LC	<i>p</i>	T20 - DC	T20 - LC	<i>p</i>
SFA						
11:0	0.67 \pm 0.00	0.23 \pm 0.04	*			
12:0	0.35 \pm 0.00	0.50 \pm 0.05	*			
14:0	0.77 \pm 0.02	3.45 \pm 0.26	*	0.08 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	ns
15:0	0.34 \pm 0.02	0.37 \pm 0.03	ns	0.07 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	*
16:0	5.95 \pm 0.11	25.53 \pm 4.13	*	1.76 \pm 0.22	2.16 \pm 0.21	ns
17:0	0.47 \pm 0.02	0.57 \pm 0.09	ns	0.29 \pm 0.02	0.12 \pm 0.01	*
18:0	2.39 \pm 0.18	2.06 \pm 0.22	ns	1.55 \pm 0.22	1.41 \pm 0.09	ns
19:0	0.03 \pm 0.00	0.43 \pm 0.14	*	0.03 \pm 0.02		-
20:0	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.01	ns	0.26 \pm 0.00	0.21 \pm 0.03	ns
22:0	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.00	ns	0.29 \pm 0.01	0.19 \pm 0.03	*
Branched & cyclo FA						
i 13:0	0.05 \pm 0.01		-			
i 15:0				0.04 \pm 0.01		-
i16:0	0.03 \pm 0.01		-			
i 17:0	0.25 \pm 0.02	0.39 \pm 0.03	*	0.09 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01	*
ai 13:0	0.10 \pm 0.00		-			
ai 15:0	0.32 \pm 0.04	0.44 \pm 0.04	*	<i>tr</i>	0.02 \pm 0.00	-
ai 17:0	0.04 \pm 0.00	0.06 \pm 0.00	*	0.07 \pm 0.05	0.01 \pm 0.00	*
Cyclo 17:0	0.24 \pm 0.03	0.14 \pm 0.04	*	0.10 \pm 0.02	0.03 \pm 0.00	*
MUFA						
15:1	0.11 \pm 0.02	0.76 \pm 0.18	*			
16:1 ω 9	0.21 \pm 0.00	0.20 \pm 0.25	ns	0.06 \pm 0.02	0.04 \pm 0.00	ns
16:1 ω 7	1.86 \pm 0.14	20.34 \pm 3.00	*	0.45 \pm 0.09	1.07 \pm 0.10	*
16:1 ω 5	0.88 \pm 0.20	0.50 \pm 0.03	ns	0.16 \pm 0.04		-
18:1 ω 9	1.72 \pm 0.38	7.34 \pm 0.88	*	1.22 \pm 0.15	1.72 \pm 0.20	ns
18:1 ω 7	1.92 \pm 0.14	8.13 \pm 0.70	*	1.14 \pm 0.27	1.65 \pm 0.18	ns
20:1 ω 9				<i>tr</i>	0.02 \pm 0.00	-
20:1 ω 7				0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	ns
PUFA						
16:2 ω 6	0.03 \pm 0.01	0.25 \pm 0.03	*			
16:2 ω 4	<i>tr</i>	1.90 \pm 0.13	-	<i>tr</i>	0.08 \pm 0.01	-
16:3 ω 4		0.75 \pm 0.13	-		0.01 \pm 0.00	-
16:3 ω 3		0.95 \pm 0.17	-			
16:4 ω 3		0.40 \pm 0.04	-		0.07 \pm 0.01	-
16:4 ω 1		0.30 \pm 0.07	-			
18:2 ω 6	1.03 \pm 0.31	2.35 \pm 0.31	*	0.91 \pm 0.11	0.64 \pm 0.05	*
18:2 ω 4		0.46 \pm 0.04	-		0.07 \pm 0.01	-
18:3 ω 6	0.05 \pm 0.02	0.23 \pm 0.05	*	0.04 \pm 0.02	0.04 \pm 0.00	ns
18:3 ω 4					0.03 \pm 0.00	-
18:3 ω 3	1.27 \pm 0.29	7.54 \pm 1.23	*	1.32 \pm 0.34	1.95 \pm 0.12	*
18:4 ω 3	0.17 \pm 0.02	1.32 \pm 0.31	*	0.08 \pm 0.03	0.18 \pm 0.01	*
20:2 ω 6	0.04 \pm 0.01	0.09 \pm 0.03	ns	0.04 \pm 0.02	0.02 \pm 0.00	ns
20:3 ω 6		0.08 \pm 0.01	-	0.03 \pm 0.03	0.02 \pm 0.00	ns
20:3 ω 3	0.04 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	*	0.04 \pm 0.01	0.04 \pm 0.00	ns
20:4 ω 6	0.71 \pm 0.22	1.63 \pm 0.19	*	0.62 \pm 0.16	0.45 \pm 0.03	ns
20:4 ω 3	0.12 \pm 0.09	0.14 \pm 0.01	ns	0.04 \pm 0.02	0.02 \pm 0.00	ns
20:5 ω 3	1.80 \pm 0.49	9.34 \pm 1.08	*	1.80 \pm 0.63	2.08 \pm 0.23	ns
Other fatty acids	0.18 \pm 0.15	0.37 \pm 0.29	ns	0.11 \pm 0.00	0.17 \pm 0.02	*
Total $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ DM	24.30 \pm 1.99	99.75 \pm 11.58	*	12.70 \pm 2.52	14.70 \pm 1.06	ns

Table S3 Neutral lipid fatty acids (NLFA) and Polar lipid fatty acids (PLFA) extracted from *Gammarus pulex* at the end of the experiment (T20 - DC: Dark conditions - LC: Light Conditions). Data are in $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ DM (mean \pm SD). FA at the limit of detection threshold are indicated as trace (*tr*). Other fatty acids: fatty acids co-eluting with impurities. (Statistical analysis: Student t-test between LC and DC, *: $p < 0.05$).

Fatty acids	Neutral lipid fatty acids			Polar lipid fatty acids		
	T20 - DC	T20 - LC	<i>p</i>	T20 - DC	T20 - LC	<i>p</i>
SFA						
12:0	0.37 \pm 0.03	0.37 \pm 0.14	ns			
14:0	1.60 \pm 0.43	2.43 \pm 0.83	ns	0.06 \pm 0.01	0.09 \pm 0.04	ns
15:0	0.61 \pm 0.17	0.40 \pm 0.05	ns	0.09 \pm 0.01	0.07 \pm 0.02	ns
16:0	10.73 \pm 3.43	10.25 \pm 1.66	ns	1.81 \pm 0.21	1.98 \pm 0.12	ns
17:0	0.53 \pm 0.14	0.40 \pm 0.02	ns	0.10 \pm 0.02	0.10 \pm 0.01	ns
18:0	1.74 \pm 0.37	1.63 \pm 0.25	ns	0.52 \pm 0.16	0.44 \pm 0.04	ns
19:0	0.07 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	ns	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	ns
20:0	0.12 \pm 0.01	0.10 \pm 0.03	ns	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	ns
22:0	0.06 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	ns	0.05 \pm 0.00	0.05 \pm 0.01	ns
Branched & cyclo FA						
i 14:0	0.15 \pm 0.05	0.10 \pm 0.01	ns			
i 15:0	0.48 \pm 0.05	0.34 \pm 0.04	*	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.01	ns
i 16:0	0.13 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	*	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	ns
i 17:0	0.35 \pm 0.01	0.31 \pm 0.05	ns	0.05 \pm 0.01	0.03 \pm 0.03	ns
a.i 15:0	0.15 \pm 0.02	0.16 \pm 0.02	ns	0.01 \pm 0.01		-
a.i 17:0	0.14 \pm 0.01	0.14 \pm 0.03	ns	0.06 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	*
Cyclo 17:0	0.43 \pm 0.19	0.50 \pm 0.17	ns	0.05 \pm 0.01	0.12 \pm 0.07	ns
MUFA						
15:1	0.41 \pm 0.15	0.28 \pm 0.06	ns	0.02 \pm 0.00	0.07 \pm 0.06	ns
16:1 ω 9	0.26 \pm 0.10	0.23 \pm 0.04	ns	0.03 \pm 0.02	0.02 \pm 0.00	ns
16:1 ω 7	2.53 \pm 0.97	4.10 \pm 0.82	ns	0.14 \pm 0.06	0.21 \pm 0.08	ns
16:1 ω 5	0.47 \pm 0.10	0.21 \pm 0.01	*	0.06 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	*
18:1 ω 9	12.63 \pm 5.12	15.59 \pm 4.03	ns	1.80 \pm 0.67	1.81 \pm 0.52	ns
18:1 ω 7	1.44 \pm 0.29	2.21 \pm 0.53	ns	0.18 \pm 0.06	0.21 \pm 0.03	ns
18:1 ω 5	0.33 \pm 0.01	0.31 \pm 0.02	ns	0.05 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00	ns
20:1 ω 9	0.31 \pm 0.13	0.60 \pm 0.20	ns	0.07 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02	ns
20:1 ω 7	0.13 \pm 0.05	0.29 \pm 0.13	ns	0.01 \pm 0.00	0.02 \pm 0.01	ns
22:1 ω 9		0.08 \pm 0.02	-	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	ns
22:1 ω 7	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	ns	0.02 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	*
24:1 ω 9		0.02 \pm 0.01	-	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	ns
PUFA						
16:2 ω 6		0.19 \pm 0.05	-			
16:2 ω 4		0.35 \pm 0.07	-	<i>tr</i>		
16:3 ω 4		0.35 \pm 0.10	-		0.04 \pm 0.02	-
16:3 ω 3		0.59 \pm 0.17	-			
16:4 ω 3		0.49 \pm 0.20	-			
16:4 ω 1		0.12 \pm 0.03	-			
18:2 ω 6	3.01 \pm 1.40	3.73 \pm 0.61	ns	0.65 \pm 0.19	0.57 \pm 0.10	ns
18:2 ω 4		0.09 \pm 0.02	-			
18:3 ω 6	0.09 \pm 0.01	0.13 \pm 0.03	ns	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	ns
18:3 ω 3	1.43 \pm 0.69	3.18 \pm 0.86	ns	0.23 \pm 0.06	0.29 \pm 0.07	ns
18:4 ω 3	<i>tr</i>	0.40 \pm 0.06	-	0.01 \pm 0.00	0.02 \pm 0.01	ns
20:2 ω 6	0.26 \pm 0.08	0.40 \pm 0.07	ns	0.08 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	ns
20:3 ω 6	0.04 \pm 0.01	0.07 \pm 0.04	ns	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	ns
20:3 ω 3	0.13 \pm 0.05	0.33 \pm 0.10	*	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	ns
20:4 ω 6	0.54 \pm 0.10	0.96 \pm 0.19	*	0.51 \pm 0.08	0.47 \pm 0.10	ns
20:4 ω 3		0.08 \pm 0.02	-	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	*
20:5 ω 3	0.85 \pm 0.27	3.41 \pm 0.46	*	0.70 \pm 0.16	0.97 \pm 0.23	ns
22:4 ω 3				0.16 \pm 0.03	0.08 \pm 0.01	*
22:5 ω 3	0.09 \pm 0.04	0.28 \pm 0.02	*	0.07 \pm 0.02	0.12 \pm 0.01	*
22:6 ω 3	0.34 \pm 0.05	0.45 \pm 0.09	ns	0.45 \pm 0.06	0.35 \pm 0.02	*
Other fatty acids	0.78 \pm 0.38	0.56 \pm 0.29	ns	0.06 \pm 0.05	0.06 \pm 0.00	ns
Total $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ DM	43.76 \pm 11.85	55.06 \pm 10.32	ns	8.34 \pm 1.46	8.71 \pm 1.40	ns

Table S4 $\delta^{13}\text{C}$ values (‰) of fatty acids from basal source total lipids and from macroinvertebrates NLFA and PLFA at T20 under dark conditions (DC). Values are mean \pm SD.

Fatty acids	Leaf litter	FPOM	Tile biofilm	NLFA <i>R. semicolorata</i>	PLFA <i>R. semicolorata</i>	NLFA <i>G. pulex</i>	PLFA <i>G. pulex</i>
SFA							
14:0	-34.61 \pm 0.31	-31.50 \pm 4.76	-30.05 \pm 0.90	-33.25 \pm 1.14	-30.81	-34.06 \pm 0.87	-35.38 \pm 2.12
16:0	-33.58 \pm 0.01	-30.77 \pm 2.04	-28.64 \pm 0.65	-30.64 \pm 0.61	-30.77 \pm 2.99	-30.88 \pm 0.26	-30.91 \pm 0.16
18:0	-31.39 \pm 0.42	-33.25 \pm 0.77	-29.69 \pm 1.65	-27.93 \pm 1.00	-27.61 \pm 1.36	-28.95 \pm 0.18	-27.43 \pm 0.60
20:0	-31.50 \pm 0.51	-31.60 \pm 0.05	-29.58 \pm 0.04	-29.89	-30.59 \pm 0.17	-30.35 \pm 3.12	-31.08
22:0	-32.58 \pm 0.42	-31.76 \pm 0.62	-30.37 \pm 1.63		-29.56		-33.63 \pm 6.06
24:0	-32.63 \pm 0.75	-32.07 \pm 0.22	-27.68 \pm 0.37				
26:0	-30.65 \pm 1.58	-31.69 \pm 0.54	-26.73 \pm 0.04				
28:0		-30.27 \pm 0.44					
15:0	-34.70 \pm 1.34	-31.86 \pm 4.34	-28.88 \pm 0.46	-33.51 \pm 0.35	-32.48	-36.15 \pm 0.47	-37.63 \pm 2.57
17:0	-31.97 \pm 0.99	-32.49 \pm 2.95	-28.02 \pm 2.24	-31.38 \pm 0.71	-31.84 \pm 0.62	-31.41 \pm 0.60	-29.99 \pm 0.64
21:0	-35.16 \pm 0.44	-33.48 \pm 0.33					
25:0		-31.57 \pm 1.11					
Branched FA							
i 15:0	-30.19 \pm 0.14	-30.47 \pm 1.69	-32.28			-32.45 \pm 0.40	-32.13
i 17:0	-37.14 \pm 2.45	-29.72 \pm 2.54	-30.94 \pm 0.26	-30.08 \pm 1.41	-32.01 \pm 5.71	-30.22 \pm 0.58	-30.63 \pm 1.96
ai15:0	-30.58 \pm 0.50	-29.88	-31.58 \pm 4.78	-30.45 \pm 1.11	-30.56		
ai 17:0		-28.77 \pm 3.02					-27.21
MUFA							
16:1 ω 9	-30.81 \pm 0.08	-29.09 \pm 3.55	-28.75 \pm 1.54	-30.22 \pm 0.95			-30.89
16:1 ω 7	-29.56 \pm 0.30	-28.80 \pm 3.95	-30.59 \pm 0.49	-29.79 \pm 0.09	-30.25 \pm 3.08	-30.40 \pm 0.25	-30.30 \pm 1.01
16:1 ω 5 ω 6	-30.04 \pm 0.25	-29.79 \pm 2.68		-30.04 \pm 0.35	-31.11 \pm 4.11	-30.36 \pm 0.17	-31.93 \pm 2.85
18:1 ω 9	-30.85 \pm 1.53	-29.16 \pm 1.00	-27.70 \pm 0.13	-30.41 \pm 0.11	-30.58 \pm 0.77	-29.83 \pm 0.08	-30.44 \pm 0.05
18:1 ω 7	-30.93 \pm 0.82	-28.22 \pm 0.76	-27.32 \pm 0.76	-28.61 \pm 0.05	-28.37 \pm 0.07	-23.73 \pm 9.02	-29.82 \pm 1.04
20:1 ω 9					-30.22	-30.34 \pm 0.63	-30.97 \pm 1.39
20:1 ω 7						-30.24 \pm 0.22	
22:1 ω 9		-31.11 \pm 2.11					-30.77 \pm 2.18
PUFA							
16:2 ω 6				-26.47 \pm 5.26	-28.63		
16:2 ω 4				-28.19 \pm 2.43	-31.10		-28.06 \pm 0.43
18:2 ω 6	-30.99 \pm 0.35	-31.14 \pm 1.19	-30.79 \pm 0.21	-31.15 \pm 0.90	-30.75 \pm 0.81	-32.94 \pm 0.44	-30.53 \pm 0.41
18:3 ω 6					-28.59	-32.36	
18:3 ω 3	-33.80 \pm 0.04	-29.96	-30.27 \pm 3.30	-32.45 \pm 0.45	-32.33 \pm 0.54	-35.71 \pm 0.25	-33.21 \pm 1.07
18:4 ω 3	-32.35 \pm 0.79		-28.91 \pm 0.25	-30.26 \pm 1.05	-30.66 \pm 0.45	-32.19 \pm 0.40	-33.89
20:2 ω 6					-25.52	-30.55 \pm 0.11	-28.68 \pm 1.50
20:3 ω 3				-30.48	-29.21 \pm 0.00	-32.57 \pm 0.93	-32.85 \pm 1.57
20:4 ω 6				-29.82 \pm 0.67	-28.89 \pm 0.60	-30.64 \pm 0.29	-29.83 \pm 0.15
20:4 ω 3				-31.28	-30.02		-29.66
20:5 ω 3		-24.42	-30.18 \pm 0.89	-28.63 \pm 0.08	-27.36 \pm 0.95	-30.44 \pm 0.30	-29.77 \pm 0.28
22:4 ω 3							-32.08 \pm 3.46
22:5 ω 3						-30.48 \pm 5.88	-31.00 \pm 1.45
22:6 ω 3						-30.65 \pm 1.66	-29.25 \pm 0.46

Table S5 $\delta^{13}\text{C}$ values (‰) of fatty acids from basal source total lipids and from macroinvertebrates NLFA and PLFA at T20 under light conditions (LC). Values are mean \pm SD.

Fatty acids	Leaf litter	FPOM	Tile biofilm	Wall biofilm	NLFA <i>R. semicolorata</i>	PLFA <i>R. semicolorata</i>	NLFA <i>G. pulex</i>	PLFA <i>G. pulex</i>
SFA								
14:0	-35.91 \pm 0.34	-22.22 \pm 1.19	-21.46 \pm 0.81	-21.95 \pm 2.46	-23.54	-28.80 \pm 0.56	-30.00 \pm 2.91	-33.16 \pm 0.07
16:0	-33.47 \pm 0.31	-25.71 \pm 0.69	-21.81 \pm 0.42	-22.08 \pm 2.05	-19.76 \pm 0.49	-21.70 \pm 0.50	-27.39 \pm 1.33	-27.75 \pm 0.72
18:0	-31.62 \pm 1.68	-28.76 \pm 0.26	-27.56 \pm 0.87	-29.62 \pm 3.43	-22.30 \pm 0.88	-21.02 \pm 0.57	-26.47 \pm 0.92	-25.87 \pm 0.05
20:0	-31.09 \pm 0.17	-31.02 \pm 0.06	-23.00	-25.13 \pm 0.96	-22.21	-22.94 \pm 0.36	-27.41	
22:0	-32.65	-31.45 \pm 0.05	-24.40	-21.19 \pm 0.83	-22.56	-24.30 \pm 1.38		-28.04 \pm 0.70
24:0	-34.18 \pm 0.03	-31.71 \pm 0.19	-23.92 \pm 2.67	-25.18				
26:0	-32.47 \pm 0.26	-32.65 \pm 0.36						
28:0	-33.43	-33.06 \pm 1.24						
15:0	-32.94 \pm 0.32	-28.99 \pm 1.73	-26.08 \pm 0.05	-27.36 \pm 2.50	-25.86 \pm 0.87		-34.34 \pm 0.58	-40.80 \pm 3.73
17:0	-32.81 \pm 0.31	-22.81 \pm 0.39	-27.99 \pm 5.51	-23.10	-24.16 \pm 0.76	-25.32 \pm 1.62	-30.26 \pm 1.23	-29.46 \pm 1.09
21:0	-34.11 \pm 1.36	-33.94 \pm 1.08						
25:0	-34.80 \pm 0.35	-34.09 \pm 0.92						
Branched FA								
i 15:0	-29.83 \pm 0.27	-23.11 \pm 1.93	-23.79 \pm 3.28	-16.12 \pm 4.62			-31.65 \pm 2.16	-38.14 \pm 0.36
i 17:0	-33.84 \pm 0.87	-23.70 \pm 1.09	-21.40 \pm 0.02	-20.95 \pm 0.51	-22.04 \pm 1.48	-28.06 \pm 1.78	-29.51 \pm 3.49	-30.12 \pm 1.80
ai 15:0		-25.25 \pm 3.04	-20.62 \pm 2.02	-17.42	-24.93 \pm 1.54			
ai 17:0		-26.22 \pm 0.06		-22.11				
MUFA								
16:1 ω 9		-19.84 \pm 1.72				-19.65 \pm 0.05		
16:1 ω 7	-29.19 \pm 0.16	-21.31 \pm 1.37	-18.66 \pm 0.98	-19.12 \pm 2.65	-19.55 \pm 0.16	-19.57 \pm 0.53	-24.59 \pm 0.54	-24.53 \pm 0.91
18:1 ω 5/ ω 6	-30.22 \pm 0.41	-24.05 \pm 2.50	-19.55 \pm 1.71	-19.39	-22.94 \pm 2.07		-29.61 \pm 4.26	-28.99 \pm 3.12
18:1 ω 9	-30.00 \pm 2.06	-25.89 \pm 1.25	-23.49 \pm 0.56	-22.72 \pm 0.82	-21.55 \pm 1.22	-21.56 \pm 0.44	-27.80 \pm 0.15	-27.75 \pm 0.24
18:1 ω 7	-30.51 \pm 1.60	-25.49 \pm 0.73	-20.28 \pm 0.77	-19.26 \pm 0.07	-20.63 \pm 0.74	-20.48 \pm 0.41	-24.19 \pm 5.40	-27.72 \pm 1.17
20:1 ω 9		-29.27 \pm 0.83	-24.01	-24.11		-23.56	-27.44 \pm 0.05	-29.09 \pm 0.89
20:1 ω 7								
22:1 ω 9		-28.12 \pm 1.23						-27.94 \pm 1.74
PUFA								
16:2 ω 6		-24.92 \pm 1.83	-19.07 \pm 0.32	-21.05 \pm 0.86	-30.11 \pm 9.42		-25.76	
16:2 ω 4	-28.14	-23.25 \pm 1.40	-17.92 \pm 2.57	-17.72	-21.28 \pm 0.19	-23.40 \pm 0.71	-24.14 \pm 1.17	
16:3 ω 4		-22.99 \pm 2.47	-18.35 \pm 1.70	-20.04	-22.95 \pm 0.49		-26.86 \pm 1.30	-28.65 \pm 0.55
16:3 ω 3	-29.77 \pm 1.53				-23.11 \pm 0.42		-23.93 \pm 1.32	
16:4 ω 3		-23.81 \pm 1.94	-19.27 \pm 0.42	-19.47 \pm 1.06	-24.77 \pm 1.09		-22.73 \pm 1.47	
16:4 ω 1			-19.43 \pm 1.83	-17.46	-22.37 \pm 0.79	-22.47 \pm 1.01	-22.56	
18:2 ω 6	-30.89 \pm 0.35	-29.69 \pm 5.00	-21.57 \pm 2.97	-21.32 \pm 3.06	-22.98 \pm 0.29	-23.64 \pm 0.38	-30.51 \pm 1.81	-29.51 \pm 0.85
18:3 ω 6	-29.51				-23.33 \pm 0.81	-21.83 \pm 1.03	-25.24	
18:3 ω 3	-33.30 \pm 3.96	-25.12 \pm 4.45	-23.22 \pm 0.93	-19.61 \pm 1.66	-23.19 \pm 0.53	-23.24 \pm 0.30	-27.77 \pm 0.12	-25.99 \pm 2.12
18:4 ω 3	-32.31 \pm 1.19	-27.58 \pm 1.29	-22.47 \pm 1.30	-23.70 \pm 0.52	-23.36 \pm 0.39	-22.76 \pm 0.49	-25.92 \pm 2.27	
20:2 ω 6							-26.75 \pm 2.33	-28.22 \pm 1.58
20:3 ω 3					-25.18	-23.76 \pm 1.51	-27.02 \pm 1.46	-26.37 \pm 1.23
20:4 ω 6	-26.82	-26.42 \pm 2.46	-20.69 \pm 0.70		-21.64 \pm 0.36	-21.94 \pm 0.48	-28.00 \pm 0.58	-28.62 \pm 0.10
20:4 ω 3								
20:5 ω 3	-32.70 \pm 0.23	-23.56 \pm 2.23	-19.41 \pm 1.71	-23.18 \pm 3.10	-22.29 \pm 0.28	-21.92 \pm 0.10	-25.33 \pm 0.04	-26.05 \pm 0.75
22:4 ω 3								
22:5 ω 3							-24.66 \pm 1.84	-27.40 \pm 1.14
22:6 ω 3		-22.87 \pm 2.44					-26.20 \pm 0.98	-27.58 \pm 0.92

Supporting information 4: Differences in the profile of the main sterols at the end of the experiment (T20).

The complete list of sterols detected in the samples is available as supporting information (Tables S6).

Basal sources

Three ubiquitous phytosterols have been systematically quantified in basal sources, i.e. β -sitosterol, stigmasterol, and campesterol. In both treatments, β -sitosterol was predominant in FPOM (0.20 ± 0.05 to $0.37 \pm 0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{DM}$) and more particularly in leaf litters (1.01 ± 0.15 to $1.28 \pm 0.15 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{DM}$), where it was 20-30 times more concentrated than other sterols. Ergosterol associated with fungal conditioning was only detected in litters with significantly higher concentrations in DC (0.15 ± 0.04 vs $0.05 \pm 0.04 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{DM}$ – t-test $p < 0.05$). Three dominant diatom sterols (Martin-Creuzburg and Merkel, 2016) were identified in LC tile and wall biofilms, i.e. epibrassicasterol (0.56 ± 0.01 to $0.69 \pm 0.02 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{DM}$), 24-methylenecholesterol, and cholesterol (0.24 ± 0.13 to $0.28 \pm 0.06 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{DM}$). Epibrassicasterol was detected in lower amounts in DC tile biofilm (t-test $p < 0.05$) while the cholesterol level ($0.34 \pm 0.18 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{DM}$) was not significantly different from that in the LC treatment. The same sterol profiles were observed in FPOM from both treatments, including cholesterol, 24-methylenecholesterol, epibrassicasterol, and ubiquitous phytosterols (Table S6).

Macroinvertebrates

Cholesterol was by far the most abundant sterol detected in both macroinvertebrates (> 70% in *G. pulex* and 80% in *R. semicolorata*) (Table S6). The light conditions did not affect the amount of cholesterol in each macroinvertebrate, with no differences reported between the two species (between 1.65 ± 0.85 and $2.06 \pm 0.69 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{DM}$). In order of abundance, desmosterol was the second commonest sterol found in macroinvertebrates (around $0.20 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{DM}$), although only detected in trace quantities in *R. semicolorata* from DC. Desmosterol, absent from basal sources, is reported to be an intermediate step in cholesterol biosynthesis in arthropods (Lafont et al., 2017). When reared in the dark (DC), both species tended to contain significantly higher β -sitosterol than in LC (2 to 4 fold). Other dietary sterols were rare in *R. semicolorata*, with only small amounts of diatom epibrassicasterol and campesterol in LC nymphs (Table S6). In contrast, *G. pulex* exhibited more varied dietary sterols including low levels of campesterol and diatom sterols, with no significant differences between treatments (t-test $p > 0.05$).

Table S6 Amount (in $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ DM) of sterols in food sources, *G. pulex* and *R. semicolorata* at the end of the experiment (T20) in the two conditions tested (DC: Dark conditions - LC: Light Conditions). Within the same condition, significant differences are indicated by different letters (one-way ANOVA with $p < 0.05$). Between conditions, significant differences are indicated by an identical * symbol (Student t-test with $p < 0.05$).

Dark conditions	Leaf litter	FPOM	Tile biofilm	<i>G. pulex</i>	<i>R. semicolorata</i>
β -sitosterol	1.28 \pm 0.15 a	0.37 \pm 0.11 bc	0.48 \pm 0.30 c	0.12 \pm 0.04 b	0.38
campesterol	0.03 \pm 0.01 a	0.04 \pm 0.01 a	trace	0.05 \pm 0.03 a	trace
cholestanol	0.02 \pm 0.01 a	0.02 \pm 0.00 a	trace	0.14 \pm 0.07 b	
cholesterol	0.07 \pm 0.02 a	0.07 \pm 0.01 a	0.34 \pm 0.18 a	2.06 \pm 0.69 b	1.69
ergosterol	* 0.15 \pm 0.04 a				
epibrassicasterol	0.07	0.06 \pm 0.01 a	0.21 \pm 0.01 b	0.19 \pm 0.05 b	
fucosterol					
desmosterol				0.23 \pm 0.06	trace
7-dehydrocholesterol				0.17 \pm 0.06	trace
24-methylenecholesterol		0.07 \pm 0.00 a		0.07 \pm 0.03 a	
stigmasterol	0.04 \pm 0.01 a	0.03 \pm 0.00 a	0.08 \pm 0.00 b		

Light conditions	Leaf litter	FPOM	Tile biofilm	Wall biofilm	<i>G. pulex</i>	<i>R. semicolorata</i>
β -sitosterol	1.01 \pm 0.15 a	0.20 \pm 0.09 cd	0.30 \pm 0.01 de	0.52 \pm 0.28 ea	0.06 \pm 0.01 b	0.08 \pm 0.01 bc
campesterol	0.04 \pm 0.02 a	0.05 \pm 0.02 a	0.11 \pm 0.01 b	0.29	0.03 \pm 0.01 a	0.04 \pm 0.01 a
cholestanol	0.01 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.01 ab	0.05 \pm 0.01 b	trace	0.12 \pm 0.09 c	
cholesterol	0.06 \pm 0.02 a	0.08 \pm 0.04 ab	0.28 \pm 0.06 c	0.24 \pm 0.13 cb	1.65 \pm 0.85 d	1.84 \pm 0.08 d
ergosterol	* 0.05 \pm 0.01 a					
epibrassicasterol		0.09 \pm 0.02 a	0.69 \pm 0.02 b	0.56	0.12 \pm 0.07 a	0.07 \pm 0.03 a
fucosterol			trace			
desmosterol					0.16 \pm 0.06 a	0.21 \pm 0.02 a
7-dehydrocholesterol					0.13 \pm 0.08 a	trace
24-methylenecholesterol		0.10 \pm 0.05 a	0.20 \pm 0.04 b	0.44	0.05 \pm 0.01 a	
stigmasterol	0.03 \pm 0.00 a	0.03 \pm 0.01 a	0.06 \pm 0.00 b	trace		0.01 \pm 0.00 c

Table S7 $\delta^{13}\text{C}$ values (‰) of sterols in food sources, *G. pulex* and *R. semicolorata* at the end of the experiment (T20) in the two conditions tested (DC: Dark conditions - LC: Light Conditions).

Dark conditions	Leaf litter	FPOM	Tile biofilm	<i>G. pulex</i>	<i>R. semicolorata</i>
β -sitosterol	-30.36 \pm 0.25	-30.62 \pm 0.41	-30.86 \pm 0.16	-31.58 \pm 0.65	-31.39
campesterol	-33.03 \pm 0.23	-33.16 \pm 0.82	-30.21 \pm 0.93	-29.76	
cholestanol	-35.04 \pm 0.42	-34.23 \pm 0.35	-33.33 \pm 1.13		
cholesterol	-34.83 \pm 0.11	-34.01 \pm 1.24	-27.48 \pm 0.33	-29.86 \pm 0.98	-30.38
ergosterol	-35.35				
epibrassicasterol		-30.28 \pm 0.71	-31.07 \pm 0.52		
fucosterol					
desmosterol				-32.80 \pm 1.36	-29.08
7-dehydrocholesterol				-33.92 \pm 1.35	
24-methylenecholesterol					
stigmasterol	-31.33	-33.37 \pm 2.74	-33.99 \pm 1.86		

Light conditions	Leaf litter	FPOM	Tile biofilm	Wall biofilm	<i>G. pulex</i>	<i>R. semicolorata</i>
β -sitosterol	-29.98 \pm 0.18	-29.77 \pm 0.39	-23.76 \pm 1.60	-19.31 \pm 0.51	-32.22	-23.81
campesterol	-30.83 \pm 2.79	-27.29 \pm 1.79	-23.06 \pm 1.65	-20.65 \pm 1.43	-27.95	-22.86
cholestanol	-34.00 \pm 0.67	-34.61 \pm 0.06	-32.24 \pm 2.27	-31.66 \pm 0.95		
cholesterol	-33.77 \pm 0.08	-32.11 \pm 1.56	-25.12 \pm 0.72	-23.69 \pm 0.63	-29.31 \pm 0.80	-23.43 \pm 1.40
ergosterol	-30.15 \pm 0.66					
epibrassicasterol		-23.08 \pm 2.06	-19.15 \pm 0.20	-17.09 \pm 0.46		
fucosterol			-21.45	-22.31 \pm 3.57		
desmosterol					-29.44 \pm 2.40	-23.92
7-dehydrocholesterol			-17.90	-15.61	-29.32	
24-methylenecholesterol			-27.58	-18.99 \pm 4.59		
stigmasterol	-32.27 \pm 2.36	-29.99 \pm 1.27				

Chapitre 3

Structure trophique et utilisation des ressources alimentaires dans un ruisseau d'ordre 1 en début de printemps : Approche basée sur l'analyse de la composition en isotopes stables des sources basales, des macroinvertébrés et des acides gras

Sommaire : Chapitre 3

3.1	Préambule	102
	Présentation du site et précisions méthodologiques.....	102
	Choix et présentation du site.....	102
	Site de prélèvement	102
	Choix des macroinvertébrés à étudier	103
	Résumé de l'étude	107
3.2	Article soumis (dans Hydrobiologia).....	108
	Introduction	109
	Methods	111
	Results	117
	Discussion.....	128
	Acknowledgments.....	133
	References.....	134
	Supplemental information	140

3 Chapitre 3

Structure trophique et utilisation des ressources alimentaires dans un ruisseau d'ordre 1 en début de printemps : Approche basée sur l'analyse de la composition en isotopes stables des sources basales, des macroinvertébrés et des acides gras

3.1 Préambule

Ces travaux de recherche ont été en partie soutenus par le projet EC2CO (INSU-CNRS) IFODPSYLO 2018-2019 et par une subvention de l'agence de l'eau Loire-Bretagne.

Présentation du site et précisions méthodologiques

Choix et présentation du site

Nous avons choisi de travailler sur un ruisseau de moyenne montagne, dans sa partie la plus amont (ordre 1) car susceptible de contenir un plus petit nombre d'espèces de macroinvertébrés à étudier que dans les parties aval (ordre 2 à 3). Toutefois, il a fallu s'assurer de l'écoulement permanent (pas d'assec estival) du site étudié afin de répondre aux critères de définition d'un cours d'eau de tête de bassin. Notre choix s'est porté sur l'amont du ruisseau d'Anglard, affluent de la Couze Pavin, situé dans le massif volcanique des Monts Dore. Le peuplement de macroinvertébrés y avait été déterminé dans les années 1970 par Verneaux (1977) qui avait trouvé alors un nombre de taxons assez limité (10 espèces), correspondant à notre objectif d'un nombre limité d'espèce à traiter (pour des raisons de complexité analytique et de coût financier).

Site de prélèvement

Notre secteur est situé à 662 m de la source principale du ruisseau (source des Costes Fig. 1) à 1114 m d'altitude (BRGM, 2010). Le ruisseau encaissé y présente des berges boisées à forte pente. Ce boisement correspond à la hêtraie résiduelle de la Sagnove qui génère d'important tapis de feuilles mortes jusqu'aux abords immédiats du ruisseau et qui sont susceptibles d'y être régulièrement entraînées par le vent. Le cours d'eau est large de 1 à 1,5 m et présente une morphologie en escalier, alternant des faciès d'écoulement de type « radiers-variés » et « plats-escaliers ». Le substrat est uniquement d'origine volcanique avec des blocs et des galets de trachyandésite basaltique et des graviers-sables de scories associés à de fines cendres d'origine pyroclastiques dans les zones de dépôts. L'analyse des

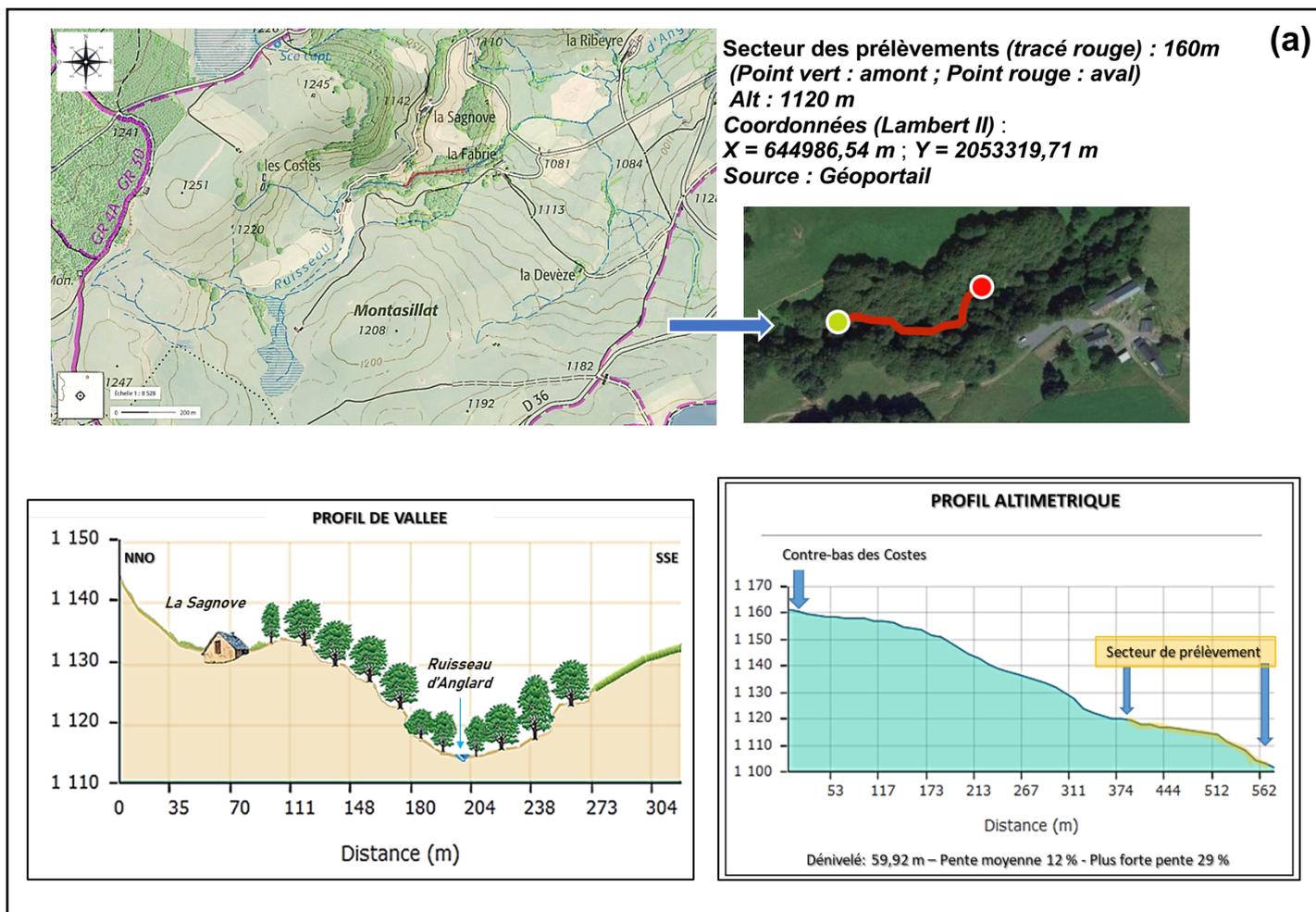
principaux paramètres physico-chimiques de l'eau classe le ruisseau en qualité « Très Bonne » (au sens de la DCE), mais un examen des teneurs en N total et P total nous donne un classement plus précis de type oligo-mésotrophe (Dodds and Smith, 2016). Les taux d'azote assez élevés pour un cours d'eau si proche de ses sources sont liés aux pratiques d'épandage autorisées sur les prairies du versant nord-ouest du Puy Montasillat (BRGM, 2010 ; Figure 3.1.).

Choix des macroinvertébrés à étudier

Préalablement à l'étude, nous avons réalisé un inventaire des espèces ou genres présents sur le cours d'eau. Les taxons ont été triés, identifiés au genre ou à l'espèce si possible et les individus photographiés afin de déterminer leur taille (Image J-Fiji, version 2.0.0-rc68). Contrairement à Verneaux (1977) nous avons identifié 28 genres de macroinvertébrés sur notre secteur, tous apparemment monospécifiques, à l'exception du genre *Leuctra* qui contenait deux ou trois espèces différentes et *Rhyacophyla* qui contenait deux espèces différentes dont une plus abondante (*praemorsa*). Nous avons décidé de travailler sur les espèces ou genres les plus abondants car il a été impossible d'obtenir sur un si petit ruisseau le nombre d'échantillons minimum pour effectuer l'ensemble de analyses prévues (Isotopes stables, contenus digestifs, profils d'AG, profils de stérols) et ce sans perturber durablement le secteur.

Afin de définir ces taxons (genres ou espèces), nous avons utilisé la méthode des rangs-fréquences (Frontier, 1976) qui nous a permis de les classer par ordre d'abondance (Figure 3.2). De plus la transformation des fréquences en logarithme naturel a mis en évidence les taxons rares qui sont en dessous du rang 12 ($LnF < 0$, Tableau 3.1). Les cinq premiers taxons représentaient ainsi 75% de la densité totale d'individus échantillonnés : soit dans l'ordre décroissant : *Gammarus pulex*, *Leuctra spp.*, *Protonemura praecox*, *Ecdyonurus sp.* et *Odontocerum albicorne*. Pour compléter cette liste nous avons aussi pris en compte l'importance de la biomasse des différents taxons. Ainsi *Isoperla ambigua*, *Baetis lutheri* et la sangsue *Erpobdella octoculata* sont venues s'ajouter aux invertébrés à étudier. Nous avons dû tenir compte également de l'homogénéité de taille des individus constituant les différents échantillons analytiques d'un même taxon. Si celle-ci s'est avérée impossible à obtenir, les taxons ont été éliminés (cas de *Siphonoperla*, *Limnephilus* etc.). Finalement, *Rhyacophila spp.* a été sélectionné en raison de la masse élevée des individus présents et du caractère prédateur de ce genre de trichoptère. En termes de groupe trophique fonctionnel (FFG), ces neuf taxons regroupaient quatre broyeurs déchiqueteurs (*G. pulex*, *g. Leuctra*, *P. praecox*, *O. albicorne*), un racleur-brouteur (*Ecdyonurus sp.*), 1 racleur-collecteur (*B. lutheri*), 1 broyeur

prédateur (*I. ambigua*) et deux tops prédateurs invertébrés (*E. octoculata* et *Rhyacophila* sp.).
Ces invertébrés sont décrits plus en détail en annexe.



(b)

Variable (unit)	Dodds & Smith, 2016			Ruisseau d'Anglard			
	Oligotrophic	Mesotrophic	Eutrophic	Avril 2017	Juillet 2017	Novembre 2017	Moyenne
Total N ($\mu\text{g/l}$)	<700	700-1500	>1500	971-1012	1038-1079	745-786	918-959
Total P ($\mu\text{g/l}$)	<25	25-75	>75	<10	<10	33	<17,5

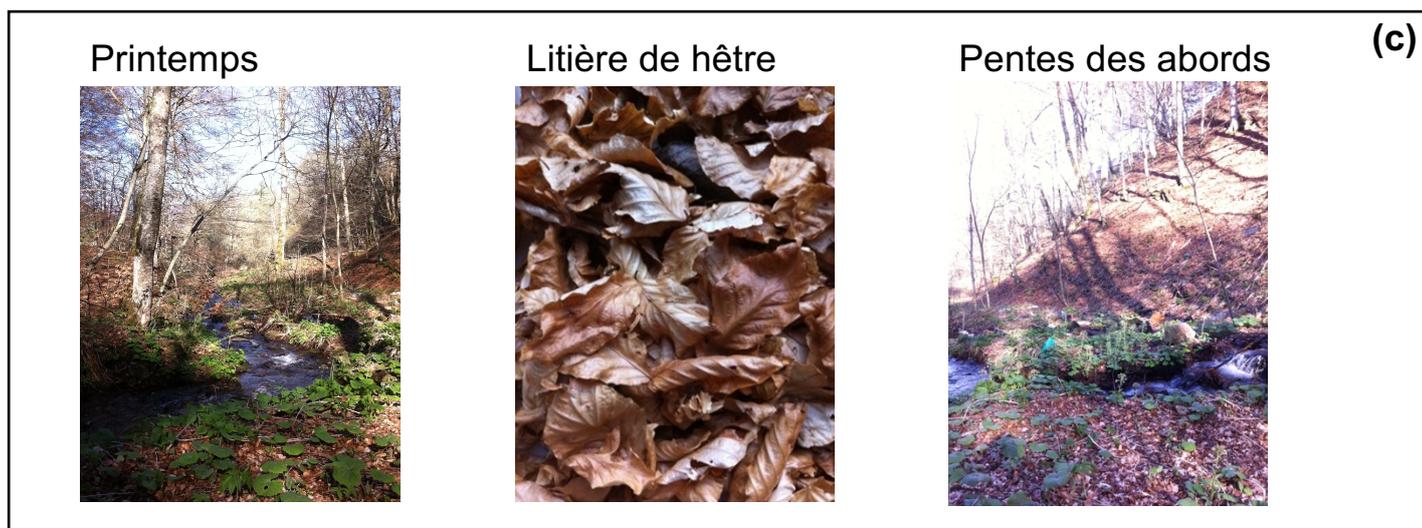


Fig. 3.1. Présentation du site de prélèvement sur le ruisseau d'Anglard.

(a) Carte topographique du secteur, photo aérienne, profil altimétrique et coupe de la vallée du site de prélèvement ; (b) Concentrations en phosphore et azote total du ruisseau et évaluation du statut trophique ; (c) Photos du site au printemps 2017.

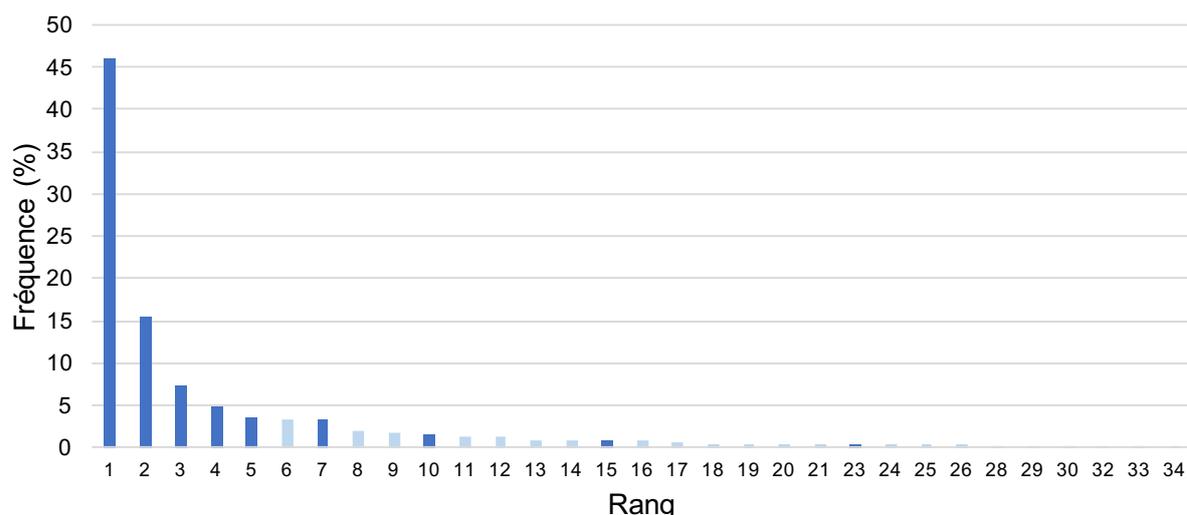


Fig. 3.2. Rang et fréquence de la densité des espèces échantillonnées dans le ruisseau d'Anglard (Puy-de-Dôme, France). Les taxons retenus sont en en bleu foncé.

Familles	Espèces	Guildes trophiques (FFGs)	Rang	Densité log (Rang-fréquence)
F. Gammaridae	<i>Gammarus pulex</i>	Broyeurs	1	3,83
F. Leuctridae	<i>Leuctra psp.</i>	Broyeurs	2	2,73
F. Nemouridae	<i>Protonemura praecox praecox</i>	Broyeurs	3	1,99
F. Heptageniidae	<i>Ecdyonurus sp.</i>	Racleurs	4	1,60
F. Odontoceridae	<i>Odontocerum albicorne</i>	Broyeurs/Prédateurs	5	1,27
F. Chloroperlidae	<i>Siphonoperla torrentium</i>	-	6	1,21
F. Baetidae	<i>Baetis lutheri</i>	Racleurs	7	1,21
F. Limnephilidae	<i>Limnephilus sp.</i>	-	8	0,68
F. Blephariceridea	<i>Blepharicera fasciata</i>	-	9	0,57
F. Perlodidae	<i>Isoperla ambigua</i>	Broyeurs/Prédateurs	10	0,46
F. Planariidae	<i>Polycelis felina</i>	-	11	0,32
F. Taeniopterygidae	<i>Taeniopteryx hubaulti</i>	-	12	0,17
F. Limnephilidae	<i>Drusus ferdes</i>	-	13	-0,24
F. Hydropsychidae	<i>Hydropsyche instabilis</i>	-	14	-0,24
F. Rhyacophilidae	<i>Rhyacophila psp.</i>	Prédateurs/Broyeurs	15	-0,24
F. Sericostomatidae	<i>Sericostoma personatum</i>	-	16	-0,52
F. Uenoidae	<i>Thremma gallicum</i>	-	17	-0,93
F. Philopotamidae	<i>Philopotamus montanus montanus</i>	-	18	-0,93
F. Elmidae	<i>Limnius volckmari</i>	-	19	-0,93
F. Simuliidae	<i>Simulium sp.</i>	-	20	-0,93
F. Psychodidae	<i>Psychoda sp.</i>	-	21	-0,93
F. Pediciidae	<i>Dicranota bimaculata</i>	-	22	-0,93
F. Erpobdellidae	<i>Erpobdella octoculata</i>	Prédateurs	23	-0,93
F. Naididae	<i>Nais sp.</i>	-	24	-0,93
F. Chironomidae	<i>Macrolepia sp.</i>	-	25	-1,62
F. Limoniidae	<i>Hexatoma sp.</i>	-	26	-1,62
F. Glossiphoniidae	<i>Glossiphonia sp.</i>	-	27	-1,62
F. Lumbricidae	<i>Eiseniella tetraedra</i>	-	28	-1,62

Tab. 3.1. Liste des taxons présents dans le ruisseau d'Anglard en 2017

Le rang et le log naturel de la fréquence des taxons sont indiqués avec le groupe trophique fonctionnel (FFG) associées des taxons sélectionnés pour l'expérience.

Résumé de l'étude

Dans les petits cours d'eau forestiers de moyenne montagne, les flux d'énergie et de matière organique reposent principalement sur les apports de feuilles mortes (litière allochtone) issus de la ripisylve décidue et des berges. Le rôle de la production primaire autochtone (microalgues des biofilms épilithiques) y est habituellement considéré comme secondaire. Toutefois, en début de printemps la végétation des rives n'a pas encore repris, ce qui pourrait favoriser et provoquer un fort développement de la production primaire autochtone en raison de l'absence d'ombrage et de l'apport en nutriments (P, N, Si) consécutif du lessivage des sols lors de la fonte des neiges.

Selon notre hypothèse, les biofilms autotrophes pourraient dès lors contribuer de manière significative à la reprise de croissance des macroinvertébrés présents dans ces milieux, au sortir de la période hivernale. Nous avons ainsi sélectionné 9 des taxons les plus abondants ou représentatifs d'un ruisseau forestier du Massif Central (France) et recherché d'où provenait l'essentiel de la matière organique qu'ils avaient assimilés au début du printemps, l'accent a été mis sur l'origine des acides gras essentiels (AGE) indispensables à leur développement et état physiologique. Les compositions en isotopes stables du Carbone et de l'Azote et les profils d'acides gras (AG) ont ainsi été déterminés dans les sources organiques basales et les macroinvertébrés sélectionnés. Les signatures isotopiques (δC^{13}_{AG}) d'une sélection d'AG ont été utilisées afin d'évaluer l'importance que représentait chaque source basale pour la couverture en AGE des invertébrés.

L'utilisation d'un modèle de mélange bayésien (SIAR, SimmR package) nous a permis de montrer que l'essentiel de l'énergie reçu par les 9 taxons de macroinvertébrés provenait des biofilms épilithiques, des bryophytes et de fines particules détritiques benthiques (FBOM). La contribution de la litière de feuilles de hêtre (*Fagus sylvatica*), reconnue pour son côté récalcitrant, était minoritaire. Grâce à un modèle reposant sur les proportions de sources basales assimilées (issu du SIAR) et les signatures de δC^{13}_{AG} , nous avons pu estimer que les AG les plus courants (16:0, 18:1 ω 9, 18:2 ω 6 et 18:3 ω 3) étaient amenés à proportion des principales sources organiques assimilées par la majorité des 9 taxons de macroinvertébrés. Par contre les longs acides gras polyinsaturés (AGPI : 20:4 ω 6 ou ARA et 20:5 ω 3 ou EPA) ont été uniquement obtenus des sources autochtones, *via* des stratégies alimentaires flexibles et pas forcément conformes au groupe fonctionnel trophique (FFG) assigné à chaque taxon étudié. Notre étude a ainsi permis de souligner la dépendance des macroinvertébrés des petits ruisseaux vis-à-vis de la production primaire autochtone pour leur besoin en longs AGPI. Elle semble aussi confirmer que les bryophytes peuvent servir de source importante d'alimentation.

3.2 Article soumis (dans Hydrobiologia)

Title

Early spring food resources and the trophic structure of macroinvertebrates in a small headwater stream as revealed by bulk and fatty acid stable isotope analysis.

Key words

Macroinvertebrates • Allochthonous organic matter • Biofilm • Bryophytes • Essential Fatty acids • Stable Isotopes

Authors

Tiphaine Labeled-Veydert¹, Apostolos-Manuel Koussoroplis¹, Alexandre Bec¹, Christian Desvillettes¹

Affiliation of the authors

¹Laboratoire Microorganisme : Génome et Environnement (LMGE) - UMR CNRS 6023, Université Clermont Auvergne (UCA), 1 impasse Amélie Murat, 63170 Aubière

E-mail address of the authors

Tiphaine Labeled-Veydert: tiphaine.lv@hotmail.fr

Apostolos-Manuel Koussoroplis: a-manuel.koussoroplis@uca.fr

Alexandre Bec : alexander.bec@uca.fr

Christian Desvillettes : Christian.desvillettes@uca.fr

Authors' contribution

Tiphaine Labeled-Veydert: Project conceptualization, Experimental management, Data acquisition and analysis, Article writing.

Apostolos-Manuel Koussoroplis and Alexandre Bec: Article writing.

Christian Desvillettes: Project manager, Project conceptualization, Data analysis, Article writing.

Funding

The project was funded by EC2CO funding (INSU-CNRS) IFODPSYLO 2018-2019 and a subvention of water agency from Loire-Bretagne.

Introduction

Headwater streams have significant ecological value due to their effect on the structure and function of higher-order streams, linking mountain and downstream ecosystems (Gomi *et al.*, 2002). Many of the temperate headwater streams are forested, at least in relatively pristine environments (Richardson & Chauvet, 2019) and falling riparian vegetation (tree leaves) is a major source of energy for their food webs (Allan & Castillo, 2007; Collins *et al.*, 2016; Franklin *et al.*, 2020). The occurrence of deciduous riparian trees largely controls the energy flow in the streambed, where there are two types of annual energy input: a massive allochthonous input during leaf fall in the autumn and an autochthonous input during peak primary production in the spring, before leaf emergence (Hill *et al.*, 2001; Ylla *et al.*, 2007). On a local scale, the quantity of the allochthonous resources is often recognized as a limiting factor for secondary production in headwater streams (Cross *et al.*, 2006). In addition, the quality of allochthonous litter affects the development of most shredder macroinvertebrates (Graça *et al.*, 2001). Some leaf litters, such as those originating from oak (genus *Quercus*) or beech (*Fagus sylvatica*), are considered recalcitrant in western Europe (Sanpera-Calbet *et al.*, 2009), constituting mainly a source of carbon. Their N and P contents depend, in particular, on the intensity of microbial colonisation and conditioning (Crenier *et al.*, 2019; Halvorson *et al.*, 2019). In contrast, benthic epilithic or epixylic microalgae, which represent the main source of autochthonous productivity in headwater streams, provide a nutritional quality that is now considered to be superior to that of all allochthonous detritus (Guenet *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2018). These biofilm microalgae (generally diatoms, chlorophytes and cyanobacteria) are rich in amino acids (more than 50% of the dry weight depending on the species, Ruess & Müller-Navarra, 2019) and generally have a low C:N ratio. They also produce lipid compounds that are essential for consumer fitness, especially in biofilms whose algal communities are dominated by diatoms (Twining *et al.*, 2017). Besides phytosterols (Gergs *et al.*, 2015), the lipid compounds are mainly long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of the ω 3 and ω 6 series, such as 20:5 ω 3, 20:4 ω 6, and to a lesser extent in rivers, 22:6 ω 3 (Torres-Ruiz *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2017). Recent studies of different aquatic invertebrate species have highlighted the importance of these long-chain dietary PUFAs for their somatic growth and reproduction (Ahlgren *et al.*, 2009; Aguilar *et al.*, 2012; Guo, Kainz, Valdez, *et al.*, 2016). However, benthic microalgae taxa differ in their fatty acid pattern and thus in their nutritional quality (Taipale *et al.*, 2013). Unlike benthic diatoms, chlorophytes and cyanobacteria do not contain 20:5 ω 3 and 20:4 ω 6, but instead have their biosynthesis precursors (18:3 ω 3 and 18:2 ω 6 respectively), which is the same as the PUFA contribution from leaf litter (Crenier, Arce-Funck, *et al.*, 2017). In addition, primary production in headwater streams draining deciduous forests has pronounced seasonal variations and is limited by several abiotic factors, particularly a high canopy cover, (Lamberti

& Steinman, 1997). Therefore, depending on the season, the supply of carbon from microalgae can be very low relative to the amount of available detrital carbon (Evans-White & Halvorson, 2017; Torres-Ruiz & Wehr, 2019). This may have an effect on consumers' development, as the seasonally lower quality of allochthonous foods tends to be mitigated by selectively consuming microalgae with a higher nutrient content (Fink & Von Elert, 2006; Kühmayer et al., 2020). However, depending on their Functional Feeding Group (FFG), limited access to long-chain diatom PUFAs from biofilms is likely to have a different impact. The fitness of grazers such as *Heptageniidae*, which derive the majority of their carbon from microalgae (Kühmayer et al., 2020), is highly dependent on the quality of their diet at the last larval instars (Winkelmann & Koop, 2007), whereas for a shredder such as *Gammarus pulex*, the effect is more limited as it depends primarily on the quality of the leaf litter (Little & Altermatt, 2019). In this context, the resumption of autochthonous primary production in early spring could reduce the ecological constraints of limited access to long-chain PUFAs, as the amount of accessible epilithic biofilm is known to have a positive effect on consumer growth at this time (Hill et al., 2010). During this open canopy period, the way in which consumer macroinvertebrates make use of the organic resources and possibly forage for foods with higher levels of PUFAs is of primary importance in initiating their development or restarting growth activity (Twining et al., 2017). For amphipods, the early spring coincides with the beginning of the recruitment period (Gee, 1988) and it is also a key period for univoltine orders of aquatic insects such as Ephemeroptera, Plecoptera and some Trichoptera (*Limnephilidae*, *Odontoceridae*). They generally emerge as adults a few weeks later, in the late spring and early summer (Wallace & Eggert, 2009), when coarse organic detritus has become scarce and the canopy has closed, thus reducing autochthonous primary production.

Within this context, the main objective of our study was to characterize the trophic links between available basal organic food sources and the predominant macroinvertebrate taxa in a mid-mountain first-order forested headwater stream in the early spring when the canopy is open. We tested the hypothesis that lower and higher-level consumers are dependent on allochthonous and autochthonous energy pathways, with a predominance of epilithic microalgae as a source of essential long-chain PUFAs. Aquatic bryophytes were also considered as a potential autochthonous resource, as a recent study proposed aquatic mosses as an alternative source of long-chain PUFAs in low order streams (Torres-Ruiz & Wehr, 2019). Trophic links between basal sources and consumers were examined using stable isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) and the origin and transfer of a selected number of fatty acids including essential PUFAs was evaluated. Our goal was to better discriminate between the overall nutrient supply and the essential FA supply of each organic resource at this key time of the year.

Methods

Study site

The study was conducted in a small first-order headwater stream “le ruisseau d’Anglard” situated in the Monts-Dore (French Massif Central, Fig. S1). The upper catchment area is a moderately mountainous landscape of wet pasture and areas of beech forest on a volcanic substratum. The sampled reach (Alt: 1114 m; 45°28’44.64”E – 2°54’50.23”N) is 1–1.5 m in width and has sloping banks with a dense beech (*Fagus sylvatica* L.) ripisylve. Field sampling was conducted under medium flow conditions (5–7 April 2017) at a period before foliage had developed on the surrounding trees, allowing maximum light penetration. Water physicochemical parameters were as follows: pH 7.2, temperature 4–6°C, silicates 27.9 mg.L⁻¹, total phosphorus < 10 µg.L⁻¹ and total nitrogen 971–1012 µg.L⁻¹, the latter parameter indicated oligo-mesotrophic conditions (Dodds & Smith, 2016).

Selection of macroinvertebrate core species

Our stream macroinvertebrates were first monitored in the 1970s and a taxonomy list drawn up (Verneaux, 1977). In the autumn preceding this study, we updated the taxonomic list following the protocol of the macroinvertebrate-based indices used in France (I2M2, Mondy et al., 2012). Thirty one taxa were obtained and classified using the rank-frequency method (Frontier, 1976) together with their weight contribution to the total biomass of macroinvertebrates sampled (table S1). This enabled us to select the core taxa which collectively accounted for both 80% of the total number of collected individuals and 80% of the biomass sampled (table S1). Core taxa in the study site were *Gammarus pulex* (Amphipoda, *Gammaridae*, FFG: shredder), *Ecdyonurus* sp. (Ephemeroptera, *Heptageniidae*, FFG: scrapper); *Baetis lutheri* (Ephemeroptera, *Baetidae*, FFG: scrapper), *Isoperla ambigua* (Plecoptera, *Perlodidae*, FFG: shredder-predator), *Leuctra* sp. (Plecoptera, *Leuctridae*, FFG: shredder), *Protonemura praecox* (Plecoptera, *Nemouridae*, FFG: shredder), *Odontocerum albicorne* (Trichoptera, *Odontoceridae*, FFG: shredder). We added two predators *Erpobdella octoculata* (Hirudinea, *Erpobdellidae*) and *Rhyacophila* sp. (Trichoptera, *Rhyacophilidae*) whose high body mass led to their ranking as major taxa, despite their low abundance.

Sampling and sorting of macroinvertebrates

Macroinvertebrates were collected from 6 to 8 random locations using a Surber sampler equipped with a 250- μm mesh net. The samples were stored in coolers filled with stream water and transported to our University Biological Field Station (UCA-Besse et St-Anastaise, France) within 1/2 h of collection. Macroinvertebrates from the selected core taxa were identified under a binocular dissecting microscope, counted and pooled into small plastic tanks filled with tap water. To achieve gut-clearance the macroinvertebrates samples in the plastic tanks were kept overnight at 4°C, except a subsample of 8-10 individuals of each core taxa which were used for gut content analysis. The next morning, fasted macroinvertebrates were placed in falcon tubes, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C in the laboratory for further analysis.

Sampling of basal organic sources

The epilithic biofilm was collected by scraping the upper surface of five cobbles using a toothbrush rinsed with stream water into a plastic beaker. The scraped area was measured by taking scaled photographs of each cobble. Biofilm suspension was filtered at 250 μm and divided into sub-samples. One sub-sample was preserved with Lugol's iodine solution for future microalgae identification. Another sub-sample was preserved with 5% formaldehyde for microorganism cell enumeration using flow cytometry. The remaining sub-samples were stored in plastic beakers. In the laboratory they were filtered using pre-combusted GF/F and frozen at -80°C prior to further analysis. Bryophytes were collected from the underwater face of boulders and kept cold in plastic bags filled with stream water. In the laboratory, the bryophytes were rinsed several times with tap water to remove detritus and micro-invertebrates. They were then drained on absorbent paper and kept frozen at -80°C prior to analysis. In addition, the quantity of submerged bryophytes was estimated after a laboratory determination of the dry mass of all bryophyte shoots collected within three sample zones of 1m² placed randomly in the stream bed. Submerged beech leaves were collected at random and stored in a cooler filled with stream water. In the laboratory, the leaves were rinsed to remove attached particulate material and frozen at -80°C. Litter mass present per m² in the stream was estimated in the same way as for the bryophytes. Fine benthic organic aggregates and small leaf detritus were recovered from the contents of the Surber samplers used to collect the macroinvertebrates. They were sieved through a stack of filters with different mesh sizes, yielding the fine benthic organic matter FBOM (fraction 1-0.25 mm). FBOM was concentrated on pre-combusted GF/A filters at 450°C and frozen at -80°C prior to analysis. Finally, we used the surface area of the Surber sampler to calculate the amount of fine benthic material deposited per m² in the stream.

Laboratory procedure

Biofilm primary producer communities

Bacteria and microalgae cells were enumerated by flow cytometry from the formaldehyde fixed biofilm samples according to the method of Tanaka et al. (2011) and using a FAC-Scan flow cytometer. The algae community structure was determined by microscope observation of the lugol fixed biofilm samples following the Utermöhl method (Lund *et al.*, 1958). Results were expressed in terms of carbon biomass ($\mu\text{g C. cm}^{-2}$) calculated from cell biovolumes and cell abundance.

Macroinvertebrate diet analysis

Gut contents were removed by micro-dissection in a drop of water, homogenized for 30-60 seconds and mounted on separate slides (V. Felten *et al.*, 2008). The slides were then examined at magnifications up to 400X with a phase contrast microscope. The results are shown in supplemental material (Table S2) as relative abundance (%) together with the frequency of occurrence of each food item.

Bulk stable isotope analysis (carbon and nitrogen)

All samples were oven-dried at 60°C for 24h-48h, ground, homogenized and weighed in a tin capsule. They were prepared in triplicate and injected into a Carlo Erba NC2500 Elemental Analyzer linked to a Finnigan Delta Plus Mass spectrometer. The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotopic ratios were expressed with the standard ‰ unit notation:

$$\delta X(\text{‰}) = \left(\frac{R_{\text{Sample}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad \text{equation 1}$$

where R is either $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ or $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ standardized according to Vienna Pee Dee Belemnite for carbon and to atmospheric N_2 for nitrogen. Analytical precision (based on the standard deviation of replicates of internal standards) was never $> 0.4\text{‰}$ and 0.23‰ for nitrogen and carbon respectively.

Fatty acid analysis

The fatty acid (FA) composition was determined from total lipids (TL) for basal organic matter sources and from neutral lipids (NL) and polar lipids (PL) for the selected macroinvertebrate taxa. Lipids were extracted and, when necessary, fractionated with pre-packed solid-phase silica columns (SPE Strata NH2 Phenomenex®) according to the methods previously described by Koussoroplis et al. (2010). FAs from TL, NL and PL fractions were converted into FA methyl-esters

(FAMEs) by acid-catalyzed transesterification using the method of Koussoroplis et al. (2010) (4% H₂SO₄ in methanol at 75°C for 2 hours). FAMEs were separated and analyzed using an Agilent 6850 gas chromatograph equipped with a J&W DB-WAX capillary column (Agilent, 30m x 0.25mm ID x 0.25 mm film) and an FID detector (split ratio 1:10; injector temperature: 240 °C; carrier gas: helium; oven temperature increases from 150 to 240 °C at 3 °C·min⁻¹ with 20-min hold). Individual FAMEs were identified by comparing retention times with certified standard mixtures (Sigma®, Supelco®, Larodan Inc.®) and quantified using 13:0 and 23:0 as internal standards. The identification of all peaks was confirmed or refined using an Agilent 6850 GC coupled to a 5975B Agilent mass spectrometer. FAME Spectra were identified using our own spectrum library and the reference libraries and databases available (NIST/NBS; lipidhome).

Compound-Specific Isotope Analysis (CSIA)

The stable carbon isotope signatures ($\delta^{13}\text{C}$ values) of FAMEs were determined using a Thermo Trace 1310 GC interfaced with a Thermo Finnigan MAT 253 IRMS via a GC IsoLink II combustion interface. FAMEs were separated on an Agilent DB-FATWAX capillary column (30m x 0.25mm ID x 0.25 mm film). All the isotope values were recorded using the δ notation relative to the Vienna PeeDee Belemnite (VPDB) reference standard. The measured $\delta^{13}\text{C}$ values were corrected by isotopic mass balance for carbon incorporated during methylation of FAs using the formula:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}} = \frac{[(n+1) \times \delta^{13}\text{C}_{\text{FAME}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{MeOH}}] - 1}{n} \quad \text{equation II}$$

where $\delta^{13}\text{C}_{\text{FAME}}$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{MeOH}}$ are the $\delta^{13}\text{C}$ values of the measured fatty acid methyl ester and the methanol used during methylation, respectively. $\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}$ represents the FA $\delta^{13}\text{C}$ before its methylation, and n is the number of carbon atoms in the non-methylated FA.

Data analysis

Statistical analyses were performed on the triplicate values for each analysis using R-Studio (Team, 2013). Data normality and homoscedasticity were tested with the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Data that were rejected were log-transformed. Depending on the data distribution, a Student t-test was applied to compare paired samples and a one-way Anova was used to compare several samples. Anova was followed by a post hoc multiple comparison (Pairwise) test. The significance level was set at $p < 0.05$.

Trophic position determination

A stable nitrogen isotope ratio is necessary to assess the Trophic Position (TP) of consumers in a food web. Because $\delta^{15}\text{N}$ values of in-stream primary producers are strongly influenced by spatio-temporal variability (Jardine *et al.*, 2014), selecting a baseline is critical in evaluating the TP of consumers. In lake ecosystems, Lake *et al.* (2019) proposed using deposited benthic organic matter as a baseline. Our choice was based on the FBOM, whose value of ^{15}N was low ($0.50\text{‰} \pm 0.3$). Thus, we calculated the TP of macroinvertebrates using the following equation:

$$TP_{\text{consumer}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{consumer}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{base}}}{\Delta\delta^{15}\text{N}} + TP_{\text{base}} \quad \text{equation III}$$

where $\delta^{15}\text{N}_{\text{base}}$ corresponds to mean $\delta^{15}\text{N}_{\text{FBOM}}$ and represents a TP_{base} of 1. According to McCutchan Jr *et al.* (2003) the trophic enrichment factor (TEF) was set at $+2.3 \pm 0.18 \text{‰}$ for consumers, excluding predator species. Based on gut content analysis, *Rhyacophila psp.* and *Erpobdella octoculata* were classified as being strictly predators (table S2). A TEF value of $+1.4 \pm 0.2 \text{‰}$ was thus used for these taxa to avoid underestimating TP (McCutchan Jr *et al.*, 2003).

Stable Isotope Mixing Model (SIAR)

The relative contributions of the different sampled basal sources to the assimilated diet of each consumer and predator were estimated using the Bayesian mixing model SIAR (Parnell *et al.*, 2010). We used the Stable Isotope Mixing Model in R (simmr package; version R.3.5.2.) for food-web studies (Phillips *et al.*, 2014). This upgraded version involves isotope values for invertebrates and organic basal sources (end-member sources) associated with TEFs to calculate estimates of the source proportions (Parnell & Inger, 2016). Bayesian statistics allow the incorporation of uncertainty and variation in isotope values to give a credibility interval of 95%. SIAR accuracy depends on the TEF to account for the isotope turnover rates specific to invertebrates (Zenteno *et al.*, 2019). In our model, constant TEF values of $\delta^{13}\text{C}$ ($0.5 \pm 0.13 \text{‰}$) and $\delta^{15}\text{N}$ ($+2.3 \pm 0.18 \text{‰}$) were used, in agreement with Majdi & Traunspurger (2017) and based on the overall enrichment of $\delta^{15}\text{N}$ ($+2.25\text{‰}$) per trophic level observed in high-altitude streams (Zah *et al.*, 2001). The prey contribution was not included in the models for *E. octoculata* and *Rhyacophila psp.*. Owing to the lack of precise prey identification, the models for these two predators only display indirect contributions from the different basal sources via their ingested prey.

Fatty acid specific stable isotope data analysis

The proportions of the basal sources in the assimilated diets of the macroinvertebrates were used to calculate an expected $\delta^{13}\text{C}$ value for a selection of fatty acids of interest for each macroinvertebrate. These were the following specific FAs: 16:0, 16:1 ω 7 and 18:1 ω 9 due to their high abundance, the essential PUFAs 18:3 ω 3, 20:5 ω 3, 18:2 ω 6 and 20:4 ω 6 and the biomarkers 16:3 ω 3 and 16:2 ω 4. We assume that a given specific FA will undergo the same overall digestion and isotope fractionation processes during its assimilation, regardless of its organic basal source. Therefore, its $\delta^{13}\text{C}$ value should be close to the sum of those derived from each organic basal source in its assimilated proportion, although with a trophic discrimination factor applied. The expected $\delta^{13}\text{C}$ values were calculated using the formula:

$$\delta^{13}C_{FA-MI} = \sum_{i=1}^n \delta^{13}C_{FA-BSi} \times P_{BSi} \quad \text{equation IV}$$

where $\delta^{13}C_{FA-BSi}$ corresponds to the observed $\delta^{13}\text{C}$ value for a given FA in the basal source i , P_{BSi} represents the proportion of the basal source i assimilated by the macroinvertebrate (MI) (according to the SIAR model) and $\delta^{13}C_{FA-MI}$ is the expected value for this same FA in the lipids of the macroinvertebrate (MI), and n the number of assimilated basal sources that contain the FA. Based on the observed carbon fractionation values between dietary FAs and invertebrate consumer FAs from the literature (Chamberlain *et al.*, 2004; Gaillard *et al.*, 2017), we set the value of the trophic discrimination factor at $\delta = \pm 3.17\text{‰}$. This value was obtained by linear regression by Gladyshev and co-authors (2014), and corresponds to the decrease in $\delta^{13}\text{C}$ in invertebrate PUFAs compared to those in food sources during dietary assimilation in rivers. For a given FA, we postulate that any observed value of $\delta^{13}\text{C}$ deviating by $\pm 3.17\text{‰}$ from the calculated $\delta^{13}\text{C}$ value indicates an FA contribution from organic sources that differ from the contributions predicted using the SIAR model. The boundaries and possible distortions of these approaches based on the SIAR model are addressed in the "Discussion" section.

Results

Basal organic sources

At the time of sampling, scattered packs of beech leaves represented on average 100.9 ± 150.1 g. DM per m^2 . Dry bryophyte biomass was estimated as being 3.8 ± 7.0 g per m^2 . The biofilm average biomass was $352.8 \mu\text{g C. cm}^{-2}$ (SD: ± 305.5), making the amount of biofilm available in the stream bed highly variable. Rheophilic taxa were the most common (Fig. 1). In order of relative abundance, large epilithic diatoms (genera: *Fragilaria*, *Pinnularia*, *Nitzschia*...) accounted for 48% (SD: ± 34.4) and cyanobacteria (*Chamaesiphon* sp.) 27.8% of the total (SD: ± 19.9). The macroalga *Hydrurus foetidus* was randomly distributed and accounted for 18.8% (SD: ± 18.1). Small diatoms (genera: *Cocconeis*, *Cymbella*, *Gomphonema*) accounted for only 3.3% of the total and heterotrophic bacteria for 1.6% (Fig.1).

Bulk stable isotope analysis and trophic position (TP)

The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures of the nine macroinvertebrate taxa and their potential food sources are shown in Fig.2. Leaf litter was significantly more depleted in ^{15}N than other food sources (1-way Anova, $p < 0.0001$), and its $\delta^{13}\text{C}$ value was -31.24 ± 0.59 ‰, typical of terrestrial vegetation (Rasmussen, 2010; Middelburg, 2014). Based on their low identical $\delta^{15}\text{N}$ values (0.42 ‰ to 0.50 ‰), FBOM and biofilm were assigned as the base of the food web (TP 1). Their $\delta^{13}\text{C}$ signatures differed significantly (1-way Anova, $p < 0.001$), with FBOM having the most depleted $\delta^{13}\text{C}$ value (-29.39 ± 0.02 ‰). The mean isotopic signature of the biofilm was significantly enriched in ^{13}C compared to other organic resources (1-way Anova, $p < 0.001$). This value (-20.18 ± 3.36 ‰) showed a strong variation, with minimum and maximum values of -22.25 ‰ and -15.21 ‰ respectively. Bryophytes were significantly enriched in ^{15}N (3.46 ± 0.49 ‰) relative to other sources (1-way Anova, $p < 0.0001$). This could be attributed to the ability of moss to rapidly fix mineral nitrogen (NO_3^-) from forest and prairie soils during snowmelt (Glime, 2017). The bryophyte $\delta^{13}\text{C}$ values (-28.95 ± 0.63 ‰) tended to be slightly enriched relative to those in the litter and FBOM, although no significant difference was detected.

In terms of the macroinvertebrates, no significant difference was observed between their mean respective $\delta^{13}\text{C}$ values (1-way Anova, $p > 0.05$) (Fig.2). With the exception of *Baetis lutheri* (-23.78 ± 2.86 ‰) and *Odontocerum albicorne* (-27.29 ± 0.20 ‰), $\delta^{13}\text{C}$ values of all other taxa were distributed over a narrow range, from -24.32 ± 2.45 ‰ (*Protonemura praecox*) to -26.48 ± 0.10 ‰ (*Leuctra psp*). Interestingly, the range of $\delta^{13}\text{C}$ values of for *B. lutheri* and *P. praecox* was quite large. Shredders, *Gammarus pulex*, *P. praecox* and *O. albicorne*,

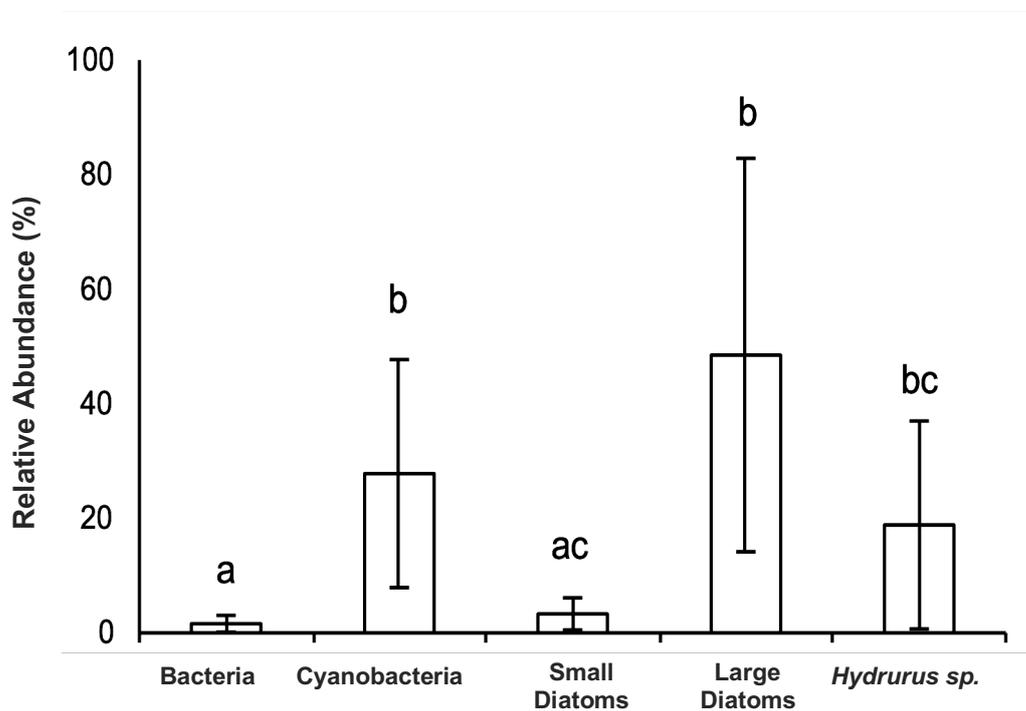


Fig. 1 Composition of epilithic biofilm primary producer community (+ bacteria) from the studied stream in early April. The relative abundance is based on biomass ($\mu\text{g C per cm}^2$). Values are reported as means of 5 replicate cobbles \pm SD. Different letters indicate significant differences (one-way Anova $p < 0.05$). Small diatoms $< 5 \mu\text{m}$.

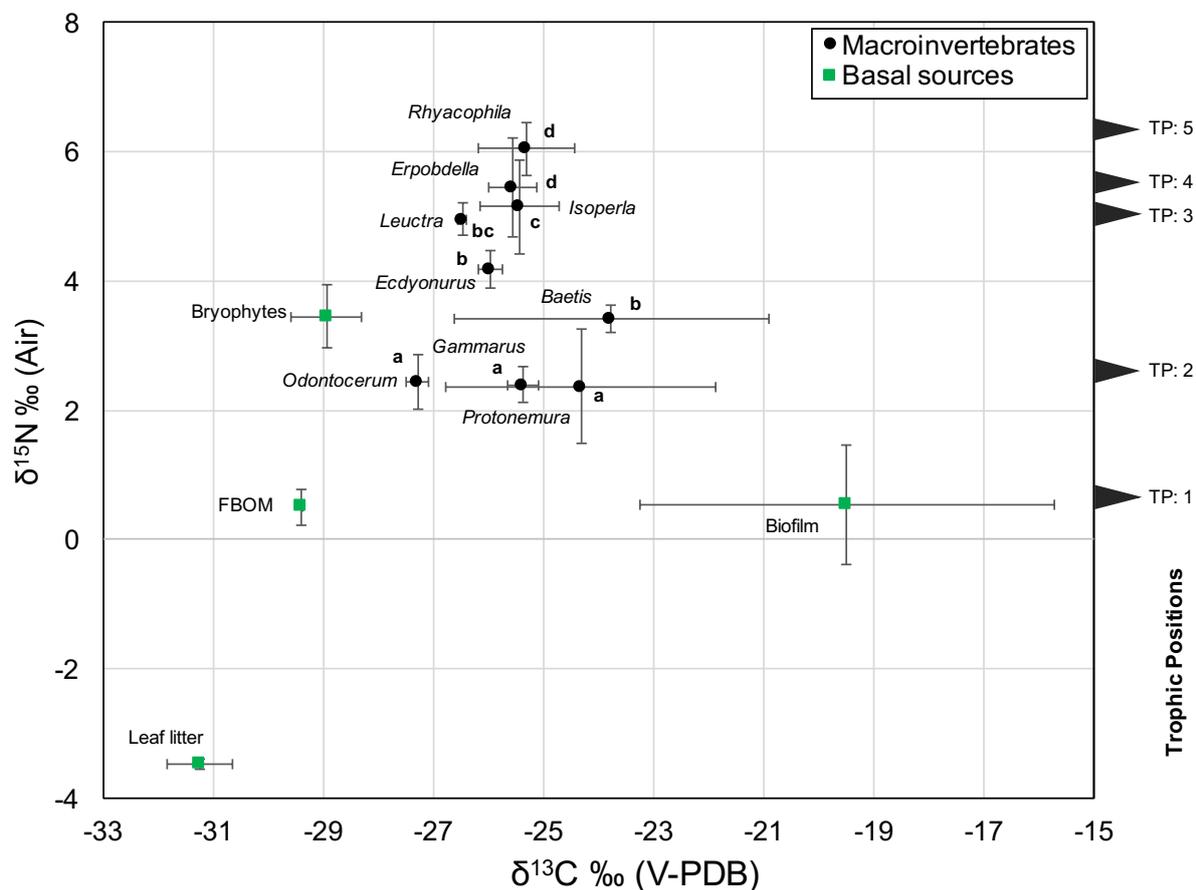


Fig. 2 Biplot of stable isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$ & $\delta^{15}\text{N}$) of the dominant macroinvertebrate taxa and their potential food sources from the headwater stream "ruisseau d'Anglard" in early April. In addition, on the right y-axis trophic position levels are reported. The baseline for the trophic position estimates was FBOM (TP1), TP values in macroinvertebrates are specified in the text of the results section. The standard deviation for the $\delta^{15}\text{N}$ value for leaf litter and the $\delta^{13}\text{C}$ value for FPOM were too low to be accurately represented in the graph. The different letters indicate significant differences of trophic position (one-way Anova, $p < 0.05$).

occupied the lower trophic level, with estimates of their trophic position ranging from 1.81 to 1.87. These shredders were significantly separated from *B. lutheri* and *Ecdyonurus sp.*, whose TPs were 2.27 and 2.60, respectively (1-way Anova, $p < 0.0001$). Only *Isoperla ambigua* occupied TP3 (value of 3.15) while the estimated TP of *Leuctra psp* (2.94) was not statistically different from that of *I. ambigua* and the *Baetis – Ecdyonurus* group. Lastly, we found that the two strictly predatory taxa occupied the upper trophic level (TP4), with the highest TP estimated for *Rhyacophila psp* (4.96).

Relative contribution of basal organic sources to macroinvertebrates

The SIAR mixing model output showed that for all macroinvertebrates analyzed, autochthonous organic matter sources tended to prevail over FBOM and leaf litter (Fig. 3). Deposited beech leaves, in particular, played only a minor role in the diets of all consumers (proportions ranging from 15.5% to 17.2%). According to the model, the diet of *O. albicorne* was distinct from that of other macroinvertebrates. This species mainly assimilated bryophytes (56.8 ± 18.4 %) followed by similar proportions of biofilm (17.4 ± 7.5 %) and FBOM (16.5 ± 13.3 %). *Leuctra psp* also assimilated slightly more bryophytes (32.8 ± 13.3 %) than epilithic biofilm (29.1 ± 18.4 %) with FBOM constituting 22.2 ± 15.4 % of the assimilated food. Predatory taxa, *Rhyacophylla psp* and *E. octoculata*, derived via their prey a high proportion of their organic matter from biofilm (34.3 to 33.3 %), bryophytes (27.6 to 29.8 %) and FBOM (22.1 to 21.5 %) (Fig. 3). At lower trophic levels, all other shredder or grazer taxa received 30.6-38.7% of their diet from biofilm and 25-29.2% from bryophytes, while FBOM constituted up to 24% of their diet (Fig.3).

Macroinvertebrate gut content analysis

The composition of macroinvertebrate gut content is given in Table S2. Macroinvertebrates were the only food consumed by *Rhyacophylla psp* and *E. octoculata*, constituting 100% of the gut contents in all specimens (Table S2). A small proportion of animal matter was found in all gut contents of *O. albicorne*, together with vegetal particles and rare diatoms (Table S2). Animal remains were scarce in *G. pulex*, *Isoperla ambigua* and *Leuctra psp*. Fine vegetal detritus and diatoms were the dominant components in *G. pulex*, *P. praecox* and *Leuctra psp* (> 60% of the gut contents; Table S2). Diatoms in *Ecdyonurus sp.* and *B. lutheri* represented a major part of the diet, with fine vegetal detritus making up the balance. Bryophyte remains were only found in small proportions (AI:11.7%) in *G. pulex* and one third

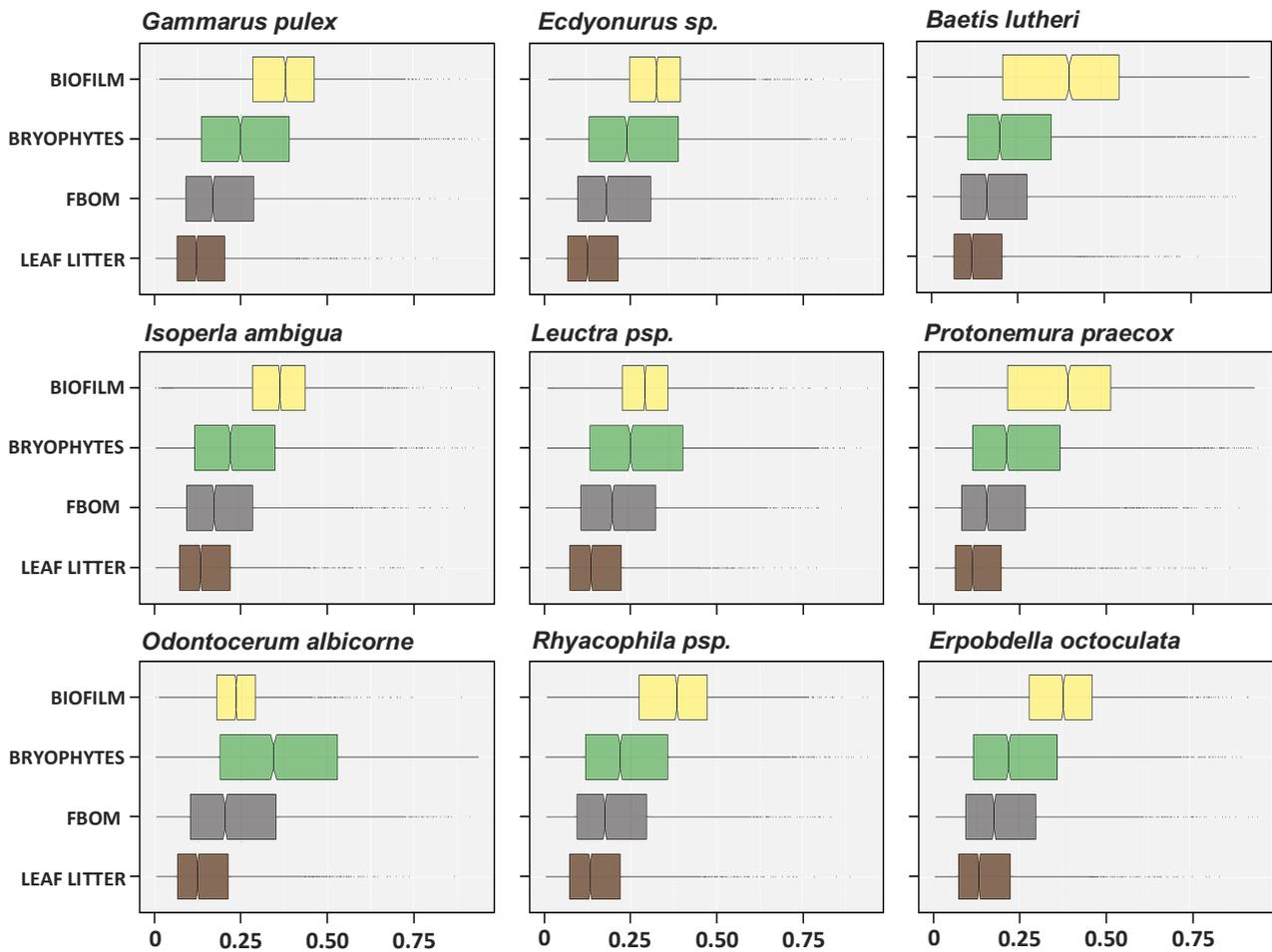


Fig. 3 Relative contribution of basal food sources to the core macroinvertebrate taxa. According to the Bayesian mixing model (SIAR). Boxplots represent 95% and 50% credible interval of basal sources assimilated by each macroinvertebrate. Each boxplot includes the centerline (median of the solutions) and the 25th and 75th quartiles of posterior distribution. For the two predators (*Erpobdella octoculata* and *Rhyacophila psp.*), boxplots represent the derived contribution of basal food sources via their main prey.

of the gut contents of *Leuctra psp.* and *P. praecox*. The shredder-predator *I. ambigua* ingested diatoms (AI: 37.6 %) and variable proportions of *Hydrurus* (AI: 46.4±40.2%).

FA profiles of basal organic sources

A total of 48 FAs was identified from the organic basal sources (Table 1). Epilithic biofilm had significantly (1-way Anova, $p < 0.05$) higher FA concentrations ($17.55 \pm 5.36 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ DM) than all other sources while FBOM ($1.74 \pm 0.90 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ DM) had the lowest (1-way Anova, $p < 0.05$). 16:0 was the most abundant ubiquitous FA observed in all sources, particularly in the biofilm where it constituted 34% ($6.08 \pm 2.43 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ DM) of total FAs. 14:0 was only a major FA in the biofilm (13% of total FAs). The contents of long-chain saturated fatty acids (LCFAs, $\text{C}_{25}\text{-C}_{28}$) were significantly higher in leaf litter and FBOM than in bryophytes and were not detected in the biofilm (Table 1). In contrast, the amounts of bacterial marker FAs (*cyclo* and *iso/anteiso* forms, (Grayston *et al.*, 2004)) were significantly higher in the biofilm (1-way Anova, $p < 0.05$) than in the FBOM and litter while they were rare or absent in the bryophytes (except *anteiso* 17:0; Table 1). The biofilm had the highest concentration of the diatom marker 16:1 ω 7 ($2.77 \pm 0.44 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ DM; 16.6% of total FA) and the leaf litter the lowest ($0.08 \pm 0.01 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ DM; 3% of total FA). A high ratio of 16:1 ω 7:16:0 reflects the importance of diatom taxa in a biomass of mixed microorganisms (Desvillettes *et al.*, 1997), and its calculated values here were significantly higher in the biofilm and FBOM (0.50 – 0.58) than in the bryophytes (0.27) and litter (0.16) (1-way Anova, $p < 0.05$). 18:1 ω 9 was the second most abundant monounsaturated FA (MUFA) in each food source with a significantly higher amount detected in the biofilm ($0.42 \pm 0.18 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ DM; 2.37% of total FA). The four sources had different polyunsaturated fatty acid (PUFAs) levels. PUFA levels were not statistically different between the bryophytes ($3.88 \pm 3.44 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ DM) and the biofilm ($2.78 \pm 1.02 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ DM), but were significantly higher than those detected in the FBOM ($0.16 \pm 0.08 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ DM) and leaf litter ($0.58 \pm 0.12 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ DM) (1-way Anova, $p < 0.05$). Although 18:3 ω 3, 18:2 ω 6, 20:4 ω 6 (ARA) and 20:5 ω 3 (EPA) were detected in the FBOM, their levels were low ($< 0.07 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ DM). No statistical differences were observed for the amount of 18:2 ω 6 and 18:3 ω 3 in the litter, bryophytes and biofilm (1-way Anova, $p > 0.05$). However, 18:3 ω 3 tended to be more abundant in the bryophytes and biofilm: $0.62 \pm 0.38 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ DM (10.19% of total FAs) and $0.65 \pm 0.43 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ DM (3.52% of total FAs) respectively (Table 1). Most of EPA was detected in similar levels in biofilm and bryophytes (0.61 ± 0.12 to $0.49 \pm 0.04 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ DM). Bryophytes were the main source of ARA ($0.54 \pm 0.01 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ DM; 11% of total FA), far ahead of the biofilm ($0.027 \pm 0.02 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ DM; 0.15% of total FA). Finally, PUFAs with 16 carbon atoms, such as the diatom markers 16:2 ω 4, 16:3 ω 4, 16:4 ω 1 (Taipale *et al.*, 2013), were found in significant quantities almost exclusively in the biofilm. They are absent or minimal in detrital sources, but

Fatty acids	Biofilm	Bryophytes	Litter	FBOM
12:0	0.21 ± 0.14 ^a		0.01 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.01 ^b
14:0	2.31 ± 0.87 ^a	0.17 ± 0.04 ^b	0.07 ± 0.02 ^c	0.05 ± 0.03 ^c
15:0	0.14 ± 0.05 ^a	0.02 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.01 ^b
16:0	6.08 ± 2.43 ^a	0.95 ± 0.15 ^b	0.55 ± 0.08 ^b	0.30 ± 0.15 ^c
17:0		0.05 ± 0.02 ^a	0.02 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.01 ^b
18:0	0.83 ± 0.54 ^a	0.12 ± 0.04 ^b	0.07 ± 0.02 ^b	0.10 ± 0.04 ^b
19:0			0.00 ± 0.00	
20:0	0.09 ± 0.03 ^a		0.08 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.03 ^a
22:0	0.08 ± 0.02 ^a	<i>tr</i>	0.28 ± 0.04 ^b	0.12 ± 0.07 ^a
24:0	0.13 ± 0.03 ^a	0.06 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.05 ^a
25:0			0.02 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.01 ^a
26:0		0.03 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.00 ^b	0.08 ± 0.04 ^b
27:0			0.02 ± 0.00	
28:0		0.07 ± 0.02 ^a	0.31 ± 0.02 ^b	0.11 ± 0.07 ^a
Total SFA	9.86 ± 4.03^a	1.48 ± 0.26^b	1.62 ± 0.18^b	0.96 ± 0.51^b
i15:0	0.32 ± 0.11 ^a		0.03 ± 0.01 ^b	0.03 ± 0.02 ^b
i16:0	0.12 ± 0.04 ^a	<i>tr</i>		0.01 ± 0.01 ^b
i17:0	0.15 ± 0.05 ^a		0.01 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^b
ai15:0	0.09 ± 0.03 ^a	<i>tr</i>	0.01 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.01 ^c
ai17:0		0.05 ± 0.02 ^a	0.01 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.01 ^c
cyclo15:0	0.10 ± 0.06			
Total Bacterial FA	0.78 ± 0.24^a	0.05 ± 0.02^b	0.06 ± 0.01^b	0.08 ± 0.04^b
16:1ω9	0.17 ± 0.08 ^a	0.09 ± 0.02 ^a	0.04 ± 0.02 ^b	0.03 ± 0.01 ^b
16:1ω7	2.77 ± 0.44 ^a	0.25 ± 0.03 ^b	0.08 ± 0.01 ^c	0.17 ± 0.09 ^b
16:1ω5	0.06 ± 0.02 ^a	0.02 ± 0.00 ^b	<i>tr</i>	0.02 ± 0.01 ^b
18:1ω9	0.42 ± 0.18 ^a	0.11 ± 0.04 ^b	0.16 ± 0.02 ^b	0.14 ± 0.06 ^b
18:1ω7	0.31 ± 0.12 ^a	0.09 ± 0.03 ^b	0.03 ± 0.01 ^c	0.07 ± 0.03 ^b
20:1ω9	0.05 ± 0.05			
20:1ω7	0.02 ± 0.04			<i>tr</i>
Total MUFA	3.80 ± 0.71^a	0.59 ± 0.06^b	0.33 ± 0.05^c	0.43 ± 0.21^{bc}
16:1ω7/16:0	0.50 ± 0.19^a	0.27 ± 0.04^b	0.16 ± 0.02^c	0.58 ± 0.03^a
16:2ω6	0.01 ± 0.02 ^a	0.01 ± 0.01 ^a		0.01 ± 0.00 ^a
16:2ω4	0.34 ± 0.06 ^a	0.03 ± 0.01 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	<i>tr</i>
16:3ω4	0.06 ± 0.03	<i>tr</i>		
16:3ω3	0.27 ± 0.09 ^a	0.11 ± 0.11 ^a		
16:4ω3	0.26 ± 0.21 ^a	0.04 ± 0.01 ^b	<i>tr</i>	<i>tr</i>
16:4ω1	0.11 ± 0.07 ^a	0.02 ± 0.00 ^b	<i>tr</i>	
18:2ω7		0.02 ± 0.00		
18:2ω6	0.30 ± 0.17 ^a	0.41 ± 0.35 ^a	0.29 ± 0.07 ^a	0.07 ± 0.04 ^b
18:3ω6	0.02 ± 0.00 ^a	0.08 ± 0.11 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.00 ^b
18:3ω3	0.65 ± 0.43 ^a	0.62 ± 0.38 ^a	0.26 ± 0.04 ^a	0.04 ± 0.02 ^b
18:4ω3	0.12 ± 0.04 ^a	0.03 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.01 ^b	0.01 ± 0.00 ^c
20:2ω6		0.73 ± 1.27		
20:3ω6		0.55 ± 0.89		
20:3ω3		0.03 ± 0.05		
20:4ω6	0.03 ± 0.02 ^a	0.54 ± 0.00 ^b		0.01 ± 0.00 ^c
20:4ω3		0.02 ± 0.01		
20:5ω3	0.61 ± 0.12 ^a	0.49 ± 0.04 ^a	0.01 ± 0.00 ^b	0.03 ± 0.01 ^c
22:2ω6		0.12 ± 0.20		
22:3ω3		0.01 ± 0.01		
22:4ω6		0.03 ± 0.04		
22:6ω3		<i>tr</i>		
Total PUFA	2.78 ± 1.03^a	3.88 ± 3.44^a	0.59 ± 0.12^b	0.16 ± 0.08^c
Total PUFA 16	1.05 ± 0.39^a	0.22 ± 0.12^b	0.00 ± 0.00^c	0.01 ± 0.01^d
Total ω3	1.91 ± 0.78^a	1.35 ± 0.58^a	0.28 ± 0.05^b	0.08 ± 0.03^b
Total ω6	0.36 ± 0.15^a	2.47 ± 2.87^b	0.30 ± 0.07^a	0.09 ± 0.05^d
Others fatty acids	0.33 ± 0.11^a	0.07 ± 0.01^b	0.20 ± 0.03^a	0.10 ± 0.06^b
Total fatty acids	17.55 ± 5.36^a	6.08 ± 3.78^b	2.80 ± 0.39^{bc}	1.74 ± 0.90^c

Table 1. Fatty Acid (FA) composition of total Lipid extracted from all basal organic sources sampled in the stream (Ruisseau d'Anglard). Values in $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ DM (mean \pm SD). SFA: Saturated FA. MUFA: mono-unsaturated FA. PUFA: Polyunsaturated FA. *i* and *ai*: *iso* and *anteiso* forms. Other fatty acids: hydroxy FA and methoxy FA co-eluting with impurities. Different letters indicate a significant difference between FA concentrations in basal sources (one-way Anova, p -values $< 0,05$).

some have been observed in bryophytes, notably 16:3 ω 3 which is a marker of *Viridiplantae* (Mongrand *et al.*, 1998).

Fatty acid profiles in macroinvertebrates

All the fatty acids identified in the neutral and polar lipids of the macroinvertebrate taxa are shown in supplementary Excel files (Tables S3 and S4). Overall, FA patterns in macroinvertebrates were consistent with data from previous studies by (Ghioni *et al.*, 1996; Sushchik *et al.*, 2003; Torres-Ruiz *et al.*, 2007; Descroix *et al.*, 2010). Among the selected FAs of interest, 18:3 ω 3, 18:2 ω 6 and EPA were the dominant PUFAs. 16:0 was the most important SFA, with the exception of *O. albicorne* and *E. octoculata* PLFAs, in which 18:0 was the most abundant. 18:1 ω 9 dominated MUFAs in both lipid classes, except in the NLFAs from *Ecdyonurus sp.* and *B. lutheri* where 16:1 ω 7 was predominant. Consistent with previous studies (Sushchik *et al.*, 2003; Descroix *et al.*, 2010), ARA amounts were quite low and overall higher in PLFAs, as this compound is mainly integrated into cell membranes (Monroig & Kabeya, 2018). While DHA was detected only in *G. pulex*, and the NLFAs from *I. ambigua* and *P. praecox*, low levels of 16:2 ω 4 and 16:3 ω 3 were found in all macroinvertebrate NLFAs, but were absent from the PLFAs of most of the taxa. Finally, all taxa contained bacterial FAs in their neutral lipids, with particularly significant levels in *Leuctra psp.*, *G. pulex*, *Ecdyonurus sp* and *Rhyacophyla psp.*

Stable isotope signatures of fatty acids

The detected $\delta^{13}\text{C}$ values of the specific selected FAs in food sources and in macroinvertebrate NLFAs and PLFAs are shown in Tables 2 and 3. Their expected $\delta^{13}\text{C}$ values calculated as a function of the proportional intake of each assimilated food source (according to the SIAR model) are also given. All FAs in the biofilm were significantly more enriched in ^{13}C than FAs from other basal sources (1-way Anova, $p < 0.05$). The most enriched $\delta^{13}\text{C}$ signatures ranged from $-13.07 \pm 0.98 \text{ ‰}$ for 16:1 ω 7 to $-18.64 \pm 3.21 \text{ ‰}$ for 16:3 ω 3 (Table 2). Only the values for 18:1 ω 9 ($-23.07 \pm 0.98 \text{ ‰}$), 18:3 ω 3 ($-20.64 \pm 2.05 \text{ ‰}$) and 18:2 ω 6 (-19.31 ‰) were below -19 ‰ (Tables 2 and 3). No specific trends were observed for the isotopic signatures of FAs from other sources. In the bryophytes, ARA and EPA were significantly depleted in ^{13}C (1-way Anova, $p < 0.05$) (-34.87 ‰ and -32.88 ‰) and showed signatures of -28.69 ‰ to -27.23 ‰ when detected in leaf litter and FBOM (Table 3). Other FA signatures tended to be slightly enriched in FBOM, with $\delta^{13}\text{C}$ values ranging from $-27.52 \pm 0.28 \text{ ‰}$ (16:1 ω 7) to $-31.64 \pm 0.50 \text{ ‰}$ (18:3 ω 3) (Tables 2 and 3). No clear trend was detected for the

leaf litter and bryophytes and most FA signatures were depleted in ^{13}C (from -35.92‰ to -30.27‰) compared to FBOM. In terms of the macroinvertebrates, no statistical difference could be found between FA $\delta^{13}\text{C}$ values in NLFAs and PLFAs, except for 16:0, 16:1 ω 7 and 18:1 ω 9 in *Ecdyonurus sp.* which were ^{13}C depleted in PLFAs relative to NLFAs (t-test, $p < 0.05$) (Table 2 and 3). This was also the case for 16:2 ω 4 in *P. praecox* and for 16:3 ω 3 in *I. ambigua*. We note that the 18:2 ω 6 $\delta^{13}\text{C}$ values in all macroinvertebrate NLFAs and PLFAs matched well with the calculated values ($-2.56\text{‰} < \delta < 0.24\text{‰}$). This is also true for 18:3 ω 3, for which only the signatures for *G. pulex* PLFAs ($-32.41 \pm 3.15\text{‰}$) and *P. praecox* NLFAs ($-32.37 \pm 0.49\text{‰}$) and PLFAs ($-32.84 \pm 0.42\text{‰}$) appeared to be more ^{13}C depleted than the calculated values ($\delta < -3.20\text{‰}$). The observed $\delta^{13}\text{C}$ values of 16:0 and 18:1 ω 9 (Table 2) matched well with the values from the model, except for *B. lutheri* (both lipid classes) and *Ecdyonorus* NLFAs, in which the $\delta^{13}\text{C}$ signatures were substantially more enriched than expected ($3.34\text{‰} < \delta < 6.31\text{‰}$). Calculated $\delta^{13}\text{C}$ values of ARA (Table 3) do not match the observed ARA $\delta^{13}\text{C}$ signatures in NLFAs and PLFAs from *Rhyacophyla psp.*, *P. praecox*, *Leuctra psp.* and in *Ecdyonorus* PLFAs ($\delta < -3.27\text{‰}$). Only the observed EPA $\delta^{13}\text{C}$ signatures in both lipid classes from *Rhyacophyla psp.*, *B. lutheri* and *Ecdyonorus* and in *Erpobdella* NLFAs corresponded well to the expected $\delta^{13}\text{C}$ values from the model (Table 3). In *B. lutheri* and *Ecdyonorus sp.*, EPA observed values were enriched in ^{13}C ($-26.21 \pm 0.81\text{‰}$ and $-26.00 \pm 1.17\text{‰}$ respectively) compared to other taxa. No agreement was found between the calculated and observed $\delta^{13}\text{C}$ signatures for 16:3 ω 3 ($-8.97\text{‰} < \delta < -4.62\text{‰}$) for the chemotaxonomic markers (Table 2).. Given the highly depleted macroinvertebrate values (from -33.04‰ to -27.71‰), this FA could obviously not have originated from the biofilm, whose $\delta^{13}\text{C}$ value for 16:3 ω 3 was $-18.64 \pm 3.21\text{‰}$. For most of the taxa, the $\delta^{13}\text{C}$ signatures of 16:1 ω 7 were more ^{13}C depleted than the values proposed by the model. On the other hand, the values measured in NLFAs and PLFAs from *B. lutheri* (-22.25‰ and -22.82‰) and *Ecdyonorus sp.* (-23.21‰ and -25.60‰) were fully consistent with the model values. A less clear match was also found in NLFAs from *Isoperla ambigua* ($-26.83 \pm 0.66\text{‰}$) and *Rhyacophyla psp.* ($-27.90 \pm 0.94\text{‰}$) (Table 3). Lastly, with the exception of *O. albicorne* NLFAs, the $\delta^{13}\text{C}$ signatures for 16:2 ω 4 in all taxa were quite from those found by the model. The values were all depleted in ^{13}C and only matched for *Ecdyonorus sp.* (both lipid classes) and NLFAs from *G. pulex* and *B. lutheri* ($-3.11\text{‰} < \delta < -2.60\text{‰}$).

Table 2. $\delta^{13}\text{C}$ values (mean \pm SD) of five specific FA in the basal sources and NLFAs and PLFAs of the 9 macroinvertebrate taxa. In addition, expected $\delta^{13}\text{C}$ values for these FA are shown. Expected values were calculated according to the proportions of food assimilated by each taxa as obtained from the SIAR Bayesian model (equation II). Δ represents the difference between an observed $\delta^{13}\text{C}$ value and the corresponding $\delta^{13}\text{C}$ value from the model. A green symbol indicates a value of Δ in the range of $\pm 3, 17\%$. A yellow symbol indicates a value of Δ greater than $+ 3, 17\%$ and the red one indicates a value less than -3.17% . For basal sources, different letters indicate statistical differences in isotopic signature (One Way Anova; $p < 0.05$). For each macroinvertebrate, the symbol * indicates a significant difference in isotopic signature between NLFAs and PLFAs.

Samples	16:0			16:1w7			16:2w4			16:3w3			18:1w9		
	$\delta^{13}\text{C}$ value	Expected $\delta^{13}\text{C}$	Δ												
Basal sources															
Biofilm	-17.61 \pm 1.17	-27.42	-0.98	-13.07 \pm 0.98	-23.01	-5.13	-16.86 \pm 2.40	-23.61	-2.60	-18.64 \pm 3.21	-23.38	-7.31	-23.89 \pm 2.12	-27.92	-4.03
Bryophyte	-33.13 \pm 0.35	-27.89	3.92	-27.59 \pm 0.83	-23.51	0.30	-27.23 \pm 1.77	-23.91	-3.11	-29.48 \pm 3.36	-23.62	-4.62	-30.27 \pm 2.19	-28.12	-2.10
Leaf litter	-35.92 \pm 0.05	-27.03	4.53	-32.20 \pm 0.45	-22.64	0.30	-27.05 \pm 0.00	-23.31	-2.97		-22.99	-4.72	-32.15 \pm 0.41	-27.76	-4.39
FPOM	-30.65 \pm 0.17	-27.43	-0.04	-27.52 \pm 0.26	-23.07	-5.46	-27.99 \pm 0.00	-23.60	-6.12		-23.16	-9.88	-28.73 \pm 0.34	-27.94	-0.79
Consumers - NLFA															
<i>Gammarus pulex</i>	-28.40 \pm 0.25	-27.20	0.05	-28.14 \pm 0.30	-23.95	-2.88	-26.20 \pm 0.85	-23.61	-2.60	-30.69 \pm 0.50	-23.38	-7.31	-28.22 \pm 0.83	-27.92	-0.30
<i>Ecdyonurus</i> sp.	-23.97 \pm 0.77	-27.20	0.05	-23.21 \pm 0.59	-23.51	0.30	-27.02 \pm 2.73	-23.91	-3.11	-28.24 \pm 0.08	-23.62	-4.62	-24.78 \pm 0.16	-28.12	3.34
<i>Baetis lutheri</i>	-22.50 \pm 1.07	-27.03	4.53	-22.35 \pm 0.02	-22.64	0.30	-26.28 \pm 1.44	-23.31	-2.97	-27.71 \pm 2.55	-22.99	-4.72	-21.44 \pm 3.15	-27.76	6.31
<i>Leuctra</i> psp.	-27.48 \pm 0.10	-27.43	-0.04	-28.53 \pm 0.17	-23.07	-5.46	-29.72 \pm 0.60	-23.60	-6.12	-33.04 \pm 0.05	-23.16	-9.88	-27.61 \pm 0.65	-27.94	0.33
<i>Isoperla ambigua</i>	-26.15 \pm 0.12	-28.32	2.18	-26.83 \pm 0.66	-23.95	-2.88	-29.34 \pm 1.40	-24.23	-5.11	-31.00 \pm 1.10	-23.94	-7.07	-26.70 \pm 0.64	-28.31	1.61
<i>Protonemura praecox</i>	-27.15 \pm 0.24	-27.20	0.05	-27.38 \pm 0.24	-22.79	-4.59	-28.87 \pm 0.16	-23.44	-5.42	-32.16 \pm 0.63	-23.20	-8.97	-27.84 \pm 0.85	-27.84	0.00
<i>Rhyacophila</i> psp.	-28.76 \pm 1.43	-29.23	0.48	-27.90 \pm 0.94	-24.81	-3.09	-23.60 \pm 0.26	-25.53	1.94	-32.60 \pm 0.49	-25.11	-7.50	-28.57 \pm 0.79	-28.66	0.09
<i>Odontocerum albicorne</i>	-27.54 \pm 1.16	-27.28	-0.26	-26.82 \pm 2.12	-22.93	-3.89	-27.20 \pm 3.64	-23.51	-3.69	-31.78 \pm 1.77	-23.00	-8.78	-28.31 \pm 1.80	-27.87	-0.43
<i>Erbodella octoculata</i>	-26.44 \pm 0.32	-27.35	0.91	-27.01 \pm 0.74	-22.99	-4.02	-	-	-	-	-	-	-27.26 \pm 0.08	-27.90	0.64
Consumers - PLFA															
<i>Gammarus pulex</i>	-28.15 \pm 0.19	-27.42	-0.73	-27.46 \pm 0.45	-23.01	-4.45	-	-23.61	-	-	-23.38	-	-27.66 \pm 0.88	-27.92	0.26
<i>Ecdyonurus</i> sp.	-26.55 \pm 1.66	-27.89	1.34	-25.60 \pm 0.84	-23.51	-2.09	-26.04 \pm 0.07	-23.91	-2.13	-	-23.62	-	-27.67 \pm 0.77	-28.12	0.45
<i>Baetis lutheri</i>	-23.20 \pm 1.95	-27.03	3.83	-22.82 \pm 0.17	-22.64	-0.18	-26.74 \pm 0.26	-23.31	-3.43	-	-22.99	-	-23.21 \pm 5.09	-27.76	4.55
<i>Leuctra</i> psp.	-27.03 \pm 0.99	-27.43	0.40	-28.88 \pm 1.45	-23.07	-5.81	-	-23.60	-	-	-23.16	-	-28.80 \pm 0.64	-27.94	-0.86
<i>Isoperla ambigua</i>	-27.39 \pm 1.66	-28.32	0.93	-28.06 \pm 3.24	-23.95	-4.11	-28.98 \pm 0.00	-24.23	-4.75	-28.73	-23.94	-4.79	-28.39 \pm 1.17	-28.31	-0.08
<i>Protonemura praecox</i>	-28.09 \pm 0.45	-27.20	-0.89	-27.88 \pm 0.03	-22.79	-5.09	-32.49 \pm 0.97	-23.44	-9.04	-	-23.20	-	-28.84 \pm 0.49	-27.84	-1.00
<i>Rhyacophila</i> psp.	-28.98 \pm 1.62	-29.23	0.26	-28.48 \pm 1.65	-24.81	-3.66	-	-25.53	-	-	-25.11	-	-29.00 \pm 0.59	-28.66	-0.34
<i>Odontocerum albicorne</i>	-28.19 \pm 0.40	-27.28	-0.91	-27.98 \pm 0.42	-22.93	-5.05	-	-23.51	-	-	-23.00	-	-29.37 \pm 0.69	-27.87	-1.50
<i>Erbodella octoculata</i>	-25.72 \pm 0.87	-27.35	1.64	-28.04 \pm 0.71	-22.99	-5.05	-	-	-	-	-	-	-27.74 \pm 1.41	-27.90	0.16

Table 3. $\delta^{13}\text{C}$ values (mean \pm SD) of four essential FAs in the basal sources and NLFAs and PLFAs of the 9 macroinvertebrate taxa. In addition, expected $\delta^{13}\text{C}$ values for these FAs are shown. Expected values were calculated according to the proportions of food assimilated by each taxa as obtained from the SIAR Bayesian model (equation II). See Table 2 for details of the legends.

Samples	18:2 ω 6			18:3 ω 3			20:4 ω 6			20:5 ω 3		
	$\delta^{13}\text{C}$ value	Expected $\delta^{13}\text{C}$	Δ									
Basal sources												
Biofilm	-19.31			-20.64 \pm 2.05	Expected $\delta^{13}\text{C}$		-15.23 \pm 0.76	Expected $\delta^{13}\text{C}$		-15.97 \pm 1.45	Expected $\delta^{13}\text{C}$	
Bryophyte	-34.30 \pm 0.10			-35.07 \pm 0.27			-34.87 \pm 0.85			-32.88 \pm 0.28		
Leaf litter	-33.04 \pm 0.23			-35.55 \pm 0.06			-			-27.23 \pm 0.05		
FPOM	-31.14 \pm 2.09			-31.64 \pm 0.50			-28.69			-27.71 \pm 2.64		
Consumers - NLFAs												
<i>Garmarus pulex</i>	-28.15 \pm 0.05	-28.03	0.12	-31.32 \pm 0.26	-29.21	2.11	-28.81 \pm 0.18	-27.93	0.88	-28.28 \pm 0.14	-24.84	3.44
<i>Ecdyonurus</i> sp.	-29.45 \pm 0.13	-28.41	1.04	-29.22 \pm 0.45	-29.60	0.38	-29.06 \pm 0.77	-26.58	2.48	-26.00 \pm 1.17	-25.18	0.82
<i>Baetis lutheri</i>	-27.41 \pm 0.17	-27.64	0.24	-27.95 \pm 0.43	-28.85	0.90	-27.28 \pm 0.79	-26.52	0.77	-26.21 \pm 0.81	-24.40	1.81
<i>Leuctra</i> sp.	-28.55 \pm 0.18	-27.98	0.57	-31.21 \pm 0.26	-29.19	2.03	-28.88 \pm 0.21	-25.58	3.30	-29.07 \pm 0.06	-24.71	4.36
<i>Isoperla ambigua</i>	-27.30 \pm 0.41	-28.80	1.50	-30.28 \pm 0.14	-29.98	0.30	-27.94 \pm 0.22	-27.01	0.93	-28.96 \pm 0.25	-25.57	3.39
<i>Protonemura praecox</i>	-29.57 \pm 0.51	-27.83	1.74	-32.37 \pm 0.49	-29.02	3.35	-30.58 \pm 2.54	-26.09	4.49	-30.60 \pm 0.11	-24.62	5.98
<i>Rhyacophila</i> sp.	-28.55 \pm 0.05	-29.72	1.17	-30.55 \pm 0.67	-30.84	0.29	-29.80 \pm 0.52	-25.22	4.58	-29.16 \pm 0.97	-26.64	2.52
<i>Odontocerum albicorne</i>	-28.54 \pm 1.12	-27.84	0.70	-31.40 \pm 1.19	-29.05	2.35	-29.29 \pm 0.68	-29.98	0.68	-28.85 \pm 2.58	-24.55	4.30
<i>Erpobdella octoculata</i>	-27.98 \pm 0.31	-27.91	0.07	-30.24 \pm 0.16	-29.12	1.12	-26.73 \pm 0.23	-25.57	1.16	-27.78 \pm 0.01	-24.64	3.14
Consumers - PLFAs												
<i>Garmarus pulex</i>	-28.45 \pm 0.19	-28.03	0.42	-32.41 \pm 1.04	-29.21	3.20	-29.26 \pm 0.24	-27.93	1.34	-28.49 \pm 0.33	-24.84	3.65
<i>Ecdyonurus</i> sp.	-30.97 \pm 1.11	-28.41	2.56	-31.31 \pm 0.31	-29.60	1.71	-29.85 \pm 0.36	-26.58	3.27	-28.30 \pm 1.06	-25.18	3.12
<i>Baetis lutheri</i>	-27.29 \pm 0.87	-27.64	0.35	-27.62 \pm 0.20	-28.85	1.23	-27.48 \pm 1.45	-26.52	0.96	-26.66 \pm 0.90	-24.40	2.26
<i>Leuctra</i> sp.	-29.15 \pm 0.78	-27.98	1.18	-31.89 \pm 0.69	-29.19	2.70	-29.00 \pm 0.64	-25.58	3.42	-28.47 \pm 0.71	-24.71	3.77
<i>Isoperla ambigua</i>	-28.82 \pm 0.82	-28.80	0.02	-31.77 \pm 0.98	-29.98	1.79	-28.78 \pm 0.44	-27.01	1.77	-29.79 \pm 0.92	-25.57	4.22
<i>Protonemura praecox</i>	-30.19 \pm 0.57	-27.83	2.37	-32.84 \pm 0.42	-29.02	3.82	-31.49 \pm 1.55	-26.09	5.40	-30.47 \pm 0.62	-24.62	5.85
<i>Rhyacophila</i> sp.	-28.72 \pm 0.57	-29.72	1.00	-31.16 \pm 1.15	-30.84	0.32	-30.65 \pm 1.19	-25.22	5.42	-29.54 \pm 1.12	-26.64	2.90
<i>Odontocerum albicorne</i>	-29.76 \pm 0.28	-27.84	1.92	-32.19 \pm 0.42	-29.05	3.14	-28.97 \pm 0.13	-29.98	1.01	-29.87 \pm 0.99	-24.55	5.31
<i>Erpobdella octoculata</i>	-28.27 \pm 0.68	-27.91	0.36	-30.30 \pm 1.16	-29.12	1.19	-27.23 \pm 0.40	-25.57	1.66	-28.03 \pm 0.37	-24.64	3.39

Discussion

This study, undertaken in the early spring, allowed us to characterize the functioning of the trophic network, composed of the core macroinvertebrate taxa, and to highlight determine the flow of matter and specific fatty acids from basal sources to consumers and predators. The food web structure has been established, including the trophic positions and levels that are central to theories of stream ecosystems functioning (Power & Dietrich, 2002). In this context, the selection of FBOM as a relevant baseline was crucial (Anderson & Cabana, 2007). The stream FBOM contained LCFA (C₂₅-C₂₈) typical of leaf litter (Torres-Ruiz & Wehr, 2010) together with ARA and EPA and a high level of 16:1 ω 7, creating a high ratio 16:1 ω 7:16:0, all typical indicators of the presence of diatoms (Webb-Robertson *et al.*, 2011; Taipale *et al.*, 2013). The FBOM thus combined allochthonous material (fine leaf fragments) and autochthonous material (diatoms) associated to fragments, (Crenier, Arce-Funck, *et al.*, 2017), and its low $\delta^{15}\text{N}$ similar to that of epilithic biofilm made FBOM a relevant baseline (Lake *et al.*, 2019).

Trophic structure

We assigned TP 1 to the FBOM, and from this baseline the macroinvertebrates were divided into three trophic groups independent of their FFG, apart from the predators *Rhyacophila psp.* and *Erpobdella octoculata*, which occupied the highest trophic level of TP 4. Leeches *E. octoculata* are documented in the literature as being strict predators (Toman & Dall, 1997), and the high trophic positions of the genus *Rhyacophila* linked to carnivorous behaviour has been observed in several streams (Céréghino, 2002; Anderson & Cabana, 2007). The high trophic position (TP3) and diet of *Isoperla ambigua* were consistent with the feeding habits of genus *Isoperla* in Europe. Larvae of related species (i.e., *I. acicularis*) are usually carnivorous but are also known to ingest large quantities of diatoms and *Hydrurus* in early spring (Lavandier, 1982; Céréghino, 2006; Bottová *et al.*, 2013). The trophic level of the primary consumers was occupied by two distinct groups. The highest group (TP2) was not very consistent with the FFG of the taxa present, *Leuctra psp.* (shredder) and the two mayflies *Baetis lutheri* and *Ecdyonurus sp* (scrapers) were all characterised by a dietary plasticity. In small high-altitude streams *Leuctridae* are either shredders or collector-gatherers, feeding on a variety of items including animal prey (Bottová *et al.*, 2013). In this study, dietary animal matter and especially dietary bryophytes enriched in ¹⁵N (3.46 ± 0.49 ‰) can explain the high value of *Leuctra* TP (2.94). Benthic algae and organic particles in the diets of *Baetidae* (*B. lutheri*) and *Heptageniidae* (*Ecdyonurus*) have been well documented (Wögerbauer & Kelly-Quinn, 2013). However, their ability to collect particles does not explain their relatively high

$\delta^{15}\text{N}$, a feature frequently reported in the literature (Mulholland et al., 2000; Anderson & Cabana, 2007) and which could be attributed to the ingestion of meiofaunal invertebrates (Majdi & Traunspurger, 2017). In the second group, three shredders *G. pulex*, *P. praecox* and *O. albicorne* occupied the lowest trophic level, below TP 2 (1.81 to 1.87). *G. pulex* and *P. praecox* had a plastic diet; classified as detritus feeders, both species actually function as generalists in headwater streams or acid streams (Dangles, 2002; Felten et al., 2008; Feeley & Kelly-Quinn, 2015). The *Odontocerum*'s low TP does not reflect their gut contents which are rich in animal matter. This species usually feed abundantly on vegetal and animal matter (Décamps, 1968; Dumont & Verneaux, 1976; Dangles, 2002). As most of our larvae were at instars IV to V, it is possible that a selective assimilation of ^{15}N occurred (Dodds et al., 2014), since in some case-bearing trichopteran, the last instars accumulate carbon molecules (i.e., glycogen) instead of proteins (Hoppeler et al., 2018). In the spring, the trophic structure of the main taxa in this stream was somewhat more complex than that described in alpine non-glacial headwater streams (Di Cugno & Robinson, 2017). Here, the invertebrates occupied a level between those of the primary consumers and the specialized predators ($2 < \text{TP} < 3$), the former being mostly generalist feeders, capitalizing on available food resources. This trophic structure questions the categorization of the invertebrate fauna into defined groups (FFG) in headwater streams, particularly since the SIAR model indicated that there were few inter-taxa variations in basal source assimilation.

Contribution of basal sources to consumers

Our Bayesian approach, recommended by Niedrist & Füreder (2017) for high-altitude streams, identified three dominant energy pathways, i.e. autochthonous sources: epilithic biofilms and bryophytes; and a primarily allochthonous source: FBOM. The SIAR model highlights the low contribution of beech leaf litter to macroinvertebrates in this stream (less than 17% of the assimilated organic matter). Beech leaves have been reported to be recalcitrant and are only palatable after a long conditioning period and the onset of microbial decomposition (Dangles, 2002; Dangles & Chauvet, 2003). In addition, where the tree species is monospecific, beech litter has limited decomposition rates in forested streams and contains seven-fold less shredders than deposits of other leaf species (Dangles, 2002; Sanpera-Calbet et al., 2009). Our litter FA composition, in particular its high content of LCFA and 18 C PUFAs was indicative of in-stream leaves that had been poorly decomposed (Torres-Ruiz & Wehr, 2010; Mueller et al., 2012). In contrast, the SIAR output clearly showed that, for most taxa analysed, the contribution of epilithic biofilms tended to prevail over other basal sources. These results are consistent with recent stream and experimental studies, which have demonstrated the importance, often minimised, of autochthonous primary producers as carbon sources for

invertebrates (Torres-Ruiz *et al.*, 2007; Twining *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018; Kühmayer *et al.*, 2020). Most importantly, our study clearly shows that consumers relied on bryophytes as a second source of dietary carbon (25-29%). Recent research has indicated that mosses seem to constitute an important food source for certain invertebrates in streams or rivers (Dangles, 2002; Kalachova *et al.*, 2011; Niedrist & Füreder, 2017). Lastly, all primary consumers received 20 to 24% of their diet from detrital particles and associated microorganisms (FBOM). In agreement with (Torres-Ruiz & Wehr, 2019), fine detrital sources are a contribution in the matter flow that should not be minimised, especially since particles of terrestrial origin are often trapped in the biofilm matrix (Roche *et al.*, 2016) and are likely ingested at the same time as epilithic algae by grazers (Rasmussen, 2010; Niedrist & Füreder, 2017). The predatory taxa displayed a similar proportion of basal sources, close to that of primary consumers with low TP. These proportions were probably derived from the predominant ingestion of prey such as *P. praecox* and *B. lutheri*, since in small mountain streams *Nemouridae* and *Baetidae*, which are highly sensitive to predation (Khamis *et al.*, 2015), are frequently recorded in the gut of *Rhyacophila* and *Isoperla* (Berthélemy & Lahoud, 1981; Céréghino, 2002; Dangles, 2002).

Origin and assimilation of the main selected fatty acids

Considering that most of the energy channelled to the main taxa came from autochthonous organic matter, it is reasonable to assume that most of the FAs and PUFAs were obtained from biofilm algae or even bryophytes. Recently, an experiment involving two different organic sources, and using CSIA of fatty acids, showed that EPA was directly absorbed by two macroinvertebrate species only from microalgae (Kühmayer *et al.*, 2020). However, tracing the origin of FAs involving the results of CSIA can be a challenge when basal sources have relatively similar carbon isotope fractionations (Bec *et al.*, 2011). Moreover, it is well established that the transmission of an FA $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio from a source to an invertebrate is accompanied by a depletion in ^{13}C (Twining *et al.*, 2020). In rivers the depletion ($\Delta\delta^{13}\text{C}$) is usually in the range of -1.3 ‰ to -3.6 ‰ (Gladyshev *et al.*, 2012, 2014). In this study, the difference in $\delta^{13}\text{C}$ between the EPA of biofilm and the EPA of *B. lutheri* NLFAs, for example, is much higher, i.e. -10.25 ‰. Conversely, calculated with respect to bryophytes, the $\delta\delta^{13}\text{C}$ reflects a net ^{13}C enrichment in *B. lutheri* EPA (+6.66 ‰), contrary to the rule of ^{13}C depletion during FA assimilation (Hayes, 2001). Therefore, the average value of EPA $\delta^{13}\text{C}$ in *B. lutheri* resulted from a combination of EPAs from several sources. This rationale is also relevant to other FAs and taxa in this study. We designed our analysis model with the objective of focussing on the contribution of different sources to the main specific FA intake for each taxon. Based on the contributions from SIAR, it should be noted that the model does not consider the potentially different FA concentrations within organic sources. Indeed, the SIAR model

assumes that the contribution from a food source to a consumer includes all organic compounds (Phillips & Koch, 2002). Thus, we are aware that estimates of the proportional contribution of sources could be biased for certain FA towards one source or the other. However, Wang et al., (2015) found little difference between estimates from concentration-dependent models and concentration-independent models. Our model clearly indicates that 16:0, 18:1 ω 9, 18:3 ω 3 and 18:2 ω 6 were assimilated into macroinvertebrates in accordance with the contribution of the different basal sources to their diet. Since these ubiquitous FAs (Descroix *et al.*, 2010) were abundant in each basal source and in most invertebrates present in this stream, this is a logical result. Nevertheless, 16:0 and 18:1 ω 9 appeared to be more enriched in ^{13}C than expected in *Ecdyonurus* and *Baetis*, reflecting a marked influence of epilithic biofilm on their origin. For all other specific FAs, the tendency of these two mayflies to forage on the biofilm and preferentially obtain their FAs from algae was confirmed. Thus, for 16:1 ω 7, 16:2 ω 4 and EPA, mainly produced by diatoms in stream (Torres-Ruiz *et al.*, 2007; Taipale *et al.*, 2013), the values measured in both species were enriched in ^{13}C in line with the expected values, and even higher for 16:1 ω 7 (from -25.60 ‰ to -22.35 ‰). For other taxa, there was a trend towards a depletion compared to the $\delta^{13}\text{C}$ found by the model, clearly indicating a lesser influence of biofilm in the contribution of these FAs. Similarly, to the mayflies, the $\delta^{13}\text{C}$ values in *Rhyacophila psp.* matched those of the model for EPA, 16:2 ω 4 and for 16:1 ω 7 in NLFAs. This confirms that these trichoptera preyed at least on *B. lutheri*, since they seem to obtain part of their FAs from these *Baetidae*. The 16:3 ω 3 signature of -29.48 ± 3.36 ‰ in bryophytes and -33.04 ‰ to -30.69 ‰ in macroinvertebrates (except for mayflies), appeared to originate mainly from mosses, assuming the classic trophic fractionations observed (-3.56 to -1.21 ‰) during assimilation. This tends to confirm the assimilation of bryophytes by primary consumers, as 16:3 ω 3 has only been detected in biofilm and bryophytes. Regarding EPA and ARA, these essential PUFAs are naturally absent from terrestrial allochthonous sources (Mueller *et al.*, 2012). Thus, detection of EPA in litter and of EPA and ARA in FBOM was due to diatoms that developed on leaf surfaces (Crenier *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018), or that were associated with leaf detritus (Torres-Ruiz & Wehr, 2019). ARA and EPA were markedly depleted in ^{13}C in bryophytes and the different ^{13}C enrichments observed in the other sources reflected a difference in the photosynthetic activity of microalgae probably related to their different exposure to solar light (Treignier *et al.*, 2009). On the whole, the ARA origin was consistent with the model, with the exception of *P. praecox* and *Leuctra psp.*, in which the depleted values of $\delta^{13}\text{C}$ likely confirm a greater contribution of ARA from bryophytes. Except for the two mayfly species and *Rhyacophyla*, EPA was always more depleted in ^{13}C than predicted for the other taxa. The assumption would therefore be a greater intake of EPA via bryophytes, but we cannot exclude that a significant portion of EPA has been selectively recovered from diatoms associated with allochthonous material. Trophic

fractionation was indeed only -1.05 ‰ to -3.24 ‰ between the EPA signatures in FBOM or litter and those EPA in the invertebrates concerned, which corresponds to the $\Delta\delta^{13}\text{C}$ range usually observed in rivers (Gladyshev *et al.*, 2012).

Implications for the stream food web functioning

Our study demonstrates that in early spring non-predatory macroinvertebrates feed predominantly on primary producers and fine detritus, and sporadically on leaf litter. The slow processing of beech litter input from the riparian banks implies access to alternative food resources at the end of winter. In this small headwater stream, the spring period is indeed essential for all taxa except leeches, for which references are lacking. An overview of the literature concerning the development patterns of the plecopteran, ephemeropteran and trichopteran taxa present in our sampled stream indicates a resumption of growth rates in April, followed by early emergence (*Leuctra*, *Isoperla*) or emergence extending from May to July for the other species (Lavandier, 1982; Céréghino, 2002; Kozáčková *et al.*, 2009; Bottová *et al.*, 2013). In line with Mihuc (1997), Dangles (2002) and Richardson (2019) we also demonstrated that trophic linkage is maintained independently of FFG by non-specialised taxa. Enhanced availability of epilithic and epixylic microalgae during the opening of the canopy explains the feeding plasticity of invertebrates that may be shredders or strictly predatory in other seasons. Most importantly, all our results indicate that macroinvertebrates consume bryophytes whenever they are abundant, confirming previous studies by (Torres-Ruiz *et al.*, 2007) and (McWilliam-Hughes *et al.*, 2009). The feeding of arthropods on bryophytes is, though, somewhat controversial because mosses can produce repellent pre-ingestive compounds (acetylenic FAs, ethyl amyl ketones) (Haines & Renwick, 2009; Lu *et al.*, 2019). However, these defence mechanisms are species-specific and were apparently ineffective here, as observed with amphipods and aquatic isopods feeding on the moss *Fontinalis* (Parker *et al.*, 2007). Two trends on the origin and transfer of FAs in this first-order stream emerge from the CSIA analysis. The first trend is that most common FAs (i.e. 16:0, MUFA, essential 18:3 ω 3 and 18:2 ω 6) are derived from major organic sources proportionally relative to their assimilation by macroinvertebrates. The second trend is that long PUFAs i.e., ARA and EPA were obtained only from autochthonous sources, including microalgae associated with litter or FBOM, through flexible feeding strategies. Our results also suggest that predators such as *Rhyacophila psp.*, by ingesting those taxa most in contact with autochthonous sources (*B. lutheri*), can meet their PUFA requirements but that they may also, like *Isoperla ambigua*, directly retrieve these compounds by ingesting diatoms or developing *Hydrurus* thallus. Consistent with the recent work of Twining *et al.* (2017), Guo *et al.* (2018) and Torres-Ruiz & Wehr (2019), our study shows that although the functional plasticity of macroinvertebrates in headwater streams

allows them to cope with most of the palatable resources, they are nevertheless highly dependent on autochthonous primary production for their long PUFA requirement.

Acknowledgments

We thank Clermont Auvergne University, CNRS and the water agency from Loire-Bretagne. We thank also Mrs Frances Van Wyk de Vries for English correction of the article and the reviewers for their comments.

References

- Aguilar, V., Racotta, I.S., Goytortúa, E., Wille, M., Sorgeloos, P., Civera, R., & Palacios, E., 2012. The influence of dietary arachidonic acid on the immune response and performance of Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at high stocking density. *Aquac Nutr* 18: 258–271.
- Ahlgren, G., Vrede, T., & Goedkoop, W., 2009. Fatty acid ratios in freshwater fish, zooplankton and zoobenthos—are there specific optima? In *Lipids in aquatic ecosystems*. Springer, pp. 147–178.
- Allan, J.D. & Castillo, M.M., 2007. Stream ecology: structure and function of running waters, Springer Science & Business Media.
- Anderson, C. & Cabana, G., 2007. Estimating the trophic position of aquatic consumers in river food webs using stable nitrogen isotopes. *J North Am Benthol Soc* 26: 273–285.
- Bec, A., Perga, M., 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.
- Berthélemy, C. & Lahoud, M., 1981. Régimes alimentaires et pièces buccales de quelques Perlodidae et Perlidae des Pyrénées [Plecoptera]. In *Annales de Limnologie*. Station Biologique du lac d'Orédon, pp. 1–24.
- Bottová, K., Derka, T., Beracko, P., & de Figueroa, J.M.T., 2013. Life cycle, feeding and secondary production of Plecoptera community in a constant temperature stream in Central Europe. *Limnologica* 43: 27–33.
- Céréghino, R., 2006. Ontogenetic diet shifts and their incidence on ecological processes: a case study using two morphologically similar stoneflies (Plecoptera). *Acta Oecologica* 30: 33–38.
- Céréghino, R., 2002. Shift from a herbivorous to a carnivorous diet during the larval development of some Rhyacophila species, (Trichoptera). *Aquat Insects* 24: 129–135.
- Chamberlain, P.M., Bull, I.D., Black, H.I.J., Ineson, P., & Evershed, R.P., 2004. Lipid content and carbon assimilation in Collembola: implications for the use of compound-specific carbon isotope analysis in animal dietary studies. *Oecologia* 139: 325–335.
- Collins, S.M., Kohler, T.J., Thomas, S.A., Fetzer, W.W., & Flecker, A.S., 2016. The importance of terrestrial subsidies in stream food webs varies along a stream size gradient. *Oikos* 125: 674–685.
- Crenier, C., Arce-Funck, J., Bec, A., Billoir, E., Perrière, F., Leflaive, J., Guéroid, F., Felten, V. & Danger, M. 2017. Minor food sources can play a major role in secondary production in detritus-based ecosystems. *Freshw Biol* 62: 1155–1167.
- Crenier, C., Sanchez-Thirion, K., Bec, A., Felten, V., Ferriol, J., González, A.G., Leflaive, J., Perrière, F. Ten-Hage, L. & Danger, M. 2019. Interactive impacts of silver and phosphorus on autotrophic biofilm elemental and biochemical quality for a macroinvertebrate consumer. *Front Microbiol* 10: 732.
- Cross, W.F., Wallace, J.B., Rosemond, A.D., & Eggert, S.L., 2006. Whole-system nutrient enrichment increases secondary production in a detritus-based ecosystem. *Ecology* 87: 1556–1565.
- Di Cugno, N. & Robinson, C.T., 2017. Trophic structure of macroinvertebrates in alpine non-glacial streams. *Fundam Appl Limnol für Hydrobiol* 190: 319–330.
- Dangles, O., 2002. Functional plasticity of benthic macroinvertebrates: implications for trophic dynamics in acid streams. *Can J Fish Aquat Sci* 59: 1563–1573.
- Dangles, O. & Chauvet, E., 2003. Effects of stream acidification on fungal biomass in decaying beech leaves and leaf palatability. *Water Res* 37: 533–538.
- Décamps, H., 1968. Vicariances écologiques chez les trichoptères des Pyrénées. 1–50.
- Descroix, A., Bec, A., Bourdier, G., Sargos, D., Sauvanet, J., Misson, B., & Desvillettes, C., 2010. Fatty acids as biomarkers to indicate main carbon sources of four major invertebrate families in a large River (the Allier, France). *Fundam Appl Limnol für Hydrobiol* 177: 39–55.

- Desvillettes, C., Bourdier, G., & Breton, J., 1997. The effect of invertebrate diets on lipids, fatty acid composition and physiological condition of pike larvae (*Esox lucius*). *J Appl Ichthyol* 13: 183–190.
- Dodds, W.K., Collins, S.M., Hamilton, S.K., Tank, J.L., Johnson, S., Webster, J.R., Rantala, H. M. & McDowell, W. H., 2014. You are not always what we think you eat: selective assimilation across multiple whole-stream isotopic tracer studies. *Ecology* 95: 2757–2767.
- Dodds, W.K. & Smith, V.H., 2016. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in streams. *Int Waters* 6: 155–164.
- Dumont, B. & Verneaux, J., 1976. Edifice trophique partiel du cours supérieur d'un ruisseau forestier. In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*. EDP Sciences, pp. 239–252.
- Evans-White, M.A. & Halvorson, H.M., 2017. Comparing the ecological stoichiometry in green and brown food webs—a review and meta-analysis of freshwater food webs. *Front Microbiol* 8: 1184.
- Feeley, H.B. & Kelly-Quinn, M., 2015. The nymphal diet of the stonefly *Protonemura meyeri* (Pictet)(Plecoptera: Nemouridae) in four episodically acidic headwater streams in Ireland. *Irish Nat J* 104–109.
- Felten, V., Tixier, G., Guérol, F., De Crespín De Billy, V., & Dangles, O., 2008. Quantification of diet variability in a stream amphipod: Implications for ecosystem functioning. *Fundam Appl Limnol* 170: 303–313.
- Fink, P. & Von Elert, E., 2006. Physiological responses to stoichiometric constraints: nutrient limitation and compensatory feeding in a freshwater snail. *Oikos* 115: 484–494.
- Franklin, H.M., Carroll, A.R., Chen, C., Maxwell, P., & Burford, M.A., 2020. Plant source and soil interact to determine characteristics of dissolved organic matter leached into waterways from riparian leaf litter. *Sci Total Environ* 703: 134530.
- Frontier, S., 1976. Utilisation des diagrammes rang-fréquence dans l'analyse des écosystèmes.
- Gaillard, B., Meziane, T., Tremblay, R., Archambault, P., Blicher, M.E., 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.
- Gee, J.H.R., 1988. Population dynamics & morphometries of *Gammarus pulex* L.: evidence of seasonal food limitation in a freshwater detritivore. *Freshw Biol* 19: 333–343.
- Gergs, R., Steinberger, N., Beck, B., Basen, T., Yohannes, E., Schulz, R., & Martin-Creuzburg, D., 2015. Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses reveal sterol metabolic constraints in an aquatic invertebrate. *Rapid Commun Mass Spectrom* 29: 1789–1794.
- Ghioni, C., Bell, J.G., & Sargent, J.R., 1996. Polyunsaturated fatty acids in neutral lipids and phospholipids of some freshwater insects. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 114: 161–170.
- Gladyshev, M.I., Sushchik, N.N., Kalachova, G.S., & Makhutova, O.N., 2012. Stable isotope composition of fatty acids in organisms of different trophic levels in the Yenisei River. *PLoS One* 7: e34059.
- Gladyshev, M.I., Sushchik, N.N., Makhutova, O.N., & Kalachova, G.S., 2014. Trophic fractionation of isotope composition of polyunsaturated fatty acids in the trophic chain of a river ecosystem. In *Doklady. Biochemistry and Biophysics*. Springer Nature BV, p. 4.
- Glime, J.M., 2017. Nutrient Relations: requirements and sources. Janice M. Glime.
- Gomi, T., Sidle, R.C., & Richardson, J.S., 2002. Understanding processes and downstream linkages of headwater systems: headwaters differ from downstream reaches by their close coupling to hillslope processes, more temporal and spatial variation, and their need for different means of protection from land. *Bioscience* 52: 905–916.
- Graça, M.A.S., Cressa, C., GESSNER, T.M.O., Feio, M.J., & Callies, K.A., 2001. Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. *Freshw Biol* 46: 947–957.

- Grayston, S.J., Campbell, C.D., Bardgett, R.D., Mawdsley, J.L., Clegg, C.D., Ritz, K., Griffiths, B. S., Rodwell, J. S. & Edward, S. J., 2004. Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. *Appl Soil Ecol* 25: 63–84.
- Guenet, B., Danger, M., Abbadie, L., & Lacroix, G., 2010. Priming effect: bridging the gap between terrestrial and aquatic ecology. *Ecology* 91: 2850–2861.
- Guo, F., Bunn, S.E., Brett, M.T., Fry, B., Hager, H., Ouyang, X., & Kainz, M.J., 2018. Feeding strategies for the acquisition of high-quality food sources in stream macroinvertebrates: Collecting, integrating, and mixed feeding. *Limnol Oceanogr* 63: 1964–1978.
- Guo, F., Bunn, S.E., Brett, M.T., & Kainz, M.J., 2017. Polyunsaturated fatty acids in stream food webs—high dissimilarity among producers and consumers. *Freshw Biol* 62: 1325–1334.
- Guo, F., Kainz, M.J., Valdez, D., Sheldon, F., & Bunn, S.E., 2016. High-quality algae attached to leaf litter boost invertebrate shredder growth. *Freshw Sci* 35: 1213–1221.
- Haines, W.P. & Renwick, J.A.A., 2009. Bryophytes as food: comparative consumption and utilization of mosses by a generalist insect herbivore. *Entomol Exp Appl* 133: 296–306.
- Halvorson, H.M., Francoeur, S.N., Findlay, R.H., & Kuehn, K.A., 2019. Algal-mediated priming effects on the ecological stoichiometry of leaf litter decomposition: a meta-analysis. *Front Earth Sci* 7: 76.
- Hayes, J.M., 2001. Fractionation of carbon and hydrogen isotopes in biosynthetic processes. *Rev Mineral geochemistry* 43: 225–277.
- Hill, W.R., Mulholland, P.J., & Marzolf, E.R., 2001. Stream ecosystem responses to forest leaf emergence in spring. *Ecology* 82: 2306–2319.
- Hill, W.R., Smith, J.G., & Stewart, A.J., 2010. Light, nutrients, and herbivore growth in oligotrophic streams. *Ecology* 91: 518–527.
- Hoppeler, F., Winkelmann, C., Becker, J., & Pauls, S.U., 2018. Larval growth and metabolic energy storage of *Micropterna lateralis* (Trichoptera: Limnephilidae) in an intermittent stream: glycogen dominates in final instars. *Hydrobiologia* 806: 175–185.
- Jardine, T.D., Hadwen, W.L., Hamilton, S.K., Hladysz, S., Mitrovic, S.M., Kidd, K.A., Tsoi, W. Y., Spears, M. & Westhorpe, D.P., 2014. Understanding and overcoming baseline isotopic variability in running waters. *River Res Appl* 30: 155–165.
- Kalachova, G., Gladyshev, M., Sushchik, N., & Makhutova, O., 2011. Water moss as a food item of the zoobenthos in the Yenisei River. *Open Life Sci* 6: 236–245.
- Khamis, K., Brown, L.E., Hannah, D.M., & Milner, A.M., 2015. Experimental evidence that predator range expansion modifies alpine stream community structure. *Freshw Sci* 34: 66–80.
- 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.
- Kozáčková, Z., de Figueroa, J.M.T., López-Rodríguez, M.J., Beracko, P., & Derka, T., 2009. Life history of a population of *Protonemura intricata* (Ris, 1902)(Insecta, Plecoptera) in a constant temperature stream in Central Europe. *Int Rev Hydrobiol* 94: 57–66.
- Kühmayer, T., Guo, F., Ebn, N., Battin, T.J., Brett, M.T., Bunn, S.E., Fry, B. & Kainz, M. J., 2020. Preferential retention of algal carbon in benthic invertebrates: Stable isotope and fatty acid evidence from an outdoor flume experiment. *Freshw Biol*.
- Lake, J.L., Serbst, J.R., Kuhn, A., Smucker, N.J., Edwards, P., Libby, A., Charpentier, M. & Miller, K., 2019. Use of stable isotopes in benthic organic material as a baseline for estimating fish trophic positions in lakes. *Can J Fish Aquat Sci* 76: 1227–1237.
- Lamberti, G.A. & Steinman, A.D., 1997. A comparison of primary production in stream ecosystems. *J North Am Benthol Soc* 16: 95–104.
- Lavandier, P., 1982. Développement larvaire—régime alimentaire, production d'isoperla viridinervis pictet (plecoptera, perlodidae) dans un torrent froid de haute montagne. In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*. EDP Sciences, pp. 301–318.

- Little, C.J. & Altermatt, F., 2019. Differential resource consumption in leaf litter mixtures by native and non-native amphipods. *Aquat Ecol* 53: 151–162.
- Lu, Y., Eiriksson, F.F., Thorsteinsdóttir, M., & Simonsen, H.T., 2019. Valuable fatty acids in bryophytes—Production, biosynthesis, analysis and applications. *Plants* 8: 524.
- Lund, J.W.G., Kipling, C., & Le Cren, E.D., 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia* 11: 143–170.
- Majdi, N. & Traunspurger, W., 2017. Leaf fall affects the isotopic niches of meiofauna and macrofauna in a stream food web. *Food Webs* 10: 5–14.
- McCutchan Jr, J.H., Lewis Jr, W.M., Kendall, C., & McGrath, C.C., 2003. Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos* 102: 378–390.
- McWilliam-Hughes, S.M., Jardine, T.D., & Cunjak, R.A., 2009. Instream C sources for primary consumers in two temperate, oligotrophic rivers: possible evidence of bryophytes as a food source. *J North Am Benthol Soc* 28: 733–743.
- Middelburg, J.J., 2014. Stable isotopes dissect aquatic food webs from the top to the bottom. *Biogeosciences* 11: 2357.
- Mihuc, T.B., 1997. The functional trophic role of lotic primary consumers: generalist versus specialist strategies. *Freshw Biol* 37: 455–462.
- Mondy, C.P., Villeneuve, B., Archaimbault, V., & Usseglio-Polatera, P., 2012. A new macroinvertebrate-based multimetric index (I2M2) to evaluate ecological quality of French wadeable streams fulfilling the WFD demands: A taxonomical and trait approach. *Ecol Indic* 18: 452–467.
- Mongrand, S., Bessoule, J.-J., Cabantous, F., & Cassagne, C., 1998. The C16: 3\C18: 3 fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. *Phytochemistry* 49: 1049–1064.
- Monroig, Ó. & Kabeya, N., 2018. Desaturases and elongases involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic invertebrates: a comprehensive review. *Fish Sci* 84: 911–928.
- Mueller, K.E., Polissar, P.J., Oleksyn, J., & Freeman, K.H., 2012. Differentiating temperate tree species and their organs using lipid biomarkers in leaves, roots and soil. *Org Geochem* 52: 130–141.
- Mulholland, P.J., Tank, J.L., Sanzone, D.M., Wollheim, W.M., Peterson, B.J., Webster, J.R., & Meyer, J.L., 2000. Food resources of stream macroinvertebrates determined by natural-abundance stable C and N isotopes and a 15 N tracer addition. *J North Am Benthol Soc* 19: 145–157.
- Niedrist, G.H. & Füreder, L., 2017. Trophic ecology of alpine stream invertebrates: current status and future research needs. *Freshw Sci* 36: 466–478.
- Parker, J.D., Burkepille, D.E., Collins, D.O., Kubanek, J., & Hay, M.E., 2007. Stream mosses as chemically-defended refugia for freshwater macroinvertebrates. *Oikos* 116: 302–312.
- Parnell, A. & Inger, R., 2016. Simmr: a stable isotope mixing model. *R Packag version 03 R*.
- Parnell, A.C., Inger, R., Bearhop, S., & Jackson, A.L., 2010. Source partitioning using stable isotopes: Coping with too much variation. *PLoS One* 5: 1–5.
- Phillips, D.L., Inger, R., Bearhop, S., Jackson, A.L., Moore, J.W., Parnell, A.C., Semmens, B. X. & Ward, E. J., 2014. Best practices for use of stable isotope mixing models in food-web studies. *Can J Zool* 92: 823–835.
- Phillips, D.L. & Koch, P.L., 2002. Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models. *Oecologia* 130: 114–125.
- Power, M.E. & Dietrich, W.E., 2002. Food webs in river networks. *Ecol Res* 17: 451–471.
- Rasmussen, J.B., 2010. Estimating terrestrial contribution to stream invertebrates and periphyton using a gradient-based mixing model for $\delta^{13}\text{C}$. *J Anim Ecol* 79: 393–402.
- Richardson, J.S., 2019. Biological diversity in headwater streams. *Water* 11: 366.
- Richardson, J.S. & Chauvet, E., 2019. Consumer responses to resource patch size and architecture: leaf packs in streams. *Fundam Appl Limnol für Hydrobiol* 192: 255–261.

- Roche, K.R., Aubeneau, A.F., Xie, M., Aquino, T., Bolster, D., & Packman, A.I., 2016. An integrated experimental and modeling approach to predict sediment mixing from benthic burrowing behavior. *Environ Sci Technol* 50: 10047–10054.
- Ruess, L. & Müller-Navarra, D., 2019. Essential biomolecules in food webs. *Front Ecol Evol* 7: 269.
- Sanpera-Calbet, I., Lecerf, A., & Chauvet, E., 2009. Leaf diversity influences in-stream litter decomposition through effects on shredders. *Freshw Biol* 54: 1671–1682.
- Sushchik, N.N., Gladyshev, M.I., Moskvichova, A. V, Makhutova, O.N., & Kalachova, G.S., 2003. Comparison of fatty acid composition in major lipid classes of the dominant benthic invertebrates of the Yenisei river. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 134: 111–122.
- Taipale, S., Strandberg, U., Peltomaa, E., Galloway, A.W.E., Ojala, A., & Brett, M.T., 2013. Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes. *Aquat Microb Ecol* 71: 165–178.
- Tanaka, T., Thingstad, T.F., Christaki, U., Colombet, J., Cornet-Barthaux, V., Courties, C., Grattepanche, J. D., Lagaria, A., Nedoma, J., Oriol, L., Psarra, S., Pujo-Pay, M. & Van Wambeke, F., 2011. Lack of P-limitation of phytoplankton and heterotrophic prokaryotes in surface waters of three anticyclonic eddies in the stratified Mediterranean Sea. *Biogeosciences* 8: 525–538.
- Team, R.C., 2013. R: A language and environment for statistical computing.
- Toman, M.J. & Dall, P.C., 1997. The diet of *Erpobdella octoculata* (Hirudinea: Erpobdellidae) in two Danish lowland streams. *Arch für Hydrobiol* 549–563.
- Torres-Ruiz, M. & Wehr, J.D., 2010. Changes in the nutritional quality of decaying leaf litter in a stream based on fatty acid content. *Hydrobiologia* 651: 265–278.
- Torres-Ruiz, M. & Wehr, J.D., 2019. Complementary information from fatty acid and nutrient stoichiometry data improve stream food web analyses. *Hydrobiologia* 847: 629–645.
- Torres-Ruiz, M., Wehr, J.D., & Perrone, A.A., 2007. Trophic relations in a stream food web: importance of fatty acids for macroinvertebrate consumers. *J North Am Benthol Soc* 26: 509–522.
- Treignier, C., Tolosa, I., Grover, R., Reynaud, S., & Sa, C.F.-P., 2009. Carbon isotope composition of fatty acids and sterols in the scleractinian coral *Turbinaria reniformis*: Effect of light and feeding. *Limnol Oceanogr* 54: 1933–1940.
- Twining, C.W., Josephson, D.C., Kraft, C.E., Brenna, J.T., Lawrence, P., & Flecker, A.S., 2017. Limited seasonal variation in food quality and foodweb structure in an Adirondack stream: Insights from fatty acids. *Freshw Sci* 36: 877–892.
- Twining, C.W., Taipale, S.J., Ruess, L., Bec, A., Martin-Creuzburg, D., & Kainz, M.J., 2020. Stable isotopes of fatty acids: current and future perspectives for advancing trophic ecology. *Philos Trans R Soc B* 375: 20190641.
- Verneaux, J., 1977. Sondages quantitatifs de la faune benthique des eaux vives des environs de Besse-en-Chandesse (Puy-De-Dômes). Données écologiques. Annales de la station Biologique de Besse-en-Chandesse. p. 3–37.
- Wallace, J.B. & Eggert, S.L., 2009. Benthic invertebrate fauna, small streams. *Encycl Inl Waters* 2 173-190 2:.
- Wang, S.W., Budge, S.M., Iken, K., Gradinger, R.R., Springer, A.M., & Wooller, M.J., 2015. Importance of sympagic production to Bering Sea zooplankton as revealed from fatty acid-carbon stable isotope analyses. *Mar Ecol Prog Ser* 518: 31–50.
- Webb-Robertson, B.-J., Bunn, A.L., & Bailey, V.L., 2011. Phospholipid fatty acid biomarkers in a freshwater periphyton community exposed to uranium: discovery by non-linear statistical learning. *J Environ Radioact* 102: 64–71.
- Winkelman, C. & Koop, J.H.E., 2007. The management of metabolic energy storage during the life cycle of mayflies: a comparative field investigation of the collector-gatherer *Ephemera danica* and the scraper *Rhithrogena semicolorata*. *J Comp Physiol B* 177: 119–128.

- Wögerbauer, C.M. & Kelly-Quinn, M., 2013. Seasonal variation in diet and feeding strategy of three mayfly species. In *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*. JSTOR, pp. 211–226.
- Ylla, I., Romani, A.M., & Sabater, S., 2007. Differential effects of nutrients and light on the primary production of stream algae and mosses. *Fundam Appl Limnol für Hydrobiol* 170: 1–10.
- Zah, R., Burgherr, P., Bernasconi, S.M., & Uehlinger, U., 2001. Stable isotope analysis of macroinvertebrates and their food sources in a glacier stream. *Freshw Biol* 46: 871–882.
- Zenteno, L., Cárdenas, L., Valdivia, N., Gómez, I., Höfer, J., Garrido, I., & Pardo, L.M., 2019. Unraveling the multiple bottom-up supplies of an Antarctic nearshore benthic community. *Prog Oceanogr* 174: 55–63.

Supplemental information

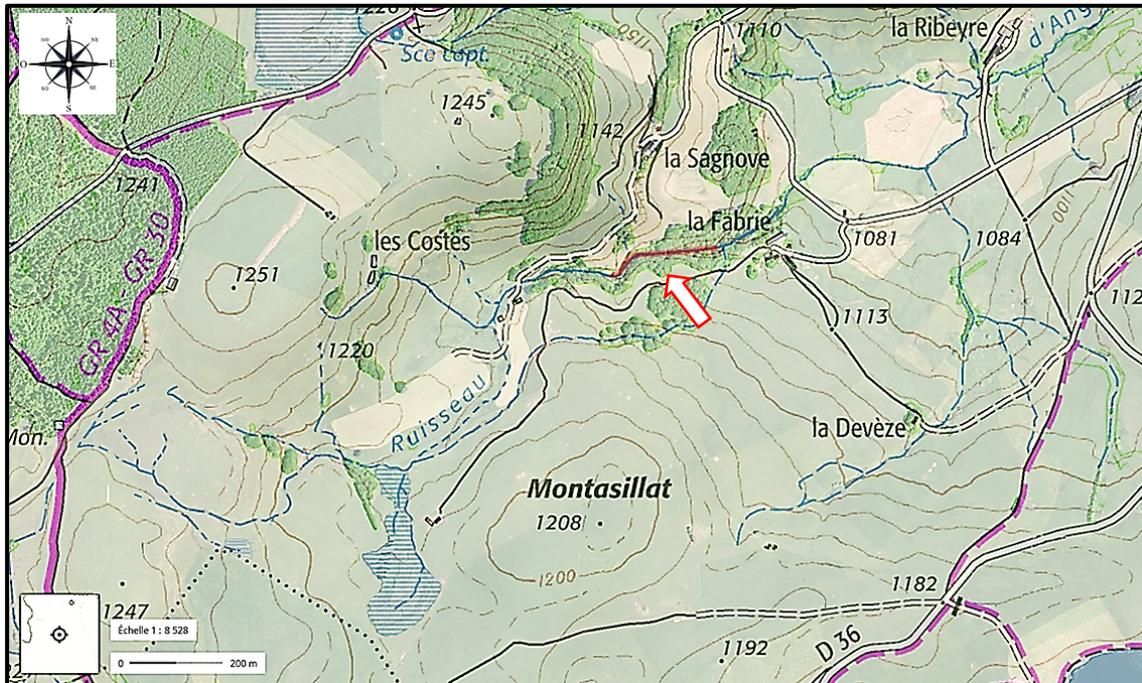


Fig. S1 The study site (Ruisseau d'Anglard) as indicated by the arrow in the Monts Dore, middle of Southern France. The stream reach sampled is underlined in red on the map.

Table S1. Rank abundance and biomass (mg.DM) of the macroinvertebrate species sampled in the stream (ruisseau d'Anglard). In bold are the taxa selected for our study with their corresponding functional group. (according to Tachet et al. 2010).

Family	Specie names	FFG	Density log of density	Biomass Mg.DM
F. Gammaridae	<i>Gammarus pulex</i>	Shredder	3.83	522
F. Leuctridae	<i>Leuctra psp.</i>	Shredder	2.73	40
F. Nemouridae	<i>Protonemura praecox praecox</i>	Shredder	1.99	31
F. Heptageniidae	<i>Ecdyonurus sp.</i>	Scrapper	1.60	78
F. Odontoceridae	<i>Odontocerum albicorne</i>	Shredder/Predator	1.27	175
F. Chloroperlidae	<i>Siphonoperla torrentium</i>	-	1.21	5
F. Baetidae	<i>Baetis lutheri</i>	Scrapper	1.21	40
F. Limnephilidae	<i>Limnephilus sp.</i>	-	0.68	66
F. Blephariceridea	<i>Blepharicera fasciata</i>	-	0.57	10
F. Perlodidae	<i>Isoperla ambigua</i>	Shredder/Predator	0.46	169
F. Planariidae	<i>Polycelis felina</i>	-	0.32	1
F. Taeniopterygidae	<i>Taeniopteryx hubaulti</i>	-	0.17	11
F. Limnephilidae	<i>Drusus ferdes</i>	-	-0.24	22
F. Hydropsychidae	<i>Hydropsyche instabilis</i>	-	-0.24	52
F. Rhyacophilidae	<i>Rhyacophila psp.</i>	Predator/Shredder	-0.24	28
F. Sericostomatidae	<i>Sericostoma personatum</i>	-	-0.52	12
F. Uenoidae	<i>Thremma gallicum</i>	-	-0.93	4
F. Philopotamidae	<i>Philopotamus montanus montanus</i>	-	-0.93	10
F. Elmidae	<i>Limnius volckmari</i>	-	-0.93	0.02
F. Simuliidae	<i>Simulium sp.</i>	-	-0.93	0.1
F. Psychodidae	<i>Psychoda sp.</i>	-	-0.93	8
F. Pediciidae	<i>Dicranota bimaculata</i>	-	-0.93	3
F. Erpobdellidae	<i>Erpobdella octoculata</i>	Predator	-0.93	57
F. Naididae	<i>Nais sp.</i>	-	-0.93	0.4
F. Chironomidae	<i>Macrolepia sp.</i>	-	-1.62	0.06
F. Limoniidae	<i>Hexatoma sp.</i>	-	-1.62	3
F. Glossiphoniidae	<i>Glossiphonia sp.</i>	-	-1.62	2
F. Lumbricidae	<i>Eiseniella tetraedra</i>	-	-1.62	2

Table S2. Diet and main item composition of the nine macroinvertebrate taxa (AI%: relative abundance; F% frequency of occurrence). Animal prey includes debris or prey remains (i.e. head capsules, claws, chitinous parts...)

Species	Fine vegetal detritus		Bryophyte particules		Diatoms		<i>Hydrurus sp.</i>		<i>Audouinella sp.</i>		Hyphomycetes		Animal prey	
	AI%	F%	AI%	F%	AI%	F%	AI%	F%	AI%	F%	AI%	F%	AI%	F%
<i>Gammarus pulex</i>	65.7 ± 17.1	100	11.7 ± 3.6	100	4.7 ± 3.5	100	-	-	-	-	1.9 ± 1.1	100	16.1 ± 14.4	66.7
<i>Ecdyonurus sp.</i>	26.4 ± 4.8	100	-	-	73.0 ± 5.3	100	-	-	-	-	0.6 ± 0.5	33.3	-	-
<i>Baetis lutheri</i>	42.5 ± 29.2	100	-	-	53.3 ± 33.8	100	-	-	4.0 ± 8.1	25	0.2 ± 0.1	25	-	-
<i>Isoperla ambigua</i>	14.8 ± 18.7	100	-	-	37.6 ± 22.2	100	46.4 ± 40.2	100	-	-	0.1 ± 0.2	66.7	1.1 ± 1.9	33.3
<i>Leuctra psp.</i>	80.6 ± 18.8	100	3.7 ± 6.3	33.3	8.0 ± 8.7	100	-	-	-	-	-	-	7.6 ± 7.5	66.7
<i>Protonemura praecox</i>	68.4 ± 9.5	100	12.1 ± 13.1	33.3	14.2 ± 14.2	100	-	-	3.0 ± 5.2	33.3	2.4 ± 1.7	100	-	-
<i>Odontocerum albicorne</i>	15.7 ± 12.9	100	-	-	1.5 ± 1.4	100	14.2 ± 14.1	33.3	-	-	0.1 ± 0.1	33.3	68.5 ± 14.4	100
<i>Rhyacophila psp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100 ± 0.0	100
<i>Erpobdella octoculata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100 ± 0.0	100

Table S3. FA composition of Neutral Lipid Fatty Acids (NLFA) from the nine macroinvertebrates taxa sampled in the stream ruisseau d' Anglard (France). Values (mean \pm SD) in $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ Dry Masse (DM).

Fatty acids	<i>Gammarus pulex</i>	<i>Ecdyonurus sp.</i>	<i>Baetis lutheri</i>	<i>Leuctra psp.</i>
SFA				
Total SFA	13.33 \pm 6.74 a	20.43 \pm 6.41 ab	37.76 \pm 6.21 b	15.32 \pm 1.22 ab
11:0		0.19 \pm 0.02		
12:0	0.28 \pm 0.09	0.99 \pm 0.14	0.26 \pm 0.12	
14:0	1.17 \pm 0.59 ab	2.83 \pm 0.93 bc	3.70 \pm 0.23 c	0.93 \pm 0.16 ad
15:0	0.48 \pm 0.21	0.20 \pm 0.06	0.33 \pm 0.10	0.87 \pm 0.33
16:0	8.92 \pm 4.61 a	13.13 \pm 4.87 ab	29.67 \pm 5.85 b	8.63 \pm 1.00 a
17:0	0.34 \pm 0.14	0.22 \pm 0.07	0.42 \pm 0.16	0.58 \pm 0.11
18:0	1.97 \pm 1.05 ab	2.68 \pm 1.16 ab	3.26 \pm 0.42 ab	4.18 \pm 1.04 b
19:0				
20:0	0.09 \pm 0.04	0.14 \pm 0.04	0.10 \pm 0.02	0.13 \pm 0.03
22:0	0.09 \pm 0.04	0.06 \pm 0.03	0.01 \pm 0.02	
24:0				
Branched and cyclo FA				
Total	1.32 \pm 0.60 a	0.48 \pm 0.06 a	1.16 \pm 0.14 a	4.52 \pm 2.23 b
iso 14:0	0.09 \pm 0.05	0.03 \pm 0.05		0.30 \pm 0.27
iso 15:0	0.28 \pm 0.13	0.34 \pm 0.08	0.52 \pm 0.13	2.11 \pm 1.05
iso 16:0	0.09 \pm 0.04			0.36 \pm 0.16
iso 17:0	0.23 \pm 0.11		0.27 \pm 0.02	0.46 \pm 0.14
anteiso 15:0	0.17 \pm 0.07		<i>tr</i>	0.70 \pm 0.34
anteiso 17:0	0.15 \pm 0.03		<i>tr</i>	<i>tr</i>
cyclo 15:0				0.24 \pm 0.11
cyclo 17:0	0.31 \pm 0.17	0.11 \pm 0.01	0.38 \pm 0.18	0.36 \pm 0.17
MUFA				
Total MUFA	29.93 \pm 24.12 a	15.16 \pm 7.15 ab	24.03 \pm 6.25 ab	20.55 \pm 4.41 ab
14:1 ω 5		0.35 \pm 0.18		
15:1	0.35 \pm 0.20	0.48 \pm 0.14		0.43 \pm 0.06
16:1 ω 9	0.19 \pm 0.10	0.21 \pm 0.07	0.29 \pm 0.04	4.81 \pm 1.88
16:1ω7	2.47 \pm 1.15 ab	7.71 \pm 4.75 bc	10.30 \pm 1.57 c	2.38 \pm 1.24 ab
16:1 ω 5	0.21 \pm 0.07	0.22 \pm 0.07	0.42 \pm 0.12	
18:1ω9	23.37 \pm 19.82 ab	3.02 \pm 1.28 c	4.41 \pm 1.65 ac	9.99 \pm 1.62 ab
18:1ω7	1.51 \pm 0.96 abc	3.09 \pm 0.70 cd	8.46 \pm 3.32 d	2.81 \pm 0.98 bd
20:1 ω 9	1.43 \pm 1.39			0.14 \pm 0.07
20:1 ω 7	0.08 \pm 0.07	0.08 \pm 0.09	0.15 \pm 0.05	
22:1 ω 9	0.34 \pm 0.36			
22:1 ω 7				
PUFA				
Total PUFA	21.31 \pm 16.61 ac	13.90 \pm 7.64 ab	23.94 \pm 5.95 bc	11.33 \pm 1.31 ab
Total C16 PUFA	0.62 \pm 0.24 ac	2.24 \pm 1.04 cd	2.58 \pm 0.51 cd	0.38 \pm 0.02 ab
Total ω3	6.74 \pm 4.59 ab	11.14 \pm 6.36 b	18.49 \pm 5.75 b	5.26 \pm 0.98 ab
Total ω6	14.15 \pm 11.84 ab	1.13 \pm 0.62 c	2.41 \pm 0.36 cd	5.91 \pm 0.91 ad
16:2 ω 6				
16:2 ω 4	0.36 \pm 0.24	0.84 \pm 0.37	1.38 \pm 0.23	0.15 \pm 0.05
16:3 ω 4	<i>tr</i>	0.17 \pm 0.03	0.45 \pm 0.17	<i>tr</i>
16:3 ω 3	0.20 \pm 0.06	0.54 \pm 0.21	0.54 \pm 0.16	0.23 \pm 0.01
16:4 ω 3		0.33 \pm 0.26		
16:4 ω 1	0.07 \pm 0.06	0.36 \pm 0.19	0.21 \pm 0.08	
18:2ω6	12.35 \pm 10.64 ab	0.68 \pm 0.34 c	1.84 \pm 0.33 acd	4.66 \pm 0.73 ad
18:2 ω 4		0.19 \pm 0.05	1.00 \pm 0.39	
18:3 ω 6	0.24 \pm 0.16	0.11 \pm 0.04	0.22 \pm 0.03	0.37 \pm 0.10
18:3 ω 4		0.07 \pm 0.03		
18:3ω3	4.20 \pm 3.21 a	2.71 \pm 1.66 ab	7.33 \pm 4.04 a	2.53 \pm 0.52 ab
18:4 ω 3		2.89 \pm 1.86	3.92 \pm 1.69	0.34 \pm 0.06
20:2 ω 6	0.82 \pm 0.63			
20:2 ω 4				
20:3 ω 6	0.10 \pm 0.05			
20:3 ω 3	0.40 \pm 0.31	0.05 \pm 0.07	0.10 \pm 0.06	
20:4ω6	0.65 \pm 0.37 a	0.27 \pm 0.14 a	0.35 \pm 0.12 a	0.88 \pm 0.11 a
20:4 ω 3	0.10 \pm 0.08	0.07 \pm 0.09	0.18 \pm 0.06	
20:5ω3	1.48 \pm 0.74 ab	4.54 \pm 2.32 bc	6.42 \pm 1.96 c	2.16 \pm 0.40 ac
22:5 ω 3	0.15 \pm 0.10			
22:6 ω 3	0.21 \pm 0.13			
<i>Others fatty acids</i>	<i>1.12 \pm 0.81</i>	<i>1.31 \pm 0.24</i>		
Total fatty acids	67.02 \pm 48.81	51.28 \pm 21.18	86.89 \pm 17.54	51.58 \pm 8.09

Other fatty acids: FA not formally identified or co-eluting with impurities. tr (traces) indicates a concentration close to the detection limit. Results of the one-way ANOVA are given in bold for the specific fatty acids selected (see text). Different letters indicate a significant difference (one-way ANOVA with p-values <0,05).

<i>Isoperla ambigua</i>	<i>Protonemura praecox</i>	<i>Odontocerum albicorne</i>	<i>Rhyacophila psp.</i>	<i>Erpobdella octoculata</i>
15.36 ± 5.74 ab	12.80 ± 1.04 a	27.34 ± 13.66 ab	16.58 ± 3.40 ab	4.70 ± 1.86 c
1.39 ± 0.29	0.16 ± 0.02		0.95 ± 1.27	0.26 ± 0.20
1.20 ± 0.44 ab	1.37 ± 0.14 ab	1.01 ± 0.47 ad	1.28 ± 0.32 ab	0.42 ± 0.16 d
0.16 ± 0.08	0.25 ± 0.08	0.14 ± 0.06	0.27 ± 0.09	0.09 ± 0.05
8.55 ± 4.15 a	6.64 ± 0.43 ac	20.67 ± 10.51 ab	10.03 ± 3.02 ab	2.46 ± 1.15 c
0.34 ± 0.15	0.70 ± 0.10	0.45 ± 0.16	0.45 ± 0.05	0.14 ± 0.03
3.56 ± 1.21 ab	3.44 ± 0.44 ab	4.89 ± 2.66 b	3.41 ± 0.20 ab	1.24 ± 0.51 a
	0.09 ± 0.01			
0.13 ± 0.06	0.10 ± 0.02	0.18 ± 0.09	0.13 ± 0.01	0.04 ± 0.01
0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01		0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01
				0.02 ± 0.00
0.42 ± 0.12 a	0.62 ± 0.02 a	0.71 ± 0.35 a	1.14 ± 0.48 a	0.86 ± 0.36 a
	0.10 ± 0.04			
	0.17 ± 0.04	0.17 ± 0.06	0.23 ± 0.06	0.19 ± 0.09
tr	0.05 ± 0.00	0.09 ± 0.06	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.03
0.12 ± 0.06	0.18 ± 0.01	0.25 ± 0.13	0.20 ± 0.07	0.22 ± 0.06
	0.11 ± 0.01		0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.06
		0.21 ± 0.14	0.15 ± 0.04	0.22 ± 0.13
0.13 ± 0.10				
0.17 ± 0.13			0.39 ± 0.51	0.08 ± 0.03
18.17 ± 6.85 ab	11.73 ± 0.85 ab	39.36 ± 20.32 a	17.74 ± 6.39 ab	7.26 ± 4.07 b
		0.10 ± 0.10		0.08 ± 0.05
1.30 ± 0.69	0.07 ± 0.01		0.12 ± 0.06	
0.15 ± 0.07	0.12 ± 0.00	0.50 ± 0.26	0.29 ± 0.08	0.14 ± 0.10
3.71 ± 1.12 bc	4.01 ± 0.32 bc	2.73 ± 0.62 b	3.65 ± 0.72 bc	0.91 ± 0.45 a
	0.22 ± 0.03	0.25 ± 0.10	0.34 ± 0.13	0.14 ± 0.09
10.94 ± 5.14 ab	6.65 ± 0.74 ab	31.97 ± 18.09 b	11.70 ± 4.93 ab	4.44 ± 2.82 c
0.98 ± 0.43 be	0.42 ± 0.07 e	1.62 ± 0.60 abc	1.30 ± 0.42 bce	0.60 ± 0.19 ae
0.29 ± 0.21	0.18 ± 0.08	0.20 ± 0.09	0.12 ± 0.08	0.26 ± 0.11
0.15 ± 0.09	0.05 ± 0.05	1.64 ± 1.11	0.19 ± 0.18	0.31 ± 0.26
		0.34 ± 0.24		0.09 ± 0.03
			0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.05
16.82 ± 6.32 ac	16.96 ± 1.59 ac	57.20 ± 29.15 c	18.65 ± 6.73 ac	5.38 ± 2.98 a
1.70 ± 0.62 bcc	4.50 ± 0.69 d	2.74 ± 3.33 bcc	1.04 ± 0.33 bcc	0.25 ± 0.34 a
10.15 ± 3.58 b	9.73 ± 0.90 b	15.19 ± 7.10 b	11.18 ± 4.63 b	1.94 ± 1.35 a
5.63 ± 3.07 ad	4.49 ± 0.63 ac	41.78 ± 23.50 b	6.91 ± 1.93 ad	3.12 ± 1.79 ac
0.30 ± 0.11	0.16 ± 0.02	1.55 ± 2.02		
0.62 ± 0.22	1.33 ± 0.22	0.15 ± 0.03	0.44 ± 0.20	0.25 ± 0.34
0.22 ± 0.11	0.31 ± 0.04		0.08 ± 0.05	tr
0.37 ± 0.21	1.43 ± 0.24	0.97 ± 1.21	0.17 ± 0.05	
	0.24 ± 0.05		0.31 ± 0.04	
0.19 ± 0.12	1.03 ± 0.15	0.08 ± 0.09	0.04 ± 0.01	
4.55 ± 2.78 ad	3.63 ± 0.64 acd	39.33 ± 24.96 b	6.09 ± 1.84 bd	2.07 ± 1.46 cd
	0.07 ± 0.00			
0.19 ± 0.04	0.30 ± 0.08		0.15 ± 0.00	
4.25 ± 2.68 a	3.25 ± 0.46 ab	11.95 ± 6.35 a	6.56 ± 2.83 a	0.83 ± 0.68 b
1.59 ± 1.02	1.10 ± 0.23	0.43 ± 0.28	0.98 ± 0.48	0.07 ± 0.03
		0.20 ± 0.11		0.57 ± 0.26
				0.07 ± 0.04
				0.03 ± 0.01
				0.05 ± 0.03
0.60 ± 0.23 a	0.40 ± 0.14 a	0.70 ± 0.52 a	0.66 ± 0.11 a	0.45 ± 0.13 a
				0.03 ± 0.02
3.70 ± 0.55 bc	3.57 ± 0.43 bc	1.85 ± 1.44 ab	3.16 ± 1.29 bc	0.89 ± 0.57 a
0.07 ± 0.04				0.05 ± 0.03
0.17 ± 0.12	0.14 ± 0.03			0.03 ± 0.02
0.22 ± 0.11		1.44 ± 1.89	0.20 ± 0.34	0.30 ± 0.19
50.99 ± 18.89	42.10 ± 3.19	126.05 ± 61.80	54.30 ± 16.98	18.50 ± 9.13

Table S4. FA composition of Polar Lipid Fatty Acids (PLFA) from the nine macroinvertebrates taxa sampled in the stream ruisseau d' Anglard (France). Values (mean \pm SD) in $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ Dry Masse (DM).

Lipids	<i>Gammarus pulex</i>	<i>Ecdyonurus sp.</i>	<i>Baetis lutheri</i>	<i>Leuctra psp.</i>
Total SFA	4.42 \pm 2.35 ab	8.10 \pm 1.58 bc	9.11 \pm 0.64 c	7.45 \pm 0.81 bc
14:0	<i>tr</i>	0.36 \pm 0.11 a	0.26 \pm 0.04 ad	0.13 \pm 0.03 cd
15:0	0.04 \pm 0.04			0.16 \pm 0.04
16:0	3.85 \pm 2.13 ab	3.82 \pm 0.64 ab	4.98 \pm 0.29 b	3.37 \pm 0.21 ab
17:0	0.01 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	0.29 \pm 0.02	0.34 \pm 0.00
18:0	0.43 \pm 0.27 a	3.12 \pm 0.82 bc	3.28 \pm 0.45 bc	2.90 \pm 0.62 bc
19:0		0.03 \pm 0.02		
20:0	0.01 \pm 0.01	0.38 \pm 0.01	0.14 \pm 0.02	0.38 \pm 0.01
22:0	0.05 \pm 0.02	0.32 \pm 0.02	0.17 \pm 0.01	0.18 \pm 0.01
24:0				
Total Branched and cyclo FA		0.18 \pm 0.08 ab		0.24 \pm 0.09 ab
iso 14:0				
iso 15:0				0.07 \pm 0.01
iso 16:0				0.08 \pm 0.01
iso 17:0	<i>tr</i>	0.07 \pm 0.00		
ai 15:0				
ai 17:0		0.10 \pm 0.08		<i>tr</i>
cyclo 17:0	<i>tr</i>	<i>tr</i>		0.10 \pm 0.09
Total MUFA	1.84 \pm 1.38 a	5.63 \pm 0.45 bc	4.94 \pm 1.73 abc	7.76 \pm 0.65 cd
14:1 ω 11				
14:1 ω 5				
16:1 ω 9		0.04 \pm 0.01		0.95 \pm 0.22
16:1ω7	<i>tr</i>	1.20 \pm 0.16 ab	1.14 \pm 0.50 ab	0.47 \pm 0.14 c
16:1 ω 5	<i>tr</i>	0.09 \pm 0.02		0.16 \pm 0.01
18:1ω9	1.61 \pm 1.26 a	1.82 \pm 0.28 a	1.46 \pm 0.50 a	4.94 \pm 0.14 cd
18:1ω7	0.15 \pm 0.09 a	2.48 \pm 0.15 e	2.35 \pm 0.75 de	1.15 \pm 0.17 ce
20:1 ω 9	0.06 \pm 0.05			0.06 \pm 0.05
20:1 ω 7		<i>tr</i>		
22:1 ω 9				0.04 \pm 0.03
Total PUFA	2.93 \pm 2.03 a	9.31 \pm 0.82 ab	10.27 \pm 3.92 b	12.12 \pm 0.59 bc
Total C16 PUFA		0.24 \pm 0.04 ab	0.12 \pm 0.05 a	
Total ω3	1.40 \pm 0.90 a	8.00 \pm 0.75 bc	8.62 \pm 3.55 bc	5.02 \pm 0.52 ab
Total ω6	1.53 \pm 1.13 ab	0.96 \pm 0.12 a	1.31 \pm 0.24 a	7.10 \pm 0.96 c
16:2 ω 4		0.21 \pm 0.04	0.12 \pm 0.05	<i>tr</i>
16:3 ω 4	<i>tr</i>	0.03 \pm 0.01		
16:3 ω 3		<i>tr</i>		
16:4 ω 1				
18:2ω6	1.07 \pm 0.82 ab	0.56 \pm 0.06 a	0.99 \pm 0.18 ab	5.24 \pm 0.83 c
18:2 ω 4		0.11 \pm 0.00	0.23 \pm 0.11	
18:3 ω 6	<i>tr</i>	0.03 \pm 0.02		0.27 \pm 0.04
18:3ω3	0.20 \pm 0.14 a	2.77 \pm 0.46 b	4.41 \pm 2.19 bc	2.11 \pm 0.07 ab
18:4 ω 3		0.99 \pm 0.26	0.79 \pm 0.33	0.08 \pm 0.07
20:2 ω 6	0.10 \pm 0.07	<i>tr</i>		
20:2 ω 4				
20:3 ω 6				
20:3 ω 3	0.05 \pm 0.04	0.06 \pm 0.00		
20:4ω6	0.36 \pm 0.24 ab	0.38 \pm 0.06 ab	0.32 \pm 0.06 a	1.60 \pm 0.08 cd
20:4 ω 3		0.06 \pm 0.02		
20:5ω3	0.78 \pm 0.49 a	4.12 \pm 0.21 cd	3.42 \pm 1.05 bcc	2.83 \pm 0.59 ac
22:2 ω 6				
22:4 ω 6				
22:5 ω 3	0.11 \pm 0.07			
22:6 ω 3	0.26 \pm 0.16			
<i>Others fatty acids</i>		<i>0.08 \pm 0.03</i>		
Total fatty acids	9.19 \pm 5.60	23.30 \pm 1.81	24.32 \pm 6.10	27.57 \pm 0.66

Other fatty acids: FA not formally identified or co-eluting with impurities. tr (traces) indicates a concentration close to the detection limit. Results of the one-way ANOVA are given in bold for the specific fatty acids selected (see text). Different letters indicate a significant difference (one-way ANOVA with p-values <0,05).

<i>Isoperla ambigua</i>	<i>Protonemura praecox</i>	<i>Odontocerum albicorne</i>	<i>Rhyacophila psp.</i>	<i>Erpobdella octoculata</i>
6.56 ± 0.49 ac	9.88 ± 1.12 c	6.07 ± 2.09 ac	7.03 ± 1.67 ac	3.21 ± 0.56 a
0.11 ± 0.04 c	0.17 ± 0.03 cd	0.03 ± 0.00 b	0.13 ± 0.03 c	0.40 ± 0.09 a
	0.09 ± 0.02		0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.02
3.44 ± 0.31 ab	4.91 ± 0.55 b	1.82 ± 0.15 ac	3.00 ± 0.54 bc	0.70 ± 0.25 b
0.26 ± 0.03	0.40 ± 0.05	0.11 ± 0.03	0.29 ± 0.07	0.17 ± 0.02
2.31 ± 0.24 ac	3.75 ± 0.56 c	2.41 ± 1.58 ac	2.80 ± 0.81 bc	1.49 ± 0.24 ab
		1.09 ± 1.26		
0.31 ± 0.05	0.31 ± 0.04	0.28 ± 0.15	0.52 ± 0.15	0.05 ± 0.01
0.14 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.32 ± 0.16	0.25 ± 0.06	0.15 ± 0.06
				0.20 ± 0.10
	0.30 ± 0.05 bc	0.04 ± 0.02 a	0.31 ± 0.12 bc	0.47 ± 0.09 c
	0.01 ± 0.02		0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01
			0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.01
	0.10 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.22 ± 0.05
				0.04 ± 0.02
	0.08 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.06 ± 0.04	0.05 ± 0.02
	0.12 ± 0.02		0.13 ± 0.06	0.07 ± 0.03
6.28 ± 0.73 bd	8.58 ± 1.22 d	4.51 ± 1.30 ab	6.88 ± 0.44 bd	6.74 ± 0.67 bd
				0.07 ± 0.04
				0.39 ± 0.13
			0.05 ± 0.01	tr
0.62 ± 0.02 ca	1.27 ± 0.23 b	0.09 ± 0.03 c	0.53 ± 0.10 c	0.11 ± 0.02 c
	0.06 ± 0.02		0.08 ± 0.04	0.08 ± 0.01
5.09 ± 0.58 cd	6.84 ± 0.93 d	4.01 ± 1.12 bc	5.36 ± 0.30 cd	2.19 ± 0.62 ab
0.42 ± 0.17 ab	0.40 ± 0.08 ab	0.24 ± 0.13 a	0.79 ± 0.07 bc	0.92 ± 0.21 bcd
0.04 ± 0.01				0.77 ± 0.11
0.11 ± 0.04		0.13 ± 0.07	0.07 ± 0.03	0.57 ± 0.09
		0.04 ± 0.03		1.63 ± 0.32
11.99 ± 1.88 bc	18.29 ± 2.86 c	9.48 ± 4.16 ab	10.52 ± 1.06 b	10.04 ± 1.55 ab
0.22 ± 0.06 ab	0.43 ± 0.10 b		0.06 ± 0.01 a	0.11 ± 0.15 a
7.92 ± 0.93 bc	11.29 ± 1.79 c	4.34 ± 1.23 ab	7.43 ± 0.80 bc	4.73 ± 1.47 ab
3.95 ± 0.92 ac	6.57 ± 1.02 c	5.14 ± 2.99 bc	3.03 ± 0.28 ab	4.97 ± 0.23 bc
	0.23 ± 0.05		0.06 ± 0.01	
				0.11 ± 0.15
0.10 ± 0.02				
0.12 ± 0.04	0.20 ± 0.05			
2.56 ± 0.64 bc	5.43 ± 0.88 c	4.22 ± 2.41 c	2.10 ± 0.16 bc	0.99 ± 0.39 ab
0.07 ± 0.01	0.20 ± 0.04			
2.47 ± 0.43 ab	5.94 ± 0.90 c	2.84 ± 0.59 b	2.73 ± 0.43 b	0.27 ± 0.14 a
0.33 ± 0.15	0.63 ± 0.19		0.32 ± 0.06	
		0.03 ± 0.01		0.78 ± 0.13
				0.23 ± 0.06
				0.06 ± 0.02
				0.04 ± 0.02
1.31 ± 0.30 cd	0.94 ± 0.27 bc	0.90 ± 0.57 ac	0.93 ± 0.12 bc	3.14 ± 0.27 d
5.02 ± 0.64 d	4.73 ± 0.81 cd	1.51 ± 0.65 ab	4.38 ± 0.53 cd	4.00 ± 1.26 cd
				tr
				tr
				0.13 ± 0.03
				0.30 ± 0.10
		0.16 ± 0.18		0.11 ± 0.03
24.84 ± 2.12	37.05 ± 5.21	20.27 ± 7.20	24.74 ± 3.28	20.56 ± 2.61

Chapitre 4

Mise en évidence du rôle de la production primaire autochtone dans un secteur de crénon : Approche analytique combinant isotopes stables et acides gras

Sommaire : Chapitre 4

4.1	Préambule	149
	Présentation du site et précisions méthodologiques.....	149
	Résumé de l'étude	151
4.2	Article en préparation	152
	Introduction	152
	Matériels et méthodes.....	154
	Résultats	160
	Discussion.....	175
	Conclusion	182
	Informations supplémentaires	183

4 Chapitre 4

Mise en évidence du rôle de la production primaire autochtone dans un secteur de crénon : Approche analytique combinant isotopes stables et acides gras

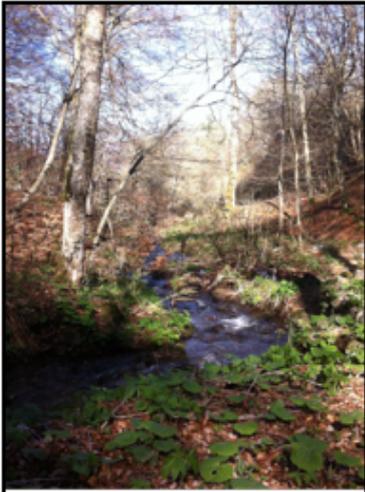
4.1 Préambule

Présentation du site et précisions méthodologiques

Le travail présenté dans ce chapitre vient compléter l'étude entreprise sur le ruisseau d'Anglard, au printemps. Nous avons choisi de travailler sur la période qui correspond au maximum de développement de la production secondaire dans ces milieux. Les données obtenues au printemps indiquaient sans ambiguïté que l'essentiel de l'énergie reçu par les macroinvertébrés étudiés provenait des biofilms épilithiques, des bryophytes et de fines particules détritiques benthiques (MOBF). La contribution de la litière de feuilles de hêtre était minoritaire. La dépendance des macroinvertébrés vis-à-vis de la production primaire autochtone pour la couverture de leur besoin en longs AGPI a également pu être mise en évidence. Il était donc intéressant de prolonger cette étude afin de savoir si un changement allait s'opérer dans l'utilisation de ces ressources et dans l'origine des AGPI en été et automne.

Nous avons donc continué notre travail sur le ruisseau d'Anglard, au niveau du même secteur (cf. descriptif au chapitre précédent). En complément des données collectées au printemps 2017, une série d'échantillonnage a été réalisée au début du mois de juillet 2017 période d'ombrage prononcée et une dernière s'est déroulée en novembre 2017 après la chute des feuilles (Photos 4.1.). Cette dernière date a été perturbée par un épisode neigeux bloquant l'accès au site.

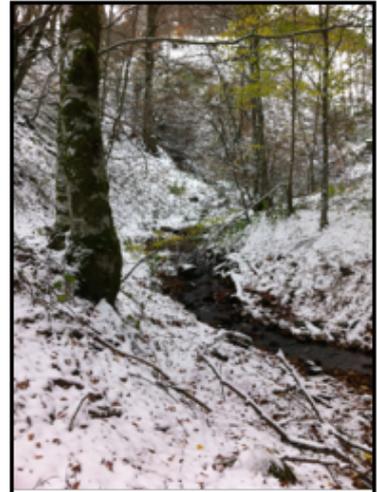
Il était difficile de pouvoir travailler sur un aussi grand nombre de taxons qu'au chapitre III, d'autant plus que certains d'entre eux étaient soit absents en automne (la *Baetidae Baetis*) ou soit présent en nombre insuffisant (les genres *Odontocerum* et *Protonemoura*) pour permettre toutes les analyses prévues. Notre étude s'est donc focalisée sur cinq taxons : deux broyeur-déchetteurs (*Gammarus pulex*, et le genre *Leuctra*), un racleur-brouteur (*Ecdyonurus sp.*), un broyeur prédateur (*Isoperla ambigua*) et un top prédateur invertébré appartenant au genre *Rhyacophila*. En terme de densité, sur les 31 taxons dénombrés dans le cours d'eau en juillet et les 26 en automne, *G. pulex*, et le genre *Leuctra* représentaient à eux deux plus de 50% des individus totaux dénombrés et occupaient les deux premiers rang-fréquence (Frontier, 1976). Les éphémères *Ecdyonurus sp.* étaient au 6^{ème} rang-fréquence en juillet et au 4^{ème} en novembre (environ 10% des individus totaux). *I. ambigua* se situait entre le 9^{ème} et le 6^{ème} et le genre *Rhyacophila* en deça du 10^{ème} rang.



Début printemps
avril 2017



Été
juillet 2017



Automne
novembre 2017

Photos 4.1. Photographies du site aux trois saisons

Résumé de l'étude

En moyenne montagne, les ruisseaux de tête de bassin versant sont caractérisés par un fonctionnement principalement hétérotrophe liée à des apports saisonniers massifs de matière allochtone sous forme de litières de feuilles mortes. Toutefois, lors des périodes d'ouverture de la canopée et sur les parties de ruisseaux à découvert la production primaire autochtone (bryophytes et algues des biofilms épilithiques) peut participer de manière importante aux flux de matière et d'énergie. Savoir si cette participation tend à se limiter à un apport complémentaire en nutriments essentiels tels que les acides gras polyinsaturés (AGPI) ou à réellement soutenir l'essentiel du réseau trophique est un sujet de débat assez vif. Nous avons donc effectué un suivi saisonnier sur un ruisseau forestier dans sa partie la plus amont (crénon) au cours de la période propice au développement de la production secondaire, d'avril à novembre. Grâce à l'utilisation d'une approche analytique basée sur les isotopes stables ($\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$) et au suivi d'un certain nombre d'acides gras spécifiques (biomarqueurs, AGPI), nous avons pu mettre en évidence que la production primaire autochtone constituait le principal apport énergétique reçu par les cinq taxons étudiés de macroinvertébrés au printemps et en été. La litière monospécifique (feuilles de *Fagus sylvatica*) présente dans ce ruisseau s'est avérée très récalcitrante mais constituait, cependant, une source régulière de particules fines sur lesquelles s'agrégeaient des microalgues. Ce matériel détritique fin à caractère allochtone/autochtone mixte a en revanche été abondamment utilisée par les consommateurs primaires étudiés, et ce quelle que soit la période. Nos résultats confirment que les biofilms épilithiques et épixyliques (associées aux particules détritiques fines) sont à l'origine des AGPI essentiels, et notamment du 20:4 ω 6 et du 20:5 ω 3 assimilés par les différents taxons de macroinvertébrés étudiés et qui, indépendamment de leur groupe trophique fonctionnel, présentaient des régimes alimentaires très diversifiés. Enfin cette étude confirme que les bryophytes aquatiques constituent une ressource organique non négligeable dans ces secteurs amonts à faible productivité.

4.2 Article en préparation

Introduction

En milieu lotique, l'origine du carbone soutenant le fonctionnement des réseaux trophiques est une thématique de recherche historique (Minshall, 1978; Vannote *et al.*, 1980; Hynes, 1983) qui reste très vive à l'heure actuelle (Pingram *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2018 ; Carroll *et al.*, 2016). Plus particulièrement la question de l'importance que représentent les apports détritiques terrestres vis-à-vis des consommateurs invertébrés par rapport à la production primaire du cours d'eau fait toujours l'objet de discussions (Finlay, 2001; Collins *et al.*, 2016; Brett *et al.*, 2017). Ce débat n'épargne pas les ruisseaux de tête de bassin versant qui sont le plus souvent caractérisés par un fort ombrage lié à leur environnement majoritairement forestier. Dès lors, il est admis que la source d'énergie dominante qui intègre ces petits écosystèmes provient du bassin versant sous forme de matière organique détritique allochtone (Wallace *et al.*, 1997; Graça, 2001; Dangles *et al.*, 2004). Si le fonctionnement de ces cours d'eau est considéré comme principalement hétérotrophe (Gessner *et al.*, 1999; Dangles & Guérol, 2001), un niveau variable d'autochtonie a pu toutefois être observé dans certains cours d'eaux forestiers indépendamment du stock disponible de matières allochtones, principalement sous forme de litières (Finlay *et al.*, 2002; Bunn *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2010; Twining *et al.*, 2017). Les périodes d'ouverture de la canopée de la ripisylve et les parties de ruisseaux à découvert sont en effet propices au développement de bryophytes et d'algues dominées par des diatomées, des cyanobactéries et quelques chlorophytes majoritairement associées à des biofilms épilithiques (Ylla *et al.*, 2007; Niedrist & Füreder, 2017). En outre, il est désormais bien établi que ces biofilms épilithiques et principalement les diatomées sont à l'origine de molécules essentielles aux développements des macroinvertébrés (Ruess & Müller-Navarra, 2019). Les ressources autochtones sont ainsi considérées de meilleure qualité nutritionnelle que le matériel détritique immergé (Guenet *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2018). De ce fait pour certains auteurs, la qualité du carbone issu des sources allochtones est insuffisante pour leur permettre à elles seules de soutenir le fonctionnement de l'écosystème (Guo *et al.*, 2017). En dehors des aspects stœchiométriques, la qualité des sources autochtones repose sur leur concentration élevée en AGPI des séries ω_3 et ω_6 reconnus comme étant essentiels pour une majorité d'invertébrés (Guo *et al.*, 2017; Torres-Ruiz & Wehr, 2019). Comme tendent à le montrer de récentes études (Twining *et al.*, 2017; Kühmayer *et al.*, 2020), il s'agit plus particulièrement du $20:5\omega_3$ et du $20:4\omega_6$ sachant que leurs précurseurs de biosynthèse $18:3\omega_3$ et du $18:2\omega_6$ sont aussi présents dans les litières de feuilles (Torres-Ruiz *et al.*, 2011). Le $20:5\omega_3$ s'insère dans les phospholipides membranaires et se concentre dans les tissus nerveux, notamment les yeux composés des arthropodes (Eguchi *et al.*, 1994). Le $20:5\omega_3$ et surtout le $20:4\omega_6$ sont les précurseurs d'hormones tissulaires telles que les

eicosanoïdes impliquées dans les processus inflammatoires et immunitaires ou la croissance cellulaire chez les arthropodes (Wiktorowska-Owczarek *et al.*, 2015; Stanley & Kim, 2019). A l'heure actuelle, on ignore les besoins spécifiques des macroinvertébrés vis-à-vis de ces composés ni si certains ont les capacités de les synthétiser à partir des précurseurs à 18 atomes de carbone (voir le bilan effectué par Monroig & Kabeya, 2018). Cependant les études menées sur plusieurs espèces de crustacés et d'insectes terrestres montrent clairement que lorsque les longs AGPI (20:4 ω 6, 20:5 ω 3) sont présents dans l'alimentation, ils améliorent considérablement la croissance, le développement larvaire et la reproduction chez les microcrustacés zooplanctoniques, les décapodes et les lépidoptères (Glencross, 2009; Arrese & Soulages, 2010; Xu *et al.*, 2017). En ligne avec ces résultats Crenier *et al.* (2017) ont pu observer que les longs AGPI des diatomées, avaient un effet positif sur le taux de croissance d'un déchetiqueur spécialiste des litières des ruisseaux forestiers, l'amphipode *Gammarus fossarum*. Les cours d'eau de tête de bassin sont des environnements contraints et plus instables que les rivières de piémont (Ceola *et al.*, 2013). Face à une abondante litière de feuilles de faible qualité nutritionnelle et à des biofilms épilithiques à développement fluctuant et saisonnier, les macroinvertébrés de ces ruisseaux présentent des stratégies alimentaires opportunistes (Dangles & Guérol, 2001; Maiolini & Silveri, 2005; Felten *et al.*, 2008). Ainsi certains déchetiqueurs compensent les limitations en nutriments par un taux d'ingestion accru et/ou recherchent des ressources ayant des propriétés nutritives plus élevées que le matériel détritique (Frost *et al.*, 2005, 2006; Flores *et al.*, 2014). Pour l'essentiel ces études se sont concentrées sur les cours d'eau d'ordre 2 à 3 (Richardson, 2019) et peu sur les secteurs d'eucrénon qui comprennent les ruisseaux d'ordre 1 et les sources rhéocrènes à écoulement permanent (Leberfinger & Herrmann, 2010; Carroll *et al.*, 2016). Pourtant à l'échelle locale ces milieux représentent environ un tiers de la biodiversité en espèces aquatiques et renferment un nombre élevé d'espèces rares et endémiques de macroinvertébrés (Cianficconi *et al.*, 1998; Rott *et al.*, 2006; Von Fumetti & Nagel, 2011; Carroll & Thorp, 2014).

Ainsi dans l'étude présentée ici, nous avons réalisé un suivi saisonnier sur un secteur de ruisseau forestier d'ordre 1 situé à 600 m de sa source principale en moyenne montagne (Massif-Central, France). Pendant la période propice au développement de la production secondaire et au déroulement des émergences (avril - novembre ; Huryn & Wallace, 2000), les objectifs de ce travail étaient d'évaluer la disponibilité et l'utilisation des ressources organiques basales par une sélection de macroinvertébrés représentatifs du secteur. Dans cette partie du crénon à environnement forestier, nous avons émis l'hypothèse que les apports allochtones étaient prépondérants pour soutenir la production secondaire mais qu'ils pourraient être éventuellement complétés, en période d'ouverture de la canopée, par l'apport issu des producteurs primaires autochtones. En revanche, nous nous attendions à ce que les taxons sélectionnés soient fortement dépendants de ces mêmes producteurs primaires pour

couvrir leurs besoins en AGPI essentiels, quelle que soit la période d'étude. En utilisant des approches analytiques basées sur les isotopes stables ($\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$) et la recherche d'AG spécifiques (biomarqueurs, AGPI), nous avons déterminé l'assimilation des différentes sources basales et l'origine des AG présents dans les lipides neutres des macroinvertébrés sur trois périodes consécutives différentes (début du printemps, été et automne).

Matériels et méthodes

Site d'étude et dates de prélèvements

L'étude a été réalisée sur la zone de crénel (ordre 1 – Strahler, 1957) d'un cours d'eau de moyenne montagne (alt : 1114 m), le ruisseau d'Anglard (France, Massif Central : 45°28'44.64"E – 2°54'50.23"N). Celui-ci s'écoule dans un environnement de pâturages humides et de hêtraies résiduelles sur substrat volcanique. La station de prélèvement (*Figure S4.1., informations supplémentaires*) était située dans une dense hêtraie où le ruisseau présente un écoulement rapide alternant des faciès de *plats-escaliers* et de *radiers-rapides* (Delacoste *et al.*, 1995) dont les substrats sont composés de blocs et galets de trachyandésite basaltique ainsi que de sédiments fins pyroclastiques. L'échantillonnage a été effectué à trois périodes différentes : (i) du 5 au 7 avril 2017 correspondant au début du printemps avec une exposition maximale du ruisseau à la lumière naturelle (canopée ouverte) ; (ii) du 3 au 7 juillet 2017 correspondant au plein été avec une faible exposition du ruisseau à la lumière naturelle (canopée fermée) ; (iii) du 6 au 14 novembre 2017 correspondant à l'automne après la chute des feuilles et en présence d'une abondante litière de feuilles de hêtre (*Fagus sylvatica*) dans le lit. Les paramètres physico-chimiques de l'eau (Tableau 1) sont restés relativement stables au cours du suivi, notamment le pH et la teneur en silice. Les concentrations en N et P totaux plus élevées qu'attendues étaient caractéristiques d'un cours d'eau oligomésotrophe (Dodds & Smith, 2016).

Sélection des macroinvertébrés et échantillonnages

Sur la base d'inventaires faunistiques effectués sur ce ruisseau dans les années 1970 (Verneaux, 1977) et par nous-même à l'automne 2016, nous avons sélectionné cinq taxons parmi les plus abondants du macrobenthos et/ou appartenant à des groupes trophiques fonctionnels (FFG) représentatifs d'un cours d'eau de tête de bassin au cours de l'année. Il s'agissait de *Gammarus pulex* (broyeur – 25 à 46% du total des individus) ; *Leuctra psp* (broyeur – 15 à 30 % du total des individus) ; *Ecdyonorus sp.* (racleur – 5 à 10 % du total des

individus) ; *Isoperla ambigua* (broyeur-prédateur – 2 à 4% du total des individus) et *Rhyacophila psp.* (prédateur – 0,5 à 1 % du total des individus).

A chacune des périodes, les macroinvertébrés ont été prélevés à l'aide d'un filet Surber (v-d-m 250 µm), puis transférés dans des glacières remplies d'eau du ruisseau et transportés en moins de 30 minutes jusqu'à la station biologique de l'Université (UCA-Besse-en-Chandesse, France). Là, les macroinvertébrés ont été triés et identifiés jusqu'au genre ou si possible à l'espèce et ceux des cinq taxons sélectionnés regroupés dans différents bacs remplis d'eau froide. Un lot de huit à dix individus de chaque taxon a été isolé et immédiatement utilisé pour l'analyse des contenus digestifs. Le reste des individus a été laissé à jeun une nuit au frais (4-5°C) pour assurer la vidange des tractus digestifs. Des lots homogènes de quatre à huit individus ont été constitués en triplicats et immédiatement congelés dans de l'azote liquide pour être ensuite conservés à -80°C pour les futures analyses.

Échantillonnage des sources organiques basales

Les quatre sources organiques basales présentes dans le cours d'eau étaient : la litière de feuille de hêtre (issue de l'abscission automnale et d'apports latéraux depuis les dépôts sur berges), les fines particules de matières organiques benthiques (MOBF), les biofilms épilithiques et des bryophytes aquatiques. Ces dernières, absentes de novembre à février, n'ont donc pas été prélevées en automne. Les feuilles et les plants de mousses immergés ont été prélevés manuellement et stockés dans une glacière remplie d'eau du ruisseau. Au laboratoire, ils ont été délicatement rincés à l'eau claire afin d'éliminer débris organiques et petits microinvertébrés. Divisés en plusieurs lots, ils sont ensuite stockés à -80°C. En outre, la quantité de feuilles et de bryophytes submergées a été estimée par détermination de la masse sèche de la totalité des feuilles ou des plants de mousses collectés sur trois surfaces du lit immergé délimitées par un gabarit de 1m². Le gabarit a été déplacé trois fois au hasard à chaque date.

Les biofilms épilithiques ont été prélevés grâce au brossage et rinçage de la surface supérieure de cinq galets immergés. Les galets ont été photographiés afin de déterminer la surface brossée à l'aide d'un analyseur d'image (Image J-Fiji, version 2.0.0-rc68). Les biofilms en suspension ont ensuite été filtrés sur 250 µm, et divisés en plusieurs sous-échantillons. Un sous-échantillon a été fixé au lugol afin de déterminer la composition taxonomique de la communauté épilithique. Un second a été fixé avec 5% de formaldéhyde pour effectuer le dénombrement des micro-organismes par cytométrie de flux. Au laboratoire, le restant des sous échantillons a été récupéré sur filtres GF/F préalablement chauffés à 450°C et stockés à -80°C en triplicats.

La MOBF a été récupérée au laboratoire par tamisage du matériel fin déposé au fond des bacs de tri lors de la séparation des lots de macroinvertébrés prélevés. Il s'agit donc de la MOBF entraînée dans les filets Surber ayant servi à la récolte des macroinvertébrés. Cette MOBF est ensuite concentrée sur filtre GF-C (Wathman™, $\varnothing = 47\text{mm}$) et divisée en plusieurs lots conservés à -80°C . Enfin, en tenant compte de la surface des Surber, nous avons calculé la quantité de MOBF déposée par m^2 dans le cours d'eau.

Procédures de laboratoire

Communautés microbiennes

Les cellules bactériennes et algales des échantillons de biofilm ont été dénombrées sur un cytomètre de flux (FASC CALIBUR cytometer, BD science, USA) selon la méthode de Tanaka *et al.* (2011). La composition de la communauté de microorganismes épilithiques a été déterminée *via* un microscope inversé (Axiovert 200M, Zeiss, Germany) en appliquant la méthode d'Utermöhl (Lund *et al.*, 1958). L'intensité de la colonisation des litières par les hyphomycètes a été analysée en déterminant la concentration en ergostérol (stérol fongique) des feuilles prélevées dans le ruisseau, selon la méthode classiquement utilisée de Bärlocher & Gessner (2005).

Régimes alimentaires des macroinvertébrés

Les tubes digestifs ont été extraits par microdissection sous une loupe binoculaire. Le contenu du tube digestif a été ensuite dispersé dans une goutte d'eau sur une lame de microscope. Les lames ont été observées sous différents grossissements (X20, X100, X400) à l'aide d'un microscope inversé à contraste de phase (Axiovert 200M, Zeiss, Germany). La surface approximative relative (en %) représentée par les différents items de nourriture identifiés a été estimée à partir de l'observation de différents champs ramenés à la surface totale couverte par le contenu digestif (Felten *et al.* 2008).

Analyse des isotopes stable, $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$

Les différents échantillons, conservés à -80°C , ont été desséchés à 60°C pendant 48h. Ensuite, ils ont été broyés et pesés dans une capsule en étain à l'aide d'une microbalance (Sartorius ME36S, Allemagne). Les analyses ont été effectuées par un spectromètre de masse (Finnigan Delta Plus Mass spectrometer) relié à un analyseur d'éléments (Carlo Erba NC2500 Elemental Analyzer). Les ratios d'isotopes stables sont exprimés en ‰ selon la notation en vigueur et sont estimés en fonction de la formule suivante :

$$\delta X(\text{‰}) = \left(\frac{R_{\text{échantillon}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad \text{Equation I}$$

Où X représente le ^{13}C ou le ^{15}N ; $R_{\text{échantillon}}$ est le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de l'échantillon ; R_{standard} est l'échantillon de référence standard : Vienna Pee-Dee Belemnite pour le carbone ou l'azote atmosphérique pour l'azote. La précision analytique ne variait pas au-delà de 0,4‰ et 0,23‰ pour l'azote et le carbone respectivement.

Détermination des profils d'acides gras des sources basales et des macroinvertébrés

Les compositions en AG ont été déterminées à partir des lipides totaux pour les sources basales et sur les lipides neutres (LN) pour les cinq macroinvertébrés. Les lipides totaux ont été extraits selon la méthode de Folch *et al.* (1957) et lorsque c'était nécessaire, séparés en LN et lipides polaires sur colonne de silice (SPE Strata NH2 Phenomenex®) selon la méthode de Koussoroplis *et al.* (2010). Les lipides polaires ont été conservés mais non traités pour cette étude.

Les deux types d'extraits lipidiques ont été trans-estérifiés en ester méthylique d'acide gras (EMAG) en présence d'acide (H_2SO_4) toujours selon Koussoroplis *et al.* (2010). Les EMAG ont été séparés et identifiés sur un chromatographe à phase gazeuse à détection FID (Agilent®, 6850 GC, USA) muni d'une colonne capillaire DB-WAX (Agilent®, 30m x 0.25mm, ID x 0.25 mm). Le programme de séparation était le suivant : split ratio 1:10 ; température de l'injecteur: 240°C ; température du four s'élevant de 150°C à 240°C à raison de $3^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ suivi d'un plateau de 20 min; gaz vecteur: hélium. Les EMAG ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention avec ceux de mélanges d'EMAG standards (Sigma®, Supelco®, Larodan Inc.®) et quantifiés à l'aide de standards d'AG internes ajoutés avant la trans-estérification (13:0 et 23:0). L'identification des EMAG a été confirmée ou corrigée en CPG-Masse à l'aide d'un spectromètre de masse (5975B Agilent®) et colonne capillaire DB-WAX. Chaque spectre de masse a été vérifié et identifiés à l'aide des banques de données (NIST / NBS) et le site web www.lipidhome.co.uk.

Traitement des données

Estimation de la position trophique

Pour estimer correctement la position trophique (TP) des macroinvertébrés (basée sur les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$), il est impératif de sélectionner une ligne de base fiable parmi les sources organiques basales (Jardine *et al.*, 2014). En milieux lacustres, Lake *et al.* (2019) conseillent d'utiliser la MOBF, constituée d'un mélange de microalgues sédimentées et de particules détritiques, comme ligne de référence représentative pour évaluer la TP des consommateurs invertébrés. Dans un ruisseau de tête de bassin, la MOBF regroupe de fines particules détritiques et divers microorganismes, certains étant autotrophes (Halvorson *et al.*, 2019). De plus dans notre étude, l'avantage majeur de la MOBF échantillonnée était sa disponibilité tout au long de l'année et ses signatures de $\delta^{13}\text{C}$ et de $\delta^{15}\text{N}$ similaires quelle que soit la date de prélèvement ($\delta^{13}\text{C}$: -29.39 ‰ à -29.27 ‰ ; $\delta^{15}\text{N}$: 0.50 ‰ à 0.85 ‰ ; Anova-1way, $p > 0,05$). Ainsi la MOBF a été sélectionnée comme ligne de base et nous avons calculé la TP des cinq taxons de macroinvertébrés à chaque date de prélèvement selon l'équation suivante :

$$TP_{\text{consommateur}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{consommateur}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{base}}}{\Delta\delta^{15}\text{N}} + TP_{\text{base}} \quad \text{Equation II}$$

Ou $\delta^{15}\text{N}_{\text{base}}$ correspond à la moyenne des $\delta^{15}\text{N}$ de la MOBF ; TP_{base} est la position trophique de la MOBF ($TP_{\text{base}} = 1$) ; $\Delta\delta^{15}\text{N}$ correspond au facteur d'enrichissement trophique (TEF). Nous avons fixé le TEF à $2,3 \pm 0,18\text{‰}$ pour les macroinvertébrés répertoriés comme consommateurs primaires (McCutchan *et al.* 2003). Toutefois, pour le prédateur *Rhyacophila psp.* et le plécoptère *Isoperla ambigua* dont le régime alimentaire contenait une majorité de proies animales, le TEF a été fixé à $1,4 \pm 0,2\text{‰}$ conformément aux préconisations de McCutchan *et al.* (2003) pour les invertébrés prédateurs.

Modèle de mélange Bayésien SIAR

A chaque saison, les proportions des différentes sources basales assimilées par les cinq consommateurs (directement ou *via* les proies assimilées) ont été estimées à l'aide du modèle de mélange bayésien SIAR reposant sur les valeurs d'isotopes stables $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ (Parnell *et al.*, 2010). Ce modèle de mélange bayésien a été calculé sur Rstudio avec le package « SimmR » (version R.3.5.2) dédié à l'étude des réseaux trophiques (Phillips *et al.*, 2014). Cette nouvelle version de SIAR utilise JAGS (Just Another Gibbs Sampler) un programme de simulation à partir de modèles hiérarchiques bayésiens utilisant la chaîne de Markov Monte Carlo (MCMC) (Parnell & Inger, 2016). Les TEF utilisés ont été fixés à

0,5±0,13‰ pour le ^{13}C et 2,3±0,18‰ pour le ^{15}N conformément à Majdi & Traunspurger (2017). Par conséquent pour le prédateur *Rhyacophila psp.* et *Isoperla ambigua*, le modèle n'a permis que de calculer la contribution indirecte de chaque source basale via les proies ingérées.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées sur Rstudio (R version 3.6.3). L'ensemble des tests a été réalisé avec un $n=3$ et une p -value de 0,05. La normalité de la distribution a été évaluée au moyen des tests de Shapiro-Wilk ou de Kolmogorov-Smirnov. Lorsque les données ne répondaient pas à la normalité, une transformation Box-Cox a été appliquée (Box & Cox, 1964). L'homoscédasticité a été vérifiée à l'aide du test de Levene. Un test-t de Student a été appliqué aux comparaisons par paires. Pour les comparaisons multiples, nous avons utilisé une Analyse de Variance à un facteur (Anova-1way) suivie d'un post-hoc Tukey HSD.

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur l'ensemble des valeurs d'abondance relative des acides gras (% du poids des AG totaux) issus des sources basales (litière, MOBF, bryophytes et biofilm épilithique) afin de mettre en évidence les AG caractéristiques de chaque source et disponibles pour les consommateurs primaires.

Afin de déterminer quelle source basale était la plus proche dans ses profils d'AG des AG extraits des LN de chacun des cinq taxons de macroinvertébrés nous avons réalisé un positionnement multidimensionnel non métrique (non-metric multidimensional scaling ou NMDS) pour chaque période de prélèvement. Cette analyse multivariée a été calculée à partir d'une sélection de plusieurs AG (% du poids des AG totaux dans l'extrait) et de sommes d'AG. Les AG individuels étaient le 16:0, le 16:1 ω 7, le 18:1 ω 7, le 18:2 ω 6 (LIN), le 18:3 ω 3 (ALA), le 20:4 ω 6 (ARA) et le 20:5 ω 3 (EPA). Les sommes d'AG étaient la somme des acides gras saturés (AGS), des acides gras mono-insaturés (AGMI) et des acides gras polyinsaturés (AGPI). De plus des acides gras caractéristiques ou biomarqueurs ont été regroupés et ajoutés à cette sélection. Il s'agissait de la somme des AGS_{C21-27} et AGS_{C22-28} (caractéristiques de la cuticule des feuilles d'arbres - Mills et al., 2003) ; de la somme des AGS ramifiés (AG biomarqueurs des bactéries - Desvilettes et al., 1997) ; de la somme des AGPI à 16 atomes de carbone (biomarqueurs des diatomées - Taipale et al., 2013).

Cette analyse a été réalisé sous Rstudio avec le package « vegan » (version 2.5-7). Les dissemblances entre échantillons ont été établies en utilisant les distances de Bray-Curtis qui permettent une mesure quantitative des dissimilarités et d'ordonner les différents échantillons.

Résultats

Biomasses des sources basales et compositions taxonomiques des biofilms

Ces données sont présentées dans le tableau 4.1. L'aspect dispersé des paquets de feuilles mortes n'a pas permis de dégager de différences statistiques entre les saisons (écart-types très étendus sauf en automne). Néanmoins, c'est en automne que la litière était la plus abondante ($178,02 \pm 44,41 \text{ g.m}^{-2}$) et présentait le plus fort degré de colonisation par les hyphomycètes ($100,26 \pm 4,68 \text{ mg C.g}^{-1} \text{ MS}$; Anova 1-way, $p < 0,05$). En été, la litière était assez rare avec son plus bas niveau ($7,35 \pm 5,40 \text{ g.m}^{-2}$), alors qu'au début de printemps, il persistait encore des paquets de litière dans le lit, mais plus faiblement colonisés par les hyphomycètes qu'en automne ($37,84 \pm 2,38 \text{ mg C.g}^{-1} \text{ MS}$; Anova 1-way, $p < 0,05$). Ceci pourrait être le signe d'apports latéraux récents provenant des feuilles de hêtre entassées sur les berges (Benfield, 1997; Gessner *et al.*, 1999). Les particules détritiques (MOBF) ont nettement augmenté d'avril à novembre (Tableau 4.1). Cependant, leurs répartitions aléatoires suivant les faciès prélevés ont induit une amplitude considérable de valeurs mesurées rendant les tests statistiques inopérants. Les bryophytes aquatiques (soit les plants immergés en permanence) étaient absentes en automne et plus abondantes au début du printemps ($3,80 \pm 7,08 \text{ g.m}^{-2}$) qu'en été ($0,64 \pm 1,03 \text{ g.m}^{-2}$) ; bien qu'ici aussi, leur répartition très hétérogène selon les faciès (écart-types très étendus) était à l'origine de l'absence de différence statistique. En ce qui concerne les biofilms épilithiques, la plus faible biomasse moyenne a été observée en été ($1,61 \pm 0,07 \text{ g.m}^{-2}$) en lien avec le fort ombrage. En période de canopée ouverte, les biofilms se sont bien développés avec une biomasse moyenne deux fois et demie plus élevée en automne ($24,78 \pm 1,51 \text{ g. m}^{-2}$) qu'au début du printemps ($9,21 \pm 0,61 \text{ g.m}^{-2}$). Quelle que soit la saison, les diatomées étaient dominantes (de 52% à 60 % de la biomasse), les cyanobactéries constituant le second groupe taxonomique par ordre d'importance avec un maximum estival (environ 40% de la biomasse), et ensuivant les bactéries hétérotrophes étaient surtout abondantes en automne (11,8% de la biomasse). Passée inaperçue lors des prélèvements, une chrysophyte pluricellulaire, *Hydrurus foetidus* a été retrouvée dans les échantillons de biofilm en avril et juillet et donc probablement sous-échantillonnée en raison de son développement assez discret (aux dates de nos sorties-terrain) et connue pour être surtout concentrée vers les parties bombées aval des galets et moins sur leurs surfaces (Cazaubon & Loudiki, 1986).

Tab. 4.1. Paramètres physico-chimiques et biomasses des sources basales du ruisseau d'Anglard (Massif Central, France) au cours des trois dates de prélèvements. Une lettre identique indique l'absence de différence significative entre les dates (Anova-1way et test de Student pour les bryophytes et *Hydrurus* sp. ; $p < 0,05$).

	Printemps	Été	Automne
Paramètres physico-chimiques			
Température (°C)	4-5°C	7-9°C	4-5°C
pH	7,2	7,2	7,3
N total dissous (µg/L)	971-1012	1038-1079	745-786
P total dissous (µg/L)	<10	<10	33
Silice dissoute (SiO ₂) (mg/L)	27,9	28,6	33,8
Canopée	ouverte	fermée	ouverte
Biomasses			
Litière de feuilles (g/m ²)	132,29 ± 168,70 a	7,35 ± 5,40 a	178,02 ± 44,41 a
Hyphomycètes (mgC/g MS de feuille)	37,84 ± 2,38 a	20,31 ± 6,43 b	100,26 ± 4,68 c
FBOM (g/m ²)	3,85 ± 2,48 a	21,75 ± 28,74 a	47,71 ± 77,64 a
Bryophytes (g/m ²)	3,80 ± 7,08 a	0,64 ± 1,03 a	<i>absent</i>
Biofilm épilithique (g/m ²)	9,21 ± 0,61 a	1,61 ± 0,07 b	24,78 ± 1,51 c
Biomasse bactéries	0,11 ± 0,10 a	0,09 ± 0,05 a	2,93 ± 2,28 b
Biomasse cyanobactéries	2,39 ± 1,71 ab	0,064 ± 0,39 a	6,95 ± 6,64 b
Biomasse diatomées	5,21 ± 3,32 a	0,84 ± 0,46 b	14,90 ± 8,46 a
Biomasse <i>Hydrurus foetidus</i>	1,48 ± 1,59 a	0,03 ± 0,02 b	<i>absent</i>

Signatures isotopiques et positions trophiques (TP)

Les TP sont présentées sur la figure 4.1. et les signatures isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$) sous formes de diagrammes *biplots* en *documents supplémentaires* (Figure S4.2.). Les signatures isotopiques des sources basales sont demeurées stables au cours du temps, avec la litière ayant des valeurs moyennes de $\delta^{13}\text{C}$ et de $\delta^{15}\text{N}$ allant respectivement de -31,24‰ à -30,11‰ et de -3,47‰ à -2,55‰ (Figure S4.2.). Les signatures de $\delta^{13}\text{C}$ des MOBF sont restées remarquablement identiques tout au long de l'étude, en moyenne -29,34‰ (écart-type : 0,05), celles de $\delta^{15}\text{N}$ étaient comprises entre 0,50‰ et 0,53‰ (printemps et automne) et 0,85‰ en été. Les valeurs chez les bryophytes étaient également similaires entre le printemps et l'été, ($\delta^{13}\text{C}$: -28,95‰ et -29,06‰ ; $\delta^{15}\text{N}$: 3,46‰ et 3,31‰) (Figure S4.2.). Seul le biofilm épilithique échantillonné au printemps avait une signature significativement plus enrichie en ^{13}C ($19,49 \pm 3,76$ ‰ – Anova-1way, $p < 0.05$) et une valeur de $\delta^{15}\text{N}$ plus basse ($0,54 \pm 0,9$ ‰) que celles mesurées aux deux autres saisons, qui étaient proches les unes des autres ($\delta^{13}\text{C}$: -26,65‰ et -27,64‰ ; $\delta^{15}\text{N}$: 2,40‰ et 2,26‰).

En ce qui concerne les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ des cinq taxons de macroinvertébrés, elles étaient assez homogènes à chaque période (Figure S4.2.) de l'ordre de -25,5‰ au printemps et à l'automne et de -24,3‰ en été. Cependant, les plécoptères *Leuctra psp.* ont présenté des valeurs plus appauvries en ^{13}C , particulièrement en été/automne où les valeurs mesurées (-26,75‰ et -27,13‰) étaient significativement plus basses que celles des autres taxons.

Les signatures de $\delta^{15}\text{N}$ converties en position trophique (TP ; Figure 4.2) ont révélé la présence de trois à quatre niveaux trophiques de consommateurs selon la saison. L'amphipode *G. pulex* s'est toujours situé le plus bas, au-dessus de la ligne de base (MOBF) avec des TP de l'ordre de 1,82 à 2,12 significativement inférieures à celles des autres taxons (Anova-1 way, $p < 0,05$). *Ecdyonorus sp.* et *Leuctra psp.* occupaient le haut du niveau trophique 2 avec des TP similaires (de l'ordre de 2,6 à 2,9) mais avec une baisse significative de valeurs en été pour les deux taxons (2,36 et 2,50). Le plécoptère *Isoperla ambigua* a changé de niveau trophique au fur et à mesure des saisons, présentant d'abord une TP identique à celles d'*Ecdyonorus sp.* et *Leuctra psp.* au début du printemps, puis atteignant ensuite les niveaux *prédateur* (TP : 4,21 puis TP : 5,68) identiques à ceux des trichoptères *prédateurs* *Rhyacophila psp.* (Figure 1). Ces derniers ont d'abord occupé le niveau 4 avec une légère baisse en été (TP : 4,18) avant d'atteindre une TP de 5,41 significativement plus élevée que les précédentes (Anova-1 way, $p < 0.05$).

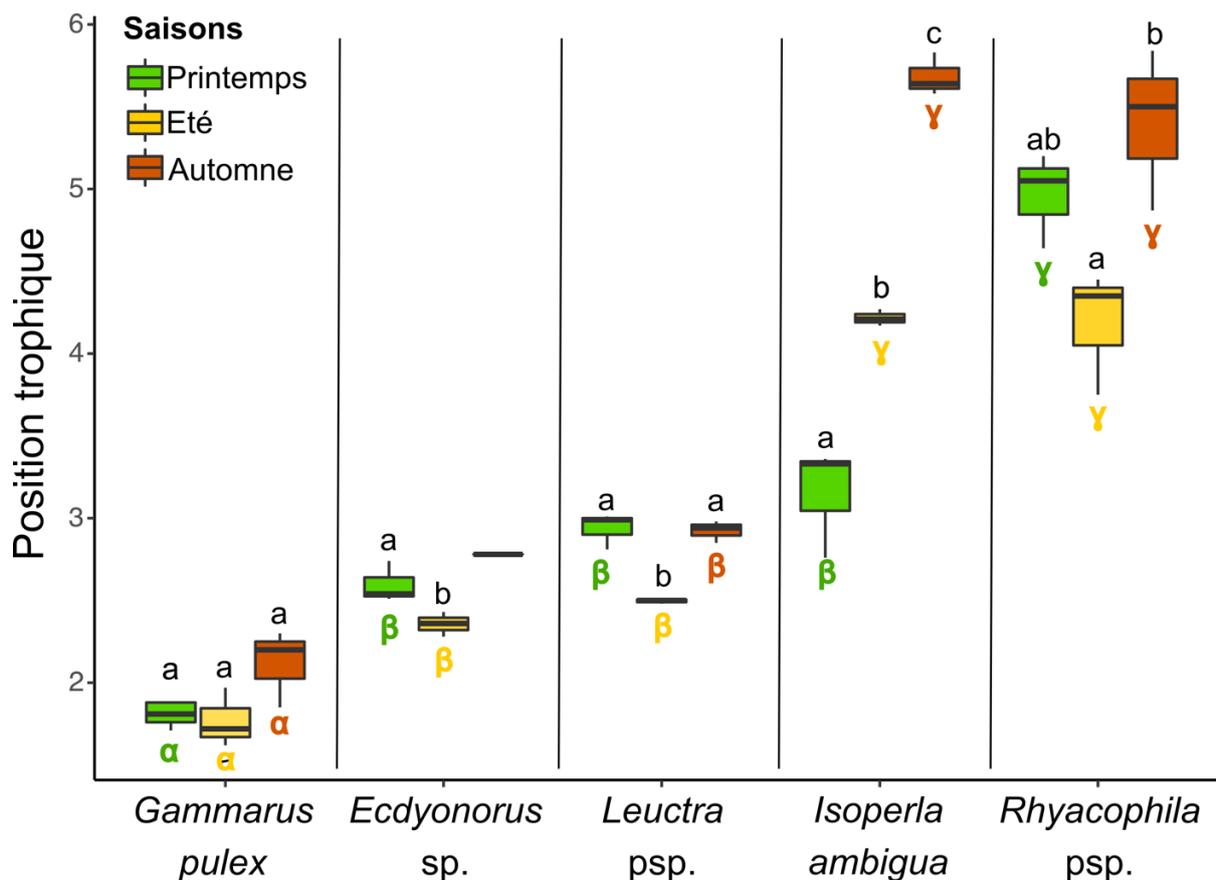


Fig. 4.1. Evolution saisonnière des positions trophiques (TP) des 5 taxons de macroinvertébrés.

Les valeurs sont représentées en « boxplots » avec l'indication de la valeur maximale, du 75Q, de la médiane, du 25Q et de la valeur minimale. Au sein d'une même espèce, l'existence de différences significatives entre les saisons est indiquée par des lettres latines différentes (ANOVA-1way, $p < 0,05$). Pour une même saison (couleur identique), les différences significatives interspécifiques sont indiquées par des lettres grecques différentes (ANOVA-1way, $p < 0,05$). La FBOM a été utilisé comme ligne de base (TP = 1).

Régimes alimentaires et assimilation des différentes sources organiques basales

Les prédateurs *Rhyacophila* sp. ont ingéré très majoritairement des proies animales, qui ont été observées dans l'ensemble de leurs tractus digestifs (F=100%) (*documents supplémentaires, Figure S4.2.*). C'est uniquement en été, que des algues en quantités significatives ont été identifiées dans un tiers des contenus digestifs, avec *Hydrurus foetidus* constituant 24,1% de l'abondance relative. En été et en automne, les fractions animales étaient présentes dans tous les tractus digestifs d'*I. ambigua* constituant plus de 99% de l'abondance relative (*Figure S4.3*). En revanche au printemps, ces plécoptères consommaient principalement des diatomées, des portions d'*H. foetidus*, des débris végétaux et pratiquement pas de matière animale. *G. pulex* et *Leuctra* sp. exploitaient une gamme assez variée de nourriture, largement dominée par de la matière végétale fine. Des restes de bryophytes ont été formellement identifiés au printemps et en été, ainsi que des débris animaux au printemps et en automne chez ces deux taxons broyeur. Enfin au printemps, le racleur *Ecdyonurus* sp. ingérait préférentiellement des diatomées (Abondance : 73%), dont la proportion a fortement diminué en été (Abondance : 19,3%) et en automne au profit de fins débris végétaux (*Figure S4.3*).

Les résultats du modèle SIAR permettant d'estimer les contributions des sources basales à la nourriture assimilée par les taxons étudiés sont illustrés sur la figure 4.2. Au printemps, la densité des pics « gaussiens » et les intervalles de confiance entre 0 et 60 % permettent d'évaluer précisément la contribution moyenne la plus probable des biofilms épilithiques à la matière organique assimilée par les taxons étudiés. Les biofilms représentaient de 33,1±13,5% (*Ecdyonurus* sp.) à 36,1±14,8% (*G. pulex* et *Leuctra* sp.) de la nourriture assimilée (*Figure 2*) et 30,4±11,8% chez *I. ambigua*. 37,1±15,4% de la matière organique transmise aux prédateurs *Rhyacophila* sp. provenait de ce même biofilm. Les proportions de contribution de la litière se situent entre 0 et 40 %, avec des pics de densité étroits, dissymétriques. Cette ressource minoritaire n'a donc constitué que de 14,8±11,1% à 17,2±12,4% de l'énergie assimilée par les cinq taxons. Entre ces deux ressources organiques, le modèle a donné par ordre d'importance, les bryophytes et la MOBF représentant respectivement de 24,7±16,8% à 29,5±19,5% et de 20,7±14,9% à 22,9±16,1% de la matière organique assimilée par les taxons ou transmise *via* les proies (dans le cas des *Rhyacophila* sp.).

En été, les intervalles de confiance de la MOBF (de 0 à 60%) et de la litière (0 à 50%) permettent de considérer la participation estimée de ces ressources comme fiable. La litière est encore une fois apparue comme minoritaire avec de 14,6±13,0% à 18,2±14,8% de la matière assimilée ou transmise (dans le cas d'*I. ambigua* et de *Rhyacophila* sp.).

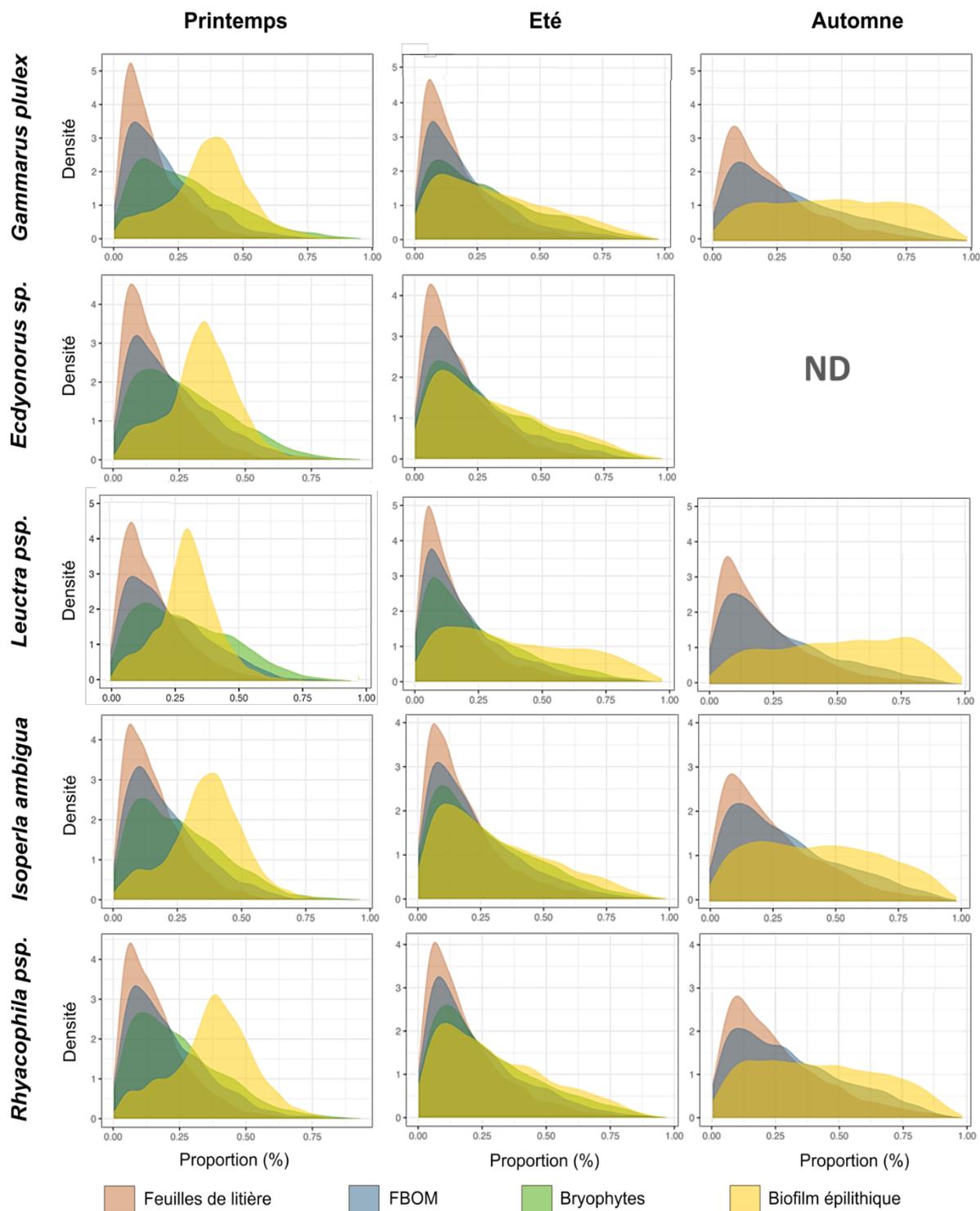


Fig. 4.2. Contribution des sources organiques basales à l'ensemble de la nourriture assimilée par les cinq taxons de macroinvertébrés du ruisseau d'Anglard.

Les diagrammes de densité ont été obtenus à partir du modèle SIAR (SimmR) pour chaque saison (printemps, été et automne). L'estimation bayésienne a permis d'obtenir la proportion de contribution la plus fréquente et la plus probable de chaque ressource alimentaire pour chaque taxon. Ainsi, un pic à densité élevée ayant une base resserrée (intervalle de confiance étroit) donne l'estimation la plus probable de la contribution d'une source (en proportion%). Un pic étalé (très large intervalle de confiance) ayant une faible densité désigne une estimation incertaine de la contribution d'une source (exemple : biofilm épilithique en été/automne pour *Leuctra psp.*).

ND : absence de données à la suite d'une erreur de manipulation du laboratoire SINLAB.

La contribution moyenne de la MOBFB est estimée entre $18,3 \pm 15,9\%$ et $22,5 \pm 17,6\%$ selon les taxons. Le modèle SIAR devient incertain, lorsqu'il s'agit d'estimer la contribution des biofilms et des bryophytes car les proportions s'étirent au-delà de 90% avec des pics de densité faible et dissymétrique. Les bryophytes pourraient représenter de $22,9 \pm 19,0\%$ à $29,6 \pm 22,0\%$ de l'assimilé et les biofilms de 30 à 35%. Pour les plécoptères du genre *Leuctra*, la contribution estimée du biofilm (32,9%) est très aléatoire car la proportion va de 0 à 95% et la densité maximale n'est que de 1,5.

En automne, les bryophytes aquatiques étaient absentes. L'estimation de la contribution des trois autres sources distingue, d'un côté la litière avec un intervalle de confiance correct de 0 à 60 %, et de l'autre les biofilms et la MOBFB avec des intervalles étendus et dépassant 90 % pour les biofilms. La part de la litière constituait donc de manière assez fiable de $21,1 \pm 17,3\%$ à $26,2 \pm 19,7\%$ du matériel assimilé par les différents taxons à l'exception d'*Ecdyonurus* sp., chez qui l'estimation n'a pu être effectuée (le laboratoire SINLAB ayant perdu ces échantillons sauf un). Pour la MOBFB, sa contribution pourrait être de l'ordre de 30% mais les intervalles de confiance étant très larges (entre 0 et 83 % pour la plupart des taxons), l'estimation reste aléatoire. Enfin si le modèle donne le biofilm comme source principalement assimilée par l'ensemble des macroinvertébrés (entre 42 et 48%), l'estimation a une fiabilité très réduite (intervalle de confiance entre 0 et 95% ; densité de l'ordre de 1 quelque-soit le taxon).

Abondances des acides gras et discrimination des sources basales en fonction de leur profil d'acides gras

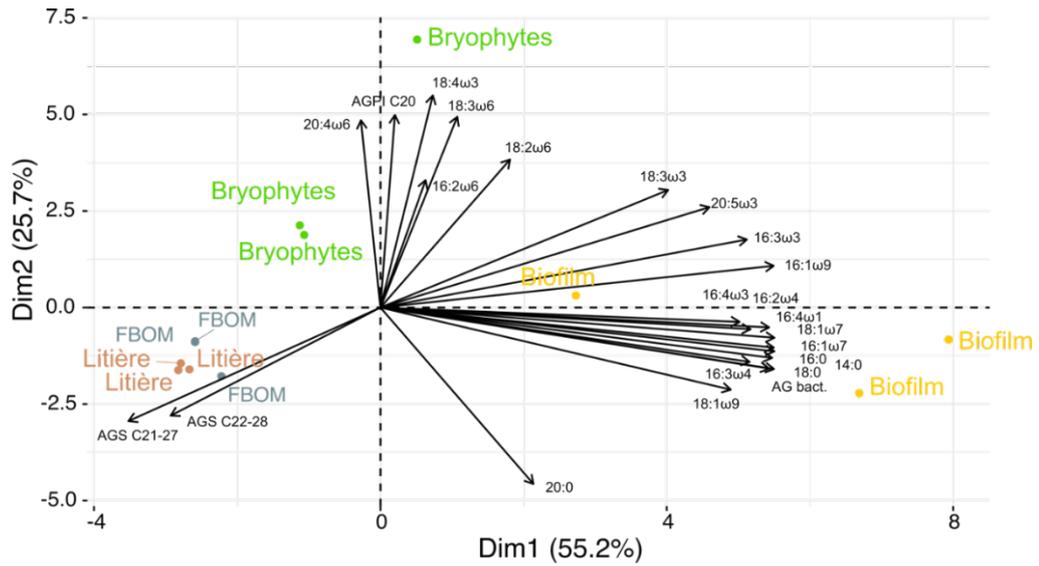
Les concentrations en AG totaux des litières et des bryophytes sont restées stables au cours des périodes de prélèvements (*informations supplémentaires ; Figure S4.4. & Tableau S4.1. à S4.4.*). Au printemps les niveaux d'AG totaux dans la MOBFB ($1,74 \pm 0,90 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{MS}$) étaient significativement inférieurs (Anova 1-way ; $p < 0,05$) à ceux de l'été ($6,31 \pm 2,11 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) et ils sont restés relativement élevés en automne ($4,78 \pm 0,47 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$). Les concentrations en AG des biofilms épilithiques ont montré une tendance non significative à l'augmentation du printemps à l'automne (*Figure S4*). Les biofilms étaient de loin la source basale la plus riche en AG, de $17,55 \pm 5,36 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ au printemps à $32,69 \pm 8,63 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ en automne. Venaient ensuite les bryophytes qui contenaient de $6,69 \pm 4,16$ à $7,62 \pm 1,84 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ d'AG alors que les feuilles de litières étaient les plus pauvres en été et en automne (de $3,01 \pm 0,37$ à $3,49 \pm 0,89 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{MS}$).

Les analyses en composantes principales (ACP) nous ont permis de différencier les sources organiques sur la base des proportions relatives d'un certain nombre d'AG spécifiques (% du poids des AG totaux) (voir Figure 4.3.). Au printemps et en été, l'axe 1 isole les biofilms

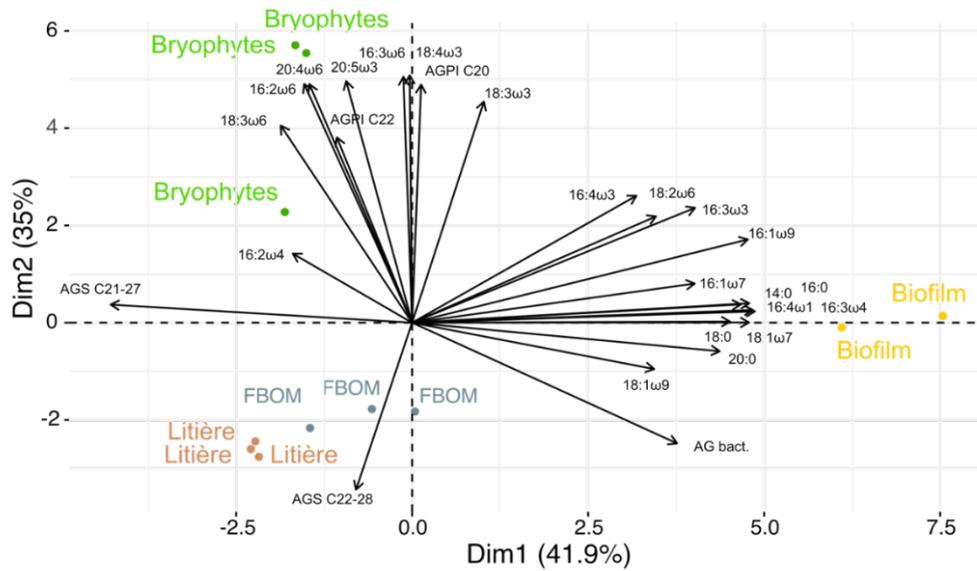
des autres sources en fonction de leurs proportions en AGPI à 16 carbones, dont des biomarqueurs de diatomées (16:2 ω 4, 16:3 ω 4, 16:4 ω 1 - Taipales *et al.* 2013), mais également en fonction de fortes teneurs relatives en 14:0, 16:1 ω 7 (été) et 20:5 ω 3 (été), tous AG activement synthétisés par ces mêmes diatomées (Desvilettes & Bec, 2009). De plus la somme des AG ramifiés (AG bact.) et le 18:1 ω 7 tous caractéristiques des bactéries (Dalsgaard *et al.*, 2003; Torres-Ruiz *et al.*, 2007) participent à cette discrimination. Les bryophytes sont regroupées suivant l'axe 2 systématiquement en raison de leurs proportions en AGPI de la série ω 6 (16:2 ω 6 ; 18:2 ω 6 ; 18:3 ω 6 ; 20:4 ω 6) auxquelles viennent s'ajouter en été les ω 3, 18:3 ω 3, 18:4 ω 3 et 20:5 ω 3. Les AGPI en ω 6 sont signalés comme particulièrement abondant dans les mousses (Lu *et al.*, 2019) et, suivant les espèces, le 20:5 ω 3 peut y être aussi activement synthétisé (Resemann *et al.*, 2019). MOBF et litières (distribution très homogène) sont isolées en fonction des deux axes sur la base de leurs teneurs relatives en AG saturés pairs (AGS_{C22-28}) et impairs (AGS_{C21-27}) à très longues chaînes et caractéristiques des cuticules foliaires (Mueller *et al.*, 2012; Angst *et al.*, 2017). En automne, les biofilms sont toujours discriminés selon leurs fortes proportions d'AGPI et d'AG marqueurs ou typiques des diatomées. Litières et MOBF se séparent selon l'axe 2 en raison de plus fortes proportions d'AGS à très longues chaînes et de 16:3 ω 4 et de 18:3 ω 6 dans la MOBF.

Dans le cadre de notre étude, il est important d'observer les différences de concentrations en AGPI entre les sources (Figure 4.4). Les sources primaires autotrophes biofilms et bryophytes étaient significativement plus riches en AGPI (Anova 1-way ; $p < 0.05$) que les litières et la MOBF. Seule la MOBF échantillonnée en été présentait un niveau d'AGPI ($1,37 \pm 0,50 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS) proche de ceux observées dans les biofilms ($2,36 \pm 0,11 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS) (Anova 1-way ; $p > 0.05$) mais inférieur à ceux des bryophytes ($4,87 \pm 1,45 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS). En ce qui concerne le 20:4 ω 6 et le 20:5 ω 3, ces deux AGPI étaient abondants dans les biofilms et les bryophytes. Avec de 0,54 à $1,19 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS, le 20:4 ω 6 était significativement plus concentré dans les bryophytes (Anova 1-way ; $p < 0.05$) que dans le biofilm (0,03 à $0,11 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS) et la MOBF (0,01 à $0,13 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS) qui en présentaient des niveaux équivalents (Figure 4). Cet AG était soit absent, soit détecté en traces infimes sur les dépôts de litière et c'était également le cas pour le 20:5 ω 3. Par contre si le 20:5 ω 3 a été observé en quantités non négligeables dans la MOBF (0,03 à $0,25 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS), il était logiquement plus abondant dans les biofilms (0,21 à $0,61 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS), et les bryophytes (0,49 à $1,04 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS). A l'exception du printemps, le 18:2 ω 6 et le 18:3 ω 3 étaient beaucoup plus concentrés dans les biofilms (entre 0,60 à $2,47 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS) que dans n'importe quelle autre source basale. Ces deux AG ont présenté des teneurs assez erratiques, mais néanmoins relativement importantes dans les autres sources (entre 0,04 à $0,82 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS). Enfin, les AGPI à 16 carbones, représentant en moyenne de 1,05 à $1,58 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS dans les lipides de biofilms étaient quasi absents de la litière (traces en avril), présent en petites concentrations dans la MOBF (0,01

Printemps



Été



Automne

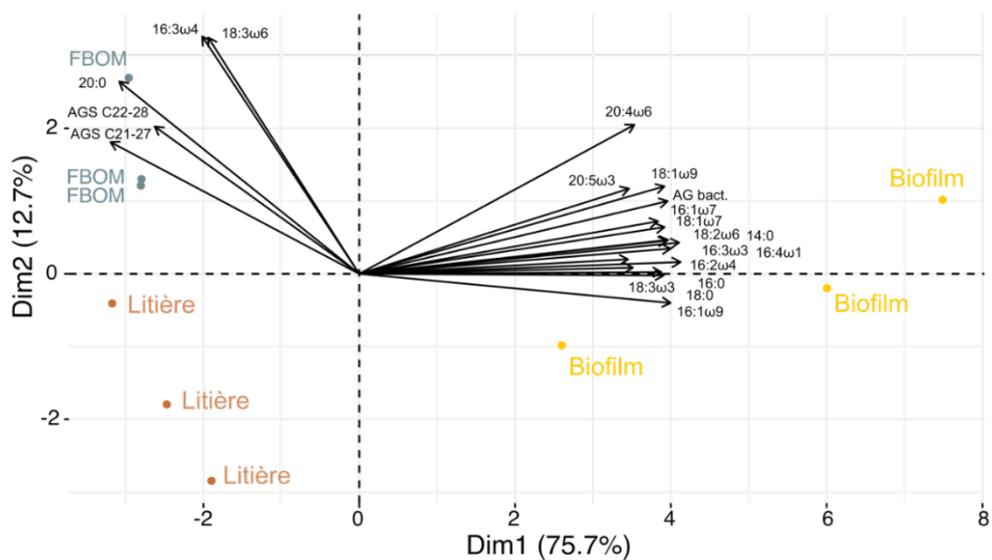


Fig. 4.3. Analyses en Composantes Principales (ACP) des compositions en AG (% du poids des AG totaux) des quatre sources basales du ruisseau d'Anglard et au cours des trois dates saisonnières. Les profils d'AG des sources sont discriminés par deux dimensions cumulant plus de 75 % de variance expliquée sur la variance totale. Automne : pas de bryophytes dans le milieu.

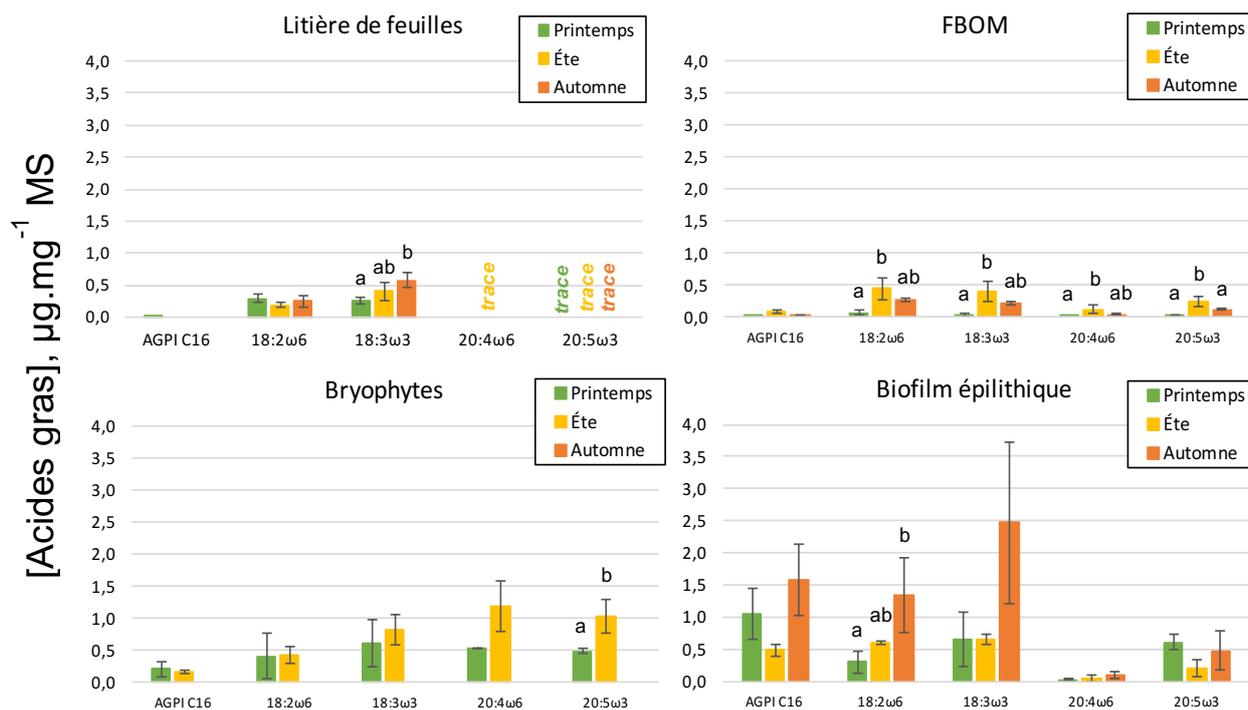


Fig. 4.4. Evolution des concentrations en acides gras polyinsaturés essentiels (18:2ω6 ; 18:3ω3 ; 20:4ω6 ; 20:5ω3) et en acides gras polyinsaturés à 16 carbones (AGPI C₁₆) dans les sources organiques basales. Chaque barre d'histogramme représente la valeur moyenne (± ET). Les différences significatives de concentrations entre les saisons sont représentées par des lettrines différentes (Anova-1way, p < 0,05).

à 0,08 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ MS) et aussi détectés dans les bryophytes (0,22 à 0,17 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ MS).

Influences des sources basales sur les profils d'acides gras des lipides neutres des macroinvertébrés

Les concentrations en AG totaux, AGPI, AGMI et AGS ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ MS) des lipides neutres des cinq taxons sont reportés sur la *figure S4.5.*, la totalité des AG retrouvés dans ces lipides neutres sont visibles sur *les tableaux supplémentaires S4.5. à S4.9.* à titre indicatif. En automne, les teneurs en AG extraits des LN étaient inférieures à celles détectées en été, chez *G. pulex*, *I. ambigua* et *Rhyacophila* psp. (Anova 1-way ; $p < 0,05$). Chez *Ecdyonurus* sp., une tendance non significative à la baisse a également été observée en automne, alors que chez le genre *Leuctra* cette même tendance était significative (Anova 1-way ; $p < 0,05$). Enfin, il n'a pas été possible de dégager de tendances nettes concernant l'évolution des AGPI et autres catégories d'AG entre les saisons et les taxons. Ceci est à mettre en relation avec des stades de développement différents entre les dates ou entre les taxons.

L'influence des sources basales sur les compositions en AG des lipides neutres à chaque saison est présentée sur la figure 4.5. contenant les résultats du positionnement multidimensionnel non métrique (NMDS). Les résultats de cette analyse multivariée sont validés par des valeurs de stress $\leq 0,11$ et des coefficients $R^2 \geq 0,94$ pour les ajustements linéaires et non-métriques (Dexter *et al.*, 2018). Chaque axe du NMDS est corrélé négativement ou positivement aux AG représentés sous formes de vecteur et permettant la répartition des échantillons dans l'espace d'ordination à deux dimensions. La longueur d'un vecteur AG traduit l'importance de la prédiction et son sens indique la corrélation maximale dans l'espace à deux dimensions. Les échantillons similaires sur la base de leur profil d'AG sont donc regroupés dans l'espace d'ordination. Un intervalle de confiance de 95% a été appliqué aux groupes d'échantillons sous la forme d'ellipse, par conséquent, les ellipses chevauchantes indiquent que la similitude est hautement significative.

Au printemps, la litière était la source la plus éloignée des lipides neutres des macroinvertébrés. Les éphéméroptères *Ecdyonorus* sp. montraient une forte proximité avec le biofilm épilithique sur la base des AGPI à 16 carbones (AGPI C₁₆), du 16:1 ω 7 et du 16:0, caractéristiques des microalgues et/ou abondamment synthétisés par les diatomées. Les 4 autres taxons présentaient une forte similitude entre eux (ellipses chevauchées), avec les genres *Gammarus*, *Isoperla* et *Rhyacophila* relativement proches des bryophytes en liaison avec les proportions élevées en AGPI. Le genre *Leuctra* bien que connecté à *Gammarus* avait une ellipse positionnée à égale distance des biofilms, bryophytes et MOBF.

En été, la litière était de nouveau la source la plus éloignée, les AG à très longue chaîne (AGS_{C22-28} et AGS_{C21-27}) étant absents des lipides neutres des macroinvertébrés. Ces derniers étaient tous fortement imbriqués, à l'exception des *Leuctra* psp., néanmoins très proches (l'AG discriminant était le 18:1 ω 7 plus abondant chez ces plécoptères). Une variabilité de profil d'AG est apparue entre les échantillons de biofilm en été (ellipse longue), mais malgré tout c'était la source basale la plus proche des macroinvertébrés et notamment d'*Ecdyonorus* sp. et de *G. pulex* (ellipses interconnectées). La seconde source basale la plus proche semblait être la MOBF alors que les bryophytes très riches en AGPI et surtout en 20:4 ω 6 étaient plus éloignées.

En automne, nous observons encore une fois la mise à l'écart des feuilles de litière. Les LN des macroinvertébrés étaient remarquablement homogènes avec des ellipses confondues sauf pour *Ecdyonorus* sp. très légèrement à l'écart. Ces derniers voyaient leur ellipse étroitement interconnectée à celle des AG du biofilm épilithique, lequel était aussi la source basale la plus proche de l'ensemble des macroinvertébrés. Ce regroupement était dû aux AGMI, 16:1 ω 7, 18:1 ω 7, AGPI-C₁₆, 20:4 ω 6 et 20:5 ω 3. La MOBF constituait la seconde source la plus proche des cinq taxons.

Origine des AG essentiels chez les 5 taxons de macroinvertébrés

Les figures 4.6. et 4.7. regroupent dans un espace à deux dimensions la manière dont chaque taxon étudié tend à satisfaire ces besoins nutritionnels en AGPI dans un milieu où plusieurs sources de composition en AGPI différente sont disponibles. C'est une approche de géométrie nutritionnelle simplifiée (Raubenheimer, 2011) et préconisée par Koussoroplis *et al.* (2011). Les AG constituant les lipides neutres des invertébrés sont en effet sous l'influence directe de leur alimentation (Sardenne *et al.*, 2020). En théorie, plus une ressource alimentaire apporte d'AG essentiels plus les proportions relatives de ces composés doivent se retrouver dans les LN des consommateurs. Surtout si ceux-ci sont en période de croissance et d'accumulation de réserves lipidiques (Sardenne *et al.*, 2020). Sur la figure 6 sont ainsi reportées les rapports de l'ensemble des AGPI en ω 3 sur les AGPI en ω 6 dans chaque source basale étudiée et dans les lipides neutres des cinq taxons. A chaque saison, le rapport ω 3/ ω 6 des LN d'*Ecdyonorus* sp. est apparu similaire à celui calculé pour les biofilms (Anova 1-way ; $p > 0.05$). Au printemps les rapports ω 3/ ω 6 des LN d'*I. ambigua* et de *Rhyacophila* psp. se situaient entre ceux du biofilm et des bryophytes. Le rapport dans les LN du genre *Leuctra* psp. était identique aux rapports ω 3/ ω 6 des feuilles et de la MOBF par ailleurs similaires. Curieusement, le rapport chez *G. pulex* se situait en deçà des lignes d'influence des sources basales, ce qui était également le cas en été. A cette même période, le rapport ω 3/ ω 6 chez *Leuctra* psp. était similaire à celui de la MOBF, tandis que celui d'*I. ambigua* demeurait

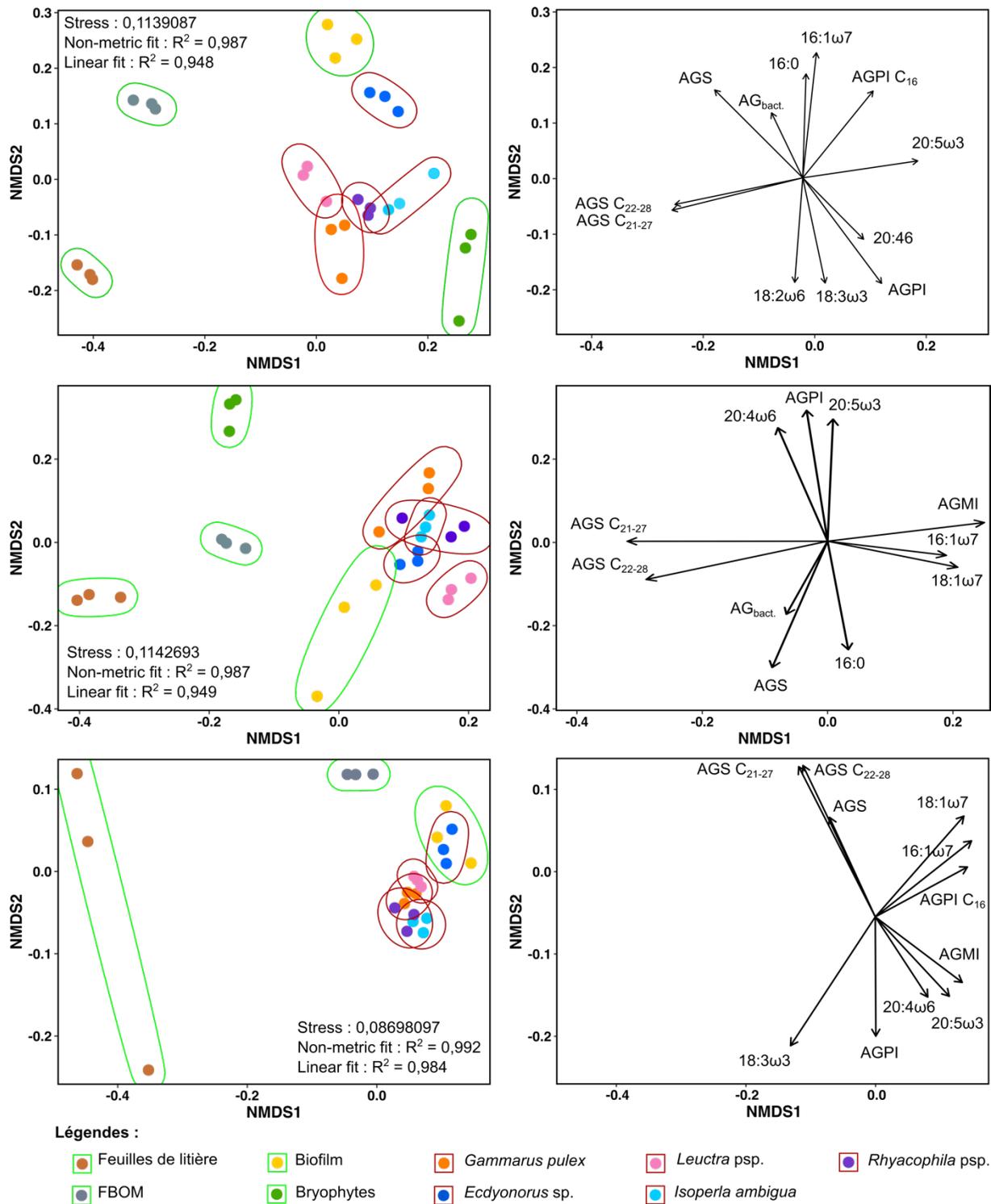


Fig. 4.5. Positionnement multidimensionnel non métrique (NMDS) des sources organiques basales et des cinq taxons de macroinvertébrés à chaque date de prélèvement.

Graphiques de gauche : Les taxons et les sources basales sont projetés sur un espace à deux dimensions en fonction des dissimilarités de compositions en acides gras (AG) ou sommes d'acides gras d'intérêt, présents dans les lipides totaux (sources basales) et les lipides neutres (macroinvertébrés). Les ellipses représentent l'intervalle de confiance (95%) de chaque groupe d'échantillon. La robustesse de la classification NMDS est indiquée par les valeurs de *Stress*, et de *linear* et *non-metric fits*.

Graphiques de droite : représentation des vecteurs d'AG significativement impliqués dans l'ordination des sources basales et des taxons dans l'espace 2D. La longueur du vecteur indique l'importance de la prédiction. Le sens du vecteur indique la corrélation maximale dans l'espace d'ordination à deux dimensions. Les bryophytes sont absentes en automne.

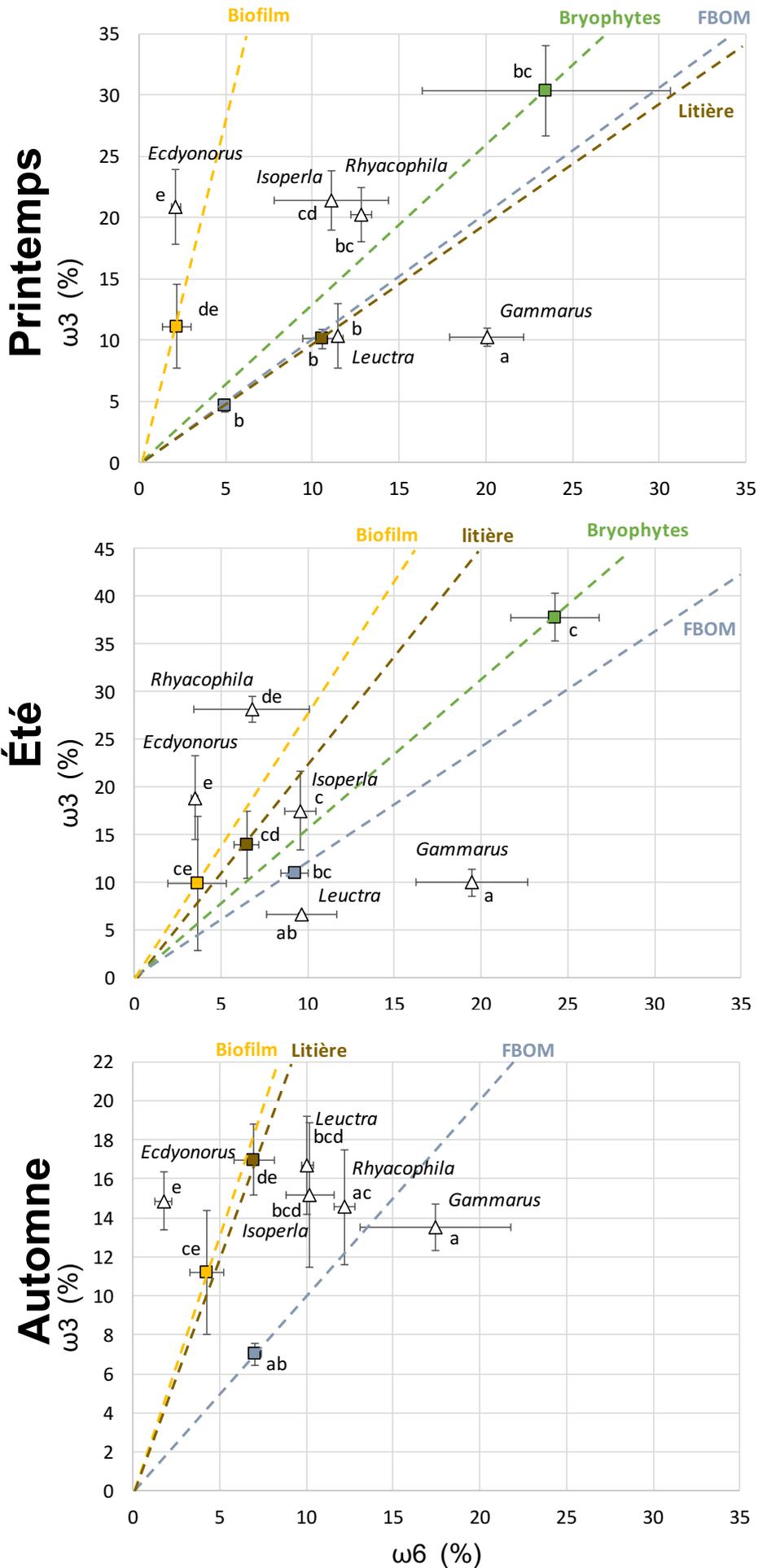


Fig. 4.6. Proportion relative de l'ensemble des AGPI en ω_3 sur celle des AGPI en ω_6 dans les lipides totaux des sources basales (en couleurs) et dans les LN des cinq taxons de macroinvertébrés (en noirs) au cours des trois périodes d'étude.

Les lignes en pointillé représentent la ligne constante de rapport ω_3/ω_6 pour chacune des sources basales. Les différences significatives entre les rapports ω_3/ω_6 sont indiquées par des lettres différentes (Anova-1 way; $p < 0.05$). Les AGPI sont en % du poids des AG totaux de l'extrait lipidique.

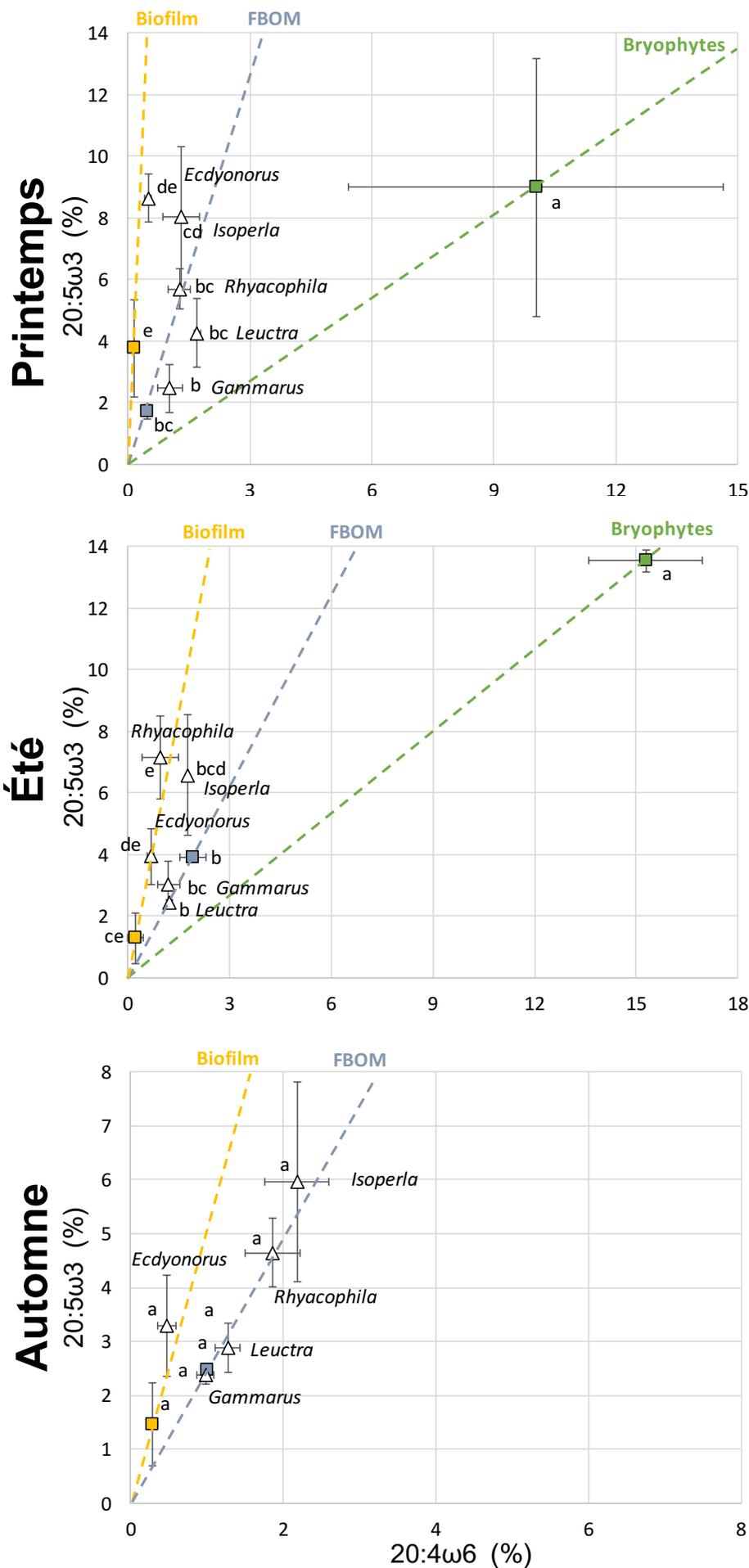


Fig. 4.7. Proportion relative du 20:5ω3 sur celle du 20:4ω6 dans les lipides totaux des sources basales (en couleurs) et dans les LN des cinq taxons de macroinvertébrés (en noirs) au cours des trois périodes d'étude.

Les lignes en pointillé représentent la ligne constante du rapport 20:5ω3 / 20:4ω6 pour chacune des sources basales.

Les différences significatives entre les rapports 20:5ω3 / 20:4ω6 sont indiquées par des lettres différentes (Anova-1way; $p < 0.05$). Les AGPI sont en % du poids des AG totaux de l'extrait lipidique.

indistinct des rapports de la litière, de la MOBF et des bryophytes. Finalement les LN de *Rhyacophila* psp. avaient un rapport assez proche du biofilm et de la litière de feuilles (Anova 1-way ; $p > 0.05$). En automne, les rapports ω_3/ω_6 du biofilm et de la litière étant similaires, les rapports des LN d'*I. ambigua*, *Leuctra* psp. et *Rhyacophila* psp. se situaient entre celui de ces deux sources et celui de la MOBF. Les gammares avaient encore une fois un rapport ω_3/ω_6 éloigné de la plupart des autres à l'exception de celui de la MOBF.

La figure 4.7. permet d'appréhender plus précisément l'origine précise des longs AGPI essentiels $20:5\omega_3$ et $20:4\omega_6$ grâce aux rapports $20:5\omega_3/20:4\omega_6$ dans les AG totaux des sources basales et dans les LN des cinq taxons. La litière de feuilles dépourvue de ces AGPI (ou n'en possédant que des traces infimes) n'est donc pas comprise dans l'analyse. De manière générale, les rapports plus faibles de $20:5\omega_3/20:4\omega_6$ dans les bryophytes étaient significativement différents de ceux des LN des macroinvertébrés et de ceux des deux autres sources basales. Quelle que soit la saison, les rapports dans les LN d'*Ecdyonorus* sp. étaient toujours identiques à ceux des biofilms au point d'être situés au contact ou sur la ligne constante du rapport $20:5\omega_3/20:4\omega_6$ de cette source basale. Au printemps, les autres taxons présentaient un rapport identique à celui de la MOBF, à l'exception d'*I. ambigua* qui se situait indifféremment entre biofilm et MOBF. En été, le rapport dans les LN de *Rhyacophila* psp. dépendait du biofilm et était distinct de celui de la MOBF (Anova-1way ; $p < 0.05$). Le rapport $20:5\omega_3/20:4\omega_6$ chez *Leuctra* psp. était identique à celui de la MOBF alors que ceux d'*I. ambigua* et *G. pulex* oscillaient entre biofilm et MOBF. En automne, les rapports dans les LN des 4 taxons autres qu'*Ecdyonorus* sp. se situaient sur la ligne constante du rapport $20:5\omega_3/20:4\omega_6$ de la MOBF, tout en n'étant pas statistiquement différents de la valeur calculé pour le biofilm (Anova 1-way ; $p > 0.05$).

Discussion

Disponibilité et signatures isotopiques des sources basales au cours de la période d'étude

La source organique la plus abondante était la litière de feuilles (excepté en été), qui présentait une évolution quantitative caractéristique de la plupart des ruisseaux forestiers de moyenne montagne, avec un apport important de feuilles en automne qui persistent une partie de l'hiver dans le lit immergé (Galas & Dumnicka, 2003; Little & Altermatt, 2018). La tendance à l'augmentation de la MOBF de l'été à l'automne est probablement à mettre en relation avec les débits d'étiages encore prononcés au début novembre 2017. L'hydrologie dans de si petits

cours d'eau est en effet le premier facteur influençant la rétention du matériel détritique (Webster *et al.*, 1994; Galas & Dumnicka, 2003). L'intensité de la colonisation des feuilles par les hyphomycètes était maximale au cours de l'apport automnal (Bärlocher, 2012) et trois fois plus élevée qu'au printemps, en dépit de biomasses de litière comparables. Nous émettons l'hypothèse qu'une partie des feuilles échantillonnées en avril provenait d'apports récents par balayage des dépôts sur berges au cours de la fonte des neiges en mars 2017. La production primaire était limitée aux biofilms épilithiques (faible en été) et aux bryophytes avec notamment l'espèce *Racomitrium aciculare*. Comme fréquemment observé dans les ruisseaux d'altitude (Di Cugno & Robinson, 2017), les producteurs primaires constituant les biofilms appartenaient aux diatomées (des genres : *Achnanthes*, *Fragilaria*, *Gomphonema*, *Navicula*, *Nitzschia*, *Pinnularia*...) et à des cyanobactéries spécifiques (des genres : *Stigonema* et *Chamaesiphon*) (Aigner *et al.*, 2018) avec la présence assez discrète, en petits agrégats, de l'algue des torrents *Hydrurus foetidus* se développant de mars à juillet (Klaveness, 2017).

Les signatures isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$) de la litière, de la MOB et des bryophytes ont très peu variées au cours du suivi. Les feuilles immergées avaient les signatures les plus faibles (en moyenne -30,50‰ pour les isotopes du carbone et -3,03‰ pour ceux de l'azote) ce qui est conforme aux données de la littérature concernant les tissus végétaux des arbres des ripisylves (Collister *et al.*, 1994; Middelburg, 2014; Fujibayashi *et al.*, 2019). La MOB et les bryophytes présentaient des signatures en $\delta^{13}\text{C}$ similaires et plus enrichies que les feuilles (de +1,21 ‰ à +1,55 ‰). Que ce soit au printemps ou en été, les bryophytes présentaient des signatures de $\delta^{15}\text{N}$ élevée (en moyenne 3,38 ‰), ce qui correspond bien avec les données enregistrées en cours d'eau forestiers pour les macrophytes (2,98 ‰ \pm 0,6 ; Peipoch *et al.*, 2012) et les bryophytes (Hayden *et al.*, 2016). Seuls les signatures $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ des biofilms épilithiques ont varié au cours des trois dates. Au printemps les valeurs très enrichies de $\delta^{13}\text{C}$ (-19,49 ‰) sont peut-être à mettre en relation avec le contexte hydrothermal volcanique du site. En effet, le $\delta^{13}\text{C}$ du carbone inorganique total dissous des sources de surface du secteur (dont la source des Costes) est de l'ordre de -18,9 ‰ à -16,6 ‰ (BRGM, 2008). De plus en période de débits élevés (de mars à juin), de petites sources carbo-gazeuses peuvent alimenter le ruisseau en carbone inorganique total dissous (CITD) lourd ($\delta^{13}\text{C}$ -4,0 ‰) (BRGM, 2008). A l'étiage les biofilms se sont appauvris en ^{13}C et enrichis en ^{15}N , avec des valeurs conformes à la littérature (Zah *et al.*, 2001; Peipoch *et al.*, 2012; Hayden *et al.*, 2016).

Assimilation des sources basales : allochtones versus production primaire autochtone

Ces ressources allochtones et autochtones ont été disponibles pour les macroinvertébrés en quantités variables pendant cette période d'étude où leur activité métabolique est la plus élevée (Verberk *et al.*, 2008). Le modèle de mélange bayésien SIAR nous a permis de mettre clairement en évidence la faible participation de la litière de feuilles de hêtre à la nourriture assimilée par les trois taxons de consommateurs primaires. L'apport était de l'ordre de 14% à 17,9 % au printemps et en été, pour remonter entre 20 et 25% de la nourriture assimilée à l'automne après la chute des feuilles. Pour *Ecdyonurus* sp. racleur-collecteur, la faible proportion de litière assimilée n'est pas surprenante, ce genre d'*Heptageniidae* étant surtout connu pour s'alimenter de microalgues épilithiques et de détritux végétaux fins, mais pas à partir de feuilles mortes immergées (Wögerbauer & Kelly-Quinn, 2013). A l'opposé les plécoptères *Nemouroidea* du genre *Leuctra* et les amphipodes *Gammarus pulex* ou *fossarum* sont des déchetteurs particulièrement efficaces, aptes à finir de décomposer une grande partie des litières des ruisseaux froids à pH neutre (Taylor & Chauvet, 2014). Dans notre cours d'eau, ils semblent pourtant n'utiliser que partiellement la litière de hêtre. Une compétition interspécifique avec les autres déchetteurs non échantillonnés qui utiliseraient cette ressource à leur avantage est envisageable (Dangles *et al.*, 2004), principalement avec les trichoptères *Sericostoma personatum*, *Limnephilus* sp. ou le *Nemouroidea*, *Protonemoura praecox*. Mais dès lors, la part de litière transmise aux top prédateurs invertébrés *Rhyacophila* psp. aurait dû être plus importante que celle donnée par le modèle SIAR, les proies ingérées reflétaient la structure générale des communautés auxquelles les prédateurs appartiennent (Lavandier, 1982; Elliott, 2005; Khamis *et al.*, 2015). Ce n'était pas le cas, puisque seulement de 16,6% (été) à 26,2 % (automne) de l'énergie transmise aux *Rhyacophila* psp. provenaient de la litière. Il faut donc considérer que c'est l'aspect récalcitrant de la litière de hêtre de ce ruisseau qui explique sa part modérée dans la matière assimilée (Sanpera-Calbet *et al.*, 2009). Les mécanismes impliqués dans la décomposition des litières monospécifiques de hêtre sont complexes (Chauvet *et al.*, 2016; Richardson & Chauvet, 2019). Parmi ceux-ci, le côté particulièrement récalcitrant des litières issues de hêtres matures (Trap *et al.*, 2013) pourrait s'avérer prépondérant. Dans une hêtraie ancienne, la litière produite par les arbres âgés (> 95 ans) est reconnue comme étant particulièrement récalcitrante et très longue à se décomposer au sol, par rapport à celle produite par les jeunes spécimens (20-50 ans ; Trap *et al.*, 2017). Or la majorité des hêtres situés sur la partie haute des berges du ruisseaux d'Anglard sont âgés (fûts > 20 m, abondance de faînes) et la hêtraie environnante est ancienne, présente en continu depuis la fin du XIXe (carte de l'état-major 1820-1866 & cartes IGN-1950 à nos jours – www.geoportail.gouv.fr). Le

principal matériel détritique utilisé au cours des saisons est donc la MOBF, bien estimée par le modèle SIAR. Elle représentait, au printemps et en été, environ 20% de la matière organique assimilée par les consommateurs primaires et environ 30% en automne. Cette estimation est bien relayée par l'observation des contenus digestifs (*Figure S4.3.*) des trois taxons consommateurs primaires. En effet, les particules fines végétales ont été retrouvées dans la totalité des contenus digestifs avec des abondances relatives croissantes après le printemps, bien que le broyeur du genre *Leuctra* présente un régime alimentaire très opportuniste dans les cours d'eau de tête de bassin (Bottová *et al.*, 2013). Ces petits plécoptères en présence de litières récalcitrantes basculent habituellement vers un comportement collecteur où l'ingestion de particules détritiques fines peut devenir dominante (Dangles *et al.*, 2001; Bottová *et al.*, 2013; Taylor & Andrushchenko, 2014). Chez les gammaridés, la part de matériel détritique fin dans l'alimentation est toujours élevée, Felten et ses collaborateurs (2008) estiment que les populations de *Gammarus fossarum* sont à 47,8 % collectrices dans les ruisseaux Vosgiens. Enfin les *Heptageniidae* du genre *Ecdyonurus* sp. bien que préférentiellement algivores (Wellnitz & Ward, 1998), présentent des comportements alimentaires très plastiques en petit cours d'eau, jusqu'à devenir principalement détritivores (Wögerbauer & Kelly-Quinn, 2013). La matière organique d'origine allochtone (litière + MOBF) peine toutefois à représenter plus d'un tiers de l'énergie transmise aux consommateurs au printemps et en été et elle ne devient que faiblement dominante en automne. Cette situation est différente de celle qui était attendue lors de la mise en place de l'étude. Un intense débat s'est déroulé et persiste encore entre hydrobiologistes sur l'importance relative de ces sources organiques terrestres par rapport aux ressources issues de la production primaire autochtone (Lau *et al.*, 2009; Brett *et al.*, 2017). Pour un grand nombre de chercheurs les apports terrestres soutiennent majoritairement les réseaux trophiques (Tank *et al.*, 2010; Richardson & Sato, 2015). A l'inverse la production primaire est mise en avant par d'autres (Thorp & Delong, 2002; Carroll *et al.*, 2016; Hayden *et al.*, 2016), dont les arguments s'appuient principalement sur la faible qualité nutritionnelle des sources allochtones (Guo *et al.*, 2018). Cependant, le contexte local pour les ruisseaux de tête de bassin versant (paramètres physico-chimiques, densité de forêts sur le bassin versant) revêt une telle importance dans l'utilisation des apports allochtones (Little & Altermatt, 2018) que les comparaisons entre études sont assez difficiles. Pour notre ruisseau, les résultats issus du modèle SIAR indiquent une prédominance de la production primaire du printemps à l'été. Au début du printemps, la part du biofilm représentait de manière sûre plus du tiers de la MO assimilée par les différents taxons alors qu'en été elle était plus difficilement évaluée. Une nette participation des biofilms autotrophes à l'énergie assimilée par les macroinvertébrés autres que racleurs brouteurs a été observée, soit expérimentalement (Kühmayer *et al.*, 2020), soit en cours d'eau par Torres-Ruiz *et al.* (2007), Twining *et al.* (2017) et Guo *et al.* (2018). Les mécanismes qui gouvernent ces comportements

peuvent différer selon les espèces étudiées. Ainsi, lorsque les petits plécoptères broyeur *Nemoura* sp. et *Nemurella pictetii*, en ont la possibilité, ils délaissent volontairement les fragments de litière au profit de microalgues de haute qualité nutritionnelle (faible rapport C:N) (Lieske & Zwick, 2007; Leberfingher & Bohman, 2008). Cependant, le trichoptère *Limnephilus bipunctatus* est uniquement guidé par l'aspect fraîcheur de la nourriture et abandonne systématiquement le matériel détritique sec au profit de n'importe quelle forme de matière végétale fraîche (algues, mousses, herbes) (Leberfingher & Bohman, 2008). Dans notre étude, les prédateurs *Rhyacophyla* sp. et *I. ambigua* ont aussi ingérés des algues, soit en été, soit au printemps. Ce comportement a été fréquemment signalé chez ces deux genres (Lavandier, 1982, 1984; Céréghino, 2002; Quevedo-Ortiz *et al.*, 2017). Lancaster *et al.* (2005) considèrent qu'il s'agit d'un comportement omnivore partiellement lié à des contraintes nutritionnelles. En accord avec les observations de ces auteurs, l'assimilation directe des algues a modifié les signatures $\delta^{15}\text{N}$ et abaissé les TP. Ainsi au printemps *I. ambigua* a connu un shift ontogénétique. Les larves étaient aux derniers stades de développement mais se situaient au niveau trophique de consommateur primaire identique à celui des *Leuctra* sp. et d'*Ecdyonurus* sp. En début de printemps, une forte consommation d'algues pendant une assez courte période a également été reportée chez les larve âgées d'*Isoperla grammatica* (Malmqvist *et al.*, 1991). Les larves de *Rhyacophyla* sp. ont présenté leur plus basse TP en été sans que l'on puisse faire une relation avec leur stade de développement, puisque les individus de tailles hétérogènes appartenaient à deux espèces différentes. Toutefois Céréghino, (2002) considère que chez le genre *Rhyacophyla*, l'ingestion d'algues est le fait des premiers stades larvaires et que ce trichoptère devient ensuite strictement prédateur. Le changement de régime alimentaire en fonction des stades de développement est une opinion également soutenue par Lancaster *et al.* (2005).

Enfin, un des points importants de notre travail a été la mise en avant des bryophytes en tant que source d'alimentation assimilée en proportion relativement proche de celles de la MOBF, comme l'indique le modèle SIAR. Si la détection de débris de mousse dans les contenus digestifs de diverses espèces de broyeur n'est pas nouvelle (Suren & Winterbourn, 1991; Dangles, 2002; Kalachova *et al.*, 2011), elle est souvent considérée comme mineure (Glime, 1994). Les bryophytes sont, en effet, susceptibles d'émettre des composés répulsifs (AG acétyléniques, méthyl-amyl cétones, terpènes) (Haines & Renwick, 2009; Liu *et al.*, 2019) qui les rendent peu attractifs ou indigestes. Cependant, très peu d'études ont testé ces hypothèses et ces mécanismes de défense sont apparemment inefficaces sur les amphipodes, les plécoptères *Nemouroidae* et certains trichoptères *Limnephilidae* (Parker *et al.*, 2007; Leberfingher & Bohman, 2008). Nos résultats sont conformes aux recherches utilisant les isotopes du carbone et de l'azote en secteur de crénon. Ainsi dans les sources pérennes ou les petits ruisseaux, plusieurs auteurs ont démontré que les mousses aquatiques

composent une part majeure, souvent supérieure aux biofilms, de la matière organique assimilée par les invertébrés (McWilliam-Hughes *et al.*, 2009; Torres-Ruiz & Wehr, 2019), y compris les racleurs (Carroll *et al.*, 2016). Avec en moyenne pas plus de 178 g.m⁻² de litière, 47,71 g.m⁻² de MOBF et 24,8 g.m⁻² de biofilm au meilleur de l'année. Les stocks de détritus et la productivité primaire algale étaient limités dans notre ruisseau expliquant aussi le recours à cette source alimentaire tant qu'elle est disponible.

Origines des acides gras assimilés par les macroinvertébrés

Les profils d'AG des principales sources basales du ruisseau d'Anglard se recoupent bien avec ceux décrits pour d'autres sites (Twining *et al.*, 2017; Torres-Ruiz & Wehr, 2019). Les litières de feuilles d'arbres sont naturellement dépourvues de long AGPI (Angst *et al.*, 2017) et les 20:4 ω 6 et 20:5 ω 3 ne sont synthétisés que par les algues des biofilms, principalement les diatomées (Taipale *et al.*, 2013) et les bryophytes (Dembitsky & Rezanka, 1995; Lu *et al.*, 2019). Dans cette étude, la présence de ces deux longs AGPI dans la MOBF, mais aussi la présence d'AG saturés à très longue chaîne (caractéristiques des lipides foliaires), traduisent le caractère composite de cette source organique. Il s'agissait principalement de débris de feuilles de hêtre car les résultats des ACP sur les compositions en AG ont systématiquement classé la MOBF comme proche de la litière. Toutefois ces particules étaient colonisées par un consortium de bactéries et de microalgues dont des diatomées responsables de la présence de 20:4 ω 6 et 20:5 ω 3 (Torres-Ruiz *et al.*, 2010; Kühmayer *et al.*, 2020).

L'analyse des lipides neutres des cinq taxons de macroinvertébrés montre un découplage plus ou moins marqué entre la contribution de chaque source basale à l'énergie assimilée et leur apport respectif en AG. Ainsi pour *Ecdyonurus* sp., les résultats du NMDS ainsi les rapports ω 3/ ω 6 et 20:5 ω 3/20:4 ω 6 sont sans ambiguïté. Quelle que soit la saison, ce racleur-brouteur dépend principalement des biofilms pour sa couverture en AG et les composés essentiels 20:5 ω 3 et 20:4 ω 6 sont notamment systématiquement obtenus à partir du biofilm. Ce résultat est en parfait accord avec les données expérimentales de Kühmayer *et al.* (2020) pour ce même genre d'*Heptageniidae*. Au fil des saisons, les profils d'AG des lipides neutres des autres taxons se sont resserrés parallèlement à la perte d'influence des AG des bryophytes en été et à la suite de leur disparition en automne (Figure 4.5.). Dans les LN de *G. pulex* et des *Leuctra*, les AGPI étaient originaires de la MOBF, tandis que le 20:5 ω 3 et le 20:4 ω 6 pouvaient provenir indifféremment soit de la MOBF soit du biofilm selon les graphiques de géométrie nutritionnelle. Ces résultats confirment les comportements collecteurs de la part de ces deux décheteteurs (Felten *et al.*, 2008; López-Rodríguez *et al.*, 2012) facilitant leur couverture en composés essentiels tels que les longs AGPI produits par les microalgues

associées aux particules détritiques (Crenier, Arce-Funck, *et al.*, 2017; Crenier *et al.*, 2019; Gossiaux *et al.*, 2020). En ce qui concerne, les prédateurs *Rhyacophyla* psp. et *I. ambigua*, lorsque leur position trophique était la plus haute, leurs lipides neutres présentaient des valeurs de rapports ω_3/ω_6 situées entre ceux des larves d'*Ecdyonurus* et ceux de *G. pulex* et *Leuctra* psp. Cela semble donc aller dans le sens d'un transfert des AGPI aux deux prédateurs *via* les consommateurs primaires depuis les biofilms et la MOBF, et semble concordant avec les stratégies nutritionnelles observées chez les prédateurs invertébrés de plusieurs cours d'eau Alpains (Guo *et al.*, 2018). En revanche, quand leurs positions trophiques étaient plus basses et que les algues étaient consommées (au printemps pour *I. ambigua* et en été pour les *Rhyacophyla* psp.), ces AGPI étaient directement obtenus depuis les biofilms. Ce comportement omnivore pourrait donc bien être lié à des besoins métaboliques spécifiques comme le propose Lancaster *et al.* (2005). Par exemple, sachant que les nymphes d'*I. ambigua* émergent de mai à juin sur ce ruisseau, l'accumulation d'AGPI pourrait être nécessaire à la future vie adulte. En effet, le stockage d'AG en fin de vie larvaire a été observé chez les éphéméroptères (ordre voisin des plécoptères) et est destiné à couvrir les besoins énergétiques pendant la maturation des ovocytes ou au cours du vol nuptial (Winkelmann & Koop, 2007). En milieu terrestre, il est en effet bien établi que les AGPI sont utilisés comme source d'énergie pendant les vols prolongés chez les lépidoptères (Murata & Tojo, 2002).

Enfin, les résultats du NMDS montrent que l'influence des bryophytes sur les profils d'AG des lipides neutres des macroinvertébrés était bien visible au printemps mais plutôt faible en été. Seul les *Leuctra* psp. ont montré un rapport ω_3/ω_6 assez proche de celui des bryophytes au printemps. La proportion des bryophytes dans l'énergie assimilée a donc pu être surestimée par le modèle SIAR en été. Mais il est également possible que l'assimilation des AG issus de ces végétaux par les trois consommateurs primaires fût assez faible en fonction de la digestibilité des molécules complexes (glycoglycerolipides, triglycérides) dans lesquelles ces AG sont insérés au niveau des différentes structures d'un plant de mousse (tissus du gamétophyte, cuticule foliaire, etc. ; Resemann *et al.*, 2019). A l'évidence, des études supplémentaires seront nécessaires pour évaluer de manière précise l'assimilation des nutriments de bryophytes aquatiques en tenant compte des espèces analysées.

Conclusion

En raison de la situation de proximité à la source de notre site d'étude et de son environnement forestier, nous nous attendions à une forte dépendance des taxons étudiés vis-à-vis des ressources allochtones et à un rôle limité des producteurs primaires, probablement simples fournisseurs de composés essentiels. Nos résultats démontrent que les sources primaires autochtones constituaient le principal apport énergétique au printemps et en été, et ce malgré la fermeture de la canopée. En cela nos travaux sont concordants avec les conclusions de Carroll *et al.* (2016) et d'autres auteurs (Niedrist & Füreder, 2017; Guo *et al.*, 2018) selon lesquelles cette voie trophique est souvent prédominante même en contexte de cours d'eau forestier. Nos résultats confirment le fait que si la litière de feuilles constituait la source la plus abondante, sa faible qualité et son apport monospécifique étaient les principaux facteurs qui limitaient son utilisation par les deux broyeurs (Sanpera-Calbet *et al.*, 2009; Marcarelli *et al.*, 2011). Cependant, la lente dégradation de cette litière de hêtre a été une source continue de débris fins. Cette MOBF combinant matériels allochtone et autochtone (diatomées), a en revanche été abondamment utilisée (y compris par les racleurs *Heptageniidae*), indiquant que le système dépend partiellement sur le long terme de la matière organique terrestre conditionnée. En accord avec d'autres recherches (Twining *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018; Torres-Ruiz & Wehr, 2019), notre étude confirme que les algues des biofilms épilithiques et épixyliques (associées à la MOBF) sont à l'origine des AGPI essentiels et notamment du 20:4 ω 6 et 20:5 ω 3 assimilés par les consommateurs primaires et de manière directe par les deux prédateurs à certaines périodes de leur cycle de vie. La nécessité d'obtenir ces nutriments essentiels et les ressources limitées expliquent la plasticité des régimes alimentaires et les comportements omnivores des cinq taxons étudiés. Enfin, nos résultats confirment que les bryophytes aquatiques sont des sources alimentaires importantes dans les zones de crénon à faible productivité.

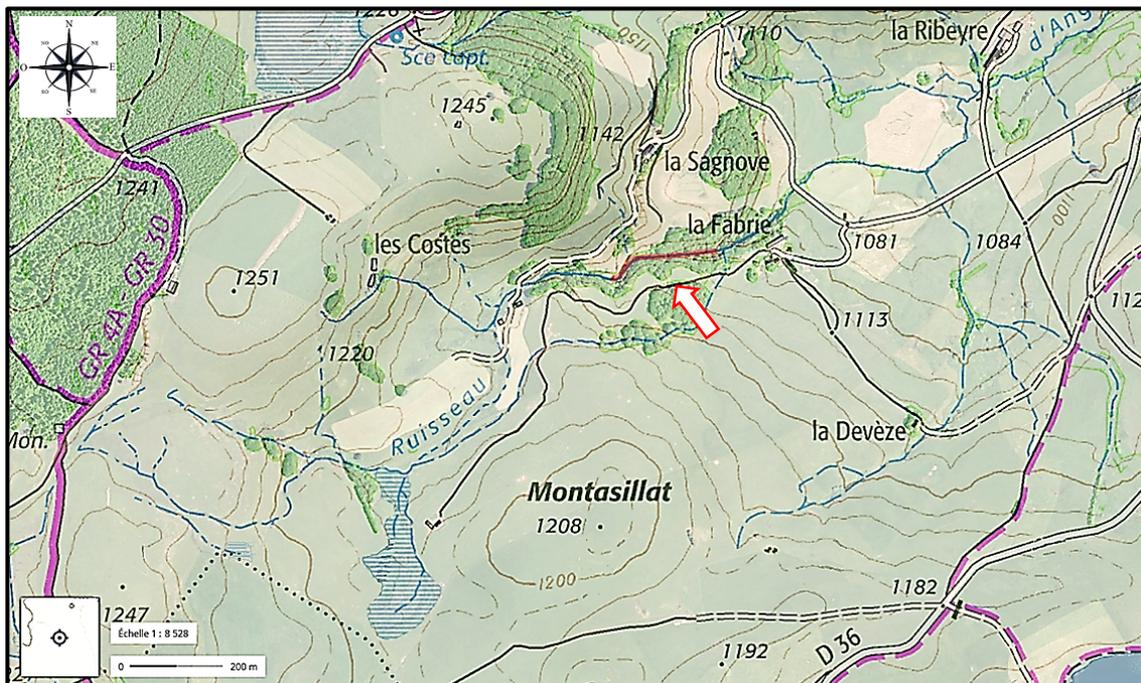


Fig. S4.1. Le site d'étude (ruisseau d'Anglard, massif du Mont-Dore, France). La flèche rouge indique le ruisseau d'Anglard proche de sa source les Costes. Le trait rouge représente la station de prélèvement.

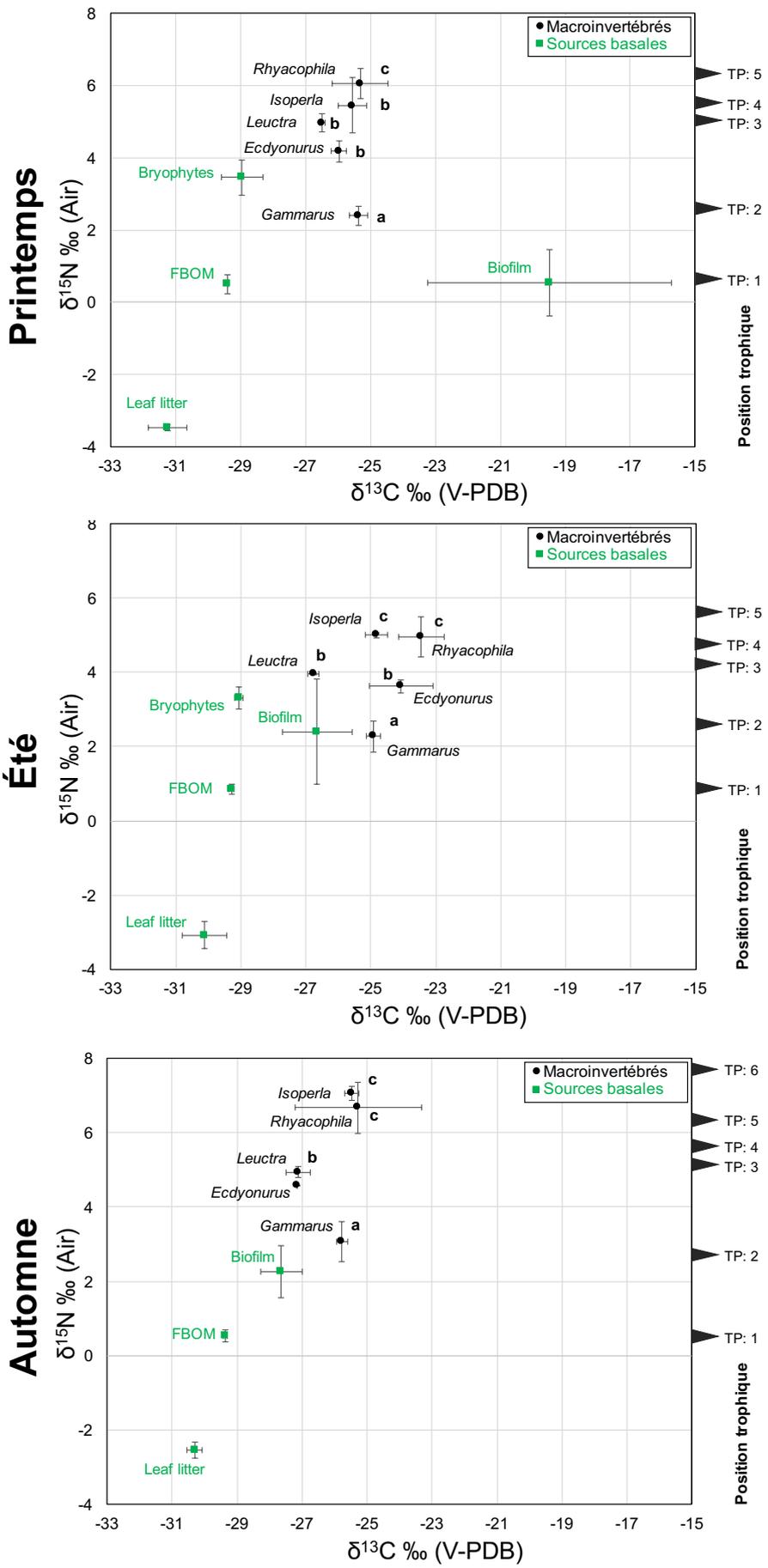


Fig. S4.2. Evolution temporelle des signatures isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ (‰) et $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de cinq taxons (en noir) et de différentes sources basales (en vert).

Les valeurs sont en moyenne \pm ET. Sur l'axe des ordonnées de droite, est reporté l'emplacement des différentes positions trophiques (TP) calculées. La FBOM étant le niveau 1. Les différences significatives entre les TP sont indiquées par des lettres différentes (ANOVA-1way, $p < 0,05$).

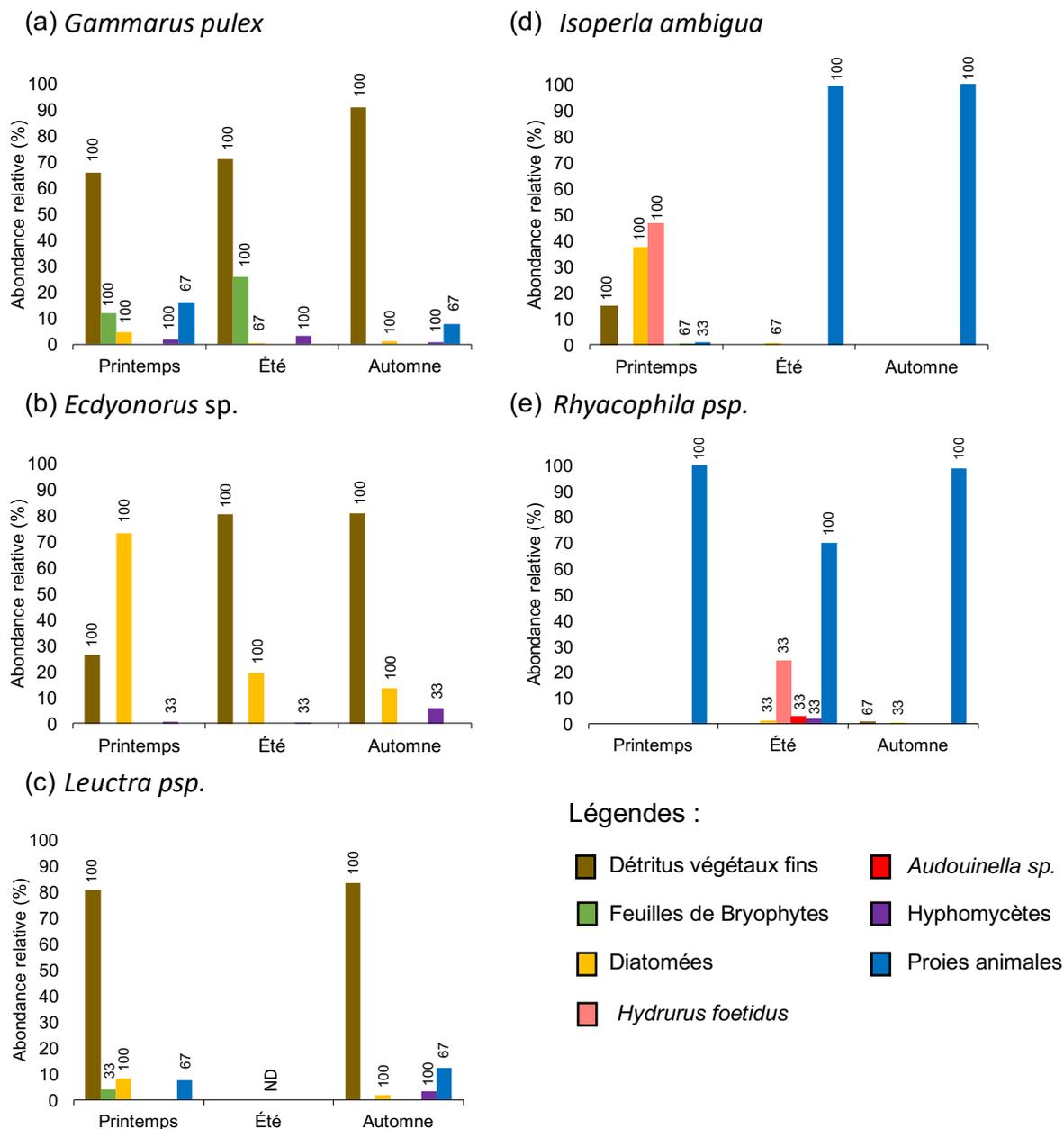


Fig. S4.3. Contenus digestifs des cinq taxons de macroinvertébrés étudiés au cours des trois saisons. Les histogrammes représentent l'abondance relative moyenne de chaque item alimentaire. Les chiffres associés aux barres d'histogramme indiquent la fréquence d'occurrence de l'item. Les bryophytes sont absentes en automne. ND : absence de données.

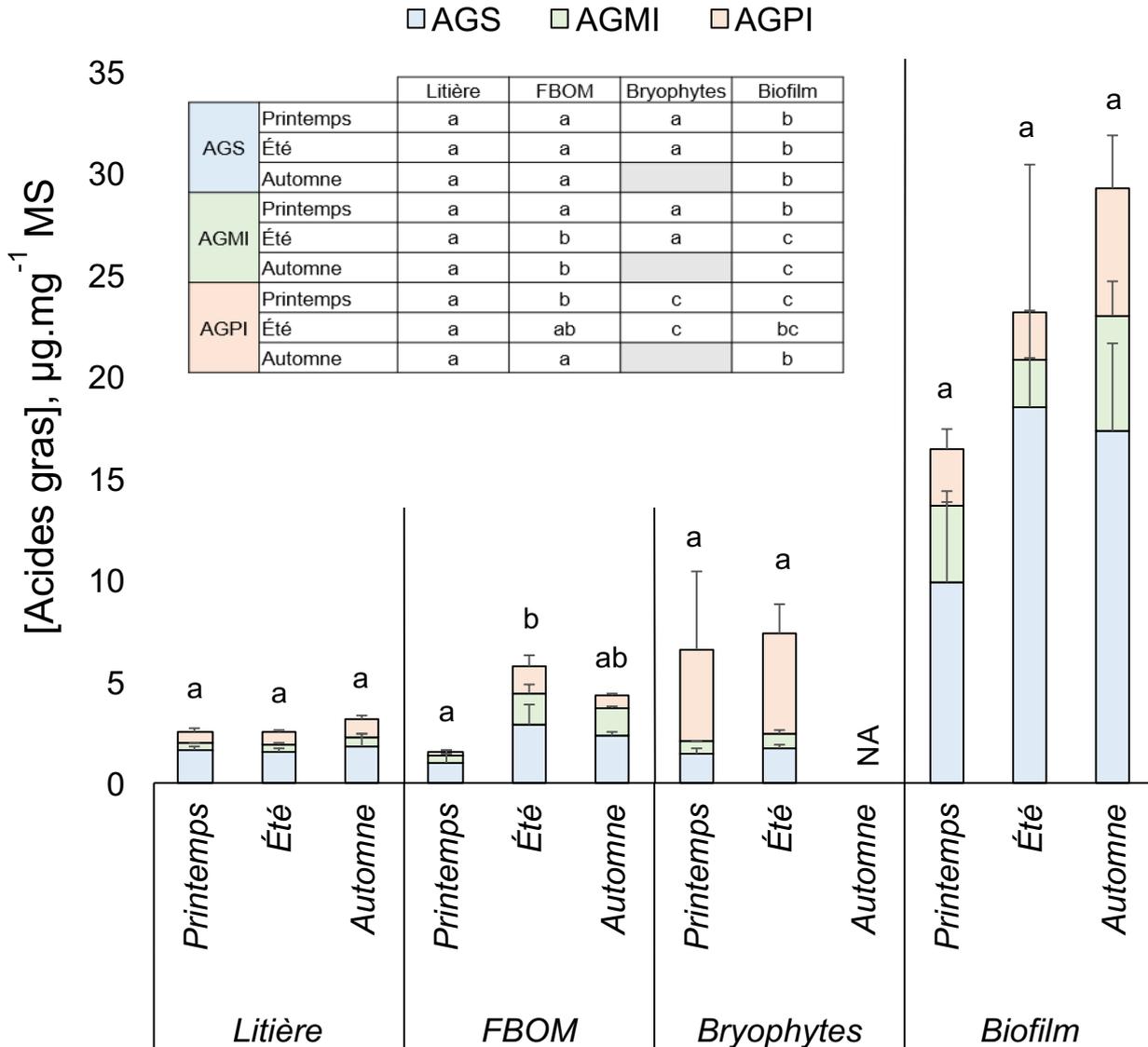


Fig. S4.4. Concentrations en acides gras totaux des sources organiques basales accompagnées des concentrations en acides gras saturés (AGS), en acides gras monoinsaturés (AGMI) et en acides gras polyinsaturés (AGPI) (printemps, été, automne). Chaque barre d'historgramme représente la valeur (moyenne \pm ET) en AG totaux avec trois sub-divisiones donnant les valeurs (moyenne \pm ET) des AGS, AGMI et AGPI. Les valeurs sont exprimées en $\mu\text{g.mg}^{-1}$ de masse sèche (MS). Pour une même source basale, les différences significatives de concentrations en AG totaux sont représentées par des lettrines différentes (Anova-1way, $p < 0,05$). En complément au graphique, le tableau regroupe les différences statistiques entre les sources basales pour les AG totaux, AGS, AGPI et AGMI aux trois saisons par des lettrines différentes (Anova-1way, $p < 0,05$).

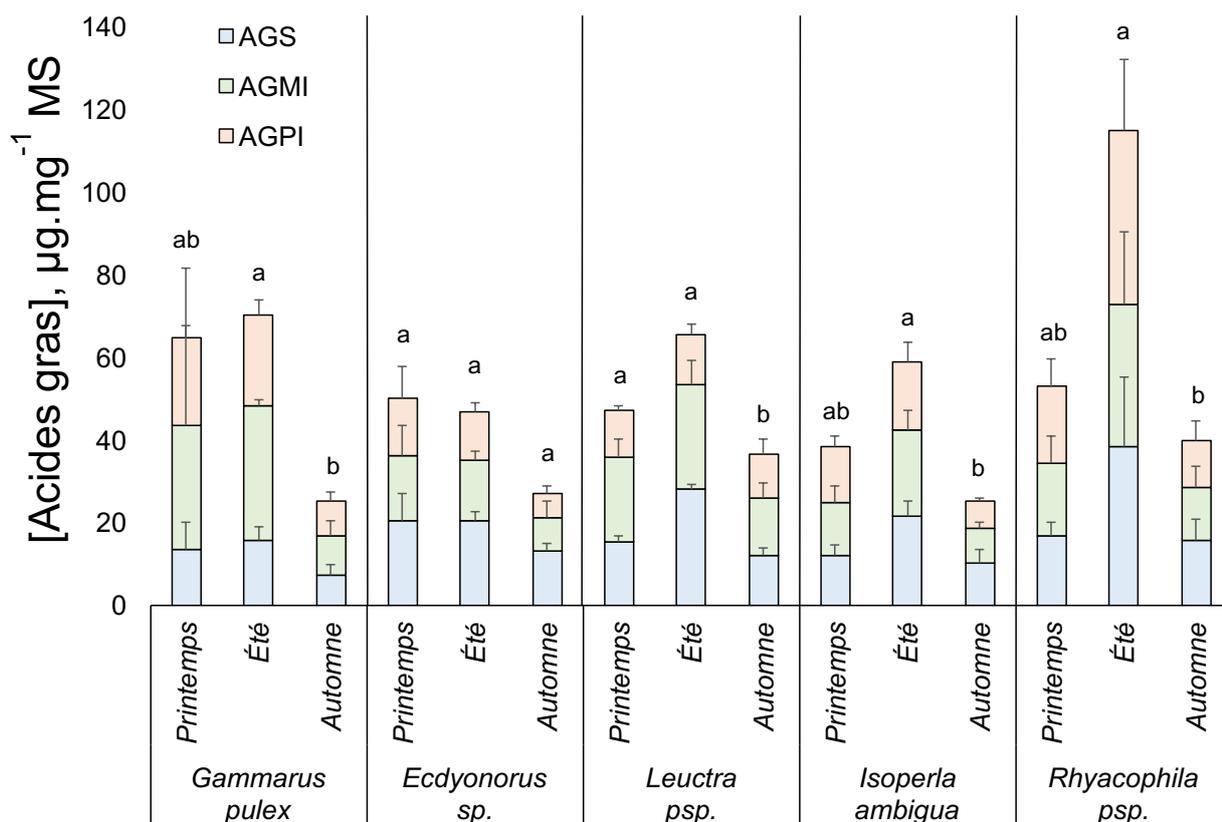


Fig. S4.5. Concentrations en acides gras totaux des lipides neutres des taxons étudiés, accompagnées des concentrations respectives en acides gras saturés (AGS), en acides gras monoinsaturés (AGMI) et en acides gras polyinsaturés (AGPI) (printemps, été, automne). Chaque barre d'histogramme représente la valeur (moyenne \pm ET) en AG totaux des lipides neutres avec trois sub-divisions donnant les valeurs (moyenne \pm ET) des AGS, AGMI et AGPI. Ces valeurs sont exprimées en $\mu\text{g.mg}^{-1}$ de masse sèche (MS). Pour un même taxon, les différences significatives de concentrations en AG totaux sont représentées par des lettres différentes (Anova-1way, $p < 0,05$).

Tab. S4.1. Composition d'acides gras (AG) issus des lipides totaux de la litière de feuilles (*Fagus sylvatica*) prélevé dans le ruisseau d'Anglard (France) au début printemps, en été et automne. Les valeurs sont en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de masse sèche (moyenne \pm ET). AG *autre* représente les AG non-identifiés, AG hydroxylés, AG méthoxylés, etc. *tr* (traces) indique les valeurs non-quantifiables et en-dessous de la limite de détection.

Acides gras	Litière de feuilles (hêtre commun, <i>Fagus sylvatica</i>)		
	Printemps	Été	Automne
AGS total	1.65 \pm 0.18	1.56 \pm 0.17	1.87 \pm 0.58
12:0	tr	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01
14:0	0.07 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01	0.07 \pm 0.03
15:0	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00
16:0	0.55 \pm 0.08	0.68 \pm 0.07	0.89 \pm 0.23
17:0	0.02 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01
18:0	0.07 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01	0.08 \pm 0.03
19:0	tr		
20:0	0.08 \pm 0.01		0.05 \pm 0.05
21:0	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.02 \pm 0.02
22:0	0.28 \pm 0.04	0.22 \pm 0.05	0.19 \pm 0.20
24:0	0.11 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.07 \pm 0.08
25:0	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01
26:0	0.08 \pm 0.00	0.06 \pm 0.02	0.06 \pm 0.07
27:0	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.02
28:0	0.31 \pm 0.02	0.21 \pm 0.05	0.33 \pm 0.37
AG ramifiés et cyclo total	0.06 \pm 0.01	0.23 \pm 0.04	0.07 \pm 0.03
iso 15:0	0.03 \pm 0.01	0.06 \pm 0.00	0.04 \pm 0.03
iso 17:0	tr		0.01 \pm 0.01
ai 15:0	tr		
ai 17:0	tr	0.12 \pm 0.05	
cyclo 17:0	tr	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
AGMI total	0.33 \pm 0.05	0.35 \pm 0.06	0.44 \pm 0.11
16:1 ω 7/16:0	0.16 \pm 0.02	0.14 \pm 0.03	0.06 \pm 0.02
14:1 ω 5		0.01 \pm 0.01	
15:1		0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00
16:1 ω 11	0.03 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	
16:1 ω 9	0.01 \pm 0.00		0.06 \pm 0.04
16:1 ω 7	0.08 \pm 0.01	0.09 \pm 0.02	0.05 \pm 0.00
16:1 ω 5			0.01 \pm 0.00
18:1 ω 9	0.16 \pm 0.02	0.15 \pm 0.03	0.28 \pm 0.13
18:1 ω 7	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02
24:1	0.01 \pm 0.00		
AGPI total	0.59 \pm 0.12	0.62 \pm 0.15	0.83 \pm 0.20
AGPI C ₁₆	0.00 \pm 0.00		
Total ω 6	0.30 \pm 0.07	0.19 \pm 0.03	0.25 \pm 0.09
Total ω 3	0.28 \pm 0.05	0.42 \pm 0.14	0.58 \pm 0.11
ω 3/ ω 6	0.96 \pm 0.05	2.20 \pm 0.73	2.47 \pm 0.37
16:2 ω 4	tr		
18:2 ω 6	0.29 \pm 0.07	0.19 \pm 0.03	0.25 \pm 0.09
18:3 ω 6	tr		
18:3 ω 3	0.26 \pm 0.04	0.40 \pm 0.14	0.58 \pm 0.11
18:4 ω 3	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	
20:4 ω 6		tr	
20:5 ω 3	tr	tr	tr
AG autres	0.18 \pm 0.03	0.26 \pm 0.07	0.28 \pm 0.08
AG total	2.80 \pm 0.39	3.01 \pm 0.37	3.49 \pm 0.89

Tab. S4.2. Composition d'acides gras (AG) issus des lipides totaux de la MOBF (Matière organique benthique fine) prélevé dans le ruisseau d'Anglard (France) au début printemps, en été et automne. Les valeurs sont en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de masse sèche (moyenne \pm ET). *AG autre* représente les AG non-identifiés, AG hydroxylés, AG méthoxylés, etc. *tr* (traces) indique les valeurs non-quantifiables et en-dessous de la limite

Acides gras	FBOM		
	Printemps	Été	Automne
AGS total	0.98 \pm 0.51	2.88 \pm 1.03	2.33 \pm 0.25
12:0	0.01 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01
14:0	0.05 \pm 0.03	0.12 \pm 0.03	0.14 \pm 0.06
15:0	tr	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00
16:0	0.30 \pm 0.15	1.02 \pm 0.39	0.76 \pm 0.12
17:0	0.01 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.03
18:0	0.10 \pm 0.04	0.41 \pm 0.18	0.21 \pm 0.02
20:0	0.06 \pm 0.03	0.16 \pm 0.06	0.12 \pm 0.01
21:0	0.01 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00
22:0	0.12 \pm 0.07	0.33 \pm 0.12	0.31 \pm 0.02
24:0	0.09 \pm 0.05	0.25 \pm 0.10	0.23 \pm 0.00
25:0	0.02 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	0.04 \pm 0.00
26:0	0.08 \pm 0.04	0.18 \pm 0.07	0.15 \pm 0.01
28:0	0.11 \pm 0.07	0.21 \pm 0.07	0.24 \pm 0.02
AG ramifiés et cyclo total	0.09 \pm 0.05	0.26 \pm 0.10	0.23 \pm 0.03
iso 14:0			0.02 \pm 0.00
iso 15:0	0.03 \pm 0.02	0.09 \pm 0.03	0.08 \pm 0.01
iso 16:0	tr	0.04 \pm 0.02	0.02 \pm 0.00
iso 17:0	tr	0.02 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
ai 15:0	0.02 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.04 \pm 0.00
ai 17:0	0.01 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.02 \pm 0.00
cyclo 17:0			0.01 \pm 0.00
AGMI total	0.43 \pm 0.21	1.52 \pm 0.43	1.35 \pm 0.13
16:1 ω 7/16:0	0.58 \pm 0.03	0.35 \pm 0.04	0.47 \pm 0.04
14:1 ω 5			0.03 \pm 0.01
16:1 ω 11	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	
16:1 ω 9	0.02 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00
16:1 ω 7	0.17 \pm 0.09	0.35 \pm 0.10	0.35 \pm 0.05
16:1 ω 5	0.02 \pm 0.01	0.07 \pm 0.02	0.10 \pm 0.01
18:1 ω 9	0.14 \pm 0.06	0.76 \pm 0.20	0.51 \pm 0.04
18:1 ω 7	0.07 \pm 0.03	0.20 \pm 0.07	0.24 \pm 0.03
20:1 ω 9		0.04 \pm 0.04	
22:1 ω 9		0.04 \pm 0.06	0.06 \pm 0.04
22:1 ω 7			0.02 \pm 0.01
AGPI total	0.16 \pm 0.08	1.37 \pm 0.50	0.69 \pm 0.06
AGPI C ₁₆	0.01 \pm 0.01	0.08 \pm 0.03	0.02 \pm 0.00
Total ω 6	0.09 \pm 0.05	0.59 \pm 0.24	0.34 \pm 0.04
Total ω 3	0.08 \pm 0.03	0.70 \pm 0.24	0.33 \pm 0.03
ω 3/ ω 6	0.95 \pm 0.10	1.19 \pm 0.09	1.00 \pm 0.13
16:2 ω 6	tr		
16:2 ω 4		0.05 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00
16:3 ω 6			
16:3 ω 4		0.03 \pm 0.02	tr
16:4 ω 3	tr		
18:2 ω 6	0.07 \pm 0.04	0.44 \pm 0.18	0.26 \pm 0.03
18:3 ω 6	0.01 \pm 0.00	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
18:3 ω 3	0.04 \pm 0.02	0.41 \pm 0.16	0.22 \pm 0.03
18:4 ω 3	tr	0.04 \pm 0.01	
20:4 ω 6	0.01 \pm 0.00	0.13 \pm 0.06	0.05 \pm 0.00
20:5 ω 3	0.03 \pm 0.01	0.25 \pm 0.08	0.12 \pm 0.01
AG autres	0.07 \pm 0.04	0.28 \pm 0.08	0.19 \pm 0.01
AG total	1.74 \pm 0.90	6.31 \pm 2.11	4.78 \pm 0.47

Tab. S4.3. Composition d'acides gras (AG) issus des lipides totaux des bryophytes prélevées dans le ruisseau d'Anglard (France) au début printemps et en été. Les bryophytes étaient absentes dans le milieu en automne. Les valeurs sont en $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de masse sèche (moyenne \pm ET). *AG autre* représente les AG non-identifiés, AG hydroxylés, AG méthoxylés, etc. *tr* (traces) indique les valeurs non-quantifiables et en-dessous de la limite de détection.

Acides gras	Bryophytes		Automne
	Printemps	Été	
AGS total	1.48 \pm 0.26	1.69 \pm 0.26	
12:0		0.04 \pm 0.00	
14:0	0.17 \pm 0.04	0.17 \pm 0.03	
15:0	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	
16:0	0.95 \pm 0.15	1.06 \pm 0.18	
17:0	0.05 \pm 0.02	0.01 \pm 0.00	
18:0	0.12 \pm 0.04	0.15 \pm 0.02	
20:0		0.03 \pm 0.00	
22:0	0.02 \pm 0.02	0.03 \pm 0.00	
24:0	0.06 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	
26:0	0.03 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	
27:0		0.07 \pm 0.01	
28:0	0.07 \pm 0.02		
AG ramifiés et cyclo total	0.05 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01	
iso 15:0		0.01 \pm 0.00	
iso 17:0		0.06 \pm 0.01	
ai 17:0	0.05 \pm 0.02		
AGMI total	0.59 \pm 0.06	0.78 \pm 0.14	
16:1 ω 7/16:0	0.27 \pm 0.04	0.26 \pm 0.03	
15:1	0.03 \pm 0.01		
16:1 ω 9	0.09 \pm 0.02	0.10 \pm 0.01	
16:1 ω 7	0.25 \pm 0.03	0.28 \pm 0.04	
16:1 ω 5	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	
18:1 ω 9	0.11 \pm 0.04	0.25 \pm 0.07	
18:1 ω 7	0.09 \pm 0.03	0.10 \pm 0.01	
18:1 ω 5		0.01 \pm 0.00	
22:1 ω 9		tr	
22:1 ω 7		0.01 \pm 0.01	
AGPI total	4.50 \pm 3.82	4.87 \pm 1.45	
AGPI C ₁₆	0.22 \pm 0.12	0.17 \pm 0.02	
Total ω 6	1.76 \pm 1.61	1.88 \pm 0.62	
Total ω 3	1.93 \pm 0.94	2.90 \pm 0.83	
ω 3/ ω 6	1.40 \pm 0.52	1.56 \pm 0.10	
16:2 ω 6	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	
16:2 ω 4	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00	
16:3 ω 6		0.01 \pm 0.00	
16:3 ω 4		0.02 \pm 0.00	
16:3 ω 3	0.11 \pm 0.11	0.03 \pm 0.00	
16:4 ω 3	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	
16:4 ω 1	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	
18:2 ω 7	0.02 \pm 0.00		
18:2 ω 6	0.41 \pm 0.35	0.43 \pm 0.14	
18:2 ω 4			
18:3 ω 6	0.08 \pm 0.11	0.05 \pm 0.01	
18:3 ω 4			
18:3 ω 3	0.62 \pm 0.38	0.82 \pm 0.24	
18:4 ω 3	0.62 \pm 0.38	0.82 \pm 0.24	
20:2 ω 6	0.03 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	
20:2 ω 4	0.73 \pm 1.27	0.02 \pm 0.01	
20:3 ω 6	0.55 \pm 0.89	0.12 \pm 0.04	
20:3 ω 3	0.03 \pm 0.05	0.02 \pm 0.01	
20:4 ω 6	0.54 \pm 0.00	1.19 \pm 0.39	
20:4 ω 3	0.02 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	
20:5 ω 3	0.49 \pm 0.04	1.04 \pm 0.27	
22:2 ω 6	0.12 \pm 0.20	0.03 \pm 0.04	
22:3 ω 3	tr		
22:4 ω 6	0.03 \pm 0.04		
22:5 ω 3		0.08 \pm 0.09	
AG autres	0.07 \pm 0.01	0.20 \pm 0.02	
AG total	6.69 \pm 4.16	7.62 \pm 1.84	

Tab. S4.4. Composition d'acides gras (AG) issus des lipides totaux du biofilm épilithique prélevé dans le ruisseau d'Anglard (France) au début printemps, en été et automne. Les valeurs sont en $\mu\text{g.mg}^{-1}$ de masse sèche (moyenne \pm ET). *AG autre* représente les AG non-identifiés, AG hydroxylés, AG méthoxylés, etc. *tr* (traces) indique les valeurs non-quantifiables et en-dessous de la limite de détection.

Acides gras	Biofilm épilithique		
	Printemps	Été	Automne
AGS total	9.86 \pm 4.03	18.53 \pm 11.91	17.38 \pm 4.24
12:0	0.21 \pm 0.14		0.11 \pm 0.05
14:0	2.31 \pm 0.87	1.32 \pm 0.84	1.78 \pm 0.61
15:0	0.14 \pm 0.05	0.16 \pm 0.01	0.24 \pm 0.14
16:0	6.08 \pm 2.43	7.83 \pm 3.95	10.09 \pm 2.71
17:0		0.13 \pm 0.04	
18:0	0.83 \pm 0.54	8.46 \pm 6.87	4.89 \pm 1.62
20:0	0.09 \pm 0.03	0.32 \pm 0.22	
21:0			
22:0	0.08 \pm 0.02	0.16 \pm 0.04	
24:0	0.13 \pm 0.03	0.14 \pm 0.03	0.15 \pm 0.04
25:0			
26:0			0.11 \pm 0.04
AG ramifiés et cyclo total	0.78 \pm 0.24	0.44 \pm 0.15	0.89 \pm 0.34
iso 15:0	0.32 \pm 0.11	0.14 \pm 0.03	0.24 \pm 0.07
iso 16:0	0.12 \pm 0.04		0.15 \pm 0.02
iso 17:0	0.15 \pm 0.05		0.25 \pm 0.15
ai 15:0	0.09 \pm 0.03	0.08 \pm 0.03	0.25 \pm 0.11
ai 17:0		0.23 \pm 0.15	
cyclo 15:0	0.10 \pm 0.06		
AGMI total	3.80 \pm 0.71	2.28 \pm 0.11	5.63 \pm 1.67
16:1 ω 7/16:0	0.50 \pm 0.19	0.10 \pm 0.09	0.26 \pm 0.09
16:1 ω 11		0.14 \pm 0.03	
16:1 ω 9	0.17 \pm 0.08	0.31 \pm 0.09	0.28 \pm 0.03
16:1 ω 7	2.77 \pm 0.44	0.63 \pm 0.29	2.61 \pm 1.19
16:1 ω 5	0.06 \pm 0.02		
18:1 ω 9	0.42 \pm 0.18	0.77 \pm 0.17	1.27 \pm 0.31
18:1 ω 7	0.31 \pm 0.12	0.43 \pm 0.05	1.47 \pm 0.64
20:1 ω 9	0.05 \pm 0.05		
20:1 ω 7	0.02 \pm 0.04		
AGPI total	2.78 \pm 1.03	2.36 \pm 0.11	6.28 \pm 2.57
AGPI C ₁₆	1.05 \pm 0.39	0.49 \pm 0.09	1.58 \pm 0.56
Total ω 6	0.36 \pm 0.15	0.64 \pm 0.08	1.45 \pm 0.62
Total ω 3	1.91 \pm 0.78	1.40 \pm 0.18	3.84 \pm 1.84
ω 3/ ω 6	5.26 \pm 0.70	2.21 \pm 0.58	2.59 \pm 0.25
16:2 ω 6	0.01 \pm 0.02		
16:2 ω 4	0.34 \pm 0.06		0.51 \pm 0.28
16:3 ω 4	0.06 \pm 0.03	0.12 \pm 0.06	
16:3 ω 3	0.27 \pm 0.09	0.08 \pm 0.03	0.81 \pm 0.44
16:4 ω 3	0.26 \pm 0.21	0.09 \pm 0.07	
16:4 ω 1	0.11 \pm 0.07	0.20 \pm 0.05	0.26 \pm 0.14
18:2 ω 7			0.21 \pm 0.08
18:2 ω 6	0.30 \pm 0.17	0.60 \pm 0.03	1.35 \pm 0.58
18:3 ω 6	0.02 \pm 0.00		
18:3 ω 3	0.65 \pm 0.43	0.65 \pm 0.08	2.47 \pm 1.27
18:4 ω 3	0.12 \pm 0.04	0.28 \pm 0.21	
20:3 ω 3		0.09 \pm 0.13	0.09 \pm 0.07
20:4 ω 6	0.03 \pm 0.02	0.04 \pm 0.06	0.10 \pm 0.04
20:5 ω 3	0.61 \pm 0.12	0.21 \pm 0.14	0.48 \pm 0.31
AG autres	0.33 \pm 0.11	1.54 \pm 1.23	2.51 \pm 0.36
AG total	17.55 \pm 5.36	25.15 \pm 10.53	32.69 \pm 8.63

Tab. S4.5. Composition d'acides gras (AG) issus des lipides neutres de *Gammarus pulex* prélevé dans le ruisseau d'Anglard (France) au début printemps, en été et automne. Les valeurs sont en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de masse sèche (moyenne \pm ET). *AG autre* représente les AG non-identifiés, AG hydroxylés, AG méthoxylés, etc. *tr* (traces) indique les valeurs non-quantifiables et en-dessous de la limite de détection.

Acides gras	<i>Gammarus pulex</i>		
	Printemps	Été	Automne
AGS total	13.33 \pm 6.74	19.42 \pm 3.16	7.13 \pm 2.44
12:0	0.28 \pm 0.09	0.55 \pm 0.12	0.20 \pm 0.07
14:0	1.17 \pm 0.59	2.20 \pm 0.52	0.77 \pm 0.31
15:0	0.48 \pm 0.21	0.50 \pm 0.08	0.28 \pm 0.07
16:0	8.92 \pm 4.61	12.64 \pm 2.35	4.54 \pm 1.55
17:0	0.34 \pm 0.14	0.50 \pm 0.07	0.22 \pm 0.06
18:0	1.97 \pm 1.05	2.66 \pm 0.03	1.00 \pm 0.38
19:0		0.14 \pm 0.02	0.04 \pm 0.02
20:0	0.09 \pm 0.04	0.13 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01
22:0	0.09 \pm 0.04	0.10 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01
AG ramifiés et cyclo total	1.59 \pm 0.80	1.59 \pm 0.23	0.87 \pm 0.28
iso 14:0	0.09 \pm 0.05	0.10 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02
iso 15:0	0.28 \pm 0.13	0.36 \pm 0.06	0.22 \pm 0.08
iso 16:0	0.09 \pm 0.04	0.13 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02
iso 17:0	0.23 \pm 0.11	0.25 \pm 0.04	0.15 \pm 0.04
ai 15:0	0.17 \pm 0.07	0.14 \pm 0.03	0.10 \pm 0.03
ai 17:0	0.15 \pm 0.03		
cyclo 17:0	0.31 \pm 0.17	0.27 \pm 0.04	0.16 \pm 0.05
cylco 19:0 ou 19:1	0.28 \pm 0.20	0.33 \pm 0.05	0.12 \pm 0.03
AGMI total	30.12 \pm 24.25	31.63 \pm 1.23	9.62 \pm 3.51
16:1 ω 7/16:0	0.28 \pm 0.02	0.22 \pm 0.00	0.31 \pm 0.01
15:1	0.35 \pm 0.20	0.40 \pm 0.10	0.21 \pm 0.06
16:1 ω 9	0.19 \pm 0.10	0.20 \pm 0.02	0.11 \pm 0.03
16:1 ω 7	2.47 \pm 1.15	2.76 \pm 0.49	1.39 \pm 0.42
16:1 ω 5	0.21 \pm 0.07	0.24 \pm 0.04	0.12 \pm 0.03
18:1 ω 9	23.37 \pm 19.82	24.07 \pm 1.21	6.60 \pm 2.70
18:1 ω 7	1.51 \pm 0.96	1.62 \pm 0.05	0.77 \pm 0.18
18:1 ω 5	0.19 \pm 0.13	0.28 \pm 0.03	0.12 \pm 0.04
20:1 ω 9	1.43 \pm 1.39	1.71 \pm 0.24	0.21 \pm 0.04
20:1 ω 7	0.08 \pm 0.07	0.09 \pm 0.02	0.05 \pm 0.02
22:1 ω 9	0.34 \pm 0.36	0.27 \pm 0.27	0.03 \pm 0.01
AGPI total	21.31 \pm 16.61	18.05 \pm 3.81	8.48 \pm 1.91
AGPI C ₁₆	0.62 \pm 0.24	0.79 \pm 0.12	0.63 \pm 0.35
Total ω 6	6.74 \pm 4.59	6.13 \pm 1.23	3.59 \pm 1.44
Total ω 3	14.15 \pm 11.84	11.37 \pm 2.67	4.34 \pm 0.14
ω 3/ ω 6	0.52 \pm 0.08	0.54 \pm 0.02	0.82 \pm 0.31
16:2 ω 4	0.36 \pm 0.24	0.13 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
16:3 ω 4		0.38 \pm 0.08	0.48 \pm 0.36
16:3 ω 3	0.20 \pm 0.06	0.12 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01
16:4 ω 3		0.12 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01
16:4 ω 1	0.07 \pm 0.06	0.04 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00
18:2 ω 6	12.35 \pm 10.64	9.79 \pm 2.30	3.72 \pm 0.06
18:3 ω 6	0.24 \pm 0.16	0.12 \pm 0.02	0.06 \pm 0.04
18:3 ω 3	4.20 \pm 3.21	3.23 \pm 0.53	2.42 \pm 1.04
18:4 ω 3		0.32 \pm 0.04	0.14 \pm 0.09
20:2 ω 6	0.82 \pm 0.63	0.81 \pm 0.08	0.29 \pm 0.03
20:3 ω 6	0.10 \pm 0.05	0.05 \pm 0.02	0.02 \pm 0.00
20:3 ω 3	0.40 \pm 0.31	0.28 \pm 0.02	0.22 \pm 0.13
20:4 ω 6	0.65 \pm 0.37	0.61 \pm 0.26	0.25 \pm 0.05
20:4 ω 3	0.10 \pm 0.08		0.02 \pm 0.02
20:5 ω 3	1.48 \pm 0.74	1.60 \pm 0.62	0.62 \pm 0.15
22:4 ω 3			
22:5 ω 3	0.15 \pm 0.10	0.12 \pm 0.07	0.03 \pm 0.00
22:6 ω 3	0.21 \pm 0.13	0.33 \pm 0.05	0.06 \pm 0.02
AG autres	0.72 \pm 0.56	0.56 \pm 0.14	0.08 \pm 0.02
AG total	66.36 \pm 48.39	70.69 \pm 3.29	26.10 \pm 8.12

Tab. S4.6. Composition d'acides gras (AG) issus des lipides neutres de *Ecdyonorus* sp. prélevé dans le ruisseau d'Anglard (France) au début printemps, en été et automne. Les valeurs sont en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de masse sèche (moyenne \pm ET). *AG autre* représente les AG non-identifiés, AG hydroxylés, AG méthoxylés, etc. *tr* (traces) indique les valeurs non-quantifiables et en-dessous de la limite de détection.

Acides gras	<i>Ecdyonorus</i> sp.		
	Printemps	Été	Automne
AGS total	20.43 \pm 6.41	19.28 \pm 2.01	13.03 \pm 1.74
11:0	0.19 \pm 0.02	0.66 \pm 0.06	0.35 \pm 0.02
12:0	0.99 \pm 0.14	1.49 \pm 0.21	0.68 \pm 0.12
14:0	2.83 \pm 0.93	1.04 \pm 0.15	0.89 \pm 0.13
15:0	0.20 \pm 0.06	0.28 \pm 0.06	0.26 \pm 0.04
16:0	13.13 \pm 4.87	11.11 \pm 1.57	8.18 \pm 1.40
17:0	0.22 \pm 0.07	0.58 \pm 0.02	0.27 \pm 0.03
18:0	2.68 \pm 1.16	3.87 \pm 0.52	2.27 \pm 0.29
19:0			
20:0	0.14 \pm 0.04	0.14 \pm 0.03	0.09 \pm 0.02
21:0			
22:0	0.06 \pm 0.03	0.09 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01
AG ramifiés et cyclo total	1.21 \pm 0.22	1.28 \pm 0.13	1.42 \pm 0.15
iso 14:0	0.03 \pm 0.05		
iso 15:0	0.34 \pm 0.08	0.26 \pm 0.04	0.60 \pm 0.04
iso 17:0		0.25 \pm 0.09	0.21 \pm 0.01
ai 17:0			
cyclo 17:0	0.11 \pm 0.01	0.09 \pm 0.03	0.06 \pm 0.03
AGMI total	15.74 \pm 7.16	12.72 \pm 2.31	8.23 \pm 3.87
16:1 ω 7/16:0	0.56 \pm 0.15	0.36 \pm 0.07	0.45 \pm 0.19
12:1	0.20 \pm 0.09	0.85 \pm 0.12	0.58 \pm 0.11
14:1	0.30 \pm 0.04		
14:1 ω 5	0.35 \pm 0.18	0.45 \pm 0.07	0.54 \pm 0.25
15:1	0.48 \pm 0.14		
16:1 ω 9	0.21 \pm 0.07	0.45 \pm 0.10	0.23 \pm 0.08
16:1 ω 7	7.71 \pm 4.75	3.98 \pm 1.53	3.87 \pm 2.23
16:1 ω 5	0.22 \pm 0.07	0.39 \pm 0.06	0.21 \pm 0.10
18:1 ω 9	3.02 \pm 1.28	2.21 \pm 0.69	0.88 \pm 0.44
18:1 ω 7	3.09 \pm 0.70	4.00 \pm 0.15	1.65 \pm 0.63
18:1 ω 5	0.08 \pm 0.02	0.36 \pm 0.09	0.27 \pm 0.10
20:1 ω 7	0.08 \pm 0.09		
22:1 ω 9		0.03 \pm 0.04	
AGPI total	13.90 \pm 7.64	13.94 \pm 2.24	5.68 \pm 1.98
AGPI C ₁₆	2.24 \pm 1.04	1.26 \pm 0.21	0.86 \pm 0.49
ω 3	11.14 \pm 6.36	11.72 \pm 2.20	4.58 \pm 1.45
ω 6	1.13 \pm 0.62	1.65 \pm 0.12	0.55 \pm 0.25
ω 3/ ω 6	9.82 \pm 0.28	7.10 \pm 1.49	8.79 \pm 1.88
16:2 ω 4	0.84 \pm 0.37	0.54 \pm 0.09	0.42 \pm 0.27
16:3 ω 4	0.17 \pm 0.03		0.05 \pm 0.01
16:3 ω 3	0.54 \pm 0.21	0.16 \pm 0.02	0.08 \pm 0.04
16:4 ω 3	0.33 \pm 0.26	0.52 \pm 0.13	0.22 \pm 0.16
16:4 ω 1	0.36 \pm 0.19	0.04 \pm 0.01	0.09 \pm 0.03
18:2 ω 6	0.68 \pm 0.34	1.28 \pm 0.14	0.40 \pm 0.19
18:2 ω 4	0.19 \pm 0.05		
18:3 ω 6	0.11 \pm 0.04		
18:3 ω 4	0.07 \pm 0.03		
18:3 ω 3	2.71 \pm 1.66	6.83 \pm 1.46	1.84 \pm 1.22
18:4 ω 3	2.89 \pm 1.86	1.38 \pm 0.28	0.42 \pm 0.27
20:3 ω 3	0.05 \pm 0.07	0.25 \pm 0.04	0.05 \pm 0.03
20:4 ω 6	0.27 \pm 0.14	0.37 \pm 0.03	0.15 \pm 0.06
20:4 ω 3	0.07 \pm 0.09	0.15 \pm 0.16	0.92 \pm 0.76
20:5 ω 3	4.54 \pm 2.32	2.42 \pm 0.48	1.04 \pm 0.49
22:2 ω 6	0.08 \pm 0.09		
AG autres		1.99 \pm 0.49	2.06 \pm 1.03
AG total	51.28 \pm 21.18	47.22 \pm 4.75	28.36 \pm 7.71

Tab. S4.7. Composition d'acides gras (AG) issus des lipides neutres de *Leuctra psp.* prélevé dans le ruisseau d'Anglard (France) au début printemps, en été et automne. Les valeurs sont en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de masse sèche (moyenne \pm ET). *AG autre* représente les AG non-identifiés, AG hydroxylés, AG méthoxylés, etc. *tr* (traces) indique les valeurs non-quantifiables et en-dessous de la limite de détection.

Acides gras	<i>Leuctra psp.</i>		
	Printemps	Été	Automne
AGS total	15.32 \pm 1.22	26.68 \pm 1.38	11.81 \pm 2.06
12:0		0.30 \pm 0.07	0.22 \pm 0.09
14:0	0.93 \pm 0.16	1.71 \pm 0.10	0.53 \pm 0.09
15:0	0.87 \pm 0.33	1.53 \pm 0.21	0.54 \pm 0.11
16:0	8.63 \pm 1.00	15.23 \pm 0.62	6.63 \pm 1.09
17:0	0.58 \pm 0.11	1.42 \pm 0.16	0.65 \pm 0.15
18:0	4.18 \pm 1.04	6.36 \pm 2.28	3.13 \pm 0.55
20:0	0.13 \pm 0.03	0.13 \pm 0.04	0.11 \pm 0.02
22:0			
AG ramifiés et cyclo total	4.52 \pm 2.23	7.39 \pm 0.51	2.18 \pm 0.46
iso 14:0	0.30 \pm 0.27	0.79 \pm 0.03	0.27 \pm 0.06
iso 15:0	2.11 \pm 1.05	3.26 \pm 0.16	0.80 \pm 0.16
iso 16:0	0.36 \pm 0.16	0.86 \pm 0.06	0.21 \pm 0.03
iso 17:0	0.46 \pm 0.14	0.98 \pm 0.12	0.35 \pm 0.08
ai 15:0	0.70 \pm 0.34	1.05 \pm 0.08	0.28 \pm 0.05
ai 17:0			
cyclo 15:0	0.24 \pm 0.11		
cyclo 17:0	0.36 \pm 0.17	0.45 \pm 0.16	0.27 \pm 0.09
AGMI total	20.55 \pm 4.41	31.21 \pm 6.05	14.13 \pm 3.47
16:1 ω 7/16:0	0.27 \pm 0.12	0.43 \pm 0.06	0.50 \pm 0.01
15:1	0.43 \pm 0.06	0.43 \pm 0.08	0.30 \pm 0.08
16:1 ω 11		0.23 \pm 0.03	0.10 \pm 0.01
16:1 ω 9	4.81 \pm 1.88	0.91 \pm 0.19	0.29 \pm 0.05
16:1 ω 7	2.38 \pm 1.24	6.51 \pm 1.04	3.34 \pm 0.59
16:1 ω 5		2.82 \pm 0.43	0.85 \pm 0.14
18:1 ω 9	9.99 \pm 1.62	15.77 \pm 3.67	7.08 \pm 2.16
18:1 ω 7	2.81 \pm 0.98	3.79 \pm 0.46	1.96 \pm 0.47
18:1 ω 5		0.21 \pm 0.02	0.15 \pm 0.04
20:1 ω 9	0.14 \pm 0.07		
20:1 ω 7		0.54 \pm 0.23	0.06 \pm 0.02
22:1 ω 9			
AGPI total	11.18 \pm 1.31	15.14 \pm 2.68	10.57 \pm 3.72
AGPI C ₁₆	0.23 \pm 0.01	0.11 \pm 0.03	0.74 \pm 0.41
ω 3	5.26 \pm 0.98	5.37 \pm 0.56	6.65 \pm 2.63
ω 6	5.91 \pm 0.91	9.77 \pm 2.21	3.92 \pm 1.10
ω 3/ ω 6	0.90 \pm 0.23	0.55 \pm 0.14	1.66 \pm 0.22
16:3 ω 3	0.23 \pm 0.01	0.11 \pm 0.03	0.01 \pm 0.02
16:4 ω 3			0.73 \pm 0.39
18:2 ω 6	4.66 \pm 0.73	8.54 \pm 2.17	3.27 \pm 0.87
18:3 ω 6	0.37 \pm 0.10	0.23 \pm 0.06	0.15 \pm 0.04
18:3 ω 3	2.53 \pm 0.52	2.93 \pm 0.39	4.41 \pm 1.62
18:4 ω 3	0.34 \pm 0.06	0.33 \pm 0.08	0.35 \pm 0.13
20:4 ω 6	0.88 \pm 0.11	1.00 \pm 0.09	0.50 \pm 0.19
20:5 ω 3	2.16 \pm 0.40	2.00 \pm 0.23	1.15 \pm 0.47
AG autres		1.21 \pm 0.40	0.21 \pm 0.05
AG total	51.58 \pm 8.09	80.42 \pm 7.76	38.70 \pm 9.66

Tab. S4.8. Composition d'acides gras (AG) issus des lipides neutres de *Isoperla ambigua* prélevé dans le ruisseau d'Anglard (France) au début printemps, en été et automne. Les valeurs sont en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de masse sèche (moyenne \pm ET). AG *autre* représente les AG non-identifiés, AG hydroxylés, AG méthoxylés, etc. *tr* (traces) indique les valeurs non-quantifiables et en-dessous de la limite de détection.

Acides gras	<i>Isoperla ambigua</i>		
	Printemps	Été	Automne
AGS total	11.82 \pm 2.62	20.98 \pm 3.70	10.27 \pm 2.98
12:0	1.10 \pm 0.44	1.61 \pm 0.52	1.09 \pm 0.45
14:0	0.98 \pm 0.50	0.99 \pm 0.86	0.72 \pm 0.54
15:0	0.11 \pm 0.04	0.17 \pm 0.05	0.10 \pm 0.02
16:0	6.22 \pm 2.02	12.11 \pm 2.49	4.51 \pm 1.29
17:0	0.26 \pm 0.05	0.72 \pm 0.05	0.27 \pm 0.09
18:0	3.05 \pm 0.47	5.17 \pm 0.32	3.42 \pm 0.93
20:0	0.10 \pm 0.02	0.20 \pm 0.00	0.16 \pm 0.04
22:0			
AG ramifiés et cyclo total	0.36 \pm 0.05	0.58 \pm 0.15	0.39 \pm 0.15
iso 16:0		0.10 \pm 0.04	0.05 \pm 0.01
iso 17:0	0.10 \pm 0.04	0.23 \pm 0.09	0.22 \pm 0.10
cyclo 15:0	0.11 \pm 0.12		0.03 \pm 0.03
cyclo 17:0	0.15 \pm 0.07	0.25 \pm 0.06	0.10 \pm 0.03
AGMI total	13.03 \pm 3.92	20.46 \pm 4.94	8.20 \pm 1.59
16:1 ω 7/16:0	0.40 \pm 0.06	0.33 \pm 0.05	0.34 \pm 0.04
12:1 ω 7	0.51 \pm 0.07	0.92 \pm 0.12	0.52 \pm 0.05
14:1	0.12 \pm 0.03	0.38 \pm 0.28	0.09 \pm 0.03
15:1	1.07 \pm 0.77	0.79 \pm 0.17	0.49 \pm 0.18
16:1 ω 9	0.11 \pm 0.03	0.31 \pm 0.09	0.11 \pm 0.02
16:1 ω 7	2.45 \pm 0.71	3.99 \pm 0.90	1.50 \pm 0.29
16:1 ω 5		0.28 \pm 0.10	0.16 \pm 0.04
18:1 ω 9	7.75 \pm 2.77	10.94 \pm 3.86	4.09 \pm 0.97
18:1 ω 7	0.67 \pm 0.18	2.58 \pm 0.46	1.00 \pm 0.40
18:1 ω 5		0.12 \pm 0.01	0.15 \pm 0.09
20:1 ω 9	0.25 \pm 0.22	0.02 \pm 0.05	0.04 \pm 0.04
20:1 ω 7	0.10 \pm 0.05	0.14 \pm 0.05	0.05 \pm 0.01
AGPI total	13.31 \pm 2.82	19.73 \pm 4.54	6.56 \pm 0.82
AGPI C ₁₆	1.55 \pm 0.72	0.58 \pm 0.15	0.21 \pm 0.03
ω 3	8.24 \pm 2.14	13.76 \pm 3.45	3.76 \pm 0.70
ω 6	4.21 \pm 1.42	5.47 \pm 1.62	2.61 \pm 0.71
ω 3/ ω 6	2.12 \pm 1.00	2.51 \pm 0.58	1.53 \pm 0.51
16:2 ω 6	0.27 \pm 0.07		
16:2 ω 4	0.53 \pm 0.28	0.42 \pm 0.13	0.12 \pm 0.07
16:3 ω 4	0.17 \pm 0.06	0.08 \pm 0.01	0.05 \pm 0.09
16:3 ω 3	0.33 \pm 0.25	0.08 \pm 0.03	0.03 \pm 0.03
16:4 ω 3	0.10 \pm 0.10		
16:4 ω 1	0.16 \pm 0.15		0.01 \pm 0.02
18:2 ω 6	3.32 \pm 1.40	4.22 \pm 1.40	2.00 \pm 0.70
18:3 ω 6	0.14 \pm 0.05	0.13 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01
18:3 ω 3	3.20 \pm 1.30	7.56 \pm 1.97	2.02 \pm 0.24
18:4 ω 3	1.38 \pm 0.89	0.71 \pm 0.23	0.24 \pm 0.05
20:4 ω 6	0.48 \pm 0.08	1.13 \pm 0.23	0.55 \pm 0.16
20:5 ω 3	3.02 \pm 0.86	5.41 \pm 1.35	1.48 \pm 0.42
22:5 ω 3	0.06 \pm 0.04		
22:6 ω 3	0.16 \pm 0.12		
AG autres	0.08 \pm 0.13		
AG total	38.52 \pm 9.38	61.75 \pm 12.52	25.42 \pm 5.31

Tab. S4.9. Composition d'acides gras (AG) issus des lipides neutres de *Rhyacophila psp.* prélevé dans le ruisseau d'Anglard (France) au début printemps, en été et automne. Les valeurs sont en $\mu\text{g.mg}^{-1}$ de masse sèche (moyenne \pm ET). AG *autre* représente les AG non-identifiés, AG hydroxylés, AG méthoxylés, etc. *tr* (traces) indique les valeurs non-quantifiables et en-dessous de la limite de détection.

Acides gras	<i>Rhyacophila psp.</i>		
	Printemps	Été	Automne
AGS total	16.58 \pm 3.40	18.77 \pm 16.89	15.60 \pm 5.01
12:0	0.95 \pm 1.27	0.14 \pm 0.21	0.47 \pm 0.26
14:0	1.28 \pm 0.32	0.97 \pm 1.12	0.78 \pm 0.24
15:0	0.27 \pm 0.09	0.23 \pm 0.12	0.25 \pm 0.06
16:0	10.03 \pm 3.02	11.65 \pm 14.84	10.93 \pm 4.59
17:0	0.45 \pm 0.05	0.63 \pm 0.38	0.50 \pm 0.13
18:0	3.41 \pm 0.20	4.90 \pm 0.35	2.54 \pm 0.27
20:0	0.13 \pm 0.01	0.18 \pm 0.02	0.10 \pm 0.01
22:0	0.05 \pm 0.01	0.06 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00
AG ramifiés et cyclo total	1.14 \pm 0.48	0.94 \pm 0.41	1.04 \pm 0.11
iso 15:0	0.23 \pm 0.06	0.21 \pm 0.07	0.18 \pm 0.05
iso 16:0	0.09 \pm 0.02	0.09 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02
iso 17:0	0.20 \pm 0.07	0.21 \pm 0.08	0.22 \pm 0.04
ai 15:0	0.08 \pm 0.03		
ai 17:0	0.15 \pm 0.04	0.22 \pm 0.05	0.27 \pm 0.07
cyclo 17:0	0.39 \pm 0.51	0.21 \pm 0.28	0.30 \pm 0.13
AGMI total	17.74 \pm 6.39	15.45 \pm 17.64	12.95 \pm 5.06
16:1 ω 7/16:0	0.37 \pm 0.04	0.37 \pm 0.08	0.21 \pm 0.02
14:1 ω 5		0.17 \pm 0.09	0.22 \pm 0.12
15:1	0.12 \pm 0.06		
16:1 ω 9	0.29 \pm 0.08	0.42 \pm 0.24	0.36 \pm 0.18
16:1 ω 7	3.65 \pm 0.72	4.32 \pm 6.51	2.34 \pm 1.08
16:1 ω 5	0.34 \pm 0.13	0.32 \pm 0.14	0.39 \pm 0.06
18:1 ω 9	11.70 \pm 4.93	7.20 \pm 6.16	8.70 \pm 3.57
18:1 ω 7	1.30 \pm 0.42	2.87 \pm 4.47	0.81 \pm 0.22
18:1 ω 5		0.15 \pm 0.07	0.10 \pm 0.01
20:1 ω 9	0.12 \pm 0.08		0.05 \pm 0.02
20:1 ω 7	0.19 \pm 0.18		
22:1 ω 7	0.05 \pm 0.01		
AGPI total	18.61 \pm 6.74	22.40 \pm 17.37	11.26 \pm 4.86
AGPI C ₁₆	1.01 \pm 0.33	1.17 \pm 0.91	0.31 \pm 0.20
ω 3	11.18 \pm 4.63	15.39 \pm 15.83	6.16 \pm 3.07
ω 6	6.91 \pm 1.93	6.11 \pm 0.57	4.96 \pm 1.70
ω 3/ ω 6	1.58 \pm 0.25	2.52 \pm 2.05	1.19 \pm 0.24
16:2 ω 6		0.08 \pm 0.03	0.12 \pm 0.08
16:2 ω 4	0.44 \pm 0.20	0.58 \pm 0.52	0.08 \pm 0.07
16:3 ω 4	0.08 \pm 0.05	0.11 \pm 0.05	0.02 \pm 0.03
16:3 ω 3	0.17 \pm 0.05	0.10 \pm 0.08	0.01 \pm 0.01
16:4 ω 3	0.31 \pm 0.04	0.29 \pm 0.29	0.08 \pm 0.04
16:4 ω 1			0.01 \pm 0.01
18:2 ω 6	6.09 \pm 1.84	4.95 \pm 0.46	4.02 \pm 1.38
18:2 ω 4		0.20 \pm 0.48	0.02 \pm 0.02
18:3 ω 6	0.15 \pm 0.00	0.15 \pm 0.06	0.07 \pm 0.04
18:3 ω 3	6.56 \pm 2.83	8.96 \pm 10.84	3.91 \pm 2.08
18:4 ω 3	0.98 \pm 0.48	0.87 \pm 1.72	0.19 \pm 0.07
20:3 ω 3		0.09 \pm 0.15	0.02 \pm 0.02
20:4 ω 6	0.66 \pm 0.11	0.92 \pm 0.05	0.75 \pm 0.28
20:4 ω 3		0.09 \pm 0.13	0.03 \pm 0.02
20:5 ω 3	3.16 \pm 1.29	5.00 \pm 2.68	1.92 \pm 0.83
AG autres	0.20 \pm 0.34	0.13 \pm 0.24	0.10 \pm 0.07
AG total	54.07 \pm 16.70	57.56 \pm 51.53	40.84 \pm 14.78

Chapitre 5

La disponibilité en stérols dans un ruisseau forestier de moyenne montagne constitue-t-elle une contrainte nutritionnelle vis-à-vis des macroinvertébrés ?

Sommaire : Chapitre 5

5.1	Préambule	199
	Présentation de l'étude	199
	Résumé de l'étude	200
5.2	Article en préparation	201
	Introduction	201
	Matériels et méthodes.....	202
	Résultats	205
	Discussion et conclusion.....	212
	Informations supplémentaires	217

5 Chapitre 5

La disponibilité en stérols dans un ruisseau forestier de moyenne montagne constitue-t-elle une contrainte nutritionnelle vis-à-vis des macroinvertébrés ?

5.1 Préambule

Présentation de l'étude

Les recherches présentées ici se sont déroulées en parallèle de l'étude entreprise sur le ruisseau d'Anglard, lequel est présenté dans le chapitre précédent. Nous avons travaillé aux mêmes dates, du printemps à l'automne, et sur les mêmes taxons. Les résultats obtenus antérieurement nous ont permis de mettre en évidence l'importance de la production primaire autochtone, principal apport énergétique au printemps et en été et unique contributeur en longs AGPI essentiels (20:4 ω 6 et du 20:5 ω 3) pour les macroinvertébrés. L'objectif dans ce chapitre était de prendre en compte les compositions en stérols des différentes sources basales et de voir comment ils venaient interférer avec les AGPI pour évaluer la qualité nutritionnelle de ces sources, sachant que l'auxotrophie des stérols est la règle chez les arthropodes (Lafont *et al.*, 2012).

Résumé de l'étude

Les ruisseaux de tête de bassin versant se caractérisent par un fonctionnement hétérotrophe reposant sur des apports saisonniers de feuilles mortes (litières) mais également par un niveau variable d'autochtonie (production primaire). Parmi les composés essentiels disponibles au sein des diverses sources organiques présentes dans ces milieux, les stérols n'ont pratiquement pas été abordés. Or ce sont des molécules indispensables au développement des invertébrés arthropodes qui vont produire leur cholestérol à partir d'une gamme assez restreinte de stérols compatibles sur le plan stéréochimique. Dans cette étude nous avons suivi, à trois périodes différentes de l'année, le transfert de divers stérols produits par les sources organiques allochtones et autochtones d'un petit ruisseau forestier vers cinq taxons d'arthropodes benthiques appartenant à des guildes trophiques différentes. Dans ce cours d'eau, les broyeurs *Leuctra psp.*, *Gammarus pulex* ainsi que le racleur *Ecdyonurus sp.* ont tous présenté un régime alimentaire assez opportuniste quelle que soit la saison. Ces comportements à tendance omnivore également observés chez les prédateurs *Isoperla ambigua* et *Rhyacophila psp.*, étaient éventuellement liés à des contraintes nutritionnelles mais qui ne semblaient pas relever de la teneur en stérols des différentes sources basales. Les stérols dominants au sein des sources détritiques (litière de feuilles et MOBF) et des producteurs primaires (bryophytes et biofilms) étaient tous des Δ^5 -stérols (β -sitostérol, campestérol, stigmastérol, épibrassicastérol). Les niveaux très importants de cholestérol relevés chez les invertébrés ainsi que la présence de desmostérol, étaient le signe d'une intense activité de désalkylation de certains de ces Δ^5 -stérols alimentaires. D'une part, la litière de feuille a toujours montré des rapports β -sitostérol/stigmastérol élevés ce qui lui conférait un intérêt certain sur le plan nutritionnel. Toutefois d'autre part, les bryophytes et surtout les biofilms ont toujours contenu du cholestérol permettant ainsi un apport direct de ce composé aux invertébrés. Les particules détritiques (MOBF) associées ou colonisées par des microalgues semblaient constituer le meilleur compromis nutritionnel possible en raison de leur teneur en cholestérol et des rapports β -sitostérol/stigmastérol élevés.

5.2 Article en préparation

Introduction

Les ruisseaux de tête de bassin versant sont souvent caractérisés par un fort couvert végétal lié à la présence d'une ripisylve dense ou d'un environnement immédiat majoritairement forestier. Depuis une dizaine d'années, les nombreuses études menées dans ces milieux ont démontré qu'ils présentent un fonctionnement hétérotrophe (Gessner *et al.*, 1999; Graça, 2001; Dangles *et al.*, 2004), mais avec un niveau variable d'autochtonie (production primaire *in situ*), indépendant du stock de matières allochtones disponible (Graça, 2001; Finlay *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2010; Twining *et al.*, 2017). Ces matières organiques allochtones sont principalement constituées de litières de feuilles rapidement colonisées par des hyphomycètes aptes à convertir une partie du matériel réfractaire en une ressource alimentaire plus digeste destinée aux macroinvertébrés détritvres (Graça *et al.*, 1993; Hieber & Gessner, 2002). Détritvres et microorganismes participent ainsi et de manière significative au recyclage du matériel déritique (Hieber & Gessner, 2002). Parallèlement, le compartiment autotrophe, bien que réduit en termes de biomasse, est de plus en plus considéré comme une source complémentaire de composés essentiels, lui conférant une qualité nutritionnelle supérieure (Guo *et al.*, 2016). Si sur le plan stœchiométrique, les microalgues des biofilms épilithiques (principale ressource autochtone étudiée) présentent des rapports C/P et C/N faibles (Hessen *et al.*, 2002), c'est sur leurs concentrations élevées en AGPI essentiels (20:5 ω 3 et 20:4 ω 6) que repose leur importance pour le développement des macroinvertébrés (Crenier, Arce-Funck, *et al.*, 2017; Twining *et al.*, 2017; Kühmayer *et al.*, 2020). Malgré un intérêt croissant vis-à-vis du rôle de ces composés essentiels dans les ruisseaux de tête de bassin versant, la plupart de ces études ont omis de prendre en compte les autres lipides essentiels que sont les stérols. Or, les crustacés et les insectes (comme les autres arthropodes) sont incapables de synthétiser *de novo* le noyau stéroïdien, puisqu'ils sont dépourvus de squalène-synthétase (Lafont *et al.*, 2012). Ils sont donc contraints de métaboliser des stérols alimentaires pour produire le cholestérol indispensable à leur croissance et à leur reproduction (Perry *et al.*, 2019). Le cholestérol est ainsi le précurseur des hormones stéroïdiennes, en particulier des ecdystéroïdes, hormones de mue et de reproduction (Lafont *et al.*, 2012). De plus, le cholestérol et certains stérols alimentaires proches sur le plan stéréochimique sont incorporés dans les membranes cellulaires en tant que stabilisateurs des bicouches phospholipidiques et en tant que molécules signal impliquées dans la différenciation cellulaire (Behmer & David Nes, 2003; Perry *et al.*, 2019). A l'heure actuelle, dans les milieux aquatiques d'eau douce, les besoins en stérols structurels n'ont été étudiées que chez les *Daphnidae* (Martin-Creuzburg *et al.*, 2014), l'amphipode *Gammarus*

roeselii (Gergs *et al.*, 2015) et l'isopode *Proasellus meridianus* (Mondy *et al.*, 2014). Ces expériences ont permis de démontrer que les phytostérols alimentaires ne sont pas équivalents dans leur aptitude à soutenir la croissance somatique des espèces étudiées. Les phytostérols en Δ^7 (chondrillastérol, fungistérol) notamment, sont bien assimilés mais non convertis en cholestérol, alors que les phytostérols en Δ^5 (β -sitostérol, brassicastérol) le sont. Ces observations rejoignent celles faites chez les crustacés d'élevage et nombre d'insectes terrestres phytophages. Toutes montrent qu'une carence en stérols alimentaires a de graves conséquences sur le cycle de vie des arthropodes, qui peuvent être confrontés à des stérols peu compatibles avec leurs besoins physiologiques (Mykles, 2010 ; Behmer, 2017). Cette incapacité à synthétiser les stérols pourrait s'avérer particulièrement délicate pour les macroinvertébrés des ruisseaux forestiers lorsqu'ils sont confrontés à des ressources organiques diverses avec des profils de stérols différent (Gergs *et al.*, 2015). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la diversité des stérols produits par les principales sources organiques basales d'un ruisseau forestier de tête de bassin versant et à leurs transferts éventuels à un petit nombre de macroinvertébrés appartenant à des guildes trophiques différentes. En effet les litières de feuilles proposent une gamme relativement restreinte de phytostérols (Prasad & Güzl, 1989; Ren *et al.*, 2017) par rapport à la diversité de stérols potentiellement synthétisés par les microalgues présentes dans les biofilms (Volkman, 2003; Martin-Creuzburg & Merkel, 2016). Il est donc possible qu'en plus de leur composition en AGPI, les sources allochtones et autochtones se distinguent aussi par leur disponibilité en phytostérols vis-à-vis des macroinvertébrés. Nous avons donc conduit une étude sur un ruisseau forestier de moyenne montagne (Massif Central, France) à trois périodes différentes de l'année (début du printemps, été et automne). Cinq taxons de macroinvertébrés ont été sélectionnés, trois décheteteurs-broyeurs, un racleur-brouteur et un prédateur strict. L'objectif était de préciser l'existence éventuelle d'une limitation nutritionnelle en stérols liée aux principales sources alimentaires présentes dans le ruisseau.

Matériels et méthodes

L'étude a été réalisée sur un cours d'eau d'ordre 1 situé dans le Massif Central en France (45°28'44.64"E – 2°54'50.23"N ; alt : 1114 m). La station de prélèvement se situait dans une hêtraie (*Fagus sylvatica*) à environ 600 m de la source principale (plus de détails sur les caractéristiques du ruisseau sont disponibles dans Labed-Veydert *et al.* (article soumis, chapitre 3)). L'échantillonnage a été effectué à trois périodes différentes : (i) du 5 au 7 avril 2017 au début du printemps avec une canopée ouverte ; (ii) du 3 au 7 juillet 2017 en été avec une canopée fermée ; (iii) du 6 au 14 novembre 2017 en automne en présence d'un dépôt récent de litières de feuilles de hêtre.

Echantillonnage des macroinvertébrés

A chacune des périodes, cinq sortes de macroinvertébrés différents appartenant aux groupes fonctionnels suivants ont été prélevés à l'aide d'un filet Surber (maille du filet : 250 μm) : *Gammarus pulex* (FFG : broyeur), *Ecdyonorus* sp. (FFG : racleur), *Leuctra psp.* (FFG : broyeur), *Isoperla ambigua* (FFG : broyeur/prédateur) et *Rhyacophila psp.* (FFG : prédateur). Ils ont été en moins de 30 minutes transférés dans des glacières remplies d'eau du ruisseau jusqu'à notre laboratoire de terrain (UCA, Besse-en-Chandesse, France). Là, les macroinvertébrés ont été triés, identifiés et regroupés par espèces dans des bacs remplis d'eau froide. Un lot de 8 à 10 individus par espèce a été isolé et immédiatement utilisé pour l'analyse des contenus digestifs. Le reste des individus a été laissé à jeun une nuit au frais (4-5°C) pour assurer la vidange des tractus digestifs. Pour le reste, des lots homogènes de 4 à 8 individus par taxon ont été constitués en triplicats et immédiatement congelés puis conservés à -80°C pour les analyses de stérols.

Analyse des contenus digestifs des macroinvertébrés

Les tractus digestifs ont été extraits par microdissection sous loupe binoculaire, puis les contenus de trois tubes digestifs ont été dispersés dans une goutte d'eau sur une lame de microscope. Ces lames ont été observées sous différents grossissements (X20, X100, X400) à l'aide d'un microscope inversé à contraste de phase (Axiovert 200M, Zeiss, Germany). La surface approximative relative (en %) représentée par les différents items de nourriture identifiables a été estimée à partir de différents champs d'observation et ramenés à la surface totale couverte par le contenu digestif, en suivant la méthode décrite par Felten *et al.* (2008).

Echantillonnage des sources basales

Dans le ruisseau, nous avons échantillonné manuellement la litière de feuilles de hêtre et des bryophytes aquatiques (plants immergés uniquement). Au laboratoire, les feuilles mortes et les bryophytes ont été rincées à l'eau claire afin d'éliminer les débris organiques et les petits microinvertébrés. Regroupés en triplicats, les échantillons ont ensuite été stockés à -80°C dans l'attente des analyses à venir. Les biofilm épilithiques ont été prélevés par brossage et rinçage de la surface supérieure de galets immergés pris au hasard. Ils ont été photographiés afin d'estimer ultérieurement la surface brossée à l'aide d'un analyseur d'image (Image J-Fiji, version 2.0.0-rc68). Les biofilms en suspension ont ensuite été filtrés sur 250 μm . Au laboratoire, les biofilms en suspension ont été récupérés sur filtres GF/F préalablement chauffés à 450°C. Les filtrats obtenus ont été stockés à -80°C en triplicats. Les

fines particules de matériel organiques détritiques (MOBF : Matière Organique Benthique Fine) ont été récupérées au laboratoire lors du tri des lots de macroinvertébrés prélevés. Il s'agit donc de la MOBF entraînée dans les filets Surber ayant servis à la récolte des macroinvertébrés. Récupérée par tamisage cette MOBF a été concentrée sur filtres GF-C préalablement grillés à 450°C avant d'être conservées en plusieurs lots à – 80°C. La biomasse de chacune des sources basales présente dans le ruisseau a été estimée selon la méthodologie décrite dans Labed-Veydert *et al.* (article soumis, Chapitre 3).

Analyse des stérols

Tous les échantillons ont été lyophilisés et leurs lipides extraits selon une adaptation de la méthode de Folch et al (1957). L'extrait lipidique à sec a été saponifié à 70°C pendant 1h dans 0,2 mole.L-1 de KOH méthanolique. Les stérols obtenus ont été récupérés par lavages successifs à l'aide d'un mélange hexane/diéthyléther (9/1, v/v), puis séchés sous flux d'azote et remis en suspension dans 100 µl d'hexane. Les stérols ont été analysés uniquement sous leurs formes dérivées : stérols triméthylsilylés (stérol-TMS). La silylation a été effectuée en incubant 100 µl de l'extrait de stérols dans un mélange Pyridine/BSTFA, 1:1 v/v à 60°C pendant 45min). Repris dans de l'hexane, les stérol-TMS ont été analysés par CG-MS (GC Agilent 6850 – Spectromètre de masse Agilent 5975B). La CG était équipée d'une colonne HP-5MS (Agilent®, 30m x 0,25mm x 0,25 µm). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur et le four a été programmé ainsi : 1 mn à 150°C, puis montée de 15°C.min⁻¹ à 280°C suivi d'une nouvelle élévation de 2°C.min⁻¹ à 320°C. Les chromatogrammes d'ions ont été enregistrés pour une énergie d'ionisation fixée à 70 eV. Les spectres de masse des stérol-TMS ont été comparés aux spectres de masse disponibles de divers standards et aux spectres de masse des bases de données disponibles. Les stérols ont été quantifiés par comparaison avec un étalon interne 5α-cholestane (ajouté avant l'extraction des lipides) et en utilisant des courbes d'étalonnage obtenues à partir de stérols standards du commerce. En dessous de 0,1 µg.mg⁻¹, les composés n'ont pas été quantifiés (traces). Les stérols présentés dans l'étude sont répertoriés dans le tableau S5.1.

Analyses statistiques

L'ensemble des statistiques a été réalisé sous Rstudio (R Development Core Team Team, 2013). La normalité de la distribution a été évaluée au moyen des tests de Shapiro-Wilk et de Kolmogorov-Smirnov. Lorsque les données ne répondaient pas à la normalité, une transformation logarithmique de base 10 a été appliquée. L'homoscédasticité a été vérifiée à l'aide du test de Levene. Pour les comparaisons multiples, nous avons utilisé une analyse de

variance à deux facteurs (1-way Anova) suivi d'un test post-hoc de Tukey (HSD). Afin de comparer des données relatives (rapport de stérols par exemple), nous avons utilisé un test-t unilatéral de conformité. Pour l'ensemble des tests la significativité a été fixée pour $p < 0,05$.

Enfin, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur l'ensemble des concentrations en stérols des sources basales (litière, MOBF, bryophytes et biofilm épilithique) afin de mettre en évidence les différences de profils en stérol de chaque source basale.

Résultats

Régimes alimentaires des cinq taxons de macroinvertébrés

Les déchetteurs *G. pulex* et *Leuctra* sp. ont utilisé une gamme variée de nourriture, mais largement dominée par de la matière végétale fine (Tableau 5.1.). Des feuilles de mousses ont aussi été formellement identifiées au printemps ou en été chez ces deux taxons avec un peu de restes d'animaux. Au printemps, le racleur *Ecdyonurus* sp. (*F Heptageniidae*) a principalement ingéré des diatomées (Abondance : 73%), dont la part a diminué en été (Abondance : 19,3%) et en automne au profit d'une ingestion accrue de fins débris végétaux (Tableau 5.1.). Le plécoptère *I. ambigua* a montré un comportement net de prédateur en été et en automne, avec une part de nourriture d'origine animale représentant plus de 99% de l'abondance relative pour l'ensemble des tubes digestifs analysés (fréquence d'occurrence : 100%). En revanche, au printemps les tubes digestifs d'*I. ambigua* ne contenaient pratiquement pas de matière animale, mais principalement des algues (diatomées, thalles d'*Hydrurus foetidus*) et des débris végétaux (Tableau 5.1.). Les trichoptères *Rhyacophila* sp. ont toujours ingéré en priorité des proies animales, (fréquence d'occurrence : 100%), toutefois en été, des algues ont été dénombrées dans un tiers de leurs contenus digestifs (principalement des portions d'*H. foetidus*).

Tab. 5.1. Contenus digestifs des cinq taxons de macroinvertébrés étudiés au cours des trois saisons. AI% représente l'abondance relative moyenne de chaque item alimentaire, F% représente fréquence d'occurrence de l'item. Les bryophytes sont absentes en automne. ND: absence de données.

Élément des contenus stomachaux	Saisons	G. pulex			Ecdyonorus sp.			Leuctra sp.			I. ambigua			Rhyacophila psp.		
		AI (%)	F (%)	F (%)	AI (%)	F (%)	F (%)	AI (%)	F (%)	F (%)	AI (%)	F (%)	F (%)	AI (%)	F (%)	F (%)
Détritus végétal fins	Printemps	65,7	100	100	26,4	100	100	80,6	100	100	14,8	100				
	Été	70,9	100	100	80,4	100	100	ND								
Bryophytes	Automne	90,8	100	100	80,8	100	100	83,3	100	100	0,9	67				
	Printemps	11,7	100					3,8	33							
	Été	25,7	100					ND								
	Automne															
Diatomées	Printemps	4,7	100	100	73,0	100	100	8,0	100	100	37,6	100				
	Été	0,3	67	100	19,3	100	100	ND			0,4	67	1,2	33		
	Automne	1,0	100	100	13,5	100	100	1,6	100							
Hydrurus foetidus	Printemps										46,4	100				
	Été							ND					24,3	33		
Audouinella sp.	Printemps															
	Été							ND					2,8	33		
Hyphomycètes	Printemps	1,9	100	100	0,6	33					0,1					
	Été	3,0	100	100	0,4	33		ND					1,9	33		
	Automne	0,6	100	100	5,7	33		3,0	100							
Proies animales	Printemps	16,1	67		0,0			7,6	67		1,1	33	100,0	100		
	Été	0,0			0,0			ND			99,6	100	69,8	100		
	Automne	7,6	67		0,0			12,1	100		100,0	100	98,6	100		

Composition en stérol des sources basales

Sept stérols et un stanol ont pu être quantifiés de manière certaine dans les différentes sources basales échantillonnées (Figure 5.1.). Ils étaient accompagnés d'un petit nombre de stérols et de dérivés de triterpènes à l'état de traces qui n'ont pu être quantifiés. Il s'agissait de 24-Méthylènecholestérol (Δ^5 -C₂₈ stérol), d'isofucostérol ($\Delta^{5,24}$ -C₂₉ stérol) et de (22E)-5 α -ergosta-7,22-dien-3 β -ol ($\Delta^{7,22}$ -C₂₈ stérol) dans les biofilms, et de lanostérol ($\Delta^{8,24}$ -C₃₀ stérol) et de β -sitostenone (Stigmast-4-en-3-one) dans la litière de feuilles. Les sources basales se différencient davantage sur les concentrations différentes en stérols que sur la présence de stérols particuliers. Ainsi l'ACP (Figure 5.2.) distingue les litières de feuilles sur la base de leurs concentrations beaucoup plus élevées en β -sitostérol (Δ^5 -C₂₉ stérol) (de 492 \pm 97,7 à 802 \pm 80,6 pg/mg MS) et en ergostérol ($\Delta^{5,7,22}$ -C₂₈ stérol) (de 153 \pm 47,6 à 310 \pm 29,4 pg/mg MS), voir Figure 5.1. Ces teneurs étaient toujours significativement (1-way Anova ; $p < 0,05$) plus élevées que dans les autres sources, à l'exception de l'été où ce n'était pas le cas pour le β -sitostérol (valeurs non différentes de celles de la MOBF et des biofilms). L'ergostérol n'a ensuite été retrouvé que dans la MOBF (Figure 5.1.). Absent en automne, les bryophytes aquatiques se séparaient des autres sources basales (Figure 2), en fonction de leur concentration en campestérol (Δ^5 -C₂₈ stérol) six à sept fois plus élevées (140 \pm 14,2 à 237 \pm 18,6 pg/mg MS) que dans les autres sources (1-way Anova ; $p < 0,05$) (Figure 5.1.). Les teneurs en stérols de la MOBF et des biofilms étaient assez proches (Figure 5.2.) et ces deux sources basales se distinguaient des autres par de fortes concentrations en cholestérol (Δ^5 -C₂₇ stérol), représentant de 127 \pm 11,8 à 232 \pm 92,1 pg/mg MS dans la MOBF et de 163 \pm 89,8 à 230 \pm 56,1 pg/mg MS dans les biofilms (Figure 5.1.). Le cholestérol était absent des litières sauf en été où une faible valeur a été détectée (23 \pm 0,8 pg/mg MS), alors qu'il était bien présent dans les bryophytes (62 \pm 35,9 à 44 \pm 4,7 pg/mg MS). Les biofilms se caractérisaient aussi par de plus fortes teneurs en épibrassicatérol ($\Delta^{5,22}$ -C₂₈ stérol) dont les valeurs étaient significativement plus élevées (Figure 5.1.) que celles des autres sources pour l'été et l'automne (70 \pm 35,2 à 83 \pm 32,9 pg/mg MS) (1-way Anova ; $p < 0,05$). Les autres stérols détectés étaient le stigmastérol ($\Delta^{5,22}$ -C₂₉ stérol) présent partout et à chaque période et le desmostérol (Δ^5 -C₂₇ stérol) présent dans les biofilms et la MOBF uniquement en automne (Figure 5.1.). Enfin de petites quantités d'un stanol, le 5 α -cholestan-3 β -ol ont été retrouvées principalement dans les biofilms et la MOBF à chaque saison (37 \pm 10,8 pg/mg MS maximum).

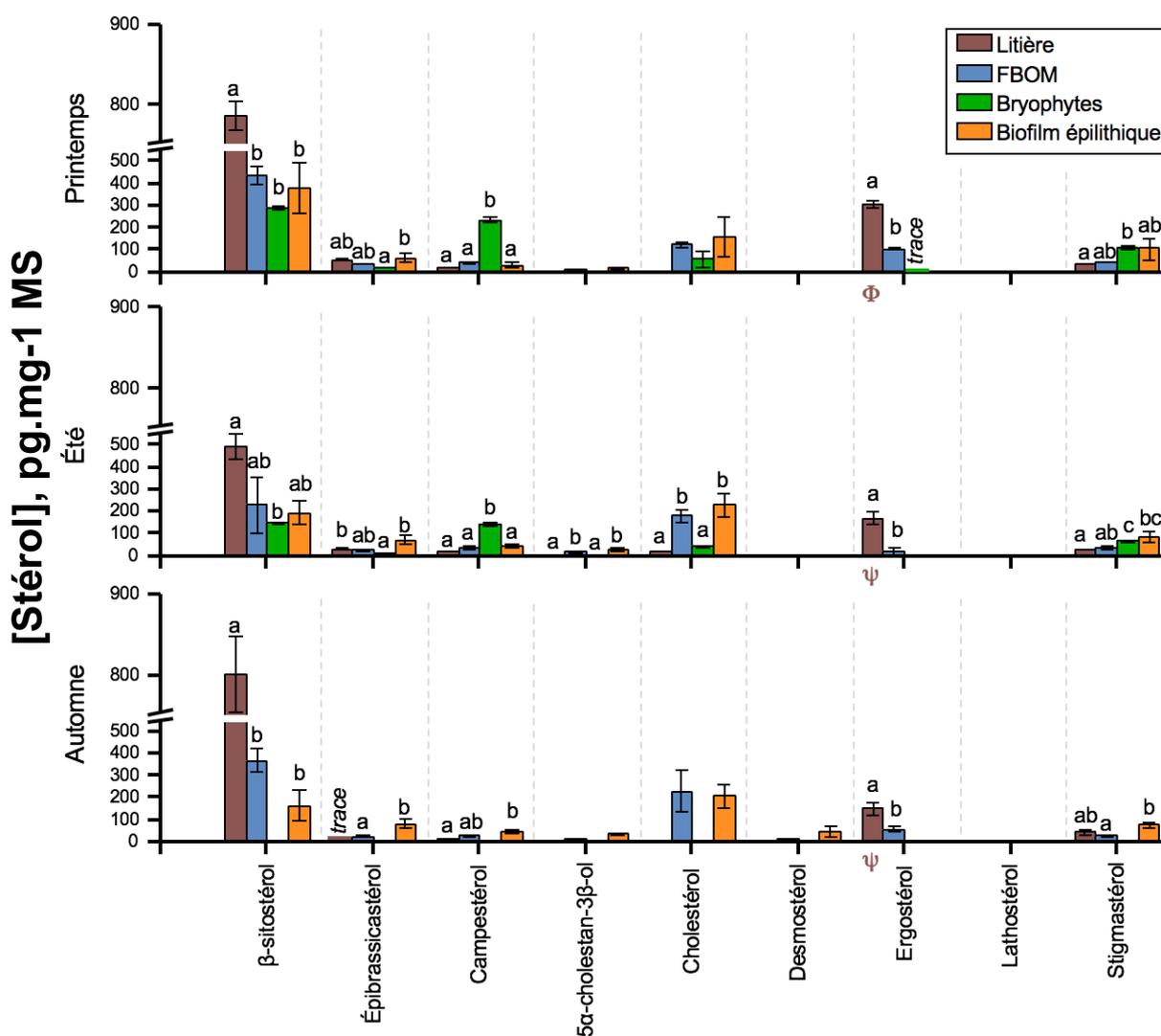


Fig. 5.1. Concentration en stérols des quatre sources basales du ruisseau d'Anglard au cours des trois périodes étudiées. Les valeurs (moyenne ± ET) sont en pg/mg de masse sèche (MS). Pour chaque stérol, une Anova-1 (post-hoc tukey HSD, $p < 0,05$) a été appliquée pour comparer les saisons et les sources basales. Les différences de concentrations significatives entre sources basales sont indiquées par des lettres différentes. Une différence significative entre saisons pour un même stérol au sein d'une même source basale est indiquée par les symboles Φ et Ψ .

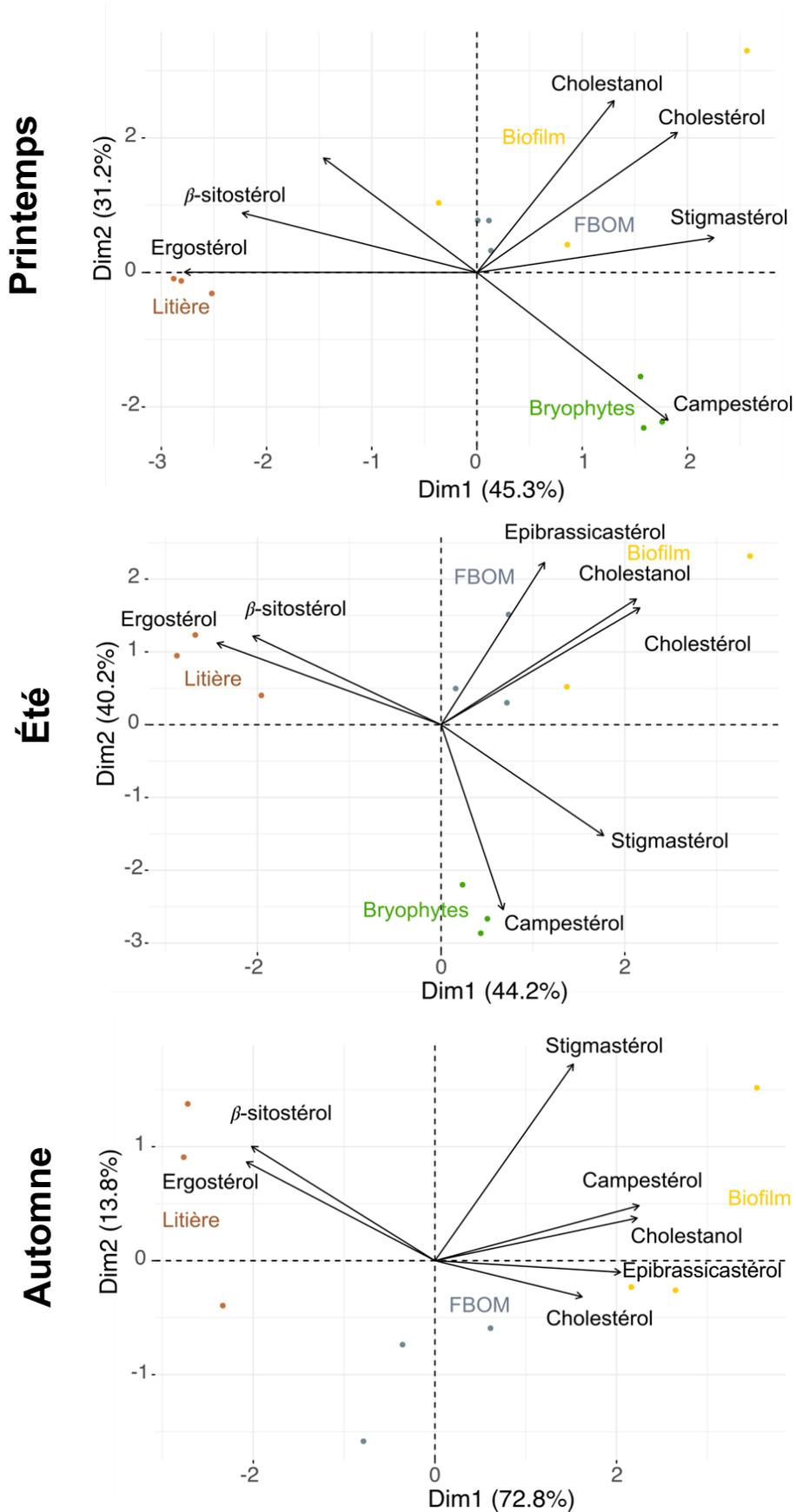


Fig. 5.2. Analyses en Composantes Principales (ACP) des compositions en stérol (pg/mg de masse sèche) des quatre sources basales du ruisseau d'Anglard au cours du printemps, de l'été et de l'automne. Les profils de stérols des sources sont discriminés par deux dimensions cumulant plus de 76,5 % de variance expliquée sur la variance totale. *Automne : bryophytes aquatiques absentes dans le milieu.*

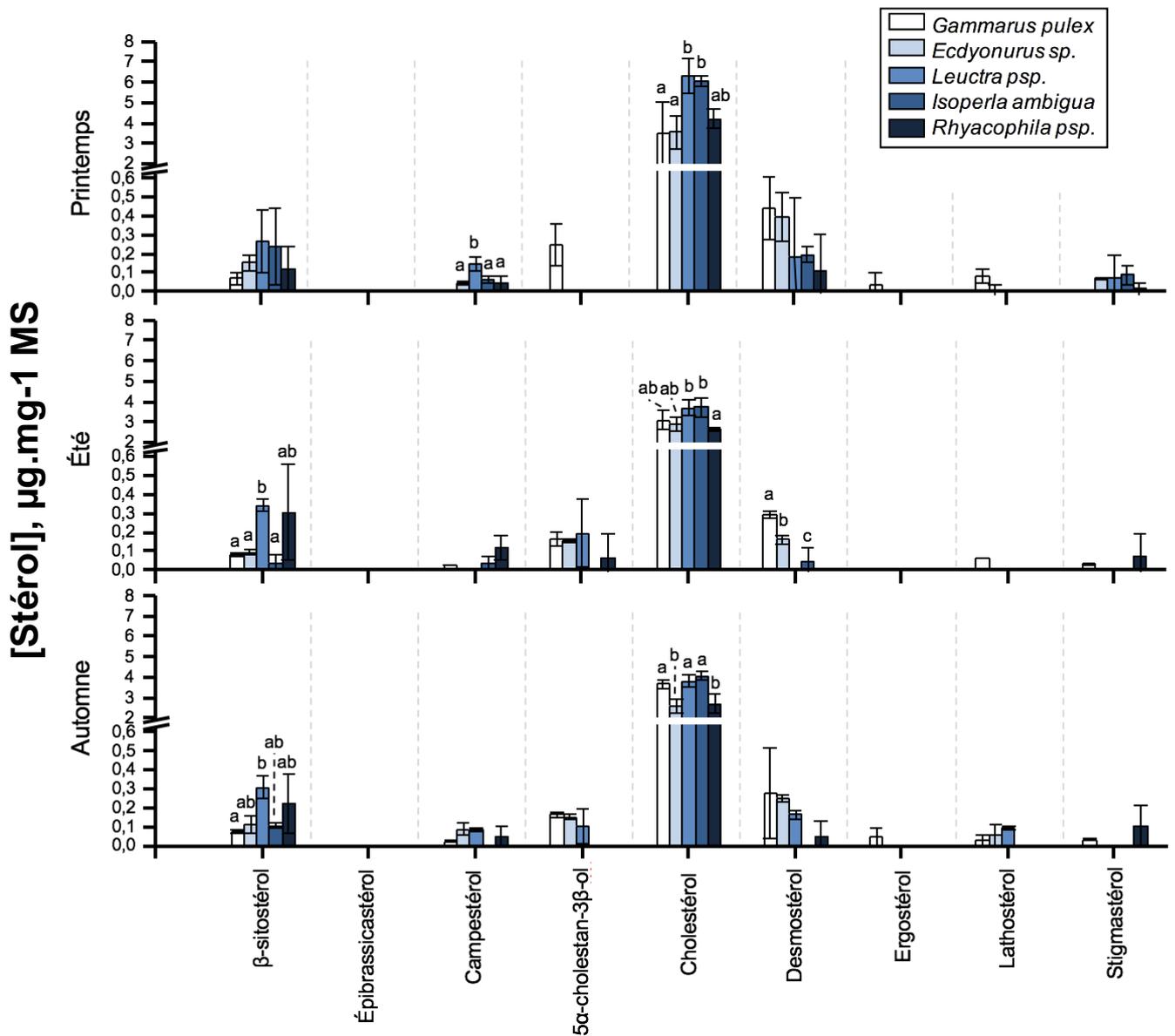


Fig. 5.3. Comparaison des concentrations en stérols entre les cinq taxons de macroinvertébrés et entre les trois périodes d'étude. Les valeurs (moyenne \pm ET) sont en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de masse sèche (MS). Pour chaque stérol, une Anova-1 (post-hoc tukey HSD, $p < 0,05$) a été appliquée pour comparer les saisons et les macroinvertébrés. Les différences de concentrations significatives entre espèces sont indiquées par des lettres différentes.

Composition en stérol des cinq taxons de macroinvertébrés

Quels que soient la saison et le taxon considérés, le cholestérol était le stérol le plus dominant chez les macroinvertébrés (Figure 5.3). En termes de proportion, il était particulièrement plus élevé chez *I. ambigua* constituant de 90,2% des stérols totaux au printemps ($6,07 \pm 0,26$ $\mu\text{g}/\text{mg MS}$) à 97,4% en automne ($4,09 \pm 0,22$ $\mu\text{g}/\text{mg MS}$). A l'opposé le cholestérol était le plus faiblement représenté chez *G. pulex*, mais constituant cependant de 84,6% des stérols totaux au printemps ($3,52 \pm 1,56$ $\mu\text{g}/\text{mg MS}$) à 87,8% à l'automne ($3,70 \pm 0,19$ $\mu\text{g}/\text{mg MS}$) (Figure 5.3). Pour les autres taxons, le cholestérol situé entre ces deux extrêmes représentait de 85 % à 93,4% des stérols totaux suivant la période. Chez *G. pulex* et *Ecdyonurus* sp. le second stérol par ordre d'importance était le desmostérol (de 5,1% à 10,7% des stérols totaux) avec des concentrations comprises entre $0,26 \pm 0,22$ et $0,45 \pm 0,11$ $\mu\text{g}/\text{mg MS}$ (Figure 5.3.). Ce stérol était absent chez *I. ambigua* en automne et chez *Leuctra* psp. et *Rhyacophila* psp. en été, alors qu'aux autres périodes il était moins abondant ($< 4\%$ et $< 0,20$ $\mu\text{g}/\text{mg MS}$) que le β -sitostérol (Figure 5.3.). Ce dernier était incontestablement le principal phytostérol détecté dans l'ensemble des taxons étudiés y compris les prédateurs, et ce, pour chaque saison. Si chez *G. pulex*, le β -sitostérol ne représentait que de 1,8 % à 2,3% des stérols totaux, soit de $0,07 \pm 0,03$ à $0,08 \pm 0,01$ $\mu\text{g}/\text{mg MS}$, c'est cependant chez *Leuctra* psp. qu'il était le plus abondant (de $0,27 \pm 0,15$ à $0,34 \pm 0,03$ $\mu\text{g}/\text{mg MS}$ soit de 3,8 % à 8,5,%) des stérols totaux (Figure 5.3.). Les concentrations dans les trois autres taxons se situaient entre ces deux extrémités. A l'exception du campestérol et du stigmastérol présent en très petites quantités (pas plus de 2,1% soit $0,15$ $\mu\text{g}/\text{mg MS}$) chez la plupart des macroinvertébrés au printemps (sauf *G. pulex*), les autres stérols étaient très minoritaires et détectés de manière irrégulière selon la période et le taxon considérés. Ainsi, si l'ergostérol n'a été observé que chez *G. pulex* (en moyenne $0,05$ $\mu\text{g}/\text{mg MS}$) au printemps et en automne, de faibles teneurs en lathostérol ($\Delta^7\text{-C}_{27}$ stérol) ont été systématiquement retrouvées chez ces amphipodes, les *Leuctra* psp. (automne) et *Ecdyonurus* sp. (printemps et automne). Enfin, aucune trace d'épibrassicastérol n'a été retrouvée dans l'ensemble des taxons.

Discussion et conclusion

Il ressort de cette étude que les cinq taxons de macroinvertébrés sélectionnés présentaient un régime alimentaire relativement opportuniste. En ce qui concerne les plécoptères du genre *Leuctra* et les amphipodes *Gammaridae* ces comportements ont été fréquemment observés dans les ruisseaux, avec un glissement d'une activité de déchiqueteur-broyeur vers la collecte de particules fines et d'algues benthiques (Felten *et al.*, 2008; Bottová *et al.*, 2013; Taylor & Andrushchenko, 2014). De même, les *Heptageniidae* du genre *Ecdyonurus* sont reconnues comme aptes à passer alternativement d'un régime alimentaire algivore vers un régime détritivore en fonction de l'abondance de fines particules détritiques dans le milieu (Wögerbauer & Kelly-Quinn, 2013). L'ingestion d'algues observée chez *Rhyacophyla* sp. et *I. ambigua* a aussi été reportée chez ces deux prédateurs (Malmqvist *et al.*, 1991; Céréghino, 2002; Quevedo-Ortiz *et al.*, 2017). La plasticité de ces régimes alimentaires et ces comportements omnivores sont liés à des ressources limitées dans les ruisseaux de tête de bassin (Dangles *et al.*, 2001) et à des contraintes nutritionnelles (Gossiaux *et al.*, 2020) y compris chez les prédateurs (Lancaster *et al.*, 2005). De nombreux auteurs considèrent que c'est la nécessité d'obtenir des nutriments essentiels, et principalement des AGPI insuffisamment représentés dans les ressources dominantes (litières et matériel détritique allochtone), qui expliquent ces régimes alimentaires à forte tendance omnivore (Crenier *et al.*, 2017; Twining *et al.*, 2017; Torres-Ruiz & Wehr, 2019). Ici, nous avons cherché à savoir si ces comportements permettaient également d'acquérir des stérols en adéquation aux besoins métaboliques essentiels des macroinvertébrés, et en fonction de la disponibilité des stérols dans les différentes sources basales. La composition en stérols des quatre sources basales échantillonnées dans ce ruisseau était conforme aux données de la littérature. Ainsi le β -sitostérol est bien reconnu comme le principal stérol rencontré dans les feuilles de hêtre avant l'abscission. Il constitue environ plus de 85% des phytostérols foliaires, le restant étant représenté par de faibles proportions de stigmastérol et de campestérol (Nguyen-Tu *et al.*, 2007). L'envahissement du parenchyme foliaire par les hyphomycètes se traduit par la détection d'ergostérol, second stérol par ordre d'importance détecté dans les litières du notre ruisseau. L'ergostérol est d'ailleurs reconnu depuis longtemps comme proxy du conditionnement microbien des litières des cours d'eau (Gessner & Schmitt, 1996). La composition en stérols des bryophytes aquatiques prélevées au printemps et en été était conforme aux résultats rapportés par Klavina (2018) sur les stérols de diverses espèces de mousses, les deux principaux stérols observés par cet auteur, étaient également le campestérol et le β -sitostérol. De plus, Klavina (2018) a également rapporté des teneurs non-négligeables de cholestérol dans les mousses. Concernant les stérols détectés dans les biofilms, ils ne différaient pas en fonction des saisons mais dépendaient de la composition

taxonomique de la communauté algale des biofilms qui dans l'ensemble a peu changé au cours de notre étude. Elle a toujours été principalement dominée par des diatomées, suivie par des cyanobactéries et un faible développement d'*H. foetidus* (cf Tableau S5.2. ou chapitre 4). Aux côtés des phytostérols ubiquistes (β -sitostérol, stigmastérol et campestérol), nous avons retrouvé des stérols plus caractéristiques des diatomées : l'épibrassicatérol (Jaramillo-Madrid *et al.*, 2019), le desmostérol (Martin-Creuzburg & Merkel, 2016; Taipale *et al.*, 2016) et surtout du cholestérol dont l'abondance peut fortement varier en fonction des familles de diatomées (Taipale *et al.*, 2016; Jaramillo-Madrid *et al.*, 2019). Ce stérol de haute importance a également été retrouvé dans la MOBF avec du desmostérol en automne. Si l'on tient compte de la présence d'ergostérol dans la MOBF et de fortes teneurs en β -sitostérol, la MOBF était donc constituée de fins débris de feuilles colonisées par des diatomées.

Les stérols dominants dans l'ensemble des sources basales sont donc tous en Δ^5 et il existe un grand nombre d'études qui ont prouvé l'efficacité des Δ^5 -stérols pour soutenir la survie et la croissance des arthropodes (D'Abramo *et al.*, 1985; Morris *et al.*, 2011; Martin-Creuzburg *et al.*, 2014; Gergs *et al.*, 2015). Le cholestérol étant néanmoins indispensable, ces Δ^5 -stérols doivent être désalkylés afin d'éliminer leurs divers substituants alkyles en C_{24} (Lafont *et al.*, 2012). Nos résultats tendent à démontrer que les espèces étudiées ici possèdent un système efficace de désalkylation. Les niveaux de cholestérol relevés étaient en effet très importants et similaires à ceux reportés par Mondy *et al.* (2014) chez *Proasellus meridianus* et chez *Gammarus roeselii* par Gergs *et al.* (2015). En outre, nous avons pu observer de petites quantités de desmostérol dans chaque taxon ($< 0,45 \mu\text{g}/\text{mg MS}$), mais pas forcément à chaque période. Or, ce stérol est le dernier intermédiaire de la chaîne de désalkylation avant d'être converti en cholestérol par la Δ^{24} stérol-réductase chez les crustacés et les insectes (Teshima *et al.*, 1975; Lafont *et al.*, 2012). A priori, il ne semble pas y avoir d'importantes différences de qualité nutritionnelle du point de vue des phytostérols entre les sources allochtones et les sources autochtones, le β -sitostérol étant en général le principal composé détecté. En effet, le β -sitostérol et le campestérol ne possèdent pas de doubles liaisons en C_{22} qui peuvent bloquer la dernière étape de la désalkylation chez certains insectes terrestres (Lafont *et al.*, 2012; Behmer, 2017). La majorité des espèces de crustacés et d'insectes terrestres étudiées sont ainsi aptes à produire du cholestérol à partir du β -sitostérol et du campestérol et à en intégrer une petite proportion comme insert membranaire (Gergs *et al.* 2015 ; Morris *et al.*, 2011 ; Behmer, 2017), ce qui est conforme à la présence de ces deux phytostérols dans l'ensemble de nos taxons, y compris les prédateurs.

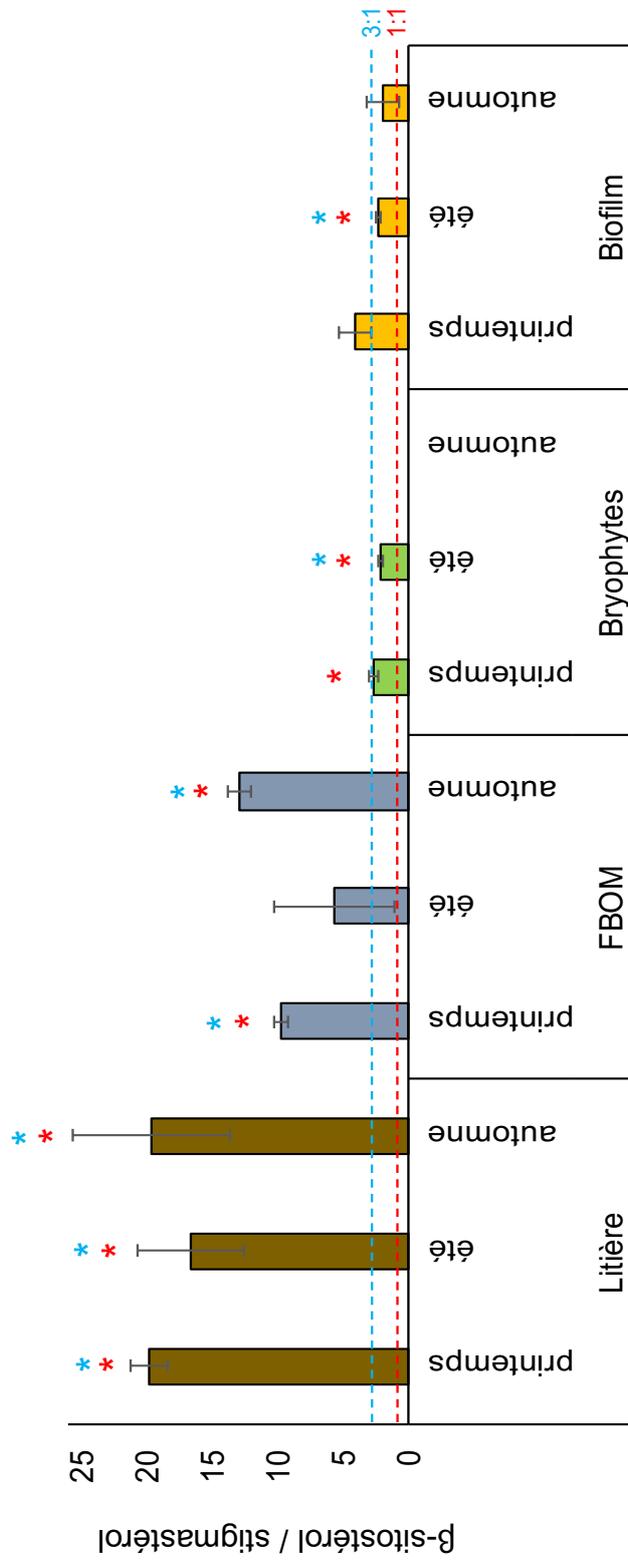


Fig. 5.4. Rapports β -sitostérol/stigmasterol calculés pour les quatre sources basales du ruisseau d'Anglard au cours des trois périodes d'études. Les valeurs représentent la moyenne \pm ET. La ligne en rouge représente la limite 1:1 du rapport et la ligne en bleu représente la limite 3:1 du rapport. Les symboles * au-dessus de chaque barre d'histogramme indiquent un rapport significativement supérieur au rapport 1:1 (en rouge) ou 3:1 (en bleu) (t.test de conformité, $p < 0,05$).

Aux périodes où les *Rhyacophila* sp. et *I. ambigua* ne consommaient que des proies, ils ne pouvaient en effet récupérer ces phytostérols qu'à partir de ces mêmes proies. Malgré le manque flagrant d'études en eau douce sur l'importance des stérols pour les arthropodes benthiques, nous avons essayé d'affiner les différences entre les sources basales en s'appuyant sur les données obtenues chez certaines espèces d'insectes terrestres et chez les crevettes *Penaeidae*. Selon Behmer (2017), la capacité qu'ont les phytophages généralistes, comme les orthoptères, à se développer et à tolérer un régime à base de phytostérols mixtes dépend aussi de la structure de la chaîne hydrocarbonée des Δ^5 -stérols disponibles (présence ou pas d'une seconde double liaison en C₂₂ et C₂₄, type de substituants en C₂₄). Les rapports entre certains Δ^5 -stérols et $\Delta^{5,22}$ -stérols semblent revêtir une réelle importance. Ainsi, Behmer & Elias (2000) ont observé que le rapport β -sitostérol/stigmastérol doit être élevé dans la nourriture des orthoptères, supérieur à 1:1 pour ne pas affecter leur survie et supérieur à 3:1 pour obtenir les meilleures performances. Ce rapport calculé pour chaque source basale de notre étude (Figure 5.4.) s'est avéré bien plus élevé dans la litière de feuilles (> 20) et dans la MOBF (> 9) que dans les bryophytes et les biofilms où, bien que supérieur à 1:1, il ne dépassait pas 3:1. Les sources allochtones de ce point de vue s'avèrent donc supérieures. De plus, les biofilms contenaient légèrement plus d'épibrassicastérol, ($\Delta^{5,22}$ -stérol absent dans nos macroinvertébrés), que de campestérol un Δ^5 -stérol assez bien représenté. Cependant si l'on tient compte de l'apport direct en cholestérol de la part des sources basales, les sources autochtones (bryophytes et surtout biofilms) sont à l'inverse supérieures à la litière. La MOBF constitue alors le meilleur compromis possible, car riche en cholestérol mais avec un rapport β -sitostérol/stigmastérol élevé. Un grand nombre de recherches expérimentales ont montré que si les taux de survie des crevettes *Penaeidae* nourries avec des aliments contenant de l'ergostérol, du stigmastérol et du β -sitostérol sont similaires à ceux des crevettes nourries avec un régime correctement formulé en cholestérol, leurs taux de croissance sont, par contre, nettement inférieurs (Teshima *et al.*, 1989 ; Mykles 2010 ; Niu *et al.*, 2012). Recevoir directement le cholestérol de la nourriture pourrait ainsi améliorer le développement des macroinvertébrés des ruisseaux. A l'évidence, de nombreux travaux spécifiques seront nécessaires pour mieux cerner ces besoins en stérols de la part des insectes aquatiques et des crustacés amphipodes. Ainsi, le lathostérol observé ici occasionnellement chez *Ecdyonurus* sp., *Leuctra* sp. mais systématiquement chez *G. pulex* résulte peut-être de la déshydrogénation du Δ^0 -stanol présent dans les sources basales, le 5 α -cholestan-3 β -ol (Svoboda *et al.*, 1975; Lafont *et al.*, 2012) sans intérêt métabolique connu. Alternativement, ce lathostérol aussi observé chez *Gammarus roeselii*, pourrait s'accumuler comme produit final de la désalkylation de stérols ayant une double liaison en Δ^7 , comme l'ergostérol un $\Delta^{5,7,22}$ -stérol (Svoboda, 1999; Gergs *et al.*, 2015).

Pour conclure, notre travail ne permet pas de mettre en évidence l'existence d'une limitation nutritionnelle en stérols de la part des différentes sources basales d'un ruisseau de tête de bassin versant. La dichotomie assez marquée et observée entre sources allochtones et production primaire du point de vue des apports en AGPI à longue chaîne (Twining *et al.*, 2017), n'apparaît pas de manière aussi marquée au niveau des profils de stérols. Notre étude démontre également que les bryophytes riches en Δ^5 -stérols (campestérol et β -sitostérol) et contenant du cholestérol sont une ressource alimentaire intéressante pour les consommateurs primaires.

Informations supplémentaires

Tab. S5.1. Nomenclature des principaux stérols détectés dans les sources basales et les cinq taxons de macroinvertébrés sélectionnés. La numérotation Δ précise la position de la première double liaison rencontrée sur le noyau cyclisé du stérol.

Nombre de carbone	Δ	Noms communs	Noms IUPAC	Formule chimique
C ₂₉	$\Delta 5$	β -sitostérol	Stigmast-5-en-3 β -ol	C ₂₉ H ₅₀ O
C ₂₉	$\Delta 5,24$	isofucostérol	(24E)-stigmasta-5,24(28)-dien-3 β -ol	C ₂₉ H ₄₈ O
C ₂₈	$\Delta 5$	campestérol	ergost-5-en-3 β -ol	C ₂₈ H ₄₈ O
C ₂₉	$\Delta 5,22$	stigmastérol	(22E)-stigmasta-5,22-dien-3 β -ol	C ₂₉ H ₄₈ O
C ₂₈	$\Delta 5,22$	épibrassicatérol	(22E)-ergosta-5,22-dien-3 β -ol	C ₂₈ H ₄₆ O
C ₂₈	$\Delta 5,7,22$	ergostérol	(22E)-ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol	C ₂₈ H ₄₄ O
C ₂₇	$\Delta 5$	cholestérol	Cholest-5-en-3 β -ol	C ₂₇ H ₄₆ O
C ₂₇	$\Delta 5,24$	desmostérol	Cholesta-5.24-dien-3 β -ol	C ₂₇ H ₄₄ O
C ₂₇	$\Delta 7$	lathostérol	5 α -cholest-7-en-3 β -ol	C ₂₇ H ₄₆ O
C ₂₇	$\Delta 0$	cholestanol	5 α -cholestan-3 β -ol	C ₂₇ H ₄₈ O

Tab. S5.2. Paramètres physico-chimiques et biomasses des sources basales du ruisseau d'Anglard (massif du Mont-Dore, France) au cours des trois dates de prélèvement. Une lettre identique indique l'absence de différence significative entre les dates (Anova-1way et test de Student pour les bryophytes et *Hydrurus foetidus*. ; $p < 0,05$).

Paramètres physico-chimiques	Printemps	Été	Automne
Température (°C)	4-5°C	7-9°C	4-5°C
pH	7,2	7,2	7,3
N total dissous (µg/L)	971-1012	1038-1079	745-786
P total dissous (µg/L)	<10	<10	33
Silice dissoute (SiO ₂) (mg/L)	27,9	28,6	33,8
Canopée	ouverte	fermée	ouverte
Biomasses			
Litière de feuilles (g/m ²)	132,29 ± 168,70 a	7,35 ± 5,40 a	178,02 ± 44,41 a
Hyphomycètes (mgC/g MS de feuille)	37,84 ± 2,38 a	20,31 ± 6,43 b	100,26 ± 4,68 c
FBOM (g/m ²)	3,85 ± 2,48 a	21,75 ± 28,74 a	47,71 ± 77,64 a
Bryophytes (g/m ²)	3,80 ± 7,08 a	0,64 ± 1,03 a	<i>absent</i>
Biofilm épilithique (g/m ²)	9,21 ± 0,61 a	1,61 ± 0,07 b	24,78 ± 1,51 c
Biomasse bactéries	0,11 ± 0,10 a	0,09 ± 0,05 a	2,93 ± 2,28 b
Biomasse cyanobactéries	2,39 ± 1,71 ab	0,064 ± 0,39 a	6,95 ± 6,64 b
Biomasse diatomées	5,21 ± 3,32 a	0,84 ± 0,46 b	14,90 ± 8,46 a
Biomasse <i>Hydrurus foetidus</i>	1,48 ± 1,59 a	0,03 ± 0,02 b	<i>absent</i>

Chapitre 6

**Synthèse des résultats et discussion générale,
Conclusions et Perspectives**

Sommaire Chapitre 6

6.1	Synthèse des résultats et discussion générale	221
	Approche expérimentale en conditions semi-naturelles	222
	Structure trophique, position trophique et régimes alimentaires des macroinvertébrés en milieu naturel à travers les saisons	223
	Contribution des sources allochtones et autochtones à la matière organique assimilée par les macroinvertébrés	226
	Qualité nutritionnelle et apport en acides gras et stérols des différentes sources basales en ruisseau forestier de tête de bassin versant	227
	Acides gras	227
	Importance des stérols.....	228
	Origine et transferts trophiques des acides gras et stérols.....	230
	Acides gras	230
	Stérols.....	231
6.2	Conclusions.....	233
6.3	Perspectives.....	234

6 Chapitre 6

6.1 Synthèse des résultats et discussion générale

Dans les régions tempérées de l'hémisphère nord, la ripisylve des petits cours d'eau de tête de bassin versant est majoritairement arborée, engendrant des apports prépondérant de carbone allochtone et limitant les apports en carbone autochtone dans le milieu (Ziegler & Lyon, 2010; Collins *et al.*, 2016; Erdozain *et al.*, 2019). Le fonctionnement du réseau trophique de ces cours d'eau est ainsi considéré comme dépendant de la matière organique allochtone selon le concept de « *River Continuum Concept* » (RCC) (Vannote *et al.*, 1980). Cependant, depuis la proposition du concept de « *Riverine Productivity Model* » (RPM) (Thorp & Delong, 1994), de nombreuses études ont mis en avant le caractère essentiel de la production primaire, et en particulier le rôle des diatomées, qui sont aptes à soutenir le développement d'une partie des consommateurs primaires en raison de leur qualité nutritionnelle élevée (Torres-Ruiz *et al.*, 2007; Descroix *et al.*, 2010; Crenier *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018; Kühmayer *et al.*, 2020). Ainsi, les diatomées sont retrouvées dans les contenus digestifs de divers macroinvertébrés et pourraient avoir des effets positifs à leur développement (Basaguren *et al.*, 2002; Füreder *et al.*, 2003; Felten *et al.*, 2008; Crenier *et al.*, 2017). Bien que les diatomées soient reconnues de meilleure qualité nutritionnelle que la litière (Thorp *et al.*, 2006), le caractère essentiel de leur consommation par les macroinvertébrés de différents groupes fonctionnels n'a pas encore été totalement démontré. De même, la part que constitue les sources autochtones dans la production secondaire des cours d'eau reposant sur un fonctionnement détritique reste encore à approfondir.

Dans ce contexte, les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit tendaient à répondre aux différentes problématiques précédemment énoncées et s'articulaient autour de trois axes principaux : (i) une étude expérimentale en conditions semi-naturelles avec des petits mésocosmes dans le but d'évaluer le caractère essentiel de la consommation de microalgues par deux macroinvertébrés à traits de vie distincts (**Chapitre 2**) ; (ii) une étude réalisée *in situ*, au début du printemps dans un ruisseau forestier de moyenne montagne et destinée à estimer les flux de matière organique et d'acides gras des sources basales aux consommateurs (**Chapitre 3**) ; (iii) un suivi saisonnier réalisé sur le même petit ruisseau forestier afin d'évaluer la disponibilité et l'utilisation des différentes sources de matière organique par une sélection de cinq macroinvertébrés représentatifs de ces écosystèmes (**Chapitre 4 et 5**). Dans ce chapitre final, nous synthétiserons et discuterons des résultats majeurs issus des travaux de ce présent manuscrit.

Approche expérimentale en conditions semi-naturelles

Nos travaux en mésocosme (canaux exposés ou non à la lumière naturelle) ont été conduits sur deux macroinvertébrés emblématiques des milieux lotiques, *Gammarus pulex* (broyeur) et *Rhitrogena semicolorata* (racleur). Nos résultats ont démontré que lorsque les microalgues phototrophes étaient disponibles, une meilleure croissance somatique a été observée chez les deux espèces. L'analyse des profils d'AG nous a permis de mettre en évidence que la croissance dépend des AGPI à longue chaîne (20:5 ω 3 ; 20:4 ω 6). Nous avons pu montrer, sans équivoque, une assimilation des diatomées par l'observation de leurs biomarqueurs AG (16:1 ω 7 ; 16:2 ω 4 ; 16:3 ω 4 ; 16:4 ω 1; 20:5 ω 3 ; Taipale *et al.*, 2013) dans les lipides neutres des deux macroinvertébrés placés en conditions de lumière. Sur ce point, nos résultats sont en accord avec l'étude de Kühmayer *et al.* (2020), laquelle rapporte une assimilation des diatomées par *Gammarus fossarum* et *Ecdyonorus dispar*, deux espèces proches de celle que nous avons étudiés. Néanmoins, contrairement à Kühmayer *et al.* (2020), nous avons proposé une litière d'aulne connue comme de meilleure qualité nutritive que la feuille de hêtre, par sa haute teneur en acides aminés et par son faible ratio C:N (Little & Altermatt, 2019). Elle est consommée plus rapidement par les broyeurs que la litière plus récalcitrante comme le hêtre (Graça *et al.*, 2001). Ainsi malgré la présence d'une litière de qualité supérieure, *R. semicolorata* obtient majoritairement son carbone du biofilm épilithique autotrophe. Cette espèce a présenté un meilleur taux de survie et d'émergence démontrant le caractère essentiel de la consommation des microalgues benthique pour les traits de vie de *R. semicolorata*. L'accès au biofilm autotrophe lors de la phase larvaire est primordial pour la survie, la croissance somatique et la phase d'émergence. À l'inverse, la survie de *G. pulex* n'a pas été affectée par la présence ou l'absence de biofilms autotrophes bien développés. Les gammares semblent couvrir leurs besoins énergiques lorsque une litière de bonne qualité est disponible (Little & Altermatt, 2019). Néanmoins, nous avons pu montrer comme dans l'étude réalisée par Crenier *et al.*, 2017) que l'ingestion de diatomées benthiques favorise la croissance somatique des amphipodes. Ces microalgues ont été en partie récupérées *via* l'ingestion de particules détritiques fines colonisées (la FPOM) et ont favorisé les performances de croissance des gammares.

Dans les deux conditions expérimentales et quel que soit l'espèce étudiée, la litière était faiblement utilisée. En absence de lumière, *R. semicolorata* et *G. pulex* ont présenté les mêmes signatures isotopiques malgré leurs groupes fonctionnels différents. Le carbone était d'origine détritique, à partir de FPOM et du biofilm hétérotrophe. Les deux espèces ont consommé plus de particules détritiques en absence de microalgues autotrophes. Ce résultat suggère l'existence d'un comportement alimentaire compensatoire, en l'absence de ressources riches en nutriments essentiels. Ce comportement déjà observé chez les larves de

lépidoptères aquatiques (Flores *et al.*, 2014) mériterait d'être plus étudié chez d'autres espèces de macroinvertébrés dulçaquicoles. En opposition à la condition lumière, les signatures isotopiques des deux macroinvertébrés étaient distinctes, indiquant des stratégies alimentaires différentes lorsque le choix alimentaire leur était possible.

L'effet positif de l'assimilation des diatomées est lié à la présence d'AG essentiels présents dans les diatomées benthiques. Ces deux espèces ont réagi comme la majorité des crustacés décapodes étudiés en aquaculture ou comme les cladocères lacustres *daphnidae* : obtenir directement le 20:5 ω 3 et le 20:4 ω 6 dans l'alimentation assure *a minima* un gain de croissance (Glencross, 2009; Xu *et al.*, 2017) mais peu également améliorer significativement la fécondité et la survie (Huang *et al.*, 2008; Ginjupalli *et al.*, 2015). Comme ce fut le cas pour la survie et l'émergence de *R. semicolorata*. Nos résultats rejoignent un nombre croissant d'études qui tendent à prouver que l'importance des producteurs primaires vis-à-vis des macroinvertébrés a été sous-estimée dans les ruisseaux de tête de bassin versant (McCutchan & Lewis, 2002; Thorp & Delong, 2002; McNeely *et al.*, 2007). En sachant que les consommateurs primaires jouent un rôle majeur dans l'affectation du flux d'énergie depuis les sources basales, soit localement vers les prédateurs, soit vers l'aval par la dérive de la matière détritique fine générée par les déchiqueteurs (Wallace & Webster, 1996) ; la nature et la qualité nutritionnelle des sources basales semblent donc jouer un rôle clef dans l'établissement des liens à la base du réseau trophique et dans la position trophique des macroinvertébrés.

Structure trophique, position trophique et régimes alimentaires des macroinvertébrés en milieu naturel à travers les saisons

La structure du réseau trophique est au cœur des théories du fonctionnement des écosystèmes lotiques (Power & Dietrich, 2002). Nos précédents résultats ont montré que la position trophique de *G. pulex* et de *R. semicolorata* était influencée par les ressources allochtone ou autochtone disponible. En milieu naturel, la comparaison des structures et des positions trophiques entre saisons et entre individus est plus complexe et nécessite une base de référence pertinente (Post, 2002; Anderson & Cabana, 2007). Dans ce contexte, nous avons sélectionné la MOBF recommandée par l'étude de Lake et ses collaborateurs (2019). De plus, ce choix présentait une cohérence dans notre cours d'eau en représentant à la fois les deux origines de matière organique du milieu, allochtone (particules de feuilles) et autochtone (diatomées associées aux fragments de litière).

Nous avons évalué la structure et les niveaux trophiques au début du printemps dans le ruisseau d'Anglard (Chapitre 3), lorsque la canopée est ouverte et les matières organiques autochtones potentiellement plus abondantes (Allan & Castillo, 2007). La communauté de macroinvertébrés étudiée était divisée en quatre niveaux trophiques dont le dernier était occupé par les prédateurs (*Rhyacophila* psp. et *Erpobdella octoculata*). Le 3^e niveau trophique suivant de peu celui des prédateurs, était occupé par *Isoperla ambigua* dont le genre est connu pour son régime mixte prédateur et algivore (Lavandier, 1982; Céréghino, 2006; Bottová *et al.*, 2013). Nos résultats des contenus stomacaux ont confirmé le caractère algivore de cette espèce par la présence de diatomées et d'*Hydrurus foetidus*. Le genre *Leuctra* (broyeur) et les deux éphémères *Baetis lutheri* et *Ecdyonurus* sp. (racleurs), constituaient le 2^e niveau trophique. Ce mélange de FFG au sein d'un même niveau trophique semble résulter de leur plasticité alimentaire (Bottová *et al.*, 2013; Wögerbauer & Kelly-Quinn, 2013). Le $\delta^{15}\text{N}$ élevé pour *Leuctra* psp. serait dû à la consommation occasionnelle de proies animales observées dans son contenu stomacal (Bottová *et al.*, 2013), et le $\delta^{15}\text{N}$ légèrement élevé des deux éphéméroptères s'expliquerait par une consommation de méiofaune comprise dans le biofilm épilithique (Majdi & Traunspurger, 2017). Le 1^e niveau a été occupé par des broyeurs : *Gammarus pulex*, *Protonemura praecox* et *Odotoceram albicorne*. La plasticité alimentaire observée chez *G. pulex* et *P. praecox*, les définit de généraliste dans le ruisseau (Dangles, 2002; Felten *et al.*, 2008; Feeley & Kelly-Quinn, 2015) et pourrait expliquer leur positionnement au plus bas niveau. Seul le contenu stomacal riche en proies animales de *O. albicorne* ne reflétait pas sa position trophique. Pourtant, cette espèce se nourrit généralement abondamment de matières végétale et animale (Décamps, 1968; Dumont & Verneaux, 1976; Dangles, 2002). Leurs positions trophiques ne dépendraient pas uniquement des ressources consommées, mais également des stades développements. En effet, Dodds et ses collaborateurs (2014) rapportent que les stades 4 et 5 pourraient assimiler sélectivement le ^{15}N et l'étude de Hoppeler *et al.* (2018) mentionne une assimilation préférentielle du glycogène aux derniers stades larvaires, laquelle pourrait entraîner une diminution du $\delta^{15}\text{N}$.

Au cours du chapitre 4, nous avons réalisé un suivi saisonnier sur le même ruisseau des structures et positions trophiques, ainsi que des contenus digestifs de cinq espèces du ruisseau d'Anglard (*G. pulex*, *Ecdyonurus* sp., *Leuctra* psp., *I. ambigua* et *Rhyacophila* psp.). Nous nous sommes focalisés sur trois saisons marquant des changements abiotiques majeurs : le début printemps (canopée ouverte), été (canopée fermée) et automne (canopée ouverte). Selon les résultats obtenus aux cours de l'expérience semi-expérimentale (Chapitre 2), nous nous attendions à une différenciation des structures trophiques aux cours des saisons. À l'évidence et contre toute attente, les données de structure trophique ont peu varié en général et concordent avec l'étude de Twining *et al.* (2017). La diminution de la luminosité due à la fermeture de la canopée en été n'a pas semblé influencer la structure trophique.

L'étude des positions trophiques, nous a permis, quant à elle, de révéler des variations aux cours des saisons. Les espèces ont conservé leur niveau trophique à travers les saisons, à l'exception de *I. ambigua*. Ce dernier a présenté un changement de niveau trophique par une évolution du régime omnivore au printemps à carnivore aux saisons suivantes. Une espèce du genre *Isoperla* a présenté une forte consommation d'algues au début du printemps lorsque les larves étaient âgées (Malmqvist et al. 1991) à l'identique de *I. ambigua* de notre étude. Bien que les autres espèces aient conservé leur niveau trophique aux cours des saisons, *Ecdyonurus* sp., *Leuctra* psp., et *Rhyacophila* psp. ont, néanmoins, présenté des faibles variations significatives de leur position trophique. La consommation de microalgues par le genre *Rhyacophila* rapporté par Céréghino (2002) a été observée en été pour *Rhyacophila* psp. L'assimilation directe des microalgues a dû modifier les signatures $\delta^{15}\text{N}$ et abaisser la position trophique pour *Rhyacophila* psp. en été, jusqu'à un changement du niveau trophique inférieur pour *I. ambigua* au printemps. Seule *G. pulex* a conservé une position trophique identique aux trois saisons, probablement due à son caractère généraliste et omnivore (Felten et al., 2008).

Les structures trophiques et les positions trophiques mises en évidence dans mes travaux de recherches (chapitre 2 à 4) remettent en question la catégorisation de la faune d'invertébrés en FFG dans les cours d'eau d'amont. La plasticité des régimes alimentaires des invertébrés est un fait qui ressort de manière transversale dans ce travail de thèse, même en conditions semi-naturelles, à l'exception peut-être de la sangsue *E. octoculata* (prédateur strict). L'omnivore et la plasticité alimentaire observées chez nos macroinvertébrés ont été rapportés dans de nombreuses études (Céréghino, 2002; Felten et al., 2008; Bottová et al., 2013; Wögerbauer & Kelly-Quinn, 2013; Quevedo-Ortiz et al., 2017). Les analyses des contenus digestifs et les positions trophiques ont révélé des comportements différents de ceux prédits par l'utilisation des FFG. D'autres travaux dédiés aux cours d'eau de tête de bassin versant ont démontré que les FFG ne sont pas des prédicteurs très fiables de l'utilisation des ressources alimentaires par les invertébrés aquatiques (Friberg & Jacobsen, 1994; Rosi-Marshall & Wallace, 2002; Rosi-Marshall et al., 2016). Nos résultats *in situ* et en conditions semi-naturelles confirmeraient que les liaisons trophiques seraient maintenues indépendamment de la FFG. Ces liaisons semblent dépendre de la qualité nutritionnelle de la matière organique disponible, notamment par leur apport en composé essentiel (Ruess & Müller-Navarra, 2019).

Contribution des sources allochtones et autochtones à la matière organique assimilée par les macroinvertébrés

Le modèle de mélange bayésien (SIAR ; Parnell & Inger, 2016) recommandé pour l'étude des réseaux trophiques en rivière (Hershey *et al.*, 2017), a déjà été utilisé dans les cours d'eau de montagne (Niedrist & Füreder, 2017) et forestiers (Hayden *et al.*, 2016). Ce modèle nous a permis d'estimer la contribution des sources basales aux macroinvertébrés étudiés au cours de mes travaux de thèse.

En milieu naturel, la prédominance de la production primaire est maintenue jusqu'en été, et ce, malgré la fermeture de la canopée. La nette contribution des biofilms autotrophes (27% à 40% en moyenne) au début printemps à l'énergie assimilée par l'ensemble des taxa, y compris le taxon des achètes (*via* les proies ingérées), n'était pas attendue. Néanmoins, de telles contributions ont été observées soit expérimentalement (Kühmayer *et al.*, 2020), soit en cours d'eau par Torres-Ruiz *et al.* (2007), Twining *et al.* (2017) et Guo *et al.* (2018). Les bryophytes, lorsqu'ils étaient présents, ont contribué à la matière organique assimilée (printemps et été). Ces résultats confirment les travaux de Torres-Ruiz *et al.* 2007, lesquels ont permis de souligner que les bryophytes aquatiques peuvent être une ressource alimentaire non négligeable dans les cours d'eau à faible productivité. La MOBF a été la matière détritique la plus contributive à la matière organique des macroinvertébrés quelle que soit la saison. Les proportions des différentes sources de matière organique assimilées par les prédateurs étaient proches de celles assimilées par les consommateurs primaires. Il s'agit d'un apport indirect *via* d'une part, l'ingestion occasionnelle de microalgues, et d'autre part, l'ingestion de proies telles que *P. praecox* et *B. lutheri*. En effet, les Nemouridae et les Baetidae sont sensibles à la prédation dans les ruisseaux de montagne (Khamis *et al.*, 2015) et ils sont fréquemment observés dans l'intestin des genres *Rhyacophila* et *Isoperla* (Berthélemy & Lahoud, 1981; Céréghino, 2002; Dangles, 2002).

En commun à l'ensemble de mes études (naturelle et semi-expérimentale) et en se référant aux consommateurs primaires étudiés, il apparaît clair que la matière allochtone sous forme de litière de feuille n'est pas utilisée en priorité, et ce, quelles que soient les litières étudiées (aulne et hêtre). À l'inverse, nous avons observé une contribution élevée des ressources autochtones aux macroinvertébrés, indépendamment de leur FFG. Enfin, la matière organique fine (MOBF et MOPF) a été la matière détritique la plus contributive à l'énergie assimilée par tous les macroinvertébrés étudiés. Néanmoins, la contribution de la matière organique fine dans l'étude *in situ* et l'étude semi-expérimentale ont montré des résultats différents pour *G. pulex*. En effet, lorsqu'elle était issue de la décomposition de litière d'aulne, la contribution a été majeure à l'inverse de celle issue de la décomposition de litière de hêtre. La comparaison des deux types de litières utilisées dans mes études (chapitre 2 à

4) indiquerait que la meilleure qualité nutritive de la feuille d'aulne pourrait participer à une meilleure assimilation de la matière détritique fine par les broyeurs du genre *Gammarus* (Little & Altermatt, 2019). Ces résultats soulignent qu'il faut considérer la part récalcitrante de la feuille de hêtre pouvant expliquer sa faible assimilation par l'ensemble des macroinvertébrés (Sanpera-Calbet *et al.*, 2009; Trap *et al.*, 2013; Little & Altermatt, 2019).

Qualité nutritionnelle et apport en acides gras et stérols des différentes sources basales en ruisseau forestier de tête de bassin versant

Acides gras

En dehors de l'aspect récalcitrant une des principales limites de la litière de hêtre analysée aux cours des trois périodes réside dans l'absence de long AGPI, 20:4 ω 6 et 20:5 ω 3. La hêtraie environnante a entraîné un apport prépondérant de matière organique détritique dépourvue de ces AGPI à longue chaîne dans le ruisseau ce qui semble constituer une contrainte nutritionnelle pour certains consommateurs primaires. À l'inverse, la MOFB contenait du 20:5 ω 3, du 20:4 ω 6 et des AG marqueurs de diatomées (16:1 ω 7 ; 16:2 ω 4 ; 16:3 ω 4 ; Taipale *et al.* 2013) au cours des trois saisons, en plus d'AGS à longue chaîne (AGS C21-18) typique de la litière de feuille (Mills *et al.*, 2003; Torres-Ruiz *et al.*, 2007). Comme pour la MOFB exposée à la lumière au cours de l'expérience en mésocosme, la MOFB est composée à la fois de matière organique allochtone et autochtone. L'enrichissement par les diatomées de la MOFB compenserait la faible valeur nutritive de la matière détritique fine comme cela a été démontré en milieu contrôlé par l'étude de Crenier *et al.* (2017) et dans notre étude semi-expérimentale.

Dans le cas des sources autochtones, ces dernières ont toutes présenté des AGPI à longue chaîne (20:4 ω 6 et 20:5 ω 3) en plus des AGPI à courte chaîne (18:2 ω 6 ; 18:3 ω 3), attestant leurs bonnes qualités nutritionnelles. Comme soulignés par Torres-Ruiz & Wehr (2019), les bryophytes ont principalement présenté des AGPI de la série ω 6, en particulier du 20:4 ω 6. Nous avons observé l'ingestion et l'utilisation des bryophytes par les macroinvertébrés. Les bryophytes de notre ruisseau semblent donc assimilables et participeraient même au fonctionnement du réseau trophique (McWilliam-Hughes *et al.*, 2009; Torres-Ruiz & Wehr, 2019). Les biofilms épilithiques ont présenté les plus fortes proportions en 20:5 ω 3 sur les trois saisons, en particuliers au printemps comme pour l'étude de Torres-Ruiz *et al.* (2007). Le 20:5 ω 3 provient des diatomées abondantes au début du printemps (Allan & Castillo, 2007), mais également d'*Hydrurus foetidus*. Cette microalgue pluricellulaire est riche en EPA et contribue à la bonne qualité nutritionnelle du biofilm épilithique à cette période de l'année (Klaveness 2017). Elle serait une source d'EPA non négligeable aux espèces vernaies (Klaveness 2017).

En général, nous n'avons pu déceler une évolution saisonnière marquée de la composition en AG des ressources comme pour l'étude de Twining *et al.*, 2017.

Importance des stérols

Peu de travaux se sont intéressés à l'origine des stérols assimilés par les macroinvertébrés d'eau douce (Gergs *et al.*, 2015). Pourtant, une carence en stérols peut avoir des effets délétères sur le développement des arthropodes (Gergs *et al.*, 2014). Nos résultats des chapitres 2 et 5 soulignent le caractère ubiquiste des phytostérols ainsi que l'absence de variations saisonnières de leurs concentrations dans les différentes sources basales. Néanmoins chaque ressource était caractérisée par un ou plusieurs stérols majeurs. Brièvement :

- Le β -sitostérol était très abondant dans les litières de feuilles (aulne et hêtre), constituant plus de 85% des phytostérols foliaires (Nguyen-Tu *et al.*, 2007).

- L'ergostérol n'a été retrouvé que dans la matière détritique des matières organiques autochtones. Il provient des hyphomycètes colonisant la litière de feuille en ergostérol et AGPI à courte chaîne (Gessner *et al.*, 1993; Funck *et al.*, 2015).

- Les bryophytes analysées ont présenté du campestérol et du β -sitostérol comme stérol majeurs. Ces résultats sont conformes aux observations de Klavina (2018) concernant les lipides des bryophytes aquatiques.

- Dans le cas du biofilm épilithique, les stérols semblent dépendre de l'assemblage de microalgues, lequel était constitué majoritairement de diatomée, suivie de cyanobactéries et d'une faible proportion d'*Hydrurus foetidus*.

Pour *H. foetidus*, aucune étude ne rapporte sa composition en stérol, mais le groupe des chrysophytes d'eau douce semble être dominé par du stigmastérol et du 24-ethylcholestérol (Cranwell *et al.*, 1988). La biosynthèse *de novo* des stérols chez la cyanobactérie n'a pas été encore prouvée (Volkman, 2016). Il est donc admis que les cyanobactéries ne possèdent aucune valeur nutritive en stérols (Bec *et al.*, 2003a). Nous avons surtout retrouvé des stérols caractéristiques des diatomées, l'épibrassicastérol (Jaramillo-Madrid *et al.*, 2019), le desmostérol (Martin-Creuzburg & Merkel, 2016; Taipale *et al.*, 2016) et surtout du cholestérol dont l'abondance peut varier en fonction des familles de diatomées (Taipale *et al.*, 2016; Jaramillo-Madrid *et al.*, 2019). Les biofilms épilithique étaient dépourvus d'ergostérol, ce qui détermine l'absence de microalgues ayant la capacité de synthétisé ce stérol (Martin-Creuzburg & Merkel, 2016) dans les cours d'eau de nos études.

Les stérols dominants dans l'ensemble des sources basales étudiées dans cette thèse sont tous des stérols Δ^5 . De nombreuses études ont prouvé l'efficacité des Δ^5 -stérols pour soutenir la survie et la croissance des arthropodes (D'Abramo *et al.*, 1985; Morris *et al.*, 2011; Martin-Creuzburg *et al.*, 2014; Gergs *et al.*, 2015). Nos travaux sur les stérols (Chapitres 2 et 5) ne permettent pas de mettre en évidence une limite nutritionnelle liée à la présence de ces composés à la base du réseau trophique des ruisseau de tête de bassin versant.

À l'inverse des AG, les stérols ne permettent pas de discriminer totalement l'importance de la matière organique allochtone par rapport à l'autochtone. Cependant, Behmer (2017) dans un article de synthèse insiste fortement sur la tolérance limitée observée chez de nombreux taxons d'insectes terrestres vis à vis des mélanges de stérol présents dans leur nourriture. De notre côté, nous avons mis en évidence une différence assez marquée entre la matière organique allochtone et autochtone concernant leur rapport β -sitostérol/Stigmastérol, lequel peut être délétère chez les espèces terrestres (orthoptères) lorsqu'il tend vers un rapport de 1:1 (Behmer 2017). Comme ces observations relèvent du niveau de l'ordre ou de la famille, il est difficile de savoir si on peut les étendre aux macroinvertébrés étudiés ici. À l'évidence, les effets limitants des mélanges de stérols sur le développement des consommateurs invertébrés ne sont pas suffisamment étudiés et n'ont pas été encore prouvés en milieu lotique.

Au cours de nos travaux les biofilms épilithiques et la MOBF ont présenté des teneurs en cholestérol non négligeables, quel que soit la saison étudiée (chapitre 5). Le cholestérol augmente la qualité nutritionnelle de ces sources en limitant le coût énergétique nécessaire à sa synthèse. Son origine peut être double chez ces deux types de ressources : d'une part, ce cholestérol peut être issu de certaines microalgues (Martin-Creuzburg & Merkel, 2016) ; d'autre part, il pourrait être issu de la méiofaune liée au biofilm. Dans les écosystèmes lotiques, l'assemblage méiofaunique est dominé par des nématodes et des rotifères (Majdi *et al.*, 2012a). Cet assemblage pourrait être consommé accessoirement en même temps que le biofilm ou la MOBF par les macroinvertébrés. Ainsi, la méiofaune pourrait contribuer directement à l'approvisionnement du cholestérol des macroinvertébrés. En outre, il a été démontré que les nématodes incorporent très rapidement le carbone algal (Majdi *et al.*, 2012b; Majdi *et al.*, 2012c) et participent aux voies énergétiques du réseau trophique (Majdi & Traunspurger, 2017). Un phénomène analogue au « *trophic-upgrading* » (Bec *et al.*, 2003b) pourrait alors exister entre les microalgues, la méiofaune et les macroinvertébrés, concernant la mise à disposition de petites quantités de cholestérol produit par des rotifères et des nématodes. Cette hypothèse reste toutefois encore à démontrer.

Origine et transferts trophiques des acides gras et stérols

Les nutriments essentiels présents à la base du réseau trophique sont des éléments clefs qui participent au maintien des liens trophiques (Ruess & Müller-Navarra, 2019). Leurs études sont particulièrement intéressantes afin de décrypter leurs origines après assimilation par les consommateurs, permettant ainsi de mieux appréhender de façon holistique le fonctionnement trophique (Majdi *et al.*, 2018). A cet effet, nous avons employé une approche analytique transdisciplinaire par l'AICS et de la géométrie nutritionnelle utilisés dans les milieux aquatiques (Bec *et al.*, 2011; Koussoroplis *et al.*, 2011).

Acides gras

L'AICS s'est avéré un outil performant au cours de notre travail de thèse. Ainsi, nous avons pu clairement démontrer au cours du chapitre 2 que les AG issus des LN et LP, mais également en particulier, le 20:5 ω 3, le 20:4 ω 6 et les AGPI C₁₆ provenaient des microalgues chez *R. semicolorata* lorsque les biofilms autotrophes étaient disponibles. L'AICS nous a aussi offert la possibilité de mieux connaître l'origine des AG chez *G. pulex* avec des composés tels que le 16:4 ω 1 attestant une assimilation de diatomées et une éventuelle double origine du 20:5 ω 3 et du 20:4 ω 6. Une partie provenait de la FPOM et une autre de la bioconversion du 18:2 ω 6 et du 18:3 ω 3. Nos travaux confirment l'assimilation préférentielle du carbone algal et du 20:5 ω 3 chez deux espèces proches des nôtres, observée par Kühmayer et ses collaborateurs (2020) par une méthode d'enrichissement en ¹³C.

De plus, l'AICS nous a permis de mettre en avant l'omnivorie observée chez le genre *Gammarus* (Felten *et al.*, 2008). Une forte variabilité intermoléculaire indiquerait une origine diversifiée du composé spécifique avec des signature isotopique distincte (Koussoroplis *et al.*, 2010; Bec *et al.*, 2011; Masclaux *et al.*, 2013). En présence de lumière, *G. pulex* a présenté une grande variabilité intermoléculaire au niveau des signatures $\delta^{13}\text{C}_{\text{AG}}$ dans ses lipides neutres, $\sim 8\text{‰}$ contre $\sim 3\text{‰}$ chez *R. semicolorata*. Ce résultat est en accord avec notre analyse HCPC du chapitre 2, où le $\delta^{13}\text{C}_{\text{AG}}$ des lipides neutres et polaires de *G. pulex* n'ont pas été rattaché à une ressource contrairement à *R. semicolorata*. Nos analyses ACIS confirment l'assimilation des AG de diverses ressources alimentaires ingérées par *G. pulex* que nous avons observé dans leurs contenus digestifs.

Au cours du chapitre 3, le modèle d'analyse que nous avons conçu et qui repose sur l'AICS et le modèle SIAR, nous a permis de préciser l'origine des principaux AG assimilés par chaque taxon de macroinvertébrés étudié. Les AG majeurs 16:0, 18:1 ω 9, 18:2 ω 6 et 18:3 ω 3 ont été assimilés et intégrés dans les lipides neutres et les lipides polaires des consommateurs conformément à la contribution des différentes sources basales à leur régime alimentaire.

Ainsi, il est apparu que l'ensemble des sources basales contribue aux réserves lipidiques des macroinvertébrés, mais avec des proportions de contributions différentes soulignant un apport prépondérant des biofilms, puis des bryophytes, de la FPOM et en dernier de la litière. Seuls les racleurs (*Ecdyonorus* sp. et *B. lutheri*) assimilaient préférentiellement les AG du biofilm épilithique avant toute autre ressource.

Bien que l'AICS soit une méthode analytique performante pour retracer l'origine des AG assimilés dans le milieu d'eau douce, (Bec *et al.*, 2011; Gladyshev *et al.*, 2012, 2014; Twining *et al.*, 2020), elle possède des limites analytiques mais aussi des limites de coût. D'autres méthodes analytiques permettent également d'évaluer l'origine des composés spécifiques, telles que la géométrie nutritionnelle (Raubenheimer, 2011) basée sur le suivi dans un espace géométrique des rapports ω_3/ω_6 et $20:5\omega_3/20:4\omega_6$ (Koussoroplis *et al.*, 2011). Ces outils ont été utilisés à partir des compositions en lipides neutres de cinq macroinvertébrés analysés à trois périodes sur le ruisseau d'Anglard (chapitre 4). Toute au long de la période de suivi, *Ecdyonorus* sp. a obtenu principalement ses AG du biofilm et notamment pour ses APGI essentiels (ω_3 , ω_6 , $20:5\omega_3$ et $20:4\omega_6$). Ces résultats sont en accord avec ceux issus de l'AICS pour cet éphémère. Pour les deux broyeurs (*G. pulex* et *Leuctra* psp.), les APGI provenaient des particules détritiques fines (la MOBF) mais, les $20:5\omega_3$ et $20:4\omega_6$ provenaient de la MOBF et/ou des biofilms au cours des trois saisons. Ceci est en accord avec les résultats obtenus chez *G. pulex* au cours de l'expérience en mésocosme. Les bryophytes semblent avoir peu contribué à partir de l'été aux apports en $20:5\omega_3$ et $20:4\omega_6$. La proportion de contribution des bryophytes aux consommateurs estimée par le modèle de mélange SIAR a pu être surestimée en été. Concernant les prédateurs, *Rhyacophila* psp. et *Isoperla ambigua* ont présenté deux stratégies alimentaires différentes, lesquelles se reflétaient à la fois dans leur position trophique et dans leur assimilation d'AGPI. Lorsque leur position trophique était élevée, ils obtenaient les AGPI essentiels des proies avec une position entre le racleur et les broyeurs. Enfin, lorsque leur position trophique était basse et ils présentaient un régime omnivore (au printemps pour *I. ambigua* et en été pour les *Rhyacophila* psp.), les AGPI essentiels provenaient du biofilm. Nous mettons en avant que le comportement opportuniste du genre *Isoperla* et *Rhyacophila* (Malmqvist *et al.*, 1991; Céréghino, 2002) serait motivé par l'acquisition d'AG essentiels.

Stérols

Les résultats obtenus dans les chapitres 2 et 4 ont mis en évidence l'ubiquité des phytostérols alimentaires présents dans les sources basales, supprimant ainsi l'avantage de l'analyse simplifiée du transfert des stérols dans le réseau trophique (Taipale *et al.*, 2016 ; Martin-Creuzburg & Merkel, 2016). Seule l'utilisation de l'AICS permet de lever les verrous

concernant l'origine des stérols assimilés. Notre étude AICS portant sur les stérols a été réalisée uniquement sur *R. semicolorata* et *G. pulex* lors de l'expérience semi-naturelle. Comme pour les AG, la signature du $\delta^{13}\text{C}$ des stérols des biofilms étaient suffisamment éloignés de celle de la matière détritique pour compenser les incertitudes liées aux fractionnements trophiques (Bec *et al.* 2011). L'HCPC a permis de mettre en évidence, qu'en présence de biofilm autotrophe, les stérols de *R. semicolorata* provenaient du biofilm épilithique. Bien que les stérols n'étaient pas limitants dans chacune des sources basales, *R. semicolorata* obtenait à la fois ses stérols et ses AG du biofilm. Les stérols de *G. pulex*, quant à eux, étaient issus de la FPOM indiquant une origine moins diversifiée que ses AG. En effet, sa variabilité intermoléculaire au niveau de ses signatures $\delta^{13}\text{C}_{\text{stérol}}$ était plus faible que celles de ses signatures $\delta^{13}\text{C}_{\text{AG}}$ ($\sim 5\text{‰}$ contre $\sim 8\text{‰}$). L'étude de Gergs *et al.* (2015) souligne l'avantage de l'AICS a révéler les mécanismes physiologiques lié à la voie de synthèse des stérols alimentaires en cholestérol. Nos résultats montrent donc que *G. pulex* et *R. semicolorata* possèdent le bagage enzymatique adéquate à la bioconversion des stérols présents dans la FPOM et les biofilms autotrophes, respectivement.

6.2 Conclusions

À l'issue de ce travail, il apparaît clairement que la production primaire autotrophe a une importance primordiale dans les ruisseaux de tête de bassin versant. Dans la mesure où les diatomées peuvent représenter une part prépondérante des producteurs primaires en tête de bassin versant, les AGPI essentiels (20:5 ω 3 et 20:4 ω 6) sont majoritairement disponibles dans la ressource autochtone. Nous avons pu mettre en évidence que ces AGPI essentiels sont fortement impliqués dans la survie et le développement de deux espèces de macroinvertébrés à FFG distincte. En outre, nous avons également observé que les AGPI essentiels issus des diatomées benthiques bénéficient aux différents groupes fonctionnels de macroinvertébrés étudiés en milieu naturel, et ce, quelle que soit la période de l'année. Nous avons pu souligner que les stérols des sources ne constitueraient pas une limite au développement du consommateur. De plus, les stérols ne distinguaient pas les ressources autochtone et allochtone contrairement au APGI essentiels. Indépendamment des spécialisations trophiques théoriques des invertébrés, les microalgues sont récupérées au niveau des biofilms, mais également au niveau des particules détritiques qu'elles colonisent plus ou moins fortement. Enfin, quel que soit le développement de la couverture végétale (printemps et été), la production primaire constituait le principal apport énergétique.

A l'encontre du RCC dans les cours d'eau de tête de bassin versant, les ressources autochtones participent de manière significative au fonctionnement du réseau trophique, malgré la faible proportion de carbone qu'elle représente face à l'abondance du carbone déritique d'origine allochtone. Mes travaux tendent à indiquer que même les tops-prédateurs invertébrés bénéficient de la qualité nutritionnelle des microalgues du biofilm *via* l'ingestion des proies. La plasticité des régimes alimentaires observé chez nos macroinvertébrés démontre une contribution directe des microalgues à différents niveaux trophiques. Elle permettrait de faire face aux différentes contraintes nutritionnelles susceptibles d'être rencontrées au cours de l'année (diminution des réserves de litières, ombrage limitant la production primaire). Mes travaux de thèse vont dans le sens du concept de RPM proposé par Thorp & Delong en 1994. Cependant, le caractère opportuniste des macroinvertébrés observé dans mes études, la totalité du fonctionnement trophique des petits cours d'eaux forestiers de tête de bassin versant ne dépend pas uniquement des sources autochtones. Nos résultats reposant sur l'AICS et les analyses isotopiques (Modèle SIAR) démontrent que l'ensemble des sources contribuent au flux de matière organique. Néanmoins, nos macroinvertébrés étudiés restent dépendant des microalgues autochtones pour leur besoin en AG essentiels.

6.3 Perspectives

Ces travaux de thèse ont contribué à améliorer la compréhension du fonctionnement globale du réseaux trophiques des cours d'eau forestier de tête de bassin, en couplant des approches *in situ* et semi-expérimentale avec des analyses allant de l'échelle moléculaire (composés lipidiques) jusqu'à des niveaux d'intégrations biologiques élevés (survie/croissance). Nos résultats soulèvent d'intéressantes questions ouvrant de nombreuses perspectives à différentes échelles du vivant, lesquelles sont énumérées ci-dessous.

1) Au cours de nos différents travaux, nous avons été surpris par l'utilisation des bryophytes par les consommateurs primaires du ruisseau d'Anglard et surtout leur assimilation. Si nos observations sont identiques à celles rapportées par McWilliam-Hughes *et al.* (2009) et Torres-Ruiz & Wehr, (2019), il n'en demeure pas moins que certaines espèces de mousses ont été signalées comme étant peu digestes (Haines & Renwick, 2009). Il semble donc important de développer des recherches sur les principales espèces de mousses et d'hépatiques aquatiques afin de mieux cerner leur qualité nutritionnelle ainsi que leur teneur en composés répulsifs. Dans un second temps, il serait donc important d'étudier l'assimilation de ces bryophytes et d'évaluer l'effet qu'elles pourraient avoir sur les traits de vie de plusieurs taxons d'invertébrés représentatifs des ruisseaux de tête de bassin versant.

2) Dans le même context, nous avons pu observer la consommation d'algues à thalle ramifié par certains invertébrés (l'algue *Hydrurus foetidus* et accessoirement *Audouinella sp.*). Ces algues macroscopiques sont potentiellement riches en longs AGPI (Torres-Ruiz *et al.*, 2007 ; Klaveness, 2017). Il conviendrait donc de mieux connaitre leur richesse en composés essentiels (AGPI à longue chaîne, stérol, ratio C:N), qui sont déterminants dans l'appréciation de leur qualité nutritionnelle. En effet des espèces comme *Hydrurus foetidus* peuvent avoir un développement très important en fin d'hivers/début de printemps puis régresser par la suite tandis que les rhodophytes sont aptes à se développer à l'ombre (Laplace-Treyture *et al.*, 2014). De plus, toutes les ressources basales de ces milieux sont susceptibles d'héberger une méiofaune abondante qui peut entrer dans le régime alimentaire des macroinvertébrés (Majdi & Traunspurger, 2017). Il serait intéressant de vérifier si un phénomène de « *trophic-upgrading* » se déroule lors de l'ingestion d'organismes méiofauniques, à savoir la production de longs AGPI ou de cholestérol par ces micro-invertébrés qui les rendraient alors disponibles pour les macroinvertébrés (Bec *et al.*, 2003b).

3) Dans la continuité des ressources alimentaires, la MOF a fait l'objet de nettement moins de recherche que les autres sources organiques clefs des cours d'eau (Bundschuh & McKie, 2016). Elle est habituellement considérée comme riche en carbone terrestre réfractaire (restes foliaires coriaces) et seule la colonisation des particules par les microorganismes

(mycètes et bactéries) améliorerait sa qualité nutritionnelle pour les collecteurs-filtreurs (Wotton, 2007). Cependant, nos résultats en mésocosme sont concordants avec ceux de Carvalho & Graça, 2007 et de Crenier *et al.* 2017, lesquels ont montré expérimentalement que les microalgues liées à la matière détritique favorisent la croissance d'un trichoptère (*Sericostoma vittatum*) et d'un amphipode (*Gammarus fossarum*). En milieu naturel, le modèle de mélange (SIAR) a mis en évidence, quelles que soient les saisons que la MOFB était la première ressource détritique assimilés par les macroinvertébrés. Cette importance pourrait s'expliquer par l'intensité de la colonisation microbienne de ces particules et notamment la présence de diatomées. Ainsi, les compositions exactes en fragments détritiques, micro-organismes hétérotrophes et autotrophes de cette matière organique fine devraient être étudiées plus en détail, ainsi que leurs contributions relatives au fonctionnement des petits cours d'eaux de têtes de bassins (Dangles *et al.*, 2001 ; Torres-Ruiz & Wehr, 2019).

4) Dans l'état actuel de nos connaissances sur le métabolisme lipidique des insectes aquatiques et des crustacés amphipodes, il conviendrait d'étudier de manière très précise leurs besoins en AG essentiels en ciblant des espèces clefs des cours d'eau de tête de bassin versant, comme les plécoptères *Leuctridae* et *Nemouridae*, les trichoptères collecteurs (*Hydropsychidae*) ou déchiqueteurs (*Sericostomatidae*, *Limnephilidae*). En effet, la co-évolution des macroinvertébrés consommateurs primaires et des arbres générant les ressources les plus abondantes (litières de feuilles) mais pauvres en longs AGPI a pu faciliter le maintien de capacités performantes de bioconversion des AGPI. Comme le montrent les recherches sur les espèces terrestres, les adaptations écophysologiques et le métabolisme lipidique des insectes peuvent se révéler surprenants, notamment dans l'expression des gènes des désaturases impliquées dans la synthèse des AGPI (Arrese & Soulages, 2010; Kabeya *et al.*, 2018). Des études dans ce sens sont donc réellement nécessaires chez les espèces aquatiques, afin de combler le retard par rapport aux espèces terrestres.

5) Comme nous l'avons souligné dans la discussion générale, peu de travaux s'attardent sur le métabolisme des stérols chez les macroinvertébrés d'eau douce (Gergs *et al.*, 2015), et ce, en dépit du fait qu'une carence en stérols peut avoir des effets délétères sur le développement des arthropodes (Gergs *et al.*, 2014). Nos travaux sur les stérols ne permettent pas de mettre en évidence une contrainte nutritionnelle à la base du réseau trophique. Nous pensons donc que les stérols ne constituent pas un nutriment essentiel limitant. Cependant, une meilleure compréhension des phénomènes nécessitera de plus amples études pour mieux cerner l'importance des stérols chez les macroinvertébrés d'eau douce.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aguilar, V., Racotta, I.S., Goytortúa, E., Wille, M., Sorgeloos, P., Civera, R., & Palacios, E. (2012) The influence of dietary arachidonic acid on the immune response and performance of Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at high stocking density. *Aquac Nutr* 18: 258–271.
- Ahlgren, G., Vrede, T., & Goedkoop, W. (2009) Fatty acid ratios in freshwater fish, zooplankton and zoobenthos—are there specific optima? In *Lipids in aquatic ecosystems*. Springer, pp. 147–178.
- Aigner, S., Herburger, K., Holzinger, A., & Karsten, U. (2018) Epilithic Chamaesiphon (Synechococcales, Cyanobacteria) species in mountain streams of the Alps—interspecific differences in photo-physiological traits. *J Appl Phycol* 30: 1125–1134.
- Alexander, R.B., Boyer, E.W., Smith, R.A., Schwarz, G.E., & Moore, R.B. (2007) The role of headwater streams in downstream water quality 1. *JAWRA J Am Water Resour Assoc* 43: 41–59.
- Allan, J.D. & Castillo, M.M. (2007) *Stream ecology: structure and function of running waters*, Springer Science & Business Media.
- Amoros, C. & Petts, G.E. (1993) *Hydrosystèmes fluviaux*; Chap. 1: Bases conceptuelles.
- Anderson, C. & Cabana, G. (2007) Estimating the trophic position of aquatic consumers in river food webs using stable nitrogen isotopes. *J North Am Benthol Soc* 26: 273–285.
- Andrade Tomaz, A.C., de Miranda, G.E.C., de Souza, M. de F.V., & da Cunha, E.V.L. (2012) Analysis and characterization of methyl esters of fatty acids of some *Gracilaria* species. *Biochem Syst Ecol* 44: 303–306.
- Angst, G., Cajthaml, T., Angst, Š., Mueller, K.E., Kögel-Knabner, I., Beggel, S., et al. (2017) Performance of base hydrolysis methods in extracting bound lipids from plant material, soils, and sediments. *Org Geochem* 113: 97–104.
- Arrese, E.L. & Soulages, J.L. (2010) Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol* 55: 207–225.
- Arts, M.T., Ackman, R.G., & Holub, B.J. (2001) “Essential fatty acids” in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *Can J Fish Aquat Sci* 58: 122–137.
- Baatrup-Pedersen, A., Graeber, D., Kallestrup, H., Guo, K., Rasmussen, J.J., Larsen, S.E., & Riis, T. (2020) Effects of low flow and co-occurring stressors on structural and functional characteristics of the benthic biofilm in small streams. *Sci Total Environ* 733: 139331.
- Baldy, V., Gessner, M.O., & Chauvet, E. (1995) Bacteria, fungi and the breakdown of leaf litter in a large river. *Oikos* 93–102.
- Bärlocher, F. (2012) *The ecology of aquatic hyphomycetes*, Springer Science & Business Media.
- Bärlocher, F. & Gessner, M. (2005) *Methods to Study Litter Decomposition*.
- Basaguren, A., Riano, P., & Pozo, J. (2002) Life history patterns and dietary changes of several caddisfly (Trichoptera) species in a northern Spain stream. *Arch für Hydrobiol* 23–41.
- Bec, A., Desvillettes, C., Véra, Aurélie, Fontvieille, D., & Bourdier, G. (2003a) Nutritional value of different food sources for the benthic Daphnidae *Simocephalus vetulus*: Role of fatty acids. *Arch fur Hydrobiol* 156: 145–163.
- Bec, A., Desvillettes, C., Véra, Aurélie, Lemarchand, C., Fontvieille, D., & Bourdier, G. (2003b) Nutritional quality of a freshwater heterotrophic flagellate: Trophic upgrading of its microalgal diet for *Daphnia hyalina*. *Aquat Microb Ecol* 32: 203–207.
- Bec, A., Perga, M., 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.

- Behmer, S.T. (2017) Overturning dogma: tolerance of insects to mixed-sterol diets is not universal. *Curr Opin Insect Sci* 23: 89–95.
- Behmer, S.T. & David Nes, W. (2003) Insect Sterol Nutrition and Physiology: A Global Overview.
- Behmer, S.T. & Elias, D.O. (2000) Sterol metabolic constraints as a factor contributing to the maintenance of diet mixing in grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). *Physiol Biochem Zool* 73: 219–230.
- Benfield, E.F. (1997) Comparison of litterfall input to streams. *J North Am Benthol Soc* 16: 104–108.
- Berggren, M., Bergström, A.-K., & Karlsson, J. (2015) Intraspecific autochthonous and allochthonous resource use by zooplankton in a humic lake during the transitions between winter, summer and fall. *PLoS One* 10: e0120575.
- Berthélemy, C. & Lahoud, M. (1981) Régimes alimentaires et pièces buccales de quelques Perlodidae et Perlidae des Pyrénées [Plecoptera]. In *Annales de Limnologie*. Station Biologique du lac d'Orédon, pp. 1–24.
- Biandolino, F. & Prato, E. (2006) A preliminary investigation of the lipids and fatty acids composition of *Gammarus aequicauda* (Crustacea: Amphipoda) and its main food source. *JMBA-Journal Mar Biol Assoc United Kingdom* 86: 345–348.
- Biggs, B.J.F. (1996) Patterns in benthic algae of streams. *Algal Ecol Freshw benthic Ecosyst* 31–56.
- Bottová, K., Derka, T., Beracko, P., & de Figueroa, J.M.T. (2013) Life cycle, feeding and secondary production of Plecoptera community in a constant temperature stream in Central Europe. *Limnologica* 43: 27–33.
- Bourrelly, P. (1988). Les algues d'eau douce: initiation à la systématique. *Société nouvelle*
- Box, G.E.P. & Cox, D.R. (1964) An analysis of transformations. *J R Stat Soc Ser B* 26: 211–243.
- Brant, A.N. & Chen, H.Y.H. (2015) Patterns and mechanisms of nutrient resorption in plants. *CRC Crit Rev Plant Sci* 34: 471–486.
- Brett, M.T., Bunn, S.E., Chandra, S., Galloway, A.W.E., Guo, F., Kainz, M.J., et al. (2017) How important are terrestrial organic carbon inputs for secondary production in freshwater ecosystems? *Freshw Biol* 62: 833–853.
- Bundschuh, M. & McKie, B.G. (2016) An ecological and ecotoxicological perspective on fine particulate organic matter in streams. *Freshw Biol* 61: 2063–2074.
- Bunn, S.E., Davies, P.M., & Winning, M. (2003) Sources of organic carbon supporting the food web of an arid zone floodplain river. *Freshw Biol* 48: 619–635.
- Carroll, T.M. & Thorp, J.H. (2014) Ecotonal shifts in diversity and functional traits in zoobenthic communities of karst springs. *Hydrobiologia* 738: 1–20.
- Carroll, T.M., Thorp, J.H., & Roach, K.A. (2016) Autochthony in karst spring food webs. *Hydrobiologia* 776: 173–191.
- Carvalho, E.M. & Graça, M.A.S. (2007) A laboratory study on feeding plasticity of the shredder *Sericostoma vittatum* Rambur (Sericostomatidae). *Hydrobiologia* 575: 353–359.
- Cazaubon, A. & Loudiki, M. (1986) Microrépartition des algues épilithiques sur les cailloux d'un torrent Corse, le Rizzanèse. In *Annales de limnologie*. EDP Sciences, pp. 3–16.
- Ceola, S., Hödl, I., Adlboller, M., Singer, G., Bertuzzo, E., Mari, L., et al. (2013) Hydrologic variability affects invertebrate grazing on phototrophic biofilms in stream microcosms. *PLoS One* 8: e60629.
- Céréghino, R. (2006) Ontogenetic diet shifts and their incidence on ecological processes: a case study using two morphologically similar stoneflies (Plecoptera). *Acta Oecologica* 30: 33–38.
- Céréghino, R. (2002) Shift from a herbivorous to a carnivorous diet during the larval development of some Rhyacophila species (Trichoptera). *Aquat Insects* 24: 129–135.
- Chamberlain, P.M., Bull, I.D., Black, H.I.J., Ineson, P., & Evershed, R.P. (2004) Lipid content and carbon assimilation in Collembola: implications for the use of compound-specific carbon isotope analysis in animal dietary studies. *Oecologia* 139: 325–335.

- Chauvet, E., Ferreira, V., Giller, P.S., McKie, B.G., Tiegs, S.D., Woodward, G., et al. (2016) Litter decomposition as an indicator of stream ecosystem functioning at local-to-continental scales: insights from the European RivFunction project. *Adv Ecol Res* 55: 99–182.
- Cianficconi, F., Corallini, C., & Moretti, G.P. (1998) Trichopteran fauna of the Italian springs. *Stud crenobiology Backhuys Publ Leiden* 125–140.
- Clarke, A., Azulai, D., Dueker, M.E., Vos, M., & Perron, G.G. (2019) Triclosan alters microbial communities in freshwater microcosms. *Water* 11: 961.
- Clarke, A., Mac Nally, R., Bond, N., & Lake, P.S. (2008) Macroinvertebrate diversity in headwater streams: a review. *Freshw Biol* 53: 1707–1721.
- Collins, S.M., Kohler, T.J., Thomas, S.A., Fetzer, W.W., & Flecker, A.S. (2016) The importance of terrestrial subsidies in stream food webs varies along a stream size gradient. *Oikos* 125: 674–685.
- Collister, J.W., Rieley, G., Stern, B., Eglinton, G., & Fry, B. (1994) Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses of leaf lipids from plants with differing carbon dioxide metabolisms. *Org Geochem* 21: 619–627.
- Cranwell, A., Jaworski, G.H.M., & Bickley, H.M. (1990) Hydrocarbons, sterols, esters and fatty acids in six freshwater chlorophytes. *Phytochemistry* 29: 145–151.
- Cranwell, P.A., Creighton, M.E., & Jaworski, G.H.M. (1988) Lipids of four species of freshwater chrysophytes. *Phytochemistry* 27: 1053–1059.
- Crenier, C., Arce-Funck, J., Bec, A., Billoir, E., Perrière, F., Leflaive, J., et al. (2017) Minor food sources can play a major role in secondary production in detritus-based ecosystems. *Freshw Biol* 62: 1155–1167.
- Crenier, C., Arce-Funck, J., Bec, A., Billoir, E., Perrière, F., Leflaive, J., et al. (2017) Minor food sources can play a major role in secondary production in detritus-based ecosystems. *Freshw Biol* 62: 1155–1167.
- Crenier, C., Sanchez-Thirion, K., Bec, A., Felten, V., Ferriol, J., González, A.G., et al. (2019) Interactive impacts of silver and phosphorus on autotrophic biofilm elemental and biochemical quality for a macroinvertebrate consumer. *Front Microbiol* 10: 732.
- Cross, W.F., Wallace, J.B., Rosemond, A.D., & Eggert, S.L. (2006) Whole-system nutrient enrichment increases secondary production in a detritus-based ecosystem. *Ecology* 87: 1556–1565.
- Cugno, N. Di & Robinson, C.T. (2017) Trophic structure of macroinvertebrates in alpine non-glacial streams. *Fundam Appl Limnol* 190: 319–330.
- Di Cugno, N. & Robinson, C.T. (2017) Trophic structure of macroinvertebrates in alpine non-glacial streams. *Fundam Appl Limnol für Hydrobiol* 190: 319–330.
- Cummins, K.W. (2018) Functional analysis of stream macroinvertebrates. In *Limnology-Some New Aspects of Inland Water Ecology*. IntechOpen.
- Cummins, K.W., Petersen, R.C., Howard, F.O., Wuycheck, J.C., & Holt, V.I. (1973) The utilization of leaf litter by stream detritivores. *Ecology* 54: 336–345.
- D'Abramo, L.R., Wright, J.S., Wright, K.H., Bordner, C.E., & Conklin, D.E. (1985) Sterol requirement of cultured juvenile crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Aquaculture* 49: 245–255.
- Dalsgaard, J., John, M.S., Kattner, G., Müller-Navarra, D., & Hagen, W. (2003) Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment.
- Danger, M., Arce Funck, J., Devin, S., Heberle, J., & Felten, V. (2013) Phosphorus content in detritus controls life-history traits of a detritivore. *Funct Ecol* 27: 807–815.
- Danger, M., Cornut, J., Chauvet, E., Chavez, P., Elger, A., & Lecerf, A. (2013) Benthic algae stimulate leaf litter decomposition in detritus-based headwater streams: A case of aquatic priming effect? *Ecology* 94: 1604–1613.
- Dangles, O. (2002) Functional plasticity of benthic macroinvertebrates: implications for trophic dynamics in acid streams. *Can J Fish Aquat Sci* 59: 1563–1573.
- Dangles, O. & Chauvet, E. (2003) Effects of stream acidification on fungal biomass in decaying beech leaves and leaf palatability. *Water Res* 37: 533–538.

- Dangles, O., Gessner, M.O., Guérol, F., and Chauvet, E. (2004) Impacts of stream acidification on litter breakdown: implications for assessing ecosystem functioning. *J Appl Ecol* 41: 365–378.
- Dangles, O. & Guérol, F. (2001) Influence of shredders in mediating breakdown rates of beech leaves in circumneutral and acidic forest streams. *Arch für Hydrobiol* 649–666.
- Dangles, O., Guérol, F., & Usseglio-Polatera, P. (2001) Role of transported particulate organic matter in the macroinvertebrate colonization of litter bags in streams. *Freshw Biol* 46: 575–586.
- Décamps, H. (1968) Vicariences écologiques chez les trichoptères des Pyrénées. 1–50.
- Delacoste, M., Baran, P., Lek, S., & Lascaux, J.M. (1995) Classification et clé de détermination des faciès d'écoulements en rivières de montagne. *Bull Français la Pêche la Piscic* 149–156.
- Dembitsky, V.M. & Rezanka, T. (1995) Distribution of acetylenic acids and polar lipids in some aquatic bryophytes. *Phytochemistry* 40: 93–97.
- Descroix, A., Bec, A., Bourdier, G., Sargos, D., Sauvanet, J., Misson, B., & Desvillettes, C. (2010) Fatty acids as biomarkers to indicate main carbon sources of four major invertebrate families in a large River (the Allier, France). *Fundam Appl Limnol für Hydrobiol* 177: 39–55.
- Desvillettes, C. & Bec, A. (2009) Formation and transfer of fatty acids in aquatic microbial food webs: role of heterotrophic protists. In *Lipids in aquatic ecosystems*. Springer, pp. 25–42.
- Desvillettes, C., Bourdier, G., & Breton, J.-C. (1994) Lipid class and fatty acid composition of planktivorous larval pike *Esox lucius* living in a natural pond. *Aquat Living Resour* 7: 67–77.
- Desvillettes, C., Bourdier, G., & Breton, J. (1997) The effect of invertebrate diets on lipids, fatty acid composition and physiological condition of pike larvae (*Esox lucius*). *J Appl Ichthyol* 13: 183–190.
- Dexter, E., Rollwagen-Bollens, G., & Bollens, S.M. (2018) The trouble with stress: A flexible method for the evaluation of nonmetric multidimensional scaling. *Limnol Oceanogr Methods* 16: 434–443.
- Dickman, E.M., Newell, J.M., González, M.J. & Vanni, M.J. (2008) Light, nutrients, and food-chain length constrain planktonic energy transfer efficiency across multiple trophic levels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 25–105.
- Dodds, W.K., Collins, S.M., Hamilton, S.K., Tank, J.L., Johnson, S., Webster, J.R., et al. (2014) You are not always what we think you eat: selective assimilation across multiple whole-stream isotopic tracer studies. *Ecology* 95: 2757–2767.
- Dodds, W.K. & Smith, V.H. (2016) Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in streams. *Inl Waters* 6: 155–164.
- Downing, J.A., Cole, J.J., Duarte, C.M., Middelburg, J.J., Melack, J.M., Prairie, Y.T., et al. (2012) Global abundance and size distribution of streams and rivers. *Inl waters* 2: 229–236.
- Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z., Knowler, D.J., Lévêque, C., et al. (2006) Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol Rev* 81: 163–182.
- Dumont, B. & Verneaux, J. (1976) Edifice trophique partiel du cours supérieur d'un ruisseau forestier. In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*. EDP Sciences, pp. 239–252.
- Durmaz, Y., Monteiro, M., Bandarra, N., Gökpınar, Ş., & Işık, O. (2007) The effect of low temperature on fatty acid composition and tocopherols of the red microalga, *Porphyridium cruentum*. *J Appl Phycol* 19: 223–227.
- Eguchi, E., Ogawa, Y., Okamoto, K., & Mochizuki, K. (1994) Fatty acid compositions of arthropod and cephalopod photoreceptors: interspecific, seasonal and developmental studies. *J Comp Physiol B* 164: 94–102.
- Elliott, J.M. (2005) Contrasting diel activity and feeding patterns of four instars of *Rhyacophila dorsalis* (Trichoptera). *Freshw Biol* 50: 1022–1033.

- Elosegi, A., Nicolás, A., & Richardson, J.S. (2018) Priming of leaf litter decomposition by algae seems of minor importance in natural streams during autumn. *PLoS One* 13: e0200180.
- Elser, J.J., Fagan, W.F., Denno, R.F., Dobberfuhl, D.R., Folarin, A., Huberty, A., et al. (2000) Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs. *Nature* 408: 578–580.
- Erdozain, M., Kidd, K., Kreutzweiser, D., & Sibley, P. (2019) Increased reliance of stream macroinvertebrates on terrestrial food sources linked to forest management intensity. *Ecol Appl* 29: e01889.
- Evans-White, M.A. & Halvorson, H.M. (2017) Comparing the ecological stoichiometry in green and brown food webs—a review and meta-analysis of freshwater food webs. *Front Microbiol* 8: 1184.
- Evans-White, M.A., Stelzer, R.S., & Lamberti, G.A. (2005) Taxonomic and regional patterns in benthic macroinvertebrate elemental composition in streams. *Freshw Biol* 50: 1786–1799.
- Feeley, H.B. & Kelly-Quinn, M. (2015) The nymphal diet of the stonefly *Protonemura meyeri* (Pictet)(Plecoptera: Nemouridae) in four episodically acidic headwater streams in Ireland. *Irish Nat J* 104–109.
- Felten, V., Tixier, G., Guérol, F., De Crespín De Billy, V., & Dangles, O. (2008) Quantification of diet variability in a stream amphipod: Implications for ecosystem functioning. *Fundam Appl Limnol* 170: 303–313.
- Fink, P. & Von Elert, E. (2006) Physiological responses to stoichiometric constraints: nutrient limitation and compensatory feeding in a freshwater snail. *Oikos* 115: 484–494.
- Finlay, J.C. (2001) Stable-carbon-isotope ratios of river biota: implications for energy flow in lotic food webs. *Ecology* 82: 1052–1064.
- Finlay, J.C., Khandwala, S., & Power, M.E. (2002) Spatial scales of carbon flow in a river food web. *Ecology* 83: 1845–1859.
- Finn, D.S., Bonada, N., Múrria, C., & Hughes, J.M. (2011) Small but mighty: headwaters are vital to stream network biodiversity at two levels of organization. *J North Am Benthol Soc* 30: 963–980.
- Flores, L., Larrañaga, A., & Elosegi, A. (2014) Compensatory feeding of a stream detritivore alleviates the effects of poor food quality when enough food is supplied. *Freshw Sci* 33: 134–141.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. (1987) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. 55: 999–1033.
- Franklin, H.M., Carroll, A.R., Chen, C., Maxwell, P., & Burford, M.A. (2020) Plant source and soil interact to determine characteristics of dissolved organic matter leached into waterways from riparian leaf litter. *Sci Total Environ* 703: 134530.
- Friberg, N. & Jacobsen, D. (1994) Feeding plasticity of two detritivore-shredders. *Freshw Biol* 32: 133–142.
- Frontier, S. (1976) Utilisation des diagrammes rang-fréquence dans l'analyse des écosystèmes.
- Frost, P.C., Benstead, J.P., Cross, W.F., Hillebrand, H., Larson, J.H., Xenopoulos, M.A., & Yoshida, T. (2006) Threshold elemental ratios of carbon and phosphorus in aquatic consumers. *Ecol Lett* 9: 774–779.
- Frost, P.C., Evans-White, M.A., Finkel, Z. V, Jensen, T.C., & Matzek, V. (2005) Are you what you eat? Physiological constraints on organismal stoichiometry in an elementally imbalanced world. *Oikos* 109: 18–28.
- Fujibayashi, M., Miura, Y., Suganuma, R., Takahashi, S., Sakamaki, T., Miyata, N., & Kazama, S. (2019) Origin of Carbon and Essential Fatty Acids in Higher Trophic Level Fish in Headwater Stream Food Webs. *Biomolecules* 9: 487.
- Von Fumetti, S. & Nagel, P. (2011) A first approach to a faunistic crenon typology based on functional feeding groups. *J Limnol* 70: 147.
- Funck, J.A., Bec, A., Perrière, F., Felten, V., and Danger, M. (2015) Aquatic hyphomycetes: a potential source of polyunsaturated fatty acids in detritus-based stream food webs. *Fungal Ecol* 13: 205–210.

- Füreder, L., Welter, C., & Jackson, J.K. (2003) Dietary and stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) analyses in alpine Ephemeroptera and Plecoptera. *Res Updat Ephemero Plecoptera* 39–46.
- Gaillard, B., Meziane, T., Tremblay, R., Archambault, P., Blicher, M.E., Chauvaud, L., et al. (2017) Food resources of the bivalve *Astarte elliptica* in a sub-Arctic fjord: a multi-biomarker approach. *Mar Ecol Prog Ser* 567: 139–156.
- Galas, J. & Dumnicka, E. (2003) Organic matter dynamics and invertebrate functional groups in a mountain stream in the West Tatra mountains, Poland. *Int Rev Hydrobiol A J Cover all Asp Limnol Mar Biol* 88: 362–371.
- Le Gall, M. & Behmer, S.T. (2014) Effects of protein and carbohydrate on an insect herbivore: the vista from a fitness landscape.
- Garrido, D., Kabeya, N., Betancor, M.B., Pérez, J.A., Acosta, N.G., Tocher, D.R., et al. (2019) Functional diversification of teleost Fads2 fatty acyl desaturases occurs independently of the trophic level. *Sci Rep* 9: 1–10.
- Gee, J.H.R. (1988) Population dynamics and morphometrics of *Gammarus pulex* L.: evidence of seasonal food limitation in a freshwater detritivore. *Freshw Biol* 19: 333–343.
- Gergs, R., Steinberger, N., Basen, T., & Martin-Creuzburg, D. (2014) Dietary supply with essential lipids affects growth and survival of the amphipod *Gammarus roeselii*. *Limnologica* 46: 109–115.
- Gergs, R., Steinberger, N., Beck, B., Basen, T., Yohannes, E., Schulz, R., & Martin-Creuzburg, D. (2015) Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses reveal sterol metabolic constraints in an aquatic invertebrate. *Rapid Commun Mass Spectrom* 29: 1789–1794.
- Gessner, M.O. & Chauvet, E. (1994) Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf litter. *Ecology* 75: 1807–1817.
- Gessner, M.O., Chauvet, E., & Dobson, M. (1999) A perspective on leaf litter breakdown in stream. *Nord Soc Oikos* 85: 377–384.
- Gessner, M.O. & Schmitt, A.L. (1996) Use of Solid-Phase Extraction To Determine Ergosterol Concentrations in Plant Tissue Colonized by Fungi. 62: 415–419.
- Gessner, M.O., Thomas, M., Jean-Louis, A.M., & Chauvet, E. (1993) Stable successional patterns of aquatic hyphomycetes on leaves decaying in a summer cool stream. *Mycol Res* 97: 163–172.
- Ghioni, C., Bell, J.G., & Sargent, J.R. (1996) Polyunsaturated fatty acids in neutral lipids and phospholipids of some freshwater insects. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 114: 161–170.
- Ginjurpalli, G.K., Gerard, P.D., & Baldwin, W.S. (2015) Arachidonic acid enhances reproduction in *Daphnia magna* and mitigates changes in sex ratios induced by pyriproxyfen. *Environ Toxicol Chem* 34: 527–535.
- Gladyshev, M.I., Sushchik, N.N., Kalachova, G.S., & Makhutova, O.N. (2012) Stable isotope composition of fatty acids in organisms of different trophic levels in the Yenisei River. *PLoS One* 7: e34059.
- Gladyshev, M.I., Sushchik, N.N., Makhutova, O.N., & Kalachova, G.S. (2014) Trophic fractionation of isotope composition of polyunsaturated fatty acids in the trophic chain of a river ecosystem. In *Doklady. Biochemistry and Biophysics*. Springer Nature BV, p. 4.
- Glencross, B.D. (2009) Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Rev Aquac* 1: 71–124.
- Glencross, B.D. & Smith, D.M. (2001) Optimizing the essential fatty acids, eicosapentaenoic and decosahexaenoic acid, in the diet of the prawn, *Penaeus monodon*.
- Glime, J.M. (1994) Bryophytes as homes for stream insects. *Hikobia* 11: 483–498.
- Glime, J.M. (2017) Nutrient relationships: requirement and sources. *Volume 1, Chapt. 8.1. Physiological Ecology*.
- Gomi, T., Sidle, R.C., & Richardson, J.S. (2002) Understanding processes and downstream linkages of headwater systems: headwaters differ from downstream reaches by their close coupling to hillslope processes, more temporal and spatial variation, and their need for different means of protection from land. *Bioscience* 52: 905–916.

- Gossiaux, A., Rollin, M., Guerold, F., Felten, V., Laviale, M., Bachelet, Q., et al. (2020) Temperature and nutrient effects on the relative importance of brown and green pathways for stream ecosystem functioning: A mesocosm approach. *Freshw Biol*.
- Graça, M.A.S. (2001) The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams - A review. *Int Rev Hydrobiol* 86: 383–393.
- Graça, M.A.S., Cressa, C., Gessner, T.M.O., Feio, M.J., & Callies, K.A. (2001) Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. *Freshw Biol* 46: 947–957.
- Graça, M.A.S., Maltby, L., & Calow, P. (1993) Importance of fungi in the diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus* I: feeding strategies. *Oecologia* 93: 139–144.
- Grayston, S.J., Campbell, C.D., Bardgett, R.D., Mawdsley, J.L., Clegg, C.D., Ritz, K., et al. (2004) Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. *Appl Soil Ecol* 25: 63–84.
- Groombridge, B. & Jenkins, M. (1998) Freshwater biodiversity: a preliminary global assessment, World Conservation Monitoring Centre.
- Guenet, B., Danger, M., Abbadie, L., & Lacroix, G. (2010) Priming effect: bridging the gap between terrestrial and aquatic ecology. *Ecology* 91: 2850–2861.
- Guisande, C., Bartumeus, F., Ventura, M., & Catalan, J. (2003) Role of food partitioning in structuring the zooplankton community in mountain lakes. *Oecologia* 136: 627–634.
- Gulis, V., Ferreira, V., & Graça, M.A.S. (2006) Stimulation of leaf litter decomposition and associated fungi and invertebrates by moderate eutrophication: implications for stream assessment. *Freshw Biol* 51: 1655–1669.
- Guo, F., Bunn, S.E., Brett, M.T., Fry, B., Hager, H., Ouyang, X., & Kainz, M.J. (2018) Feeding strategies for the acquisition of high-quality food sources in stream macroinvertebrates: Collecting, integrating, and mixed feeding. *Limnol Oceanogr* 63: 1964–1978.
- Guo, F., Bunn, S.E., Brett, M.T., & Kainz, M.J. (2017) Polyunsaturated fatty acids in stream food webs—high dissimilarity among producers and consumers. *Freshw Biol* 62: 1325–1334.
- Guo, F., Kainz, M.J., Sheldon, F., & Bunn, S.E. (2016) The importance of high-quality algal food sources in stream food webs—current status and future perspectives. *Freshw Biol* 61: 815–831.
- Guo, F., Kainz, M.J., Valdez, D., Sheldon, F., & Bunn, S.E. (2016) High-quality algae attached to leaf litter boost invertebrate shredder growth. *Freshw Sci* 35: 1213–1221.
- Haines, W.P. & Renwick, J.A.A. (2009) Bryophytes as food: comparative consumption and utilization of mosses by a generalist insect herbivore. *Entomol Exp Appl* 133: 296–306.
- Hall Jr, R.O., Likens, G.E., & Malcom, H.M. (2001) Trophic basis of invertebrate production in 2 streams at the Hubbard Brook Experimental Forest. *J North Am Benthol Soc* 20: 432–447.
- Halvorson, H.M., Francoeur, S.N., Findlay, R.H., & Kuehn, K.A. (2019) Algal-mediated priming effects on the ecological stoichiometry of leaf litter decomposition: a meta-analysis. *Front Earth Sci* 7: 76.
- Hayden, B., McWilliam-Hughes, S.M., & Cunjak, R.A. (2016) Evidence for limited trophic transfer of allochthonous energy in temperate river food webs. *Freshw Sci* 35: 544–558.
- Hayes, J.M. (2001) Fractionation of carbon and hydrogen isotopes in biosynthetic processes. *Rev Mineral geochemistry* 43: 225–277.
- Hershey, A.E., Northington, R.M., Finlay, J.C., & Peterson, B.J. (2017) Stable isotopes in stream food webs. In *Methods in stream ecology*. Elsevier, pp. 3–20.
- Hessen, D.O., Færøvig, P.J., & Andersen, T. (2002) Light, nutrients, and P: C ratios in algae: grazer performance related to food quality and quantity. *Ecology* 83: 1886–1898.
- Hieber, M. & Gessner, M.O. (2002) Contribution of stream detritivores, fungi, and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates. *Ecology* 83: 1026–1038.
- Hill, W.R., Mulholland, P.J., & Marzolf, E.R. (2001) Stream ecosystem responses to forest leaf emergence in spring. *Ecology* 82: 2306–2319.

- Hill, W.R., Smith, J.G., and Stewart, A.J. (2010) Light, nutrients, and herbivore growth in oligotrophic streams. *Ecology* 91: 518–527.
- Hillebrand, H. & Sommer, U. (1999) The nutrient stoichiometry of benthic microalgal growth: Redfield proportions are optimal. *Limnol Oceanogr* 44: 440–446.
- Hoover, T.M., Pinto, X., & Richardson, J.S. (2011) Riparian canopy type, management history, and successional stage control fluxes of plant litter to streams. *Can J For Res* 41: 1394–1404.
- Hoppeler, F., Winkelmann, C., Becker, J., & Pauls, S.U. (2018) Larval growth and metabolic energy storage of *Micropterna lateralis* (Trichoptera: Limnephilidae) in an intermittent stream: glycogen dominates in final instars. *Hydrobiologia* 806: 175–185.
- Huang, X., Warren, J.T., & Gilbert, L.I. (2008) New players in the regulation of ecdysone biosynthesis. 35: 1–10.
- Hulbert, A.J. & Abbott, S.K. (2012) Nutritional ecology of essential fatty acids: an evolutionary perspective. *Aust J Zool* 59: 369–379.
- Huryn, A.D. & Wallace, J.B. (2000) Life history and production of stream insects. *Annu Rev Entomol* 45: 83–110.
- Hynes, H.B.N. (1983) Groundwater & stream ecology. *Hydrobiologia* 100: 93–99.
- Jaramillo-Madrid, A.C., Ashworth, J., Fabris, M., & Ralph, P.J. (2019) Phytosterol biosynthesis and production by diatoms (Bacillariophyceae). *Phytochemistry* 163: 46–57.
- Jardine, T., McGeachy, S., Paton, C., & Savoie, M. (2003) Stable isotopes in aquatic systems: sample preparation, analysis and interpretation.
- Jardine, T.D., Hadwen, W.L., Hamilton, S.K., Hladyz, S., Mitrovic, S.M., Kidd, K.A., et al. (2014) Understanding and overcoming baseline isotopic variability in running waters. *River Res Appl* 30: 155–165.
- Kabeya, N., Fonseca, M.M., Ferrier, D.E.K., Navarro, J.C., Bay, L.K., Francis, D.S., et al. (2018) Genes for de novo biosynthesis of omega-3 polyunsaturated fatty acids are widespread in animals. *Sci Adv* 4:6849.
- Kalachova, G., Gladyshev, M., Sushchik, N., & Makhutova, O. (2011) Water moss as a food item of the zoobenthos in the Yenisei River. *Open Life Sci* 6: 236–245.
- Khamis, K., Brown, L.E., Hannah, D.M., & Milner, A.M. (2015) Experimental evidence that predator range expansion modifies alpine stream community structure. *Freshw Sci* 34: 66–80.
- Klaveness, D. (2017) *Hydrurus foetidus* (Chrysophyceae)—an inland macroalga with potential. *J Appl Phycol* 29: 1485–1491.
- Klavina, L. (2018) Composition of mosses , their metabolites and environmental stress impacts.
- Koussoroplis, A.-M. (2010) Sources de carbone et d'acides gras essentiels pour les juvéniles de *Liza saliens* (Pisces, Mugilidae) dans le réseau trophique d'une lagune côtière méditerranéenne: approches in situ par biomarqueurs lipidiques et isotopiques. *Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal.*
- Koussoroplis, A.-M., Bec, A., Perga, M.-E., Koutrakis, E., Bourdier, G., & Desvillettes, C. (2011) Fatty acid transfer in the food web of a coastal Mediterranean lagoon: Evidence for high arachidonic acid retention in fish. *Estuar Coast Shelf Sci* 91: 450–461.
- 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 $\delta^{13}C$ analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 404: 207–217.
- Kozáčková, Z., de Figueroa, J.M.T., López-Rodríguez, M.J., Beracko, P., & Derka, T. (2009) Life history of a population of *Protonemura intricata* (Ris, 1902)(Insecta, Plecoptera) in a constant temperature stream in Central Europe. *Int Rev Hydrobiol* 94: 57–66.
- Kühmayer, T., Guo, F., Ebn, N., Battin, T.J., Brett, M.T., Bunn, S.E., et al. (2020) Preferential retention of algal carbon in benthic invertebrates: Stable isotope and fatty acid evidence from an outdoor flume experiment. *Freshw Biol.*

- Lafont, R., Dauphin-Villemant, C., Warren, J.T., & Rees, H. (2012) Ecdysteroid chemistry and biochemistry. In *Insect endocrinology*. Elsevier, pp. 106–176.
- Lagarrigue, T., Baran, P., Lascaux, J.M., Delacoste, M., Abad, N., & Lim, P. (2001) Taille à 3 ans de la truite commune (*Salmo trutta* L.) dans les rivières des pyrénées française : relations avec les caractéristiques mésologiques et influence des aménagements hydroélectriques.. *Bull Fr la Pech la Piscic* 549–571.
- Lake, J.L., Serbst, J.R., Kuhn, A., Smucker, N.J., Edwards, P., Libby, A., et al. (2019) Use of stable isotopes in benthic organic material as a baseline for estimating fish trophic positions in lakes. *Can J Fish Aquat Sci* 76: 1227–1237.
- Lamberti, G.A. (1996) The role of periphyton in benthic food webs. *Algal Ecol*.
- Lamberti, G.A. & Steinman, A.D. (1997) A comparison of primary production in stream ecosystems. *J North Am Benthol Soc* 16: 95–104.
- Lancaster, J., Bradley, D.C., Hogan, A., & Waldron, S. (2005) Intraguild omnivory in predatory stream insects. *J Anim Ecol* 74: 619–629.
- Lang, I., Hodac, L., Friedl, T., & Feussner, I. (2011) Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biol* 11: 1–16.
- Laplace-Treyture, C., Peltre, M.-C., Lambert, É., Rodriguez, S., Vergon, J.-P., & Chauvin, C. (2014) Guide pratique de détermination des algues macroscopiques d'eau douce et de quelques organismes hétérotrophes.
- Lau, D.C.P., Leung, K.M.Y., & Dudgeon, D. (2009) Are autochthonous foods more important than allochthonous resources to benthic consumers in tropical headwater streams? *J North Am Benthol Soc* 28: 426–439.
- Lavandier, P. (1982) Développement larvaire—régime alimentaire, production d'isoperla viridinervis pictet (plecoptera, perlodidae) dans un torrent froid de haute montagne. In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*. EDP Sciences, pp. 301–318.
- Lavandier, P. (1984) Dynamique des populations larvaires et régime alimentaire de Rhyacophila tristis Pictet (Trichoptera: Rhyacophilidae) dans un ruisseau de haute montagne. In *Annales de limnologie*. EDP Sciences, pp. 209–214.
- Leberfinger, K. & Bohman, I. (2008) Leaves, grass, mosses or algae?—food preference among shredders in small grassland streams on Öland (Baltic Sea, Sweden).
- Leberfinger, K. & Herrmann, J. (2010) Spatial and temporal distribution of shredders in leaf-limited intermittent streams. *Int Vereinigung für Theor und Angew Limnol Verhandlungen* 30: 1342–1344.
- Lecerf, A., Risnoveanu, G., Popescu, C., Gessner, M.O., & Chauvet, E. (2007) Decomposition of diverse litter mixtures in streams. *Ecology* 88: 219–227.
- Lhéritier, N. (2012) Les têtes de bassin versant : de la cartographie aux échelles mondiale et française à la caractérisation des ruisseaux limousins. *Thèse de doctorat. Université de Limoges*.
- Lieske, R. & Zwick, P. (2007) Food preference, growth and maturation of Nemurella pictetii (Plecoptera: Nemouridae). *Freshw Biol*.
- Lindeman, R.L. (1942) The trophic-dynamic aspect of ecology. *Ecology* 23: 399–417.
- Little, C.J. & Altermatt, F. (2019) Differential resource consumption in leaf litter mixtures by native and non-native amphipods. *Aquat Ecol* 53: 151–162.
- Little, C.J. & Altermatt, F. (2018) Landscape configuration alters spatial arrangement of terrestrial-aquatic subsidies in headwater streams. *Landsc Ecol* 33: 1519–1531.
- Liu, Y., Johnson, M.G., Cox, C.J., Medina, R., Devos, N., Vanderpoorten, A., et al. (2019) Resolution of the ordinal phylogeny of mosses using targeted exons from organellar and nuclear genomes. *Nat Commun* 10: 1–11.
- López-Rodríguez, M.J., Tierno de Figueroa, J.M., Bo, T., Moggi, A., & Fenoglio, S. (2012) Living apart together: on the biology of two sympatric Leuctra species (Plecoptera, Leuctridae) in an Apenninic Stream, Italy. *Int Rev Hydrobiol* 97: 117–123.
- Lu, Y., Eiriksson, F.F., Thorsteinsdóttir, M., & Simonsen, H.T. (2019) Valuable fatty acids in bryophytes—Production, biosynthesis, analysis and applications. *Plants* 8: 524.

- Lund, J.W.G., Kipling, C., & Le Cren, E.D. (1958) The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia* 11: 143–170.
- Maiolini, B. & Silveri, L. (2005) Feeding habits of *Dictyogenus fontium* (Plecoptera Perlodidae) in Alpine streams (Trentino-NE Italy). *Stud Trentini Sci Nat Acta Biol* 82: 77–83.
- Majdi, N., Hette-Tronquart, N., Auclair, E., Bec, A., Chouvelon, T., Cognie, B., et al. (2018) There's no harm in having too much: A comprehensive toolbox of methods in trophic ecology. *Food webs* 17: 00-100.
- Majdi, N., Mialet, B., Boyer, S., Tackx, M., Leflaive, J., Boulêtreau, S., et al. (2012a) The relationship between epilithic biofilm stability and its associated meiofauna under two patterns of flood disturbance. *Freshw Sci* 31: 38–50.
- Majdi, N., Tackx, Michèle, & Buffan-Dubau, E. (2012b) Trophic positioning and microphytobenthic carbon uptake of biofilm-dwelling meiofauna in a temperate river. *Freshw Biol* 57: 1180–1190.
- Majdi, N., Tackx, Michele, Traunspurger, W., & Buffan-Dubau, E. (2012c) Feeding of biofilm-dwelling nematodes examined using HPLC-analysis of gut pigment contents. *Hydrobiologia* 680: 219–232.
- Majdi, N. & Traunspurger, W. (2017) Leaf fall affects the isotopic niches of meiofauna and macrofauna in a stream food web. *Food Webs* 10: 5–14.
- Malmqvist, B., Sjöström, P., & Frick, K. (1991) The diet of two species of *Isoperla* (Plecoptera: Perlodidae) in relation to season, site, and sympatry. *Hydrobiologia* 213: 191–203.
- Marcarelli, A.M., Baxter, C. V, Mineau, M.M., & Hall Jr, R.O. (2011) Quantity and quality: unifying food web and ecosystem perspectives on the role of resource subsidies in freshwaters. *Ecology* 92: 1215–1225.
- Martin-Creuzburg, D. & Von Elert, E. (2004) Impact of 10 dietary sterols on growth and reproduction of *Daphnia galeata*. *J Chem Ecol* 30: 483–500.
- Martin-Creuzburg, D. & Merkel, P. (2016) Sterols of freshwater microalgae: potential implications for zooplankton nutrition. *J Plankton Res* 38: 865–877.
- Martin-Creuzburg, D., Oexle, S., & Wacker, A. (2014) Thresholds for Sterol-Limited Growth of *Daphnia magna*: A Comparative Approach Using 10 Different Sterols. *J Chem Ecol* 40: 1039–1050.
- Martin-Creuzburg, D., Sperfeld, E., and Wacker, A. (2009) Colimitation of a freshwater herbivore by sterols and polyunsaturated fatty acids. *Proc R Soc B Biol Sci* 276: 1805–1814.
- Masclaux, H., Bec, A., Kagami, M., Perga, M.-E., Sime-Ngando, T., Desvillettes, C., & Bourdier, G. (2011) Food quality of anemophilous plant pollen for zooplankton. *Limnol Oceanogr* 56: 939–946.
- Masclaux, H., Perga, M.-E., Kagami, M., Desvillettes, C., Bourdier, G., & Bec, A. (2013) How pollen organic matter enters freshwater food webs. *Limnol Oceanogr* 58: 1185–1195.
- McCutchan, J.H.J. & Lewis, W.M.J. (2002) Relative importance of carbon sources for macroinvertebrates in a Rocky Mountain stream. *Limnol Oceanogr* 47: 742–752.
- McCutchan Jr, J.H., Lewis Jr, W.M., Kendall, C., & McGrath, C.C. (2003) Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos* 102: 378–390.
- McNeely, C., Finlay, J.C., & Power, M.E. (2007) Grazer traits, competition, and carbon sources to a headwater-stream food web. *Ecology* 88: 391–401.
- McShaffrey, D. & McCafferty, W.P. (1988) Feeding Behavior of *Rhithrogena pellucida* (Ephemeroptera:Heptageniidae). *J North Am Benthol Soc* 7: 87–99.
- McWilliam-Hughes, S.M., Jardine, T.D., & Cunjak, R.A. (2009) Instream C sources for primary consumers in two temperate, oligotrophic rivers: possible evidence of bryophytes as a food source. *J North Am Benthol Soc* 28: 733–743.
- Methvin, B.R. & Suberkropp, K. (2003) Annual production of leaf-decaying fungi in 2 streams. *J North Am Benthol Soc* 22: 554–564.
- Meyer, J.L., Strayer, D.L., Wallace, J.B., Eggert, S.L., Helfman, G.S., & Leonard, N.E. (2007) The contribution of headwater streams to biodiversity in river networks 1. *JAWRA J Am Water Resour Assoc* 43: 86–103.

- Middelburg, J.J. (2014) Stable isotopes dissect aquatic food webs from the top to the bottom. *Biogeosciences* 11: 2357.
- Mihuc, T.B. (1997) The functional trophic role of lotic primary consumers: generalist versus specialist strategies. *Freshw Biol* 37: 455–462.
- Mihuc, T.B. & Minshall, G.W. (1995) Trophic generalists vs. trophic specialists: implications for food web dynamics in post-fire streams. *Ecology* 76: 2361–2372.
- Mills, G.L., McArthur, J.V., & Wolfe, C.P. (2003) Lipid composition of suspended particulate matter (SPM) in a southeastern blackwater stream. *Water Res* 37: 1783–1793.
- Minshall, G.W. (1978) Autotrophy in stream ecosystems. *Bioscience* 28: 767–771.
- Mondy, C.P., Villeneuve, B., Archaimbault, V., & Usseglio-Polatera, P. (2012) A new macroinvertebrate-based multimetric index (I2M2) to evaluate ecological quality of French wadeable streams fulfilling the WFD demands: A taxonomical and trait approach. *Ecol Indic* 18: 452–467.
- Mondy, N., Grossi, V., Cathalan, E., Delbecque, J.P., Mermillod-Blondin, F., & Douady, C.J. (2014) Sterols and steroids in a freshwater crustacean (*Proasellus meridianus*): Hormonal response to nutritional input. *Invertebr Biol* 133: 99–107.
- Mongrand, S., Bessoule, J.-J., Cabantous, F., & Cassagne, C. (1998) The C16:3\C18:3 fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. *Phytochemistry* 49: 1049–1064.
- Monroig, Ó. & Kabeya, N. (2018) Desaturases and elongases involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic invertebrates: a comprehensive review. *Fish Sci* 84: 911–928.
- Morais, S., Mourente, G., Martínez, A., Gras, N., & Tocher, D.R. (2015) Docosahexaenoic acid biosynthesis via fatty acyl elongase and Δ 4-desaturase and its modulation by dietary lipid level and fatty acid composition in a marine vertebrate. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Biol Lipids* 1851: 588–597.
- Morris, T.C., Samocha, T.M., Davis, D.A., & Fox, J.M. (2011) Cholesterol supplements for *Litopenaeus vannamei* reared on plant based diets in the presence of natural productivity. *Aquaculture* 314: 140–144.
- Mueller, K.E., Polissar, P.J., Oleksyn, J., & Freeman, K.H. (2012) Differentiating temperate tree species and their organs using lipid biomarkers in leaves, roots and soil. *Org Geochem* 52: 130–141.
- Mulholland, P.J., Tank, J.L., Sanzone, D.M., Wollheim, W.M., Peterson, B.J., Webster, J.R., & Meyer, J.L. (2000) Food resources of stream macroinvertebrates determined by natural-abundance stable C and N isotopes and a ^{15}N tracer addition. *J North Am Benthol Soc* 19: 145–157.
- Müller-Navarra, D.C. (2008) Food web paradigms: the biochemical view on trophic interactions. *Int Rev Hydrobiol* 93: 489–505.
- Murata, M. & Tojo, S. (2002) Utilization of lipid for flight and reproduction in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Eur J Entomol* 99: 221–224.
- Mykles, D.L. (2010) Ecdysteroid metabolism in crustaceans. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127: 196–203.
- Napolitano, G.E. (1999) Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems. In *Lipids in freshwater ecosystems*. Springer, pp. 21–44.
- Nguyen-Tu, T.T., Egasse, C., Zeller, B., & Derenne, S. (2007) Chemotaxonomical investigations of fossil and extant beeches. I. Leaf lipids from the extant *Fagus sylvatica* L. *Comptes Rendus Palevol* 6: 451–461.
- Niedrist, G.H. & Füreder, L. (2017) Trophic ecology of alpine stream invertebrates: current status and future research needs. *Freshw Sci* 36: 466–478.
- Niu, J., Chen, P.-F., Tian, L.-X., Liu, Y.-J., Lin, H.-Z., Yang, H.-J., & Liang, G.-Y. (2012) Excess dietary cholesterol may have an adverse effect on growth performance of early post-larval *Litopenaeus vannamei*. *J Anim Sci Biotechnol* 3: 1–5.
- Onema (2015) Les rencontres de l'Onema : Les têtes de bassin versant, un enjeu essentiel pour la ressource en eau.

- Parker, J.D., Burkepille, D.E., Collins, D.O., Kubanek, J., & Hay, M.E. (2007) Stream mosses as chemically-defended refugia for freshwater macroinvertebrates. *Oikos* 116: 302–312.
- Parnell, A. & Inger, R. (2016) Simmr: a stable isotope mixing model. *R Packag version 03 R*.
- Parnell, A.C., Inger, R., Bearhop, S., & Jackson, A.L. (2010) Source partitioning using stable isotopes: Coping with too much variation. *PLoS One* 5: 1–5.
- Peipoch, M., Martí, E., & Gacia, E. (2012) Variability in $\delta^{15}\text{N}$ natural abundance of basal resources in fluvial ecosystems: a meta-analysis. *Freshw Sci* 31: 1003–1015.
- Perry, C., Scanlan, J., & Robin, C. (2019) Mining insect genomes for functionally affiliated genes. *Curr Opin insect Sci* 31: 114–122.
- Phillips, D.L., Inger, R., Bearhop, S., Jackson, A.L., Moore, J.W., Parnell, A.C., et al. (2014) Best practices for use of stable isotope mixing models in food-web studies. *Can J Zool* 92: 823–835.
- Phillips, D.L. & Koch, P.L. (2002) Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models. *Oecologia* 130: 114–125.
- Pingram, M.A., Collier, K.J., Hamilton, D.P., David, B.O., & Hicks, B.J. (2012) Carbon sources supporting large river food webs: a review of ecological theories and evidence from stable isotopes. *Freshw Rev* 5: 85–103.
- Post, D.M. (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83: 703–718.
- Power, M.E. & Dietrich, W.E. (2002) Food webs in river networks. *Ecol Res* 17: 451–471.
- Prasad, R.B.N. & Gülz, P.G. (1989) Composition of Lipids of Beech (*Fagus sylvatica* L.) Seed Oil. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci* 44: 735–738.
- Quevedo-Ortiz, G., Fernández-Calero, J.M., Luzón-Ortega, J.M., López-Rodríguez, M.J., & Tierno de Figueroa, J.M. (2017) Life cycles and nymphal feeding of *Isoperla morenica*. *Aquat Insects* 38: 219–229.
- Randhir, A., Laird, D.W., Maker, G., Trengove, R., & Moheimani, N.R. (2020) Microalgae: A potential sustainable commercial source of sterols. *Algal Res* 46: 101772.
- Rasmussen, J.B. (2010) Estimating terrestrial contribution to stream invertebrates and periphyton using a gradient-based mixing model for $\delta^{13}\text{C}$. *J Anim Ecol* 79: 393–402.
- Raubenheimer, D. (2011) Toward a quantitative nutritional ecology: the right-angled mixture triangle. *Ecol Monogr* 81: 407–427.
- Ren, X., He, T., Chang, Y., Zhao, Y., Chen, X., Bai, S., et al. (2017) The genus *Alnus*, a comprehensive outline of its chemical constituents and biological activities. *Molecules* 22: 1383.
- Resemann, H.C., Lewandowska, M., Gömann, J., & Feussner, I. (2019) Membrane lipids, waxes and oxylipins in the moss model organism *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol* 60: 1166–1175.
- Richardson, J.S. (2019) Biological diversity in headwater streams. *Water* 11: 366.
- Richardson, J.S. & Chauvet, E. (2019) Consumer responses to resource patch size and architecture: leaf packs in streams. *Fundam Appl Limnol für Hydrobiol* 192: 255–261.
- Richardson, J.S., Hoover, T.M., & Lecerf, A. (2009) Coarse particulate organic matter dynamics in small streams: towards linking function to physical structure. *Freshw Biol* 54: 2116–2126.
- Richardson, J.S. & Sato, T. (2015) Resource subsidy flows across freshwater–terrestrial boundaries and influence on processes linking adjacent ecosystems. *Ecohydrology* 8: 406–415.
- Rielley, G., Collier, R.J., Jones, D.M., & Eglinton, G. (1991) The biogeochemistry of Ellesmere Lake, UK—I: source correlation of leaf wax inputs to the sedimentary lipid record. *Org Geochem* 17: 901–912.
- Roche, K.R., Aubeneau, A.F., Xie, M., Aquino, T., Bolster, D., & Packman, A.I. (2016) An integrated experimental and modeling approach to predict sediment mixing from benthic burrowing behavior. *Environ Sci Technol* 50: 10047–10054.

- Rosemond, A.D., Mulholland, P.J., & Brawley, S.H. (2000) Seasonally shifting limitation of stream periphyton: response of algal populations and assemblage biomass and productivity to variation in light, nutrients, and herbivores. *Can J Fish Aquat Sci* 57: 66–75.
- Rosenfeld, J. & Roff, J.C. (1991) Primary production and potential availability of autochthonous carbon in southern Ontario streams. *Hydrobiologia* 224: 99–109.
- Rosi-Marshall, E.J., Vallis, K.L., Baxter, C. V., & Davis, J.M. (2016) Retesting a prediction of the River Continuum Concept: autochthonous versus allochthonous resources in the diets of invertebrates. *Freshw Sci* 35: 534–543.
- Rosi-Marshall, E.J. & Wallace, J.B. (2002) Invertebrate food webs along a stream resource gradient. *Freshw Biol* 47: 129–141.
- Rott, E., Cantonati, M., Füreder, L., & Pfister, P. (2006) Benthic algae in high altitude streams of the Alps—a neglected component of the aquatic biota. *Hydrobiologia* 562: 195–216.
- Ruess, L. & Müller-Navarra, D. (2019) Essential biomolecules in food webs. *Front Ecol Evol* 7: 269.
- Sanpera-Calbet, I., Lecerf, A., & Chauvet, E. (2009) Leaf diversity influences in-stream litter decomposition through effects on shredders. *Freshw Biol* 54: 1671–1682.
- Sardenne, F., Bodin, N., Latour, J.C.-T., & McKindsey, C.W. (2020) Influence of lipid separation on the trophic interpretation of fatty acids. *Food Webs* 24: e00146.
- Solomon, C.T., Carpenter, S.R., Clayton, M.K., Cole, J.J., Coloso, J.J., Pace, M.L., et al. (2011) Terrestrial, benthic, and pelagic resource use in lakes: results from a three-isotope Bayesian mixing model. *Ecology* 92: 1115–1125.
- Sörensen, B. (2012) The alpha-linolenic acid requirements of developing heliothines.
- Stanley, D. & Kim, Y. (2019) Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biosynthesis and biological actions. *Front Physiol* 9: 1927.
- Strahler, A.N. (1957) Quantitative Analysis of Watershed Geomorphology, Transactions of the American Geophysical Union. *Trans Am Geophys Union* 38: 913–920.
- Suren, A.M. & Winterbourn, M.J. (1991) Consumption of aquatic bryophytes by alpine stream invertebrates in New Zealand. *New Zeal J Mar Freshw Res* 25: 331–343.
- Sushchik, N.N., Gladyshev, M.I., Moskvichova, A. V., Makhutova, O.N., & Kalachova, G.S. (2003) Comparison of fatty acid composition in major lipid classes of the dominant benthic invertebrates of the Yenisei river. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 134: 111–122.
- Svoboda, J.A. (1999) Variability of metabolism and function of sterols in insects. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 34: 49–57.
- Svoboda, J.A., Kaplanis, J.N., Robbins, W.E., & Thompson, M.J. (1975) Recent developments in insect steroid metabolism. *Annu Rev Entomol* 20: 205–220.
- Taipale, S., Strandberg, U., Peltomaa, E., Galloway, A.W.E., Ojala, A., & Brett, M.T. (2013) Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes. *Aquat Microb Ecol* 71: 165–178.
- Taipale, S.J., Brett, M.T., Hahn, M.W., Martin-Creuzburg, D., Yeung, S., Hiltunen, M., et al. (2014) Differing *Daphnia magna* assimilation efficiencies for terrestrial, bacterial, and algal carbon and fatty acids. *Ecology* 95: 563–576.
- Taipale, S.J., Hiltunen, M., Vuorio, K., & Peltomaa, E. (2016) Suitability of phytosterols alongside fatty acids as chemotaxonomic biomarkers for phytoplankton. *Front Plant Sci* 7: 212.
- Tanaka, T., Thingstad, T.F., Christaki, U., Colombet, J., Cornet-Barthaux, V., Courties, C., et al. (2011) Lack of P-limitation of phytoplankton and heterotrophic prokaryotes in surface waters of three anticyclonic eddies in the stratified Mediterranean Sea. *Biogeosciences* 8: 525–538.
- Tank, J.L., Rosi-Marshall, E.J., Griffiths, N.A., Entekin, S.A., & Stephen, M.L. (2010) A review of allochthonous organic matter dynamics and metabolism in streams. *J North Am Benthol Soc* 29: 118–146.

- Taylor, B.R. & Andrushchenko, I. V (2014) Interaction of water temperature and shredders on leaf litter breakdown: a comparison of streams in Canada and Norway. *Hydrobiologia* 721: 77–88.
- Taylor, B.R. & Chauvet, E.E. (2014) Relative influence of shredders and fungi on leaf litter decomposition along a river altitudinal gradient. *Hydrobiologia* 721: 239–250.
- Team, R.C. (2013) R: A language and environment for statistical computing.
- Teshima, S.-I., Ceccaldi, H.J., Patrois, J., & Kanazawa, A. (1975) Bioconversion of desmosterol to cholesterol at various stages of molting cycle in *Palaemon serratus* Pennant, Crustacea Decapoda. *Comp Biochem Physiol Part B Comp Biochem* 50: 485–489.
- Teshima, S.-I., Kanazawa, A., Koshio, S., & Horinouchi, K. (1989) Lipid metabolism of the prawn *Penaeus japonicus* during maturation: variation in lipid profiles of the ovary and hepatopancreas. *Comp Biochem Physiol Part B Comp Biochem* 92: 45–49.
- Thorp, J.H. & DeLong, M.D. (2002) Dominance of autochthonous autotrophic carbon in food webs of heterotrophic rivers. *Oikos* 96: 543–550.
- Thorp, J.H. & DeLong, M.D. (1994) The riverine productivity model: an heuristic view of carbon sources and organic processing in large river ecosystems. *Oikos* 305–308.
- Thorp, J.H., Thoms, M.C., & DeLong, M.D. (2006) The riverine ecosystem synthesis: biocomplexity in river networks across space and time. *River Res Appl* 22: 123–147.
- Tocher, D.R., Bell, J.G., Dick, J.R., Henderson, R.J., McGhee, F., Michell, D., & Morris, P.C. (2000) Polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation and the effects of dietary linseed and rapeseed oils. *Fish Physiol Biochem* 23: 59–73.
- Tocher, D.R., Betancor, M.B., Sprague, M., Olsen, R.E., & Napier, J.A. (2019) Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA: bridging the gap between supply and demand. *Nutrients* 11: 89.
- Tockner, K., Uehlinger, U., & Robinson, C.T. (2009) Rivers of Europe, Academic Press.
- Toman, M.J. & Dall, P.C. (1997) The diet of *Erpobdella octoculata* (Hirudinea: Erpobdellidae) in two Danish lowland streams. *Arch für Hydrobiol* 549–563.
- Torres-Ruiz, M. & Wehr, J.D. (2010) Changes in the nutritional quality of decaying leaf litter in a stream based on fatty acid content. *Hydrobiologia* 651: 265–278.
- Torres-Ruiz, M. & Wehr, J.D. (2019) Complementary information from fatty acid and nutrient stoichiometry data improve stream food web analyses. *Hydrobiologia* 847: 629–645.
- Torres-Ruiz, M., Wehr, J.D., & Perrone, A.A. (2010) Are net-spinning caddisflies what they eat? An investigation using controlled diets and fatty acids. *J North Am Benthol Soc* 29: 803–813.
- Torres-Ruiz, M., Wehr, J.D., & Perrone, A.A. (2007) Trophic relations in a stream food web: importance of fatty acids for macroinvertebrate consumers. *J North Am Benthol Soc* 26: 509–522.
- Trap, J., Akpa-Vinceslas, M., Margerie, P., Boudsocq, S., Richard, F., Decaëns, T., and Aubert, M. (2017) Slow decomposition of leaf litter from mature *Fagus sylvatica* trees promotes offspring nitrogen acquisition by interacting with ectomycorrhizal fungi. *J Ecol* 105: 528–539.
- Trap, J., Bureau, F., Perez, G., & Aubert, M. (2013) PLS-regressions highlight litter quality as the major predictor of humus form shift along forest maturation. *Soil Biol Biochem* 57: 969–971.
- Treignier, C., Tolosa, I., Grover, R., Reynaud, S., & Sa, C.F.-P. (2009) Carbon isotope composition of fatty acids and sterols in the scleractinian coral *Turbinaria reniformis*: Effect of light and feeding. *Limnol Oceanogr* 54: 1933–1940.
- Turunen, J., Muotka, T., & Aroviita, J. (2020) Aquatic bryophytes play a key role in sediment-stressed boreal headwater streams. *Hydrobiologia* 847: 605–615.
- Twining, C.W., Josephson, D.C., Kraft, C.E., Brenna, J.T., Lawrence, P., & Flecker, A.S. (2017) Limited seasonal variation in food quality and foodweb structure in an Adirondack stream: Insights from fatty acids. *Freshw Sci* 36: 877–892.

- Twining, C.W., Taipale, S.J., Ruess, L., Bec, A., Martin-Creuzburg, D., & Kainz, M.J. (2020) Stable isotopes of fatty acids: current and future perspectives for advancing trophic ecology. *Philos Trans R Soc B* 375: 20190641.
- Vance, D.E. & Vance, J.E. (1985) Biochemistry of lipids and membranes, *Benjamin/Cummings Pub. Co.*
- Vannote, R.L., Minshall, G.W., Cummins, K.W., Sedell, J.R., & Cushing, C.E. (1980) The river continuum concept. *Can J Fish Aquat Sci* 37: 130–137.
- Vera, A. (2005) Stratégies de développement du copépode calanoïde *Mixodiaptomus laciniatus* dans un lac de montagne: approche par les biomarqueurs lipidiques et pigmentaires To cite this version : HAL Id : tel-00684181.
- Verberk, W.C.E.P., Siepel, H., & Esselink, H. (2008) Life-history strategies in freshwater macroinvertebrates. *Freshw Biol* 53: 1722–1738.
- Verneaux, J. (1977) Sondages quantitatifs de la faune benthique des eaux vives des environs de Besse-en-Chandesse (Puy-dDe_Dôme). Données écologiques. *Annales de Besse-en-Chandesse*. p. 3-37.
- Veyret-Mekdjian, Y. & Dubois, J.-J.(2002) Géographie physique: milieux et environnement dans le système terre, Armand Colin.
- Volkman, J.K. (2016) Sterols in microalgae. In *The physiology of microalgae*. Springer, pp. 485–505.
- Volkman, J.K. (2003) Sterols in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 495–506.
- Wallace, J.B., Eggert, S.L., Meyer, J.L., & Webster, J.R. (1997) Multiple trophic levels of a forest stream linked to terrestrial litter inputs. *Science (80-)* 277: 102–104.
- Wallace, J.B. & Webster, J.R. (1996) The role of macroinvertebrates in stream ecosystem function. *Annu Rev Entomol* 41: 115–139.
- Wang, S.W., Budge, S.M., Iken, K., Gradinger, R.R., Springer, A.M., & Wooller, M.J. (2015) Importance of sympagic production to Bering Sea zooplankton as revealed from fatty acid-carbon stable isotope analyses. *Mar Ecol Prog Ser* 518: 31–50.
- Webb-Robertson, B.-J., Bunn, A.L., & Bailey, V.L. (2011) Phospholipid fatty acid biomarkers in a freshwater periphyton community exposed to uranium: discovery by non-linear statistical learning. *J Environ Radioact* 102: 64–71.
- Webster, J.R. & Benfield, E.F. (1986) Vascular plant breakdown in freshwater ecosystems. *Annu Rev Ecol Syst* 17: 567–594.
- Webster, J.R., Covich, A.P., Tank, J.L., & Crockett, T. V (1994) Retention of coarse organic particles in streams in the southern Appalachian Mountains. *J North Am Benthol Soc* 13: 140–150.
- Weete, J.D., Abril, M., & Blackwell, M. (2010) Phylogenetic distribution of fungal sterols. *PLoS One* 5: 3–8.
- Wellnitz, T.A. & Ward, J. V (1998) Does light intensity modify the effect mayfly grazers have on periphyton? *Freshw Biol* 39: 135–149.
- Wetzel, R.G. (2001) Limnology: lake and river ecosystems, gulf professional publishing.
- Wiktorowska-Owczarek, A., Berezinska, M., & Nowak, J.Z. (2015) PUFAs: structures, metabolism and functions. *Adv Clin Exp Med* 24: 931–941.
- Winkelmann, C. & Koop, J.H.E. (2007) The management of metabolic energy storage during the life cycle of mayflies: a comparative field investigation of the collector-gatherer *Ephemera danica* and the scraper *Rhithrogena semicolorata*. *J Comp Physiol B* 177: 119–128.
- Wögerbauer, C.M. & Kelly-Quinn, M. (2013) Seasonal variation in diet and feeding strategy of three mayfly species. In *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*. JSTOR, pp. 211–226.
- Wootton, K.L. (2017) Omnivory and stability in freshwater habitats: Does theory match reality? *Freshw Biol* 62: 821–832.
- Wotton, R.S. (2007) Do benthic biologists pay enough attention to aggregates formed in the water column of streams and rivers? *J North Am Benthol Soc* 26: 1–11.

- Xu, H., Cao, L., Zhang, Y., Johnson, R.B., Wei, Y., Zheng, K., & Liang, M. (2017) Dietary arachidonic acid differentially regulates the gonadal steroidogenesis in the marine teleost, tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*), depending on fish gender and maturation stage. *Aquaculture* 468: 378–385.
- Xu, H., Zhang, Y., Luo, K., Meng, X., Luan, S., Cao, B., et al. (2017) Arachidonic acid in diets for early maturation stages enhances the final reproductive performances of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 479: 556–563.
- Ylla, I., Romani, A.M., & Sabater, S. (2007) Differential effects of nutrients and light on the primary production of stream algae and mosses. *Fundam Appl Limnol für Hydrobiol* 170: 1–10.
- Young, M.R., Cosgrove, P.J., & Hastie, L.C. (2001) The extent of, and causes for, the decline of a highly threatened naiad: *Margaritifera margaritifera*. In *Ecology and evolution of the freshwater mussels Unionoida*. Springer, pp. 337–357.
- Zah, R., Burgherr, P., Bernasconi, S.M., & Uehlinger, U. (2001) Stable isotope analysis of macroinvertebrates and their food sources in a glacier stream. *Freshw Biol* 46: 871–882.
- Zenteno, L., Cárdenas, L., Valdivia, N., Gómez, I., Höfer, J., Garrido, I., & Pardo, L.M. (2019) Unraveling the multiple bottom-up supplies of an Antarctic nearshore benthic community. *Prog Oceanogr* 174: 55–63.
- Ziegler, S.E. & Lyon, D.R. (2010) Factors regulating epilithic biofilm carbon cycling and release with nutrient enrichment in headwater streams. *Hydrobiologia* 657: 71–88.

Annexe

Annexe

Caractéristiques des macroinvertébrés étudiés au cours de la thèse.

Plécoptères



Protonemura praecox praecox (Morton, 1894)

Biotope : Sources et ruisselets de moyenne altitude.

Cycle de vie : Univoltin – Emergences de février à mai.

Mode d'alimentation : Broyeurs

Type de nourriture (genre) : Débris végétaux >1mm ; Débris organiques <1mm; Microphytes.

D'après Tachet et al. (2000) – Vinçon & Ravizza (2005)



g. Leuctra espèce *despaxi* ? et espèce *flavomaculata* ?

Biotope : du crénel au rhithral.

Cycle de vie : Semivoltin – Emergences de mai à juillet/août.

Mode d'alimentation : Broyeurs – racleurs – mangeur de sédiments

Type de nourriture (genre) : Débris organiques <1mm ; Débris végétaux >1mm ; Macrophytes ; Microphytes ; Animaux morts.

D'après Tachet et al. (2000) – Thomsen & Friberg (2002)



Isoperla ambigua (Despax, 1936)

Biotope : sources et ruisseaux de montagne (Massif Central)

Cycle de vie : Univoltin – Emergences de mai à juillet.

Mode d'alimentation : Broyeurs-Prédateurs- brouteurs

Type de nourriture (genre) : Macro & Micro invertébrés ; Microphytes ; Débris organiques <1mm.

D'après Tachet et al. (2000) – Berthélemy (1965) - Labat (2013)

Éphéméroptères



g. *Ecdyonurus* espèce angelieri ? ou espèce parahelveticus/alpinus ?

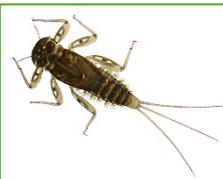
Biotope : torrents et ruisseaux de montagne

Cycle de vie : Univoltin – Emergences de mai à octobre

Mode d'alimentation : Brouteurs – broyeurs

Type de nourriture (genre) : Débris végétaux >1mm ; Microphytes ; Débris organiques <1mm ; sédiments fins et microorganismes.

D'après Tachet et al. (2000) – Lavandier & Dumas (1971) – Labat (2013)



Rhithrogena groupe *semicolorata* (Curtis, 1834)

Biotope : Rhithral

Cycle de vie : Univoltin – Emergences mi-mai à mi-juillet (Hte-vallée de l'Allier – 43)

Mode d'alimentation : Brouteurs – mangeurs de sédiments fins

Type de nourriture (genre) : Microphytes ; Macrophytes ; Débris organiques <1mm.

D'après Tachet et al. (2000) – Winkelmann & Koop (2007)



Baetis *lutheri* (Müller-Liebenau, 1967)

Biotope : ruisseaux et rivières rapides des massifs montagneux

Cycle de vie : Bivoltin – Une cohorte automnale (émergence juin) et une cohorte estivale (émergence en octobre)

Mode d'alimentation : Brouteurs – Collecteurs - mangeurs de sédiments

Type de nourriture (genre) : Microphytes ; Débris organiques <1mm ; Débris végétaux >1mm.

D'après Tachet et al. (2000) – Humpesch (1979) - Labat (2013)

Trichoptères



Odontocerum albicorne (Scopoli, 1763)

Biotope : Crénal et Rhithral – substrats grossiers

Cycle de vie : Univoltin (Semivoltin rare) – Emergences juin et été

Mode d'alimentation : Broyeurs – prédateurs

Type de nourriture de l'espèce : Macrophytes; Microphytes; Macro & Microinvertébrés.
D'après Tachet et al. (2000) – Elliott (1982)



g. Rhyacophila - 2 espèces : dont une serait *praemorsa* ?

Biotope : Crénal-Rhithral

Cycle de vie : Le genre est surtout univoltin

Mode d'alimentation : Prédateurs – broyeurs



Type de nourriture (genre) : Macro & Microinvertébrés; Microphytes;
Débris organiques <1mm.

D'après Tachet et al. (2000)

Amphipodes



Gammarus pulex (Linnaeus, 1758)

Biotope : Ruisseaux-Rivières > 400 m alt. dans le Massif central)

Cycle de vie : 2-3 ans – Reproduction estivale (4-6 couvées)

Mode d'alimentation : Broyeurs – racleurs

Type de nourriture (genre) : Débris végétaux >1mm ; Microphytes ; Débris organiques <1mm ;
Macrophytes ; invertébrés morts.

D'après Tachet et al. (2000) – Goedmakers (1974)

Achètes



Erpobdella octoculata (Linnaeus, 1758)

Biotope : Crénal-Rhithral

Cycle de vie : 2 ans – Reproduction estivale

Mode d'alimentation : Prédateurs

Type de nourriture de l'espèce : Macroinvertébrés - Microinvertébrés

D'après Tachet et al. (2000) – Elliott (1973)

Remerciements

En premier, je remercie le CNRS et l'INEE pour le suivi et le financement de ma thèse. Je remercie les Directeurs d'Unités, le Dr Téléphore Sime-Ngando et le Dr Didier Debroas, pour mon accueil au sein du LMGE. Je remercie le Pr Christian Desvillettes de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer une thèse et de prétendre au titre de Docteur. Je remercie également Mme Nathalie Fruquière et Brigitte Chebance pour leur collaboration concernant la gestion administrative nécessaire au bon déroulement de ma thèse. Je remercie les membres de mon équipe IRTA (Delphine Latour, Clarisse Mallet, Alexandre Bec, Apostolos-Manuel Koussoroplis, Jean-François Carrias, Hélène Le Jeune, Fanny Perrière, Thomas Ruiz et Amélie Larmarck) et les membres de l'équipe BIOADAPT (Jonathan Colombet et Hermine Billard) pour leur soutien aux échantillonnages dans le ruisseau d'Anglard malgré le mauvais temps à certaines périodes. Je remercie Corinne Mestas pour la gestion de notre accueil à la station biologique de Besse-en-Chandesse permettant la bonne réalisation des prélèvements en milieu naturel sur le ruisseau d'Anglard. Je remercie M. Patrick Martin, le directeur du CNSS, pour m'avoir permis de réaliser mon expérience en conditions semi-naturelles par la mise à disposition du bief.

En second, je remercie le Dr Alexandre Bec et le Dr Apostolos-Manuel Koussoroplis de l'équipe IRTA, ainsi que le Dr Michael Danger, le Dr Vincent Felten et le Dr Martin Laviale du LIEC (Université de Lorraine) avec qui j'ai collaboré pour la soumission de mes deux premiers articles scientifiques en tant que premier auteur. Je les remercie tout particulièrement pour leur bonne humeur lors des expériences sur le terrain et les échanges très bénéfiques à ma thèse.

Je remercie mes 3 stagiaires (Théo Aurand, Floriane Martin et Corentin Mouveaux), lesquels ont tous montré de la persévérance malgré les aléas des travaux du bâtiment du LMGE qui ont fortement perturbé les travaux de recherche. Je les remercie également d'avoir accepté de venir en aide aux expériences au CNSS du projet IFODPSYLO en plus de leur temps consacrer à leur stage.

Je remercie chaudement et avec cœur mes collègues et mes amis du LMGE pour leur bonne humeur et leurs soutiens au cours de ma thèse, Delphine, Clarisse, Laurianne, Louis, Florent, Hélène, Brigitte, Lucie et les amis du fameux bureau bleu : Benjamin, Thomas et Amélie.

En dernier, je remercie les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de m'évaluer pour l'obtention du grade de Docteur, Dr Frédéric Santoul (Université de Toulouse), Pr Christine Dupuys (Université de La Rochelle), Dr Nabil Majdj (Université de Bielefeld, Allemagne), Dr Clarisse Mallet (Université Clermont Auvergne) et Dr Hélène Masclaux (Université de Bourgogne).