

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE VENAM

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Bases biologiques de la prolifération
d'un Gastéropode invasif de la côte Atlantique européenne,
Crepidula fornicata

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Océanologie biologique
Spécialité : Écologie et biologie côtières

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Alexandra VALDIZAN

Le 25 mars 2011, devant le jury ci-dessous

Président M. Joël FLEURENCE, Professeur, Université de Nantes
Rapporteurs M. Gaël LE PENNEC, Maître de conférences, Université Européenne de Bretagne
M. David THIELTGES, Chercheur, Royal Netherlands Institute for Sea Research
Examineurs M. Laurent BARILLÉ, Professeur, Université de Nantes
M. Pierre-Guy SAURIAU, Chercheur CNRS, La Rochelle
M^{me} Frédérique VIARD, Directrice de recherche CNRS, Roscoff
Invité M. Philippe GLIZE, Conseiller aquacole, SMIDAP

*Directeur de thèse : M. Peter G. BENINGER, Professeur, Université de Nantes
Co-encadrant de thèse : M. Bruno COGNIE, Maître de conférence, Université de Nantes*

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE VENAM

Année 2011

Bases biologiques de la prolifération
d'un Gastéropode invasif de la côte Atlantique
européenne, *Crepidula fornicata*

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Océanologie biologique
Spécialité : Écologie et biologie côtières



Présentée

et soutenue publiquement par

Alexandra VALDIZAN

" Le vrai tombeau des morts, c'est le cœur des vivants "

Jean Cocteau (1889-1963)

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu le professeur Peter G. BENINGER, pour sa confiance, son implication dans ma thèse, l'amour de la biologie qu'il m'a transmise et au-delà de la science, pour sa gentillesse et ses conseils quand je n'allais pas bien.

Merci Bruno pour la qualité de ton encadrement, tes soutiens, tes conseils, ta patience, et la façon (sans le montrer) dont tu as toujours essayé de me protéger. Merci.

Merci ma Prisci pour ta contribution, ton implication dans ma thèse, alors que tu n'y étais pas obligée. Depuis mon master 2 tu es pour moi ma "grande sœur" Crépi du laboratoire, si forte et quelque fois tellement sensible!

Je remercie M^r François POUCHUS et M^r Joël FLEURENCE qui ont permis la réalisation de ces travaux en m'accueillant au sein de leur laboratoire.

Je remercie les différents organismes qui ont financé les études réalisées au cours de cette thèse: le Conseil Général de Loire-Atlantique pour l'allocation de recherche qui m'a été attribuée, et le Conseil Régional des Pays de Loire associé au SMIDAP pour avoir financé notre étude sur la recherche d'une technique innovante pour diminuer la biomasse de la crépidule.

Merci à tous ceux qui m'ont accompagné pour ramasser mes crépi, été comme hiver, Bruno, Mickaël, Pierre, Prisci, ma petite Anna et son papa, et mon petit Jérôme. Mais bien sûr merci à Philippe avec lequel j'ai fait presque tout ces prélèvements, en musique, de bonne humeur, sur la plage pour déjeuner, nos cafés, notre baignade, sa gentillesse et merci mille fois de m'avoir sortie de la vase!!! Merci à Pierre pour son aide dans le 'labo' commun, et bien sûr à Philippe qui m'a beaucoup aidé pendant mon Master 2 et au cours de ma thèse, surtout pour porter des choses lourdes (j'avoue je suis une crevette comparé à toi)!

Je remercie M^r Laurent Barillé, et oui je reviens un peu en arrière mais cela a été un réel plaisir d'effectuer mon stage de Master 1 avec vous!

Je remercie Monsieur Cédric Gaillard de l'INRA de Nantes ainsi que Monsieur Gaël Le Pennec de l'UBS pour le temps qu'ils ont passé à régler le knifemaker et à m'enseigner à utiliser l'ultramicrotome. Je remercie également Madame Miegville de la faculté de médecine de Nantes pour m'avoir gentiment enseigné le protocole permettant d'observer les spermatozoïdes au MEB.

Je remercie mon autre famille d'accueil du CMC de l'IMN, pour leur accueil, leur gentillesse, leur aide si précieuse, et les pauses café du matin! Merci à Stéphane et Nicolas pour les superbes photos MEB que j'ai pu obtenir et à Alain Barreau avec qui j'ai également apprécié

travailler en écoutant "Simon & Garfunkel" ou encore de la musique classique! Un GRAND merci à Éric, Nicolas et Luc, déjà pour leur bonne humeur, leur réconfort quand j'avais quelques problèmes (!), et surtout de m'avoir totalement intégré à l'équipe: je pense aux galettes des rois, à nos fous rires sur les pompiers et bien plus encore...MERCII !!!

Je remercie Mickaël et Madame Aumaille pour leur aide si précieuse en histologie. Merci Mickaël pour tes conseils pour beaucoup d'autres "manips", et Madame Aumaille pour votre gentillesse, votre compréhension, et vos sourires quand tout n'était pas si rose pour moi. Merci Vincent pour ta gentillesse, ton humour et tes multiples aides en informatique!

Merci à toutes mes petites fourmis, mes stagiaires qui ont égayé mes journées de "manips". Je pense surtout à ma Marine, qui commence aujourd'hui sa thèse à Nouméa, je ne t'oublierais jamais, à nos rigolades et à nos pleurs quand tu es partie, tu as été plus qu'une stagiaire pour moi, aujourd'hui tu es une vraie amie.

Je remercie tous les membres du laboratoires de Biologie Marine de l'Université de Nantes, ainsi que tous les "habitants" d'hier de la salle dite des "thésards", je n'oublie pas Astrid (que de conversations sur nos passions), Cindy, Rozenn, Mickaël pour leur gentillesse; et je pense aussi à un ancien doctorant dit du 1^{ère} étage mon pti Dim, bravo pour ton parcours, et vivement août pour ton mariage! Merci à mes miss d'aujourd'hui, pour leur soutien, leur bonne humeur, nos fous rires et nos dialogues franco-hispaniques, à ma petite Sigrid, à ma grande Mathilde, ma Melha, à mes copines espagnoles Nuria, Inma, Martha, et également à Inna ! Merci à ma belette, ma petite Anna, tu as été mon premier rayon de soleil qui est arrivé dans ce labo, nous sommes pour certain très différentes, toi rugbygirl et extravertie, moi sophro et timide, mais au fond on se ressemble tellement (ne m'efface pas de Facebook ma puce!!).

Je remercie mes amis pour leur soutien si précieux: ma petite Anne-So et Dim, ma Clairette, mon pti Nico, ma Raphaëlle (j'ai hâte d'être tata!), ma picina Francesca, Julien et Vaness, ma grande Agnès.

Enfin je remercie toute ma petite famille des 4 (+1!): ma maman pour sa gentillesse et ses conseils sur la vie, mon papa pour son courage et l'amour qu'il me porte, ma Johanna sans toi ma vie aurait été morose, quelle chance de t'avoir comme sœur, et mon petit chien Yps qui s'est rajouté à notre famille, pour son amour, son caractère (bien trempé!) et sa présence quand il sent que je ne vais pas bien. Je vous aime tous les 5! Je ne t'oublie pas Brice, tu es le meilleur beau-frère dont j'aurais pu rêver !

Merci à ma petite famille française que j'aime très fort y a mi grande familia peruana tengo tanta ganas de verlos, los quiero michiisssiiimo !!!!

A mon Taupi pour son amour, nos accrochages réconfortants et les petits plats délicieux qu'il me concocte tous les jours surtout quand il fallait que je grossisse. A toi, à moi, à nous, à la petite famille qu'on construira tout les deux. Je t'aime.

Papa ça y est ta petite Sana va devenir "Docteur Valdizan" comme toi! Je resterais toujours le papillon de tes rêves, comme toi tu resteras à jamais en moi ...

TABLE DES MATIÈRES

PREMIER CHAPITRE: INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. INTRODUCTIONS ET INVASIONS BIOLOGIQUES EN MILIEU MARIN	- 1 -
A. La mondialisation: intensification de l'introduction d'espèces	- 1 -
B. Réchauffement climatique et invasions marines	- 2 -
C. Parasites et invasions marines	- 2 -
1.2. HISTORIQUE DE L'INTRODUCTION D'UNE ESPÈCE INVASIVE : LA CRÉPIDULE	- 3 -
A. Introduction de la crépidule en Europe	- 3 -
B. Introduction de la crépidule en France	- 4 -
1.3. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DE LA CRÉPIDULE : CLASSIFICATION, ANATOMIE ET RAISON DE SON SUCCÈS INVASIF	- 7 -
A. Sa classification	- 7 -
B. Sa biologie générale	- 7 -
C. Particularités ayant favorisé sa rapide prolifération	- 10 -
1.4. LA REPRODUCTION DE LA CREPIDULE : ÉTAT DES CONNAISSANCES ACTUELLES	- 11 -
A. Un système de reproduction original	- 11 -
B. Organe de stockage des spermatozoïdes et accouplement chez <i>Crepidula fornicata</i>	- 16 -
a. Vésicule et réceptacle séminaux	
b. Déroulement de l'accouplement	
C. Fécondation et encapsulation des œufs de <i>Crepidula fornicata</i>	- 19 -
D. Le développement embryonnaire et larvaire chez la crépidule	- 21 -
a. Le développement intracapsulaire	
b. Développement de la larve véligère dans la colonne d'eau	
c. La métamorphose	
1.5. UN ESPACE ENVAHI PAR LA CREPIDULE: LA BAIE DE BOURGNEUF	- 28 -
A. Présentation de la baie de Bourgneuf: patrimoine biologique et ressources économiques	- 28 -
B. <i>Crepidula fornicata</i> dans la baie de Bourgneuf	- 29 -
C. Conséquences de cette prolifération dans la baie	- 31 -
1.6. TECHNIQUES D'INTERVENTION POUR DIMINUER SA BIOMASSE	- 34 -
A. Stratégie d'élimination de la crépidule	- 34 -
B. Essai de valorisation de la crépidule	- 34 -
C. Action de lutte contre la crépidule dans la baie de Bourgneuf	- 35 -
1.7. INTÉRÊTS ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	- 37 -

SECOND CHAPITRE: ÉTUDE DU CYCLE SEXUEL DE L'ESPÈCE INVASIVE *CREPIDULA FORNICATA* DANS LA BAIE DE BOURGNEUF

<u>CONTEXTE DES TRAVAUX</u>	- 39 -
<u>ÉTUDE DU CYCLE SEXUEL DE <i>CREPIDULA FORNICATA</i></u>	- 41 -
2.1. ABSTRACT	- 41 -
2.2. RÉSUMÉ	- 42 -
2.3. INTRODUCTION	- 43 -
2.4. MATERIALS AND METHODS	- 44 -
A. Specimen sampling and histological processing	- 45 -
B. Reproductive dynamics analysis	- 45 -
C. Gamete status within the seminal receptacle and vesicle	- 46 -
D. Brood Presence	- 47 -
E. Determination of oocyte diameters	- 47 -
F. Data analysis	- 47 -
2.5. RESULTS	- 48 -
A. Males	- 48 -
a. Histological aspect	
b. Reproductive cycle	
c. Activity of the seminal vesicle	
B. Females	- 53 -
a. Histological aspect	
b. Reproductive cycle	
c. Oocyte diameters	
d. Activity of the seminal receptacle	
2.6. DISCUSSION	- 57 -
A. Reproductive events underlying brooding and nonbrooding phases	- 57 -
B. Importance of the sperm storage organs	- 59 -
2.7. AKNOWLEDGEMENTS	- 60 -

TROISIÈME CHAPITRE: EFFETS DU RÉCHAUFFEMENT DE L'EAU DANS LA BAIE DE BOURGNEUF SUR LE CYCLE DE REPRODUCTION DE *CREPIDULA* *FORNICATA*

<u>CONTEXTE DES TRAVAUX</u>	- 61 -
<u>RÉCHAUFFEMENT DE LA TEMPÉRATURE DE L'EAU ET SUCCÈS REPRODUCTEUR DE L'ESPÈCE INVASIVE <i>CREPIDULA FORNICATA</i></u>	- 63 -
3.1. ABSTRACT	- 63 -
3.2. RÉSUMÉ	- 64 -

3.3. INTRODUCTION	- 64 -
3.4. MATERIALS AND METHODS	- 66 -
A. Specimen sampling, histological preparation and reproductive dynamics analysis	- 66 -
B. Water temperature over the sampling periods, historical water temperature and chlorophyll <i>a</i>	- 67 -
C. Data analysis	- 68 -
3.5. RESULTS	- 68 -
A. Gametogenic cycle stability of <i>C. fornicata</i> , 2000 - 2001 vs 2006 - 2007	- 68 -
a. Males	
b. Females	
B. Environmental variations	- 72 -
a. Historical variations in water temperature and chlorophyll <i>a</i>	
b. Influence of temperature and chlorophyll <i>a</i> on the reproductive cycle of <i>Crepidula fornicata</i>	
3.6. DISCUSSION	- 77 -
A. Reproductive cycles	- 77 -
a. Extended period of brood presence	
b. Greater intensity of reproductive activity	
B. Influence of water temperature and chlorophyll <i>a</i> on reproductive cycle	- 79 -
C. Strength of data	- 81 -
3.7. ACKNOWLEDGEMENTS	- 82 -
QUATRIÈME CHAPITRE : ÉTUDE D'UN AGENT ALLOGÈNE PRÉSENT DANS LA GLANDE DIGESTIVE DE L'ESPÈCE INVASIVE <i>CREPIDULA FORNICATA</i>	
<u>PRELIMINARY REMARK : TERMINOLOGY</u>	- 83 -
<u>REMARQUE PRÉLIMINAIRE : TERMINOLOGIE</u>	- 83 -
4.1. ABSTRACT	- 83 -
4.2. RÉSUMÉ	- 83 -
4.3. INTRODUCTION	- 84 -
4.4. MATÉRIELS ET MÉTHODES	- 85 -
A. Echantillonnage et procédé histologique	- 85 -
B. Taux d'infestation de la glande digestive, influence de la température de l'eau	- 85 -
C. Analyses statistiques	- 87 -
4.5. RÉSULTATS	- 88 -
4.6. DISCUSSION	- 90 -
4.7. ACKNOWLEDGEMENTS	- 91 -

CINQUIÈME CHAPITRE: ÉTUDE D'UNE STRATÉGIE DE DIMINUTION DE LA BIOMASSE DE *CREPIDULA FORNICATA*, ET ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT INTRACAPSULAIRE

<u>CONTEXTE DES TRAVAUX</u>	- 93 -
<u>FÉCONDATIONS EXTERNES ET ÉLEVAGES D'EMBRYONS EXCAPSULÉS: ÉVALUATION DES RISQUES LIÉS AU DRAGUAGE, BROYAGE ET RELARGUAGE SUR SITE DE <i>CREPIDULA FORNICATA</i></u>	- 95 -
5.1. ABSTRACT	- 95 -
5.2. RÉSUMÉ	- 96 -
5.3. INTRODUCTION	- 97 -
5.4. MATERIALS AND METHODS	- 98 -
A. <i>Crepidula fornicata</i> sampling	- 98 -
B. Periods of brood presence	- 98 -
C. External fertilizations	- 99 -
D. Determination of intracapsular developmental stages	- 99 -
E. Culture of excapsulated embryos and larvae	- 99 -
a. Culture method	
b. Algal consumption	
c. Mortality and growth	
F. Statistical analysis	- 101 -
5.5. RESULTS	- 101 -
A. Periods of brood presence	- 101 -
B. Intracapsular development baseline	- 101 -
C. External fertilizations	- 103 -
D. Cultures of excapsulated embryos and larvae	- 105 -
a. Culture of excapsulated early embryos and mid-stages	
b. Culture of excapsulated veligers	
5.6. DISCUSSION	- 109 -
A. Viability of non-capsulated / excapsulated embryos and mid-stages	- 109 -
B. Viability of excapsulated veligers	- 109 -
C. Biological feasibility of dredging, crushing, and on-site rejection of <i>Crepidula fornicata</i>	- 109 -
5.7. AKNOWLEDGEMENTS	- 112 -

SIXIÈME CHAPITRE: TRAVAUX EN COURS - ONGOING WORKS :

Crepidula fornicata: nature des relations physiologiques entre les spermatozoïdes et l'épithélium du réceptacle séminal & étude ultrastructurale de la morphologie des spermatozoïdes

6.1. CONTEXTE DES TRAVAUX EN COURS	- 113 -
6.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	- 115 -

A. Études ultrastructurales en microscopie électronique à balayage (MEB)	- 115 -
B. Études ultrastructurales en microscopie électronique à transmission (MET)	- 115 -
6.3. RÉSULTATS & CONCLUSIONS PRÉLIMINAIRES	- 116 -
A. Nature des relations physiologiques entre les spermatozoïdes et l'épithélium du réceptacle séminal	- 115 -
B. Étude ultrastructurale de la morphologie des spermatozoïdes	- 122 -
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	- 113 -
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 113 -

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

PREMIER CHAPITRE : INTRODUCTION GÉNÉRALE

- Figure 1.1. **Introduction de *Crepidula fornicata* en Europe.**
Aire de distribution naturelle (en vert), première introduction vers l'Europe (flèche verte), aire d'invasion (en bleu) et divers transferts vers l'Europe (flèches bleu).
(1) arrivée de la crépidule sur les côtes anglaises
(2) dispersion naturelle de la larve de crépidules vers les pays nordiques
(3) première vague d'installation des crépidules dans les eaux atlantiques françaises lors du débarquement
(4) seconde vague d'installation des crépidules en France, fixées sur les huîtres creuses importées. **5**
- Figure 1.2. **Introduction de *Crepidula fornicata* en France.**
(A) Première vague invasive lors du débarquement de 1944 (flèches et zones infestées en jaune).
(B) Seconde vague invasive lors de l'introduction de l'huître creuse (flèches et zones infestées en rouge)
(C) Prolifération de la crépidule le long des côtes françaises par l'aquaculture, les transports maritimes, les courants de marée, les activités de dragage et de chalutage (flèches et zones infestées en verte)
D'après Blanchard (1995). **6**
- Figure 1.3. **Chaînes de crépidules.**
(A) Chaîne composée d'individus fixés sur une coquille vide de crépidule
(B) Multiples chaînes fixées sur un caillou. **8**
- Figure 1.4. **Coquilles de *Crepidula fornicata*.**
(A) Faces dorsales
(B) Face dorsale et ventrale
(C) Coquille perforée par l'éponge *Cliona celata*. **8**
- Figure 1.5. **Anatomie de *Crepidula fornicata*.**
(A) Vue ventrale d'une crépidule dans sa coquille
Vue ventrale (B) et vue dorsale (C) d'une crépidule sortie de sa coquille.
b = bouche, bma = bord du manteau, br = branchie, m = mufle, ma = manteau, mé = mésopodium, pr = propodium, t = tentacule **9**
- Figure 1.6. **Anatomie générale de la gonade de *Crepidula fornicata***
Vue ventrale (pied enlevé), ba = branche antérieure, bl = branches latérales, gd = glande digestive, oe = œsophage, os = organe de stockage des spermatozoïdes **10**
- Figure 1.7. **Différents stades sexuels au sein d'une chaîne de crépidule.** **11**
- Figure 1.8. **Anatomie et mise en place de la gonade chez le juvénile.**
Juvéniles en face dorsale (A) et ventrale (B) dont le pénis n'est pas encore développé (B, pied enlevé);
(C), (D) Coupes histologiques de la masse viscérale montrant la gonade juvénile.
br = branchie, es = estomac, gd = glande digestive, i = intestin, mv = masse viscérale **12**

Figure 1.9. Anatomie de la gonade et du tractus génital mâle.

(A) Schéma en vue dorsale, manteau ouvert (d'après Le Gall, 1980)

(B) Photographie en vue ventrale (pied enlevé). an = anus, co = coude de la gouttière ciliée, es = estomac, gc = gouttière ciliée, gd = glande digestive, i = intestin, spd = spermiducte, oe = œsophage, vs = vésicule séminale.

13

Figure 1.10. Inversion sexuelle chez *Crepidula fornicata*.

(A)-(C) Première étape de l'inversion sexuelle au niveau de la gonade; (A), (B) Dégénérescence des spermatozoïdes et développement des ovocytes en latence dans un tubule gonadique; (C) Spermatozoïdes totalement lysés, nombreuses ovogonies et ovocytes en développement.

(D) Seconde étape de l'inversion sexuelle au niveau anatomique, vue dorsale: apparition du tractus génital femelle, pénis peu régressé.

br = branchie, i = intestin, ovoc. dév. = ovocytes en développement, ovoc. lat. activés = ovocytes en latence activés, ovog. = ovogonies en multiplication, szd = spermatozoïdes en dégénérescence, ut = utérus, vag = vagin.

15

Figure 1.11. Anatomie de la gonade et du tractus génital femelle

(A) Schéma en vue dorsale, manteau ouvert (d'après Le Gall, 1952).

(B) Photographie en vue ventrale (pied enlevé).

an = anus, gd = glande digestive, i = intestin, oe = œsophage, ovi = oviducte, rs = réceptacle séminal, ut = utérus, vag = vagin

16

Figure 1.12. Description de la vésicule séminale (vs).

(A) Coupe histologique, testicule (test) contenant les spermatozoïdes (spz) relié à la vésicule séminale par le gonoducte (gono).

(B) Vue anatomique des ampoules (amp).

(C) Disposition anarchique des spermatozoïdes à l'intérieur des ampoules.

17

Figure 1.13. Description du réceptacle séminal (rs).

(A) Vue anatomique des ampoules (amp)

(B), (C) Coupes histologiques du réceptacle séminal, (B) les spermatozoïdes (spz) forment au sein des ampoules des zones concentriques, (C) les zones des têtes (t), très contrastées, des pièces intermédiaires (pi) et des flagelles (fl) sont bien visibles, la tête des spermatozoïdes est orientée vers les noyaux (no) de l'épithélium (ep) ampullaire.

18

Figure 1.14. Déroulement de l'accouplement chez *Crepidula fornicata* (A-D).

Photos extraites d'une vidéo prise lors d'une copulation. t = tentacule.

19

Figure 1.15. Description histologique et anatomique de l'oviducte, de l'utérus et du réceptacle séminal chez la femelle *C. fornicata*.

(A)-(E) Détails de l'utérus et du vagin, (A) Schéma d'après Martin (1985); (B) Photographie après ouverture du manteau; (C) Photographie en microscopie électronique à balayage; (D), (E) Coupes histologiques montrant l'épithélium utérin.

pg = pore génital, rs = réceptacle séminal, vag = vagin.

(F), (G) Détails de l'oviducte (ovi) permettant le transfert des ovocytes matures vers l'utérus.

21

Figure 1.16. Incubation des œufs chez *C. fornicata*.

(A) Femelle incubant une ponte.

(B) Œufs récemment fécondés réunis à l'intérieur d'une capsule ovigère.

22

Figure 1.17. Différents stades du développement intracapsulaire de *Crepidula fornicata*, (schémas modifiés d'après Conklin 1897).

(A) Œuf fécondé; (B) Embryon en division synchrone (stade 2 cellules); (C), (D) Embryons en division asynchrone avec présence de macromères (ma) et de micromères (mi); (E) Embryon au stade blastula; (F) Embryon en gastrulation, formation du blastopore (bl).

24

Figure 1.18. Développement de la larve de *Crepidula fornicata* dans la colonne d'eau (schémas modifiés d'après Werner, 1948).

(A) Jeune larve véligère ; (B) Larve véligère plus âgée; (C) Larve pédivéligère. an = anus, b = bouche, br = branchie, cc = coquille en forme de 'chausson', coe = cœur, cs = coquille spiralée, es = estomac, gd = glande digestive, ma = manteau, mé = mésopodium, mv = masse viscérale, pr = propodium, op = opercule, os = osphradie, re = rein, sc = stylet cristallin, t = tentacule, vc = vélum cilié. **25**

Figure 1.19. Anatomie d'un juvénile après la métamorphose (schémas modifiés d'après Werner 1948, 1955).

Juvénile en vue ventrale (A) et en vue dorsale (B). (B) Le contenu de la masse viscérale normalement non visible est représenté sur le schéma.

an = anus, br = branchie, cc = coquille en forme de 'chausson', coe = cœur, es = estomac, gd = glande digestive, mé = mésopodium, pr = propodium, os = osphradie, re = rein, sc = stylet cristallin, t = tentacule. **26**

Figure 1.20. Les différentes étapes de la vie larvaire pélagique de *C. fornicata* jusqu'à la métamorphose (d'après Pechenik 1984). **27**

Figure 1.21. La baie de Bourgneuf.

(A) Carte géographique de la baie.

(B), (C), (D) Particularités biologiques de la baie, (B) Réserve naturelle nationale des marais de Müllembourg, (C) Récifs d'hermelles, (D) Herbiers à zostères. **29**

Figure 1.22. Stocks de crépidule dans la baie de Bourgneuf.

(A) Découpage de la baie en 7 zones homogènes sur la base des conditions hydrodynamiques et de la nature des sédiments

(B) Estimation de la biomasse moyenne de crépidules 'mobiles' dans la zone intertidale, en fonction de la localisation géographique au sein de la baie. D'après Barillé & Barillé (2003).

Les cercles rouges indiquent les sites intertidaux présentant les plus fortes densités moyennes. Seuls les principaux gisements subtidaux sont représentés en rouge. **31**

Figure 1.23. Conséquences de la présence de la crépidule.

(A) Crépidules fixées sur des huîtres – les flèches noirs indiquent les crépidules fixées.

(B) Prélèvement à la benne sur un fond de crépidule montrant le phénomène d'envasement.

(C) Opérations de nettoyage de mollusques colonisés par des crépidules. Photos provenant de la Fiche de synthèse d'habitat "Crépidule" – Avril 2009 Ifremer.

(C) Tapis coquillier de crépidules entraînant un envasement du fond. **32**

Figure 1.24. Moyens de diminuer la biomasse de la crépidule.

(A), (B) Projet Areval, récolte industrielle de la crépidule en Baie de Saint-Brieuc au moyen d'une barge aspiratrice (<http://www.ifremer.fr/delec/projets/habitats/crepidule/areval.htm>).

(C), (D), (E) Utilisation de la crépidule comme appât pour pêcher le bar, (C) Prélèvement de crépidules sur l'estran, (D) Séparation de la chair de la coquille, (E) Chairs récoltées, regroupées puis congelées (<http://www.fishing-forum.info/sea-fishing-tips-forum/9566-slipper-limpet-tutorial-part-1-harvesting.html>).

Utilisation de la crépidule pour l'alimentation humaine, crépidules décortiquées à froid (F) et recette à base de crépidule (G) (<http://www.berlingot-de-mer.fr/recettes.html>). **36**

SECOND CHAPITRE : ÉTUDE DU CYCLE SEXUEL DE L'ESPÈCE INVASIVE CREPIDULA FORNICATA DANS LA BAIE DE BOURGNEUF

Figure 2.1. Anatomie de la partie antérieure de la masse viscérale de *Crepidula fornicata* (vue ventrale).

(A) Photographie à la loupe binoculaire montrant la localisation des sections effectuées (1) à la branche antérieure de la gonade, (marqueur externe = cœur (h)), et (2) à l'organe de stockage des spermatozoïdes (so, vésicule séminale chez les mâles, réceptacle séminal chez les femelles);
 (B) Section histologique de la branche antérieure de la gonade, montrant la gonade ainsi que les structures anatomiques présentes dans la masse viscérale. dg = digestive gland, e = esophagus, f = foot, gi = gill, i = intestine, m = mantle, p = pericardial sac. **46**

Figure 2.2. Sections histologiques du testicule et de la vésicule séminale de *Crepidula fornicata*.

(A)-(D) Tubules du testicule, (A), (B) Tubules durant la période d'activité sexuelle, montrant tout les stades de la spermatogenèse, de la lame basale (bs) vers la lumière: gamètes en développement (d) formant une couche germinale, spermatozoïdes immatures (isz) et spermatozoïdes matures (msz) libres remplissant le lumen. Des ovogonies en latence (lo) sont observées le long des parois des tubules; (C), (D) Tubules en dégénérescence durant la période de repos sexuel montrant: des spermatozoïdes résiduels dégénérés (dsz) et de l'espace unoccupé (us). Les gamètes en développement, toujours présents, sont dispersés.
 (E)-(G) Vésicule séminale, (E) Ampoule (am) de la vésicule séminale, près de l'intestin (i), remplie de spermatozoïdes matures. (F) Détail d'une ampoule connectée au testicule (t) par le gonoducte (g). (G) Détail d'une ampoule montrant l'épithélium ampullaire (e) et des spermatozoïdes matures libres dans le lumen. **50**

Figure 2.3. Résultats stéréologiques pour la gonade de *Crepidula fornicata* et température de l'eau de mars 2006 à septembre 2007.

(A) Variations saisonnières des pourcentages de spermatozoïdes matures et de gamètes en développement / spermatozoïdes immatures dans le testicule.
 (B) Variations saisonnières des pourcentages d'ovocytes matures et d'ovocytes en développement dans l'ovaire. Les flèches indiquent les périodes de pontes (Valdizan *et al.* 2009). **51**

Figure 2.4. Résultats stéréologiques pour *Crepidula fornicata* de mars 2006 à septembre 2007.

(A) Variations saisonnières des pourcentages de spermatozoïdes matures et en dégénérescences dans le testicule.
 (B) Variations saisonnières des pourcentages d'ovocytes matures, en cours de dégénérescence, et lysés dans l'ovaire. Les flèches indiquent les périodes de pontes (Valdizan *et al.* 2009). **52**

Figure 2.5. Pourcentage d'occupation des spermatozoïdes à l'intérieur des ampoules de la vésicule séminale, de mars 2006 à septembre 2007.

La limite de la boîte la plus proche de zéro indique le 25ème percentile, la ligne dans la boîte marque la médiane et la limite de la boîte la plus loin de zéro indique le 75ème percentile. Les barres au-dessus et au-dessous de la boîte indiquent respectivement le 90ème et le 10ème percentile. La courbe relie toutes les médianes. **53**

Figure 2.6. Sections histologiques de l'ovaire et du réceptacle séminal de *Crepidula fornicata*.

(A)-(C) Ovaire (o) durant les périodes de ponte (2006 et 2007) montrant la présence à l'intérieur des tubules (t) d'espace inoccupé (us), d'ovocytes en développement (do), d'ovocytes en cours d'atrésie (ao) et d'ovocytes lysés (lo). La glande digestive (dg) et les conduits digestifs (d) sont indiqués en (A) et (D).
 (D)-(F) Ovaire durant la période de maturation des ovocytes (automne 2006 jusqu'à fin hiver 2007), montrant des tubules dilatés remplis d'ovocytes matures.
 (G)-(I) Réceptacle séminal, (G) Ampoule (am) du réceptacle séminal montrant des spermatozoïdes (sz) unis à l'épithélium, et de la matière organique (lom) présente dans la lumière; (H), (I) Detail de l'épithélium (e) de l'ampoule montrant une unique couche de spermatozoïdes unis à l'épithélium, formant des zones superposées correspondant aux trois parties du spermatozoïde: h = head, m = midpiece and f = flagella. Les noyaux basaux sont visibles au sein de l'épithélium ampullaire. **56**

Figure 2.7. **Distribution des fréquences des diamètres ovocytaires chez *Crepidula fornicata* de mars 2006 à septembre 2007.** 57

Figure 2.8. **Synopsis du cycle de reproduction de *C. fornicata* dans la baie de Bourgneuf.** 58

TROISIÈME CHAPITRE : EFFETS DU RÉCHAUFFEMENT DE L'EAU DANS LA BAIE DE BOURGNEUF SUR LE CYCLE DE REPRODUCTION DE *CREPIDULA FORNICATA*

Figure 3.1. **Carte montrant la localisation de l'aire d'étude et le site d'échantillonnage des crépidules, *Crepidula fornicata*, dans la baie de Bourgneuf.**

(image provenant de Google Earth®)

67

Figure 3.2. **Résultats stéréologiques pour le testicule de *Crepidula fornicata*.**

Fractions volumiques de spermatozoïdes matures, de gamètes en développement (spermatoocytes et spermatozoïdes immatures) et de spermatozoïdes en dégénérescence dans le testicule de juin 2000 à juin 2001 (un à deux échantillonnages/mois), et juin 2006 à juin 2007 (deux échantillonnages/mois), moyennes \pm IC à 95 %.

Les lignes en pointillé délimitent les différentes phases du cycle reproducteur en 2000-1 et 2006-7. Donnée non disponible en décembre 2000, du à un vidage des gamètes des tubules au niveau du plan de coupe (les seuls tubules visibles à cet endroit dans la gonade pour ce mois). La taille des échantillons est indiquée au dessus des intervalles de confiance.

69

Figure 3.3. **Résultats stéréologiques pour l'ovaire de *Crepidula fornicata*.**

Fractions volumiques d'ovocytes matures, en développement, en atresie et lysés dans l'ovaire de juin 2000 à juin 2001 (un à deux échantillonnages/mois), et juin 2006 à juin 2007 (deux échantillonnages/mois), moyennes \pm IC à 95 %. Les lignes en pointillé délimitent les différentes phases du cycle reproducteur en 2000-1 et 2006-7.

Données non disponibles en décembre 2000 et fin juin 2001, du à un vidage des gamètes des tubules au niveau du plan de coupe (les seuls tubules visibles à cet endroit dans la gonade pour ces mois). La taille des échantillons est indiquée au dessus des intervalles de confiance. Les périodes de ponte de 2000-1 et 2006 -7 sont ajoutées (2006-7: Valdizan *et al.* 2009).

72

Figure 3.4. **Variations historiques de la température de l'eau dans la baie de Bourgneuf depuis la prolifération de la crépidule dans les années 70 (Météo-France, base de données Climathèque data, Noirmoutier).**

(A) Moyenne annuelle et moyenne des mois les plus chaud. Les lignes en pointillé dénotent les températures qui séparent nettement les valeurs les plus anciennes des plus récentes. Les deux régressions linéaires sont indiquées avec des lignes continues et les équations sont présentées.

(B) Date à partir de laquelle la température de l'eau dépasse le seuil des 10°C nécessaire à l'activation de la période des pontes. Les lignes en pointillé indiquent le point moyen pour les 4 mois d'intervalles.

74

Figure 3.5. **Variations historiques de la chlorophylle *a* dans la baie de Bourgneuf depuis l'augmentation de la biomasse des crépidules, 1996-2007.**

La ligne en pointillée horizontale indique la concentration en chl *a* qui sépare nettement les plus faibles valeurs en chl *a* (< 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$) des valeurs les plus élevées (> 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Durant les 6 années allant de 2002 à 2007, on retrouve 10 valeurs élevées vs 5 valeurs élevées durant les 6 années allant de 1996 à 2001.

75

Figure 3.6. **Température de l'eau pour les deux périodes d'échantillonnage, juin 2000-début août 2001, et juin 2006-début août 2007**

La ligne en pointillée horizontale correspond au seuil de température minimal nécessaire pour activer le procédé de ponte (10°C). Les lignes verticales en tiret montre la correspondance entre ce seuil et le début d'incubation des pontes.

Les périodes de ponte sont indiquées sous le graphique. Les lignes pleines représentent toutes les dates où la présence de ponte a été observée, tandis que les portions pointillées représentent la plus période de ponte la plus longue possible (fin de la saison de ponte) et le démarrage le plus précoce possible de la période de ponte (voir texte). 76

Figure 3.7. **Concentration en chlorophylle *a* d'avril 2000 à août 2001, et d'avril 2006 à Août 2007** (périodes de ponte pour 2006–2007: Valdizan *et al.* 2009).

Les données pour la fin septembre et novembre 2006 ne sont pas disponibles. La ligne en pointillée horizontale indique la concentration en chl *a* qui sépare nettement les plus faibles valeurs en chl *a* (< 5 µg.L-1) des valeurs plus élevées (> 5 µg.L-1). 77

QUATRIÈME CHAPITRE : ÉTUDE D'UN AGENT ALLOGÈNE PRÉSENT DANS LA GLANDE DIGESTIVE DE L'ESPÈCE INVASIVE *CREPIDULA FORNICATA*

Figure 4.1. **Anatomie et profils histologiques de la partie antérieure de la masse viscérale de *Crepidula fornicata*.**

(A), (B) Photos prises à la loupe binoculaire montrant la localisation des sections effectuées, h = coeur (marqueur externe anatomique); (A) vue dorsale, mv = masse viscérale (B) vue ventrale, pied enlevé. go = gonade.

(C)-(E) Profils histologiques montrant (C) les tubules de la gonade, les tubules de la glande digestive (tgd), l'intestin (i) et la branchie (br); (D), (E) Respectivement sections mâle et femelle, montrant les tubules de la glande digestive infectés par l'agent allogène (ag). On remarque l'absence d'allogènes dans les tubules de la gonade. gd = digestive gland, ov = ovaire, test = testicule. 87

Figure 4.2. **Présence de l'agent allogène dans la glande digestive de *C. fornicata*.**

(A), (B) Vue de la glande digestive infectée (A), et détail de tubules digestifs (tgd) infectés par l'agent allogène (ag), logé à l'intérieur des cellules de la glande digestive (cgd) (B).

(C), (D) Agent allogène à l'intérieur d'une cellule de tubule digestif. L'allogène semble être entouré par une vacuole parasitophore - like (vp) entourant l'agent allogène; le noyau (n) de la cellule hôte est visible en (D). 88

Figure 4.3. **Moyenne ($\pm 95\%$ CI) du nombre d'allogènes présents dans la glande digestive chez les mâles et les femelles de *C. fornicata* pour chaque échantillonnage. Les courbes noires correspondent aux variations de température pour chaque échantillonnage.**

(A) 2000 - 2001

(B) 2006 - 2007 89

CINQUIÈME CHAPITRE: ÉTUDE D'UNE STRATÉGIE DE DIMINUTION DE LA BIOMASSE DE *CREPIDULA FORNICATA*, ET ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT INTRACAPSULAIRE

Figure 5.1. **Evolution du pourcentage de femelles incubatrices (courbe) parmi les femelles de la population de *Crepidula fornicata*, et fréquence des pontes jeunes et plus âgées (histogramme cumulatif), entre mi-mars 2006 et Novembre 2007.** 102

Figure 5.2. **Principaux stades du développement embryonnaire intracapsulaire de *Crepidula fornicata*.**

(A) à (L) Jeunes embryons, photographies en MEB (A) embryon au stade 2 cellules; (B) embryon au stade 4 cellules; (C), (D), (E) embryons en stade avancé de division; (F), (G), (H) embryons en gastrulation, ba = blastopore; photographies en microscopie optique (I), (J), (K), (L) embryons en cours de division.

(M) à (T) Stades intermédiaires, photographies en MEB (M) gastrula ciliée, pc = patches of cilia; (N), (O), (P) trochophores en cours de transformation en larves véligères, montrant le début de l'extension latérale du vélum, photographies en microscopie optique (Q), (R) gastrulas ciliées, (S), (T) trochophores en cours de transformation en larves véligères, psh = presumptive shell, p.v = presumptive velum.

(U) à (X) Véligères intracapsulaires, photographies en MEB (U), (V) véligères intracapsulaires; f = foot, hv = head vesicle, k = embryonic kidney, sh = shell, v = velum Photographies en microscopie optique (W), (X) véligères intracapsulaires. **103**

Figure 5.3. *Crepidula fornicata*: efficacité des fécondations pour différents ratios de spermatozoïdes - ovocytes (moyenne \pm 95 % IC, n = 5). **104**

Figure 5.4. Photographies en microscopie optique des stades embryonnaires obtenus après les fécondations externes.

(A) embryon en cours de 1ère division; (B) embryon au stade 2 cellules; (C) embryon au stade 4 cellules. Barre d'échelle = 100 microns. **105**

Figure 5.5. Evolution de la densité embryonnaire dans les cultures de jeunes embryons et d'embryons en stades intermédiaires. **105**

Figure 5.6. Consommation algale par larve, du jour 1 au jour 4, dans les quatre cultures de véligères excapsulées: U1, U2, T1, T2. Pas d'intervalle de confiance (n = 1). **106**

Figure 5.7. Moyenne (\pm 95 % IC, n = 30) de croissance des coquilles pour les quatre cultures de véligères excapsulées : U1, U2, T1, T2. **107**

Figure 5.8. Cultures de véligères excapsulées.

Photographies en microscopie optique de Véligères excapsulées, (A) possédant une coquille transparente et des tentacules, sh = shell, t = tentacles; (B) Véligère excapsulée montrant une perte importante de tissu, dt = degraded tissue; (C) Coquille vidée; (D) Véligère compétente à la métamorphose.

Photos MEB de Véligères compétentes à la métamorphose (E), (F) f = foot. Barre d'échelle = 100 microns. **108**

Figure 5.9. Densités larvaires par bac (larve ml⁻¹) pour les quatre cultures de véligères excapsulées : U1, U2, T1, T2. **109**

SIXIÈME CHAPITRE: TRAVAUX EN COURS - ONGOING WORKS

Figure 6.1. Observations au MEB du réceptacle séminal de *Crepidula fornicata*.

(A) Coupe transversale d'un réceptacle séminal (rs) composé de plusieurs ampoules (amp).

(B), (C) Les têtes des spermatozoïdes semblent être accolées à l'épithélium ampullaire (ep) sur toute sa longueur. Détail d'une ampoule séminale (C), les acrosomes (ac) des spermatozoïdes sont directement fixés dans l'épithélium. (D) Amas de flagelles (fl) au centre d'une ampoule séminale.

(E), (F) Détails de l'épithélium ampullaire. L'épithélium est constitué de nombreuses cellules épithéliales (ce), les têtes des spermatozoïdes sont à proximité de celles-ci (E). L'épithélium semble être en dégénérescence, il comporte de nombreuses vacuoles intracellulaires (vac) (F). **117**

Figure 6.2. Coupe transversale, observée au MET, de l'épithélium ampullaire et de la zone d'insertion des spermatozoïdes chez *Crepidula fornicata*.

ac = acrosome, fib = fibrocyte, nce = noyau d'une cellule épithéliale, vac = vacuole. **118**

Figure 6.3. Différents stades d'évolution de la paroi des ampoules du réceptacle séminal de *C. fornicata*.

(A) - (C) Dégénérescence progressive de l'épithélium.

(A) Epithélium non dégénéré. Les spermatozoïdes ne semblent pas être insérés très profondément dans le cytoplasme des cellules épithéliales, peu de vacuoles intracellulaires (vac) sont visibles. Des réticulum endoplasmiques (re) sont observés. fib = fibrocyte.

(B), (C) Dégénération de l'épithélium. Les vacuoles intracellulaires envahissent le cytoplasme, elles sont plus nombreuses et plus grosses, les acrosomes (acr) des spermatozoïdes sont insérés dans le cytoplasme des cellules épithéliales mais également à proximité des noyaux (nce). La paroi de l'ampoule est en dégénérescence (B). Néanmoins la formation d'un nouvel épithélium ampullaire est observée, qui permettra à l'ampoule de se régénérer après sa dégénération (C). **120 - 121**

Figure 6.4. **Observation en MEB de la structure d'un spermatozoïde de *Crepidula fornicata*.** (A) Vue de l'acrosome (acr), de la membrane contenant le noyau (n) et du début de la pièce intermédiaire (pi), (B) Détail de l'acrosome, (C) Jonction entre l'acrosome et le noyau, (D) Jonction entre le noyau et la pièce intermédiaire, (E) Détail de la pièce intermédiaire, (F) Jonction entre la pièce intermédiaire et la flagelle. **123.**

Figure 6.5. **Observation en MET de la structure d'un spermatozoïde de *Crepidula fornicata*.** (A) Coupe longitudinale de l'acrosome (acr) et du début du noyau (n), esa = espace sub-acrosomial, pb = plateau basal, va = vésicule acrosomial, (B) Coupe transversale de l'acrosome dans sa partie distale, (C) Coupe transversale au niveau du noyau (n). (D) Coupes transversales de pièces intermédiaires (pi) et de pièces principales de flagelles (fl), (E) Coupe transversale de la pièce intermédiaire: l'axonème (ax) est typique (structure de microtubule 9 + 2) et des mitochondries (mi) l'entourent. (F) Coupes longitudinales au niveau de la pièce principale du flagelle, entouré par une gaine de glycogène (gly), (G), (H) Coupes transversales au niveau de la pièce principale du flagelle, l'axonème est entouré par une gaine de glycogène. **125**

Figure 6.6. **Schéma d'un spermatozoïde Caenogastropoda**, possédant une structure similaire à celle des spermatozoïdes de *C. fornicata* (modifié d'après Healy 1996). **126**

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Figure c.1. **Rôle de la reproduction dans le succès invasif de *Crepidula fornicata* et impact du réchauffement climatique.** + = augmentation,  = réchauffement climatique. **129**

TABLEAUX

CINQUIÈME CHAPITRE:

Tableau 5.1. **Fécondations externes de *Crepidula fornicata*.**
Survie des embryons et développement. **104**

Tableau 5.2. **Mortalité et taux de croissance dans les cultures de véligères excapsulées.** **108**

SIXIÈME CHAPITRE:

Tableau 6.1. **Taille des différentes parties du spermatozoïde de *C. fornicata*.** **122**

PREMIER CHAPITRE
INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 INTRODUCTIONS ET INVASIONS BIOLOGIQUES EN MILIEU MARIN

A. *La mondialisation: intensification de l'introduction d'espèces*

Les grands changements climatiques (périodes glaciaires, interglaciaires), les processus géologiques (déplacements des plaques tectoniques) ainsi que les grandes découvertes et explorations naturalistes (XV^{ème} et XVI^{ème} siècles) ont entraîné la migration d'espèces végétales et animales, y compris de l'homme, rendant possible leur transport et leur changements d'aire de répartition (Lodge 1993). Néanmoins, les phénomènes d'extension brutale de l'aire de répartition de ces espèces restaient extrêmement rares. C'est à partir du XX^{ème} siècle que les transports d'espèces se sont réellement accélérés avec l'intensification, liée à la mondialisation, de l'accroissement des échanges commerciaux à l'échelle internationale, incluant l'importation d'espèces notamment pour la consommation (Ruiz *et al.* 1997, Gouletquer *et al.* 2002, Davis 2003, Ehrenfeld 2003). Ce phénomène a depuis sans cesse augmenté l'influence de nos sociétés sur les écosystèmes terrestres et aquatiques (Pimm *et al.* 1996, Heal 2002, Ehrenfeld 2003), et entraîné la surexploitation et la disparition de nombreuses espèces, au profit d'autres plus opportunistes et résistantes aux variations du milieu, introduites souvent accidentellement (Bax *et al.* 2003, Davis 2003).

En milieu marin, les phénomènes d'introduction d'espèces se sont intensifiés majoritairement en raison de deux vecteurs que sont les échanges par voie maritime et l'importation d'espèces pour l'aquaculture (Carlton 1989, 1996, Ruiz *et al.* 1997, Naylor *et al.* 2001). L'apparition de nombreux mollusques marins et estuariens, non indigènes, a été observée le long des côtes européennes (Carlton 1992, 1996, Ruiz *et al.* 1997, Gouletquer *et al.* 2002). La plupart de ces espèces ont été introduites volontairement en vue d'exploitation commerciale (Naylor *et al.* 2001), ou accidentellement par leur transport dans les eaux de ballast de navires (Carlton 1985, Carlton & Geller 1993), ou encore fixées sur des espèces d'intérêt commercial importées pour l'aquaculture. Environ 10% de ces espèces introduites s'adaptent à leur nouvel environnement, devenant capables de s'y reproduire sans intervention humaine et de s'y développer de façon pérenne (Lodge 1993, Williamson & Fitter 1996). Nombre d'entre elles ont entraînés de sérieux impacts écologiques négatifs et également économiques : elles sont appelées **espèces invasives** ou encore espèces envahissantes (Williamson 1996, Davis & Thompson 2000). Ainsi, Gouletquer *et al.*

recensaient en 2002 la présence de 104 espèces introduites le long des côtes de l'Atlantique et de la Manche, dont presque 1/3 appartenait au phylum des mollusques.

B. Réchauffement climatique et invasions marines

Les invasions d'espèces marines représentent aujourd'hui un réel danger pour la biodiversité, les industries maritimes et la santé publique (Bax *et al.* 2003). De plus, l'actuel réchauffement climatique global semble augmenter le succès biologique (succès reproducteur, dispersif, de prolifération) de ces espèces invasives (Dukes & Mooney 1999). Au cours du siècle dernier, la température de l'eau a augmenté entre 0.4 - 0.8 °C et l'on prévoit au cours de ces 100 prochaines années une augmentation de la température comprise entre 1 - 3.5 °C (Harley *et al.* 2006). Les espèces invasives sont plus tolérantes aux variations environnementales que les espèces natives, facilitant leur adaptation à de nouveaux climats (Rejmánek & Richardson 1996). Plusieurs études ont démontré que le réchauffement des températures des océans peut augmenter la reproduction et la croissance des espèces invasives (Diederich *et al.* 2005, Ray 2005, Nehls *et al.* 2006, Heiler *et al.* 2008, Dutertre *et al.* 2010, ter Hofstede *et al.* 2010). Ce réchauffement climatique peut avoir des conséquences sur les invasions biologiques, telles l'installation de nouvelles espèces invasives ou encore l'augmentation des impacts et de la distribution des espèces invasives existantes sur les écosystèmes colonisés (Hellmann *et al.* 2008).

C. Parasites et invasions marines

Bien que le taux d'invasions marines ne cesse d'augmenter et risque de prendre encore plus d'ampleur dans le futur, très peu d'études se sont intéressées aux agents pathogènes introduits avec ces espèces invasives. Lorsque les espèces sont introduites dans un nouvel environnement au stade larvaire, via les eaux de ballast, le risque d'importation de pathogènes (bactéries, parasites, virus) est extrêmement faible (Lafferty & Kurys 1996). Mais, lorsque les espèces sont introduites fixées sur des mollusques importés pour l'aquaculture, **elles hébergent typiquement un lot de pathogènes présents dans leur aire native** (Torchin *et al.* 2002). Ces parasites exotiques peuvent potentiellement infecter des espèces natives (Torchin *et al.* 2002) et avoir des effets négatifs sur leur survie, leur fécondité et réguler la dynamique de leurs populations (May & Anderson 1978, Anderson 1978, Hudson *et al.* 1998, Tompkins & Begon 1999). Des études effectuées sur des parasites pathogènes ont démontré que l'élévation de la température de l'eau, due au réchauffement climatique, facilite leur transmission et leur prolifération, augmente leur abondance locale et

accélère leur développement (Poulin 2006, Poulin & Mouritsen 2006, Thieltges & Rick 2006, Studer *et al.* 2010). Ce réchauffement des eaux pourrait donc conduire à une augmentation de la mortalité liée à ces infestations chez les espèces natives, moins résistantes aux changements environnementaux (Rejmánek & Richardson 1996).

1.2. HISTORIQUE DE L'INTRODUCTION D'UNE ESPÈCE INVASIVE : LA CRÉPIDULE

A. *Introduction de la crépidule en Europe*

La crépidule est un gastéropode originaire des côtes nord-est américaines. À la fin du XIX^{ème} siècle, son aire de répartition s'étalait de la frontière canadienne au Mexique (Murie 1911). Introduite de façon involontaire par l'homme dans diverses régions du monde, elle est aujourd'hui retrouvée sur la côte ouest des Etats-Unis, sur la côte uruguayenne, dans plusieurs baies japonaises et est largement distribuée sur les côtes européennes (Blanchard 1997).

En Europe, la crépidule est tout d'abord apparue dans les centres ostréicoles du sud de la Grande-Bretagne entre les années 1870 et 1920. Elle a été introduite accidentellement fixée sur des naissains de l'huître américaine *Crassostrea virginica* importés pour remédier à la quasi-disparition des bancs d'huîtres plates *Ostrea edulis* surexploités sur les côtes anglaises (Fig. 1.1 (1), Murie 1911; Blanchard 1997). Avant leur commercialisation, ces lots d'huîtres étaient entreposés dans des sites où se trouvaient des bancs naturels de l'huître plate, alors rapidement colonisées par les crépidules (Blanchard 1997). L'histoire de l'introduction et de la dissémination de la crépidule en Europe est ainsi intimement liée à celle de l'ostréiculture. En effet, la crépidule, fixée sur les coquilles d'huîtres anglaises, va se propager progressivement vers de nouveaux pays européens importateurs de ces huîtres, telles la France et la Hollande. Le manque de précaution sanitaire lors des importations de coquillage au début du XX^{ème} siècle a permis aux crépidules de se développer sur leurs nouveaux foyers de façon massive (Blanchard 1997). La larve ciliée de la crépidule ayant une longue vie pélagique (5 semaines environ - Chipperfield 1951) peut se déplacer dans la colonne d'eau et être transportée par les courants maritimes sur une distance allant jusqu'à plusieurs kilomètres par jour (Blanchard, 1997). Cette caractéristique a permis une dispersion naturelle de *C. fornicata* à partir de son foyer anglais dans les courants maritimes de la mer du Nord, et explique sa présence aujourd'hui dans des pays nordiques tels que les Pays-Bas, le Danemark, la Norvège et la Suède (Fig. 1.1. (2), Blanchard 1997). Elle est retrouvée sur une

large partie des côtes européennes, et particulièrement dans les baies peu profondes et les estuaires : en France, en Belgique, aux Pays-Bas, en Allemagne, au Danemark, en Norvège et en Suède le long de la façade Atlantique. Uniquement quelques zones ont été infestées le long des côtes méditerranéennes, dans le sud de la France, en Sicile et à Malte.

B. Introduction de la crépidule en France

En France, l'introduction de la crépidule s'est effectuée en deux grandes vagues. **La première vague** correspond à l'arrivée massive et incontrôlée de la crépidule suite aux opérations navales alliées de 1944 (Fig. 1.1 (3), Fig. 1.2 A). Les navires alliés entreposés dans les ports de la côte sud anglaise, ont été fortement colonisés par les juvéniles de crépidules qui ont été transportés lors du débarquement sur les plages françaises. Les bateaux échoués, coulés sur les plages normandes et dans les ports de Cherbourg et de Brest, le développement d'un fort trafic naval destinés à la reconstruction des villes détruites et la recrudescence de l'ostréiculture après-guerre ont été des facteurs décisifs de l'invasion de la crépidule (Blanchard 1995).

La seconde vague invasive s'est déroulée lors de l'introduction volontaire de l'huître japonaise *Crassostrea gigas* en 1967 en France. Suite aux multiples épizooties ayant affectées les productions d'huîtres plates autochtones *Ostrea edulis* et d'huîtres creuses portugaises (introduites) *Crassostrea angula* (Héral 1986, Grizel & Héral 1991, Gruet & Baudet 1997), des naissain et des géniteurs de *Crassostrea gigas* furent importés respectivement de la baie de Tokyo et de la côte nord-ouest américaine au début des années 1970 (Grizel & Héral 1991). Ces lots d'huîtres importés transportaient de nombreuses espèces exotiques vivantes, telles des Annélides polychètes ou encore des Ascidies, et notamment la crépidule (Gruet *et al.* 1976, Grizel & Héral 1991, Zibrowius 1994, Ruesink *et al.* 2005 ; Fig. 1.1 (4), Fig. 1.2 B). Suite à son installation dans les parcs de *C. gigas*, la crépidule s'est ensuite dispersée vers de nouveaux foyers *via* l'aquaculture et les transports maritimes mais également localement à l'intérieur des baies et des estuaires grâce aux courants de marée, aux activités de dragage et de chalutage (Fig. 1.2 C ; Blanchard & Erhold 1999). La crépidule est aujourd'hui considérée comme une espèce invasive *sensu stricto* (Davis & Thompson 2000).

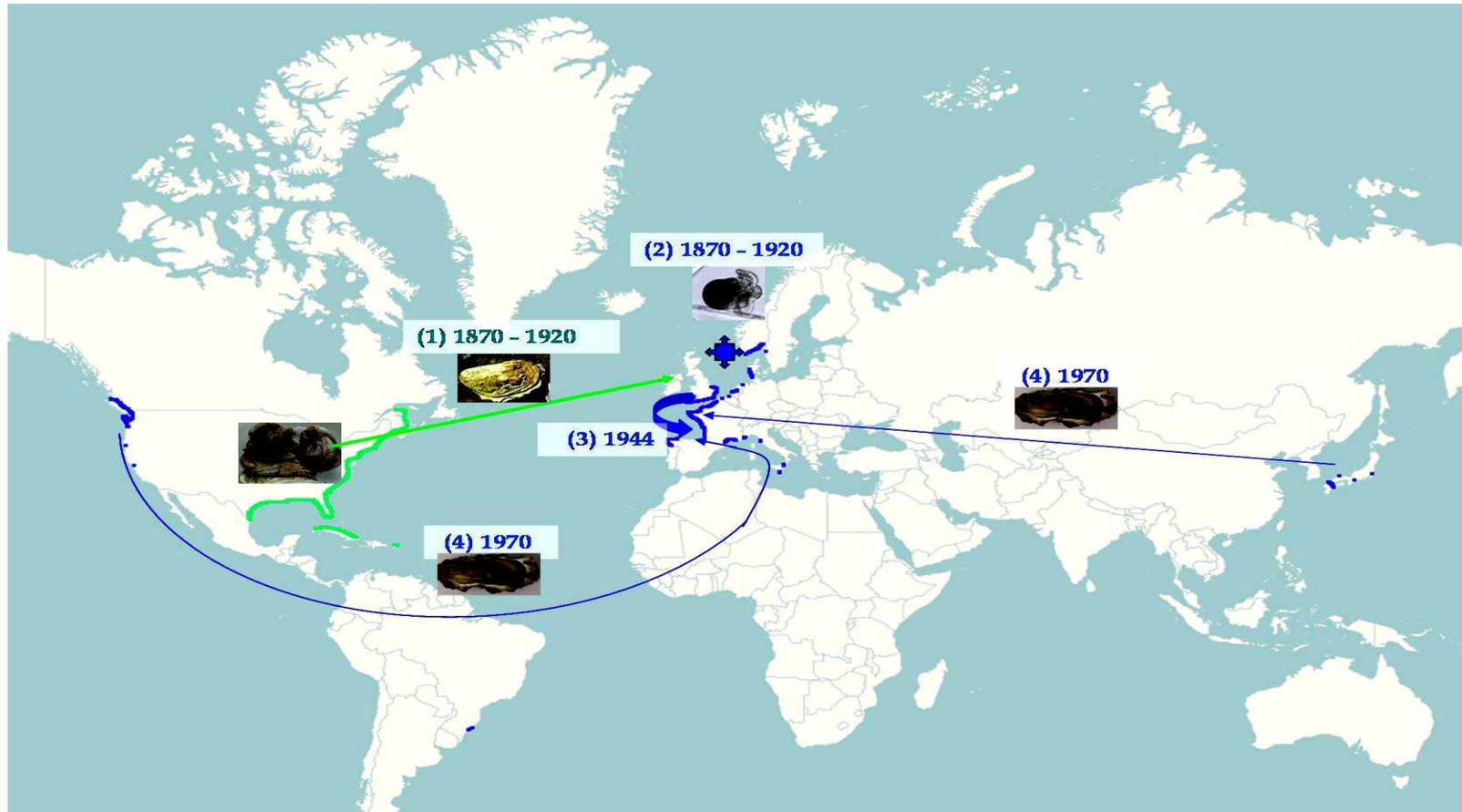


Figure 1.1. Introduction de *Crepidula fornicata* en Europe.

Aire de distribution naturelle (en vert), première introduction vers l'Europe (flèche verte), aire d'invasion (en bleu) et divers transferts vers l'Europe (flèches bleu).

- (1) arrivée de la crépidule sur les côtes anglaises
- (2) dispersion naturelle de la larve de crépidules vers les pays nordiques
- (3) première vague d'installation des crépidules dans les eaux atlantiques françaises lors du débarquement
- (4) seconde vague d'installation des crépidules en France, fixées sur les huîtres creuses importées.



Figure 1.2. Introduction de *Crepidula fornicata* en France.

(A) Première vague invasive lors du débarquement de 1944 (flèches et zones infestées en jaune).

(B) Seconde vague invasive lors de l'introduction de l'huître creuse (flèches et zones infestées en rouge).

(C) Prolifération de la crépidule le long des côtes françaises par l'aquaculture, les transports maritimes, les courants de marée, les activités de dragage et de chalutage (flèches et zones infestées en verte). D'après Blanchard (1995).

1.3. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DE LA CRÉPIDULE : CLASSIFICATION, ANATOMIE ET RAISON DE SON SUCCÈS INVASIF

A. Sa classification

Le nom binominal de ce gastéropode invasif, *Crepidula fornicata*, provient de la forme de sa coquille: « *Crepidula* » et « *fornicata* » signifient respectivement en français « petite sandale » et « voûtée », relatif à sa forme arrondie, en chausson. Selon la classification traditionnelle, la crépidule est un mollusque gastéropode, appartenant à la sous-classe des Prosobranches, l'ordre des Mésogastéropodes, et à la famille des Calyptraeidae (Fretter & Graham 1962, Franc 1968). La classification phylogénétique la plus récente des mollusques place la famille des Calyptraeidae dans le super-ordre des Caenogastéropodes, groupe dominant de gastéropodes marins en terme du nombre d'espèces, et dans l'ordre des Hypsogastéropodes (Colgan *et al.* 2007). Dans la famille des Calyptraeidae, il existe trois genres distincts : *Crepidula* (Lamarck 1799), *Crucibulum* (Schumacher 1917) et *Calyptraea* (Lamarck 1799).

B. Sa biologie générale

Toutes les espèces de la famille des Calyptraeidae sont marines, suspensivores, hermaphrodites protandres et incubent leur œufs (Hoagland 1977, Collin 2000). Le genre *Crepidula* possède de plus une importante plasticité phénotypique lui permettant de s'adapter à différents milieux et à différentes conditions environnementales (Hoagland, 1977). Il existe actuellement une cinquantaine d'espèces du genre *Crepidula* réparties sur une grande partie du globe : sur les continents américains, européen, en Chine et au Japon, en Afrique du Sud et de l'Ouest, en Australie et en Nouvelle Zélande (Collin 2003).

Les crépidules sont empilées les unes sur les autres, formant des **chaînes** caractérisées par la présence d'individus d'âges divers (Fig. 1.3 A, B, Lubet & Le Gall 1972). Après un stade juvénile mobile, les jeunes crépidules se fixent définitivement, soit sur un substrat dur (coquille vide, débris...) amorçant ainsi le début d'une nouvelle chaîne, soit sur une chaîne d'individus pré-existante. Généralement, les individus les plus jeunes sont placés au sommet de la chaîne, tandis que ceux de la base, les plus gros, sont les plus âgés. Dans certains cas, des jeunes individus se fixent en milieu de chaînes et vont servir de point de départ à des chaînes latérales.

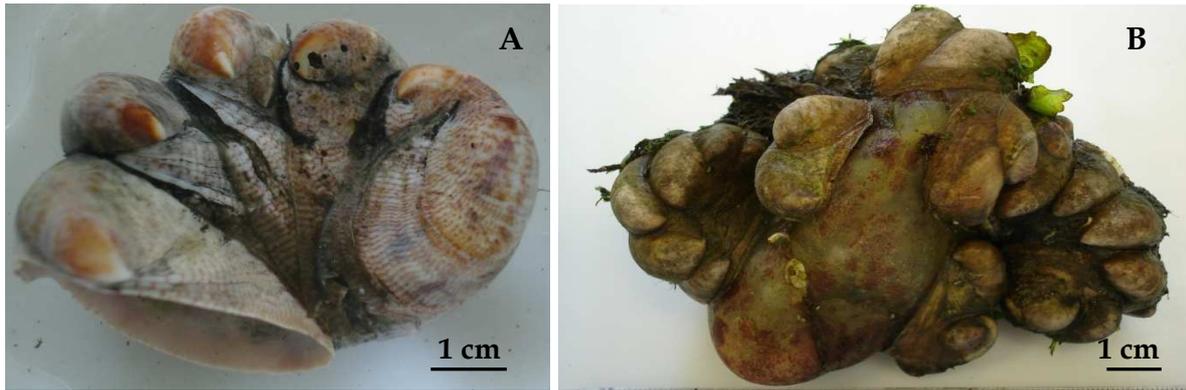


Figure 1.3. Chaînes de crépidules.

(A) Chaîne composée d'individus fixés sur une coquille vide de crépidule.

(B) Multiples chaînes fixées sur un caillou.

La **coquille** de la crépidule est de couleur brune, légèrement rosée et présente un apex postérieur légèrement décalé sur le côté droit lui valant sa ressemblance à un 'bonnet phrygien' (Fig. 1.4 A, B). L'extérieur de la coquille est d'aspect rugueux, tandis que l'intérieur est d'aspect brillant porcelaine. L'ouverture de la coquille est à demi obturée par une fine expansion calcaire, le septum (Fig. 1.4 B). Les coquilles que nous avons récoltées présentaient fréquemment de multiples perforations, les rendant friables (Fig. 1.4 C, D). Ce phénomène déjà observé dans l'estuaire de l'Essex, dans la baie de Saint Brieuc et de Morlaix (Orton 1924, Blanchard *et al.* 2001, Le Cam 2009) est dû à la présence dans l'épaisseur de la coquille de l'**éponge** *Cliona celata* pouvant infecter jusqu'à 67 % des animaux (Le Cam 2009). L'éponge perforante ne semble pas affecter la physiologie de cette espèce. Néanmoins les coquilles infectées pourrait servir de "réservoir" à cette éponge pour infecter d'autres coquillages (Le Cam 2009). Des infections par *Cliona celata* de coquillages d'intérêt commerciaux ont déjà été observées, notamment chez les huîtres cultivées (*Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*) entraînant une mortalité et une sensibilité à la prédation beaucoup plus forte par rapport aux coquillages non infestés (Snowden 2007, Rosell *et al.* 1999).

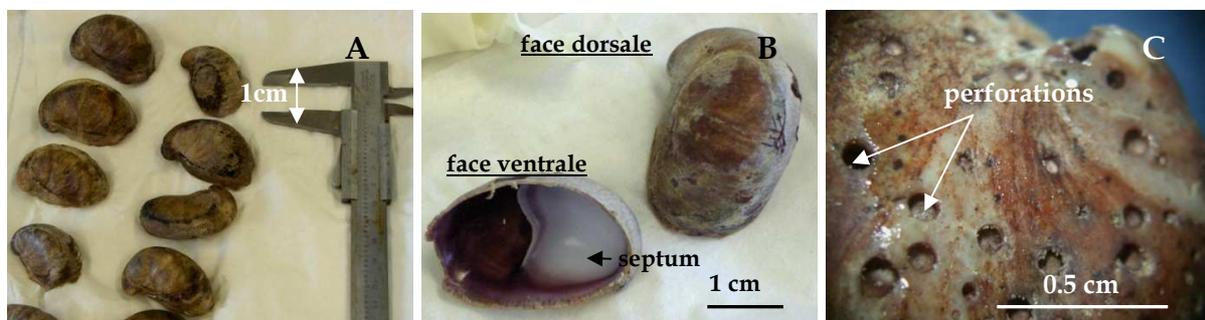


Figure 1.4. Coquilles de *Crepidula fornicata*.

(A) Faces dorsales; (B) Face dorsale et ventrale; (C) Coquille perforée par l'éponge *Cliona celata*.

La **tête** aplatie de la crépidule est formée d'un large mufle de chaque côté duquel est porté un tentacule, pourvu à sa base postérieure d'un œil (Fig. 1.5 B). Le **pied**, très développé, recouvre le septum de la coquille et est formé de deux parties distinctes (Fig. 1.5 A). La partie postérieure du pied ou mésopodium, musculeuse, permet à l'animal de se fixer au substrat ; cette fixation est légère et temporaire chez les juvéniles puis devient définitive chez les adultes grâce à un mécanisme de succion du pied sur le substrat sous-jacent (Fig. 1.5 B, Smith, 1991). La partie antérieure ou propodium, lâche et mobile, sert à l'exploration du substrat et à la protection de la ponte chez les femelles (Fig. 1.5 B). La **masse viscérale** dorsale et triangulaire, protégée par le manteau, est logée dans la cavité conique de la coquille. La cavité palléale contient une unique branchie monopectinée, non-repliée, et ciliée (Fig.1.5 C).

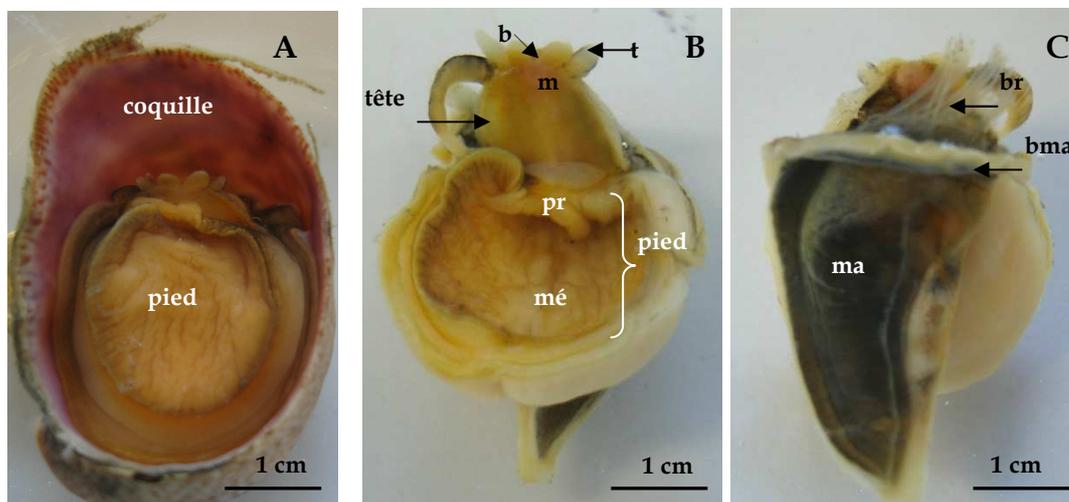


Figure 1.5. Anatomie de *Crepidula fornicata*.

(A) Vue ventrale d'une crépidule dans sa coquille; vue ventrale (B) et vue dorsale (C) d'une crépidule sortie de sa coquille. b = bouche, bma = bord du manteau, br = branchie, m = mufle, ma = manteau, mé = mésopodium, pr = propodium, t = tentacule

L'anatomie de la gonade de *Crepidula* a été décrite par Gould (1917a) et plus récemment par Le Gall (1980) et Martin (1985). La **gonade tubulaire** de la crépidule est disposée dans la masse viscérale. Elle est constituée d'une **branche antérieure transversale** dans laquelle se déroule une gamétogenèse particulièrement active. La branche antérieure se ramifie en **deux branches latérales verticales** s'étendant de part et d'autre des deux lobes de la glande digestive jusqu'à l'extrémité postérieure de la masse viscérale (Fig. 1.6). Dans sa partie distale droite, la branche antérieure se prolonge par le gonoducte au niveau duquel existe, chez le mâle comme chez la femelle, un organe destiné au stockage des spermatozoïdes (Fig. 1.6).

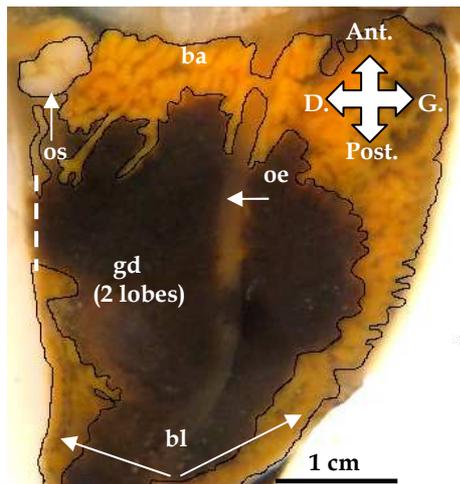


Figure 1.6. Anatomie générale de la gonade de *Crepidula fornicata*, vue ventrale (pied enlevé).
 ba = branche antérieure, bl = branches latérales
 gd = glande digestive, oe = œsophage,
 os = organe de stockage des spermatozoïdes

C. Particularités ayant favorisé sa rapide prolifération

Les raisons du succès invasif de la crépidule sont nombreuses. La crépidule ne possède **pas de prédateurs** efficaces pouvant limiter sa biomasse dans ses nouvelles aires d'introduction. De plus, elle possède **de faibles exigences écologiques** (espèce eurybiotique, eurytherme, euryhaline) lui permettant une certaine ubiquité. La crépidule est ainsi retrouvée de l'estran, où elle peut survivre jusqu'à plusieurs jours à l'air libre, jusqu'au secteur subtidal (Newell & Kofoed 1977, Coum 1979), et sur une large gamme de substrats sédimenteux (De Montaudouin & Sauriau 1999). Ce gastéropode filtreur possède une **stratégie alimentaire suspensivore efficace** lui permettant de se développer dans des écosystèmes macrotidaux turbides et d'accéder à une large gamme de particules alimentaires (Decottignies 2006).

Cependant, le phénomène de prolifération de *C. fornicata* tient essentiellement à sa **stratégie de reproduction**. La stratégie de reproduction d'une espèce invasive est une composante déterminante quand à sa capacité à maintenir ses populations locales (Hasting *et al.* 2005, Ray 2005). Depuis l'apparition de ce gastéropode le long des côtes atlantiques françaises, les stocks de crépidules n'ont cessé de croître, atteignant dans plusieurs baies des biomasses supérieures à 50 000 tonnes : 51 000 tonnes en baie de Bourgneuf (Sauriau 2003, Barillé & Barillé 2003, Sauriau *et al.* 2006), 128 000 tonnes dans la rade de Brest (Chauveau 1998), 160 000 tonnes en baie du Mont Saint-Michel (Blanchard & Ehrhold 1999) et 250 000 tonnes dans la baie de Saint-Brieuc (Hamon & Blanchard 1994). Une bonne connaissance du processus de reproduction de cette espèce invasive est un élément clé de la compréhension du succès de son installation dans un nouvel environnement et peut contribuer, dans certains cas, au contrôle des populations établies (Myers *et al.* 2000). Néanmoins, l'étude de ce mécanisme biologique a été relativement abandonnée ces dernières décennies. Dans le

paragraphe suivant, nous détaillerons les connaissances acquises sur la reproduction de la crépidule et ferons ressortir les nombreuses zones d'ombre que nous étudierons par la suite dans ce travail.

1.4. LA REPRODUCTION DE LA CRÉPIDULE : ÉTAT DES CONNAISSANCES ACTUELLES

A. Un système de reproduction original

La crépidule est une espèce hermaphrodite protandre : après un stade mâle de quelques années, la crépidule devient femelle après un processus d'**inversion sexuelle**. **La protandrie est sélectivement avantageuse** chez la crépidule car la fertilité augmente avec l'âge et la taille chez la femelle, alors que la fécondité chez le mâle dépend de sa mobilité au sein de la chaîne (Hoagland 1978, Heller 1993). Cet hermaphrodisme séquentiel est peu commun chez les mollusques prosobranches, puisqu'il n'est représenté que par 3 % des espèces appartenant à ce taxon (Heller 1993). Les individus au sommet de la chaîne de crépidules sont des juvéniles ou des mâles, les individus au milieu de la chaîne peuvent montrer des signes externes d'inversion sexuelle et les individus en bas de la chaîne sont des femelles (Fig. 1.7). Cet hermaphrodisme protandre et cette vie grégaire **permettent d'assurer la reproduction** chez cette espèce invasive (Fig. 1.7 ; Le Gall 1980, Collin 2003, Dupont *et al.* 2006).

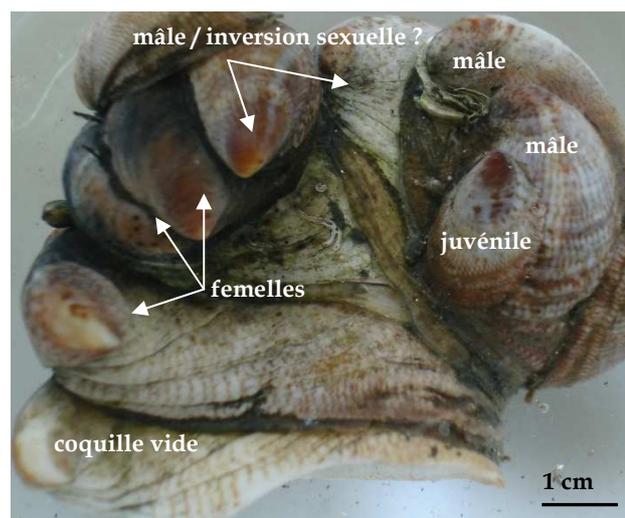


Figure 1.7. Différents stades sexuels au sein d'une chaîne de crépidule.

Depuis la fin du XIX^{ème} siècle, les modalités particulières de la sexualité de la crépidule, et notamment de l'inversion sexuelle, ont retenu l'attention des biologistes aussi

bien dans l'aire native que dans les aires d'introduction de cette espèce invasive (Conklin 1897, Orton 1909, 1922, Coe 1935, 1936, 1938a, b, 1948, 1953, Wilczynski 1955; Hoagland 1975, 1978, Le Gall 1980, Martin 1985, Collin 1995). L'évolution sexuelle de la crépidule au cours de sa vie a été décrite par Le Gall (1980) :

(1) **Le juvénile** de *C. fornicata* ne mesure pas plus de 1 mm de longueur après sa métamorphose. La masse viscérale réduite est occupée dans sa quasi-totalité par la glande digestive. En comparaison, le pied quant à lui est largement développé (Silberzahn 1977). La **différenciation sexuelle** commence par la formation de la gonade (Fig. 1.8 A, B) au niveau de l'extrémité de la corne péricardique antérieure droite de la masse viscérale (Fig. 1.8 C, Gould 1917a, Silberzahn 1977). La gonade juvénile est constituée de quelques follicules attachés à la lame basale des tubules gonadiques et d'un grand nombre de spermatogonies qui prolifèrent (Fig. 1.8 D). Le massif cellulaire va ensuite s'allonger en cordon depuis son point de naissance, s'insinuer entre la glande digestive et l'estomac et se ramifier (Silberzahn 1977). Des neurosécrétions favorisent la lignée mâle et répriment la lignée femelle (Martin 1985). L'animal ne présente encore aucun tractus génital externe (Martin 1985). Le tractus génital mâle se mettra en place en dernier. Les individus atteindront leur première maturité sexuelle au printemps qui suit leur éclosion.

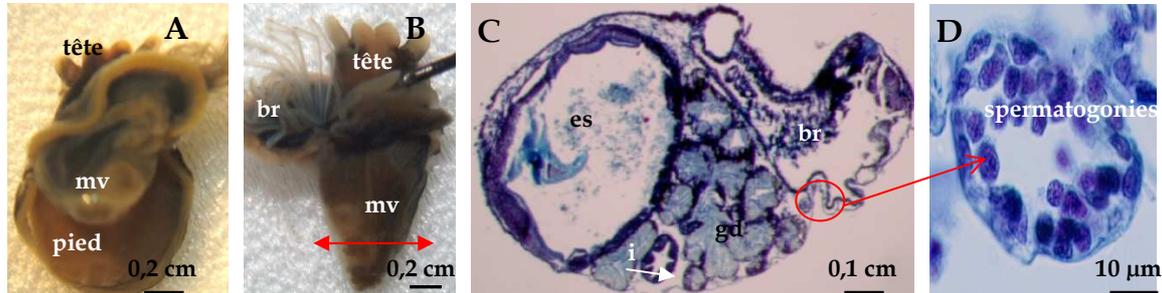


Figure 1.8. Anatomie et mise en place de la gonade chez le juvénile.

Juvéniles en face dorsale (A) et ventrale (B) dont le pénis n'est pas encore développé (B, pied enlevé)

(C), (D) Coupes histologiques de la masse viscérale montrant la gonade juvénile.

br = branchie, es = estomac, gd = glande digestive, i = intestin, mv = masse viscérale

(2) **Chez les mâles fonctionnels**, le tractus génital comprend trois parties distinctes (Fig. 1.9 A, B): (1) Le spermiducte relié au testicule, et qui dans à son extrémité distale grossit et s'entortille autour de lui-même pour former un organe, la vésicule séminale. Le spermiducte permettra le transfert des spermatozoïdes mûres du testicule vers la vésicule séminale (2) La gouttière ciliée déférente externe qui part de l'extrémité de la vésicule séminale, remonte en suivant le bord latéral droit du cou et se prolonge le long du pénis, le coude qu'elle forme est au creux d'un profond repli tégumentaire (3) Le pénis mobil et

extensible est parcouru par la gouttière ciliée (Martin 1985). Un facteur masculinisant émis par les ganglions cérébroïdes assure le maintien de la gonade en phase mâle (Lubet & Streiff 1969, Martin 1985). En période d'activité sexuelle, une spermatogenèse particulièrement active prend place au sein des tubules gonadiques, notamment au niveau de la branche antérieure transversale. Au sein de la gonade, de la lame basale vers la lumière des tubules, les différentes étapes de la spermatogenèse sont présentes : des spermatogonies, des spermatocytes primaires, de fugaces spermatocytes secondaires (rarement observés), des jeunes spermatides, des spermatozoïdes immatures et des spermatozoïdes matures (Martin 1985). Chez la majorité des mâles, quelques cellules de la lignée femelle, en latence, ovogonies ou ovocytes, accolés à la lame basale sont présents et se développeront lors de l'inversion sexuelle.

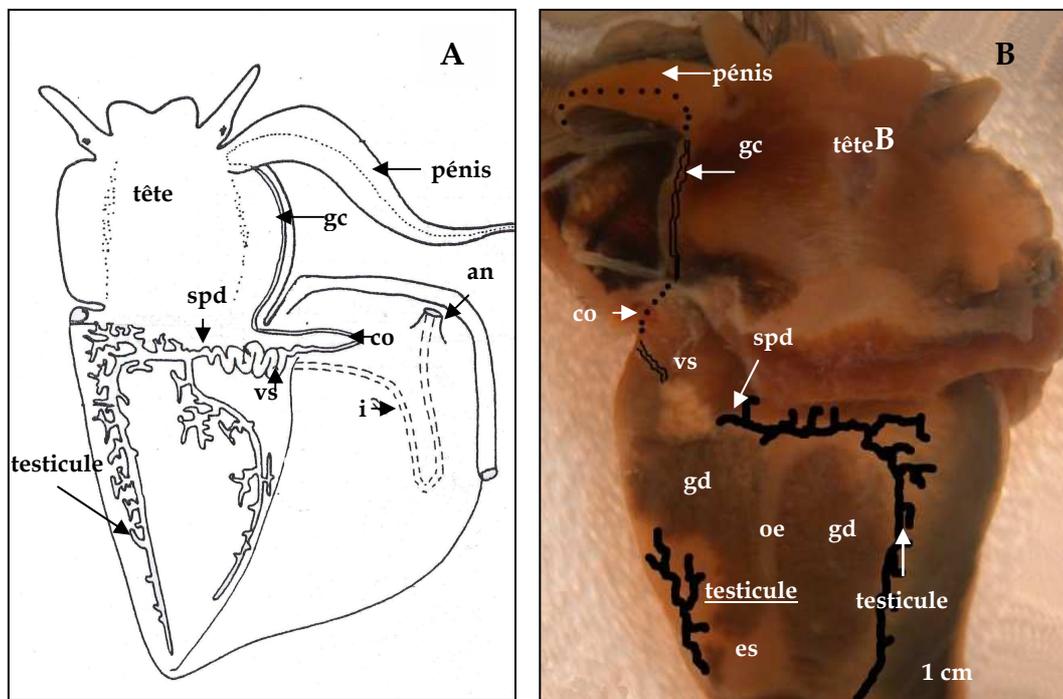


Figure 1.9. Anatomie de la gonade et du tractus génital mâle.

(A) Schéma en vue dorsale, manteau ouvert (d'après Le Gall 1980)

(B) Photographie en vue ventrale (pied enlevé)

an = anus, co = coude de la gouttière ciliée, es = estomac, gc = gouttière ciliée, gd = glande digestive, i = intestin, spd = spermiducte, oe = œsophage, vs = vésicule séminale.

(3) L'inversion sexuelle : Après la phase mâle obligatoire, de durée variable suivant des déterminants d'ordre environnementaux ou suivant l'influence des conspécifiques (Coe 1938a, b), les individus subissent une inversion sexuelle qui les fait entrer définitivement en phase femelle. Le schéma général de l'inversion sexuelle a été décrit par Martin (1985).

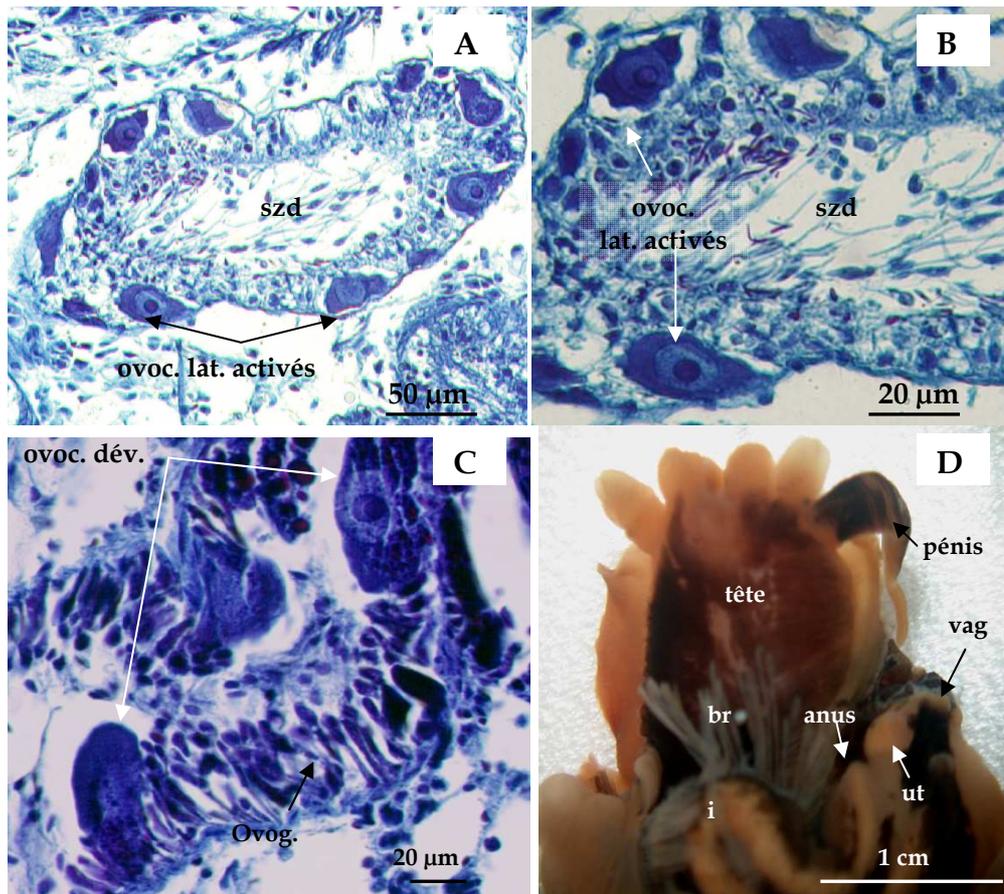
L'inversion sexuelle est observable **dans un premier temps** uniquement au niveau de la **gonade** (Fig. 1.10 A, B, C). La lignée mâle dégénère, les ovocytes en latence sont activés, se développent et deviennent rapidement fonctionnels (Fig. 1.10 A, B); des ovogonies se forment, et se multiplient (Fig. 1.10 C). Cette étape est très rapide (Orton 1909, 1922, Le Gall 1980, Martin 1985) alors que la mise **en place du tractus génital femelle** est beaucoup plus lente. Tout d'abord, on observe une suture des bords de la gouttière ciliée, au niveau du coude, qui aboutit à la mise en place du vagin. En amont du vagin, un élargissement et un épaissement des parois de la gouttière ciliée sont observables dans sa partie distale : ses parois internes se segmentent aboutissant à la formation d'un utérus proéminent et à la différenciation des ampoules du réceptacle séminale (Fig. 1.10 D). La vésicule séminale se transforme plus tardivement en oviducte qui permettra le transfert des ovocytes matures de l'ovaire vers l'utérus. **Le tractus génital femelle devient fonctionnel** dès sa formation (Martin 1985). **La régression du pénis** est très lente et celui-ci peut persister longtemps après la fin de l'inversion sexuelle: de nombreuses femelles dont le pénis n'est pas totalement régressé ou même parfois bien développé ont été observées dans notre étude (Fig. 1.10 D). Le passage du stade mâle au stade femelle n'est pas synchrone pour l'ensemble de la population, cette étape étant sous la dépendance de nombreux facteurs comme, par exemple, la position dans la chaîne (Coe 1938b, Coum 1979, Le Gall 1980, Collin 1995) : la durée de la phase mâle dépend notamment de la proximité de femelles. Ainsi, lorsque un juvénile arrive dans un habitat où ses conspécifiques sont absents, l'inversion sexuelle de la phase mâle à la phase femelle se fait quasiment dès que l'individu a atteint sa taille de maturité sexuelle (Wright, 1988). Des expériences réalisées en laboratoire par Coe (1938b) ont démontré que lorsqu'une femelle de la base est retirée d'une chaîne, le mâle se trouvant le plus à la base de la chaîne se transforme rapidement en femelle. **Cette flexibilité permet ainsi d'avoir constamment au sein des chaînes de crépidule des individus mâles et femelles matures aptes à se reproduire.**

Figure 1.10. Inversion sexuelle chez *Crepidula fornicata*.

(A)-(C) Première étape de l'inversion sexuelle au niveau de la gonade: (A), (B) Dégénérescence des spermatozoïdes et développement des ovocytes en latence dans un tubule gonadique; (C) Spermatozoïdes totalement lysés, nombreuses ovogonies et ovocytes en développement;

(D) Seconde étape de l'inversion sexuelle au niveau anatomique, vue dorsale: apparition du tractus génital femelle, pénis peu régressé.

br = branchie, i = intestin, ovoc. dév. = ovocytes en développement, ovoc. lat. activés = ovocytes en latence activés, ovog. = ovogonies en multiplication, szd = spermatozoïdes en dégénérescence, ut = utérus, vag = vagin



(4) Les femelles fonctionnelles sont caractérisées par la présence d'un réceptacle séminal, d'un utérus, d'un vagin proéminent du côté droit du manteau (Fig. 1.11 A, B) et par une gonade jaune orangée (Fig. 1.11 B), plus ou moins large suivant l'amas d'ovocytes qu'elle contient. Un facteur féminisant, retrouvé dans l'hémolymphe des animaux en période d'inversion sexuelle, assure le développement de la lignée femelle (entrée en prévitellogenèse des ovocytes) et reste présent mais dans des proportions moindres durant le stade femelle (Martin 1985). Aucun élément de la lignée mâle n'est présent. Les cellules souches, les ovogonies et les jeunes ovocytes sont appliqués contre la lame basale des tubules gonadiques. Les jeunes ovocytes sont entourés d'une ou plusieurs rangées de cellules folliculeuses. Les principaux constituants du vitellus semblent provenir, pour la plus grande part, des synthèses de l'ovocyte lui-même : émissions nucléolaires, protéines endogènes produites par l'ergastoplasme, concentrées dans l'appareil de Golgi et associées à des glucides, lipides fournis par le réticulum endoplasmique lisse et de grandes plages de glycogène (Silberzahn 1980). Néanmoins, les cellules folliculeuses interviennent également dans ce processus en élaborant et en transformant des réserves en faveur de l'ovocyte (Silberzahn 1980, Martin 1985).

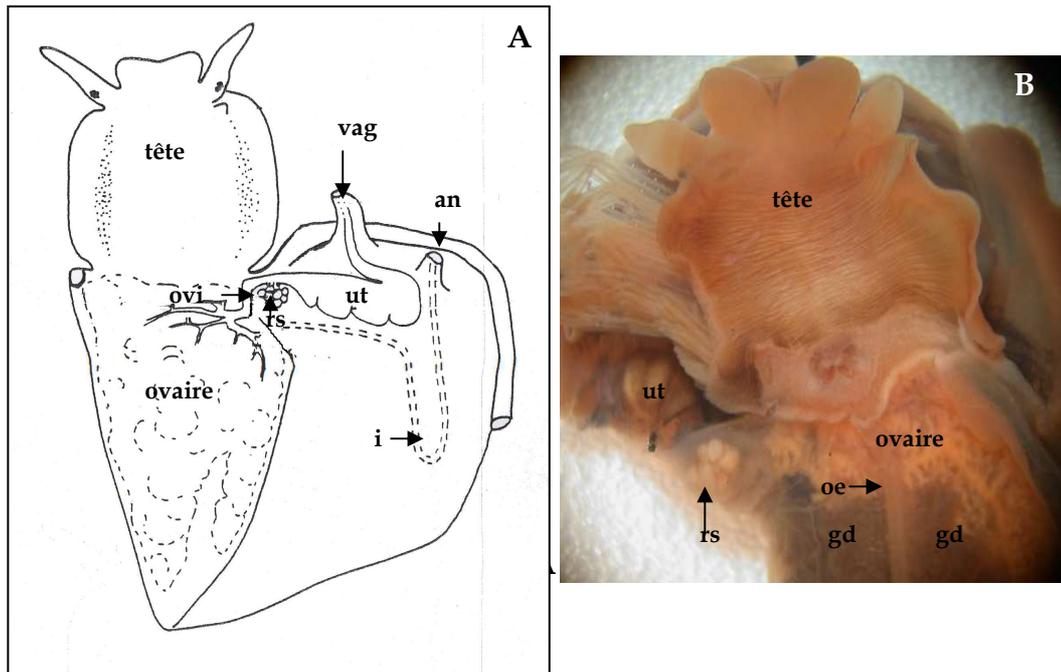


Figure 1.11. Anatomie de la gonade et du tractus génital femelle

(A) Schéma en vue dorsale, manteau ouvert (d'après Le Gall 1952).

(B) Photographie en vue ventrale (pied enlevé).

an = anus, gd = glande digestive, i = intestin, oe = œsophage, ovi = oviducte, rs = réceptacle séminal, ut = utérus, vag = vagin

Si de nombreuses études se sont penchées sur le mécanisme de l'inversion sexuelle, aucune travail à notre connaissance n'indique le cycle gamétogénique de l'espèce invasive *C. fornicata*. Connaître ce processus est pourtant d'ordre primordial pour comprendre son fort potentiel invasif. Au cours de nos travaux, nous avons étudié pendant 18 mois (2006-7) le cycle des gonades mâle et femelle de la crépidule - Second chapitre.

B. Organe de stockage des spermatozoïdes et accouplement chez *Crepidula fornicata*

a. Vésicule et réceptacle séminaux

A la confluence des tubules du testicule, un canal court appelé le gonoducte s'élargit dans sa partie distale et forme des ampoules (Fig. 1.12 A). L'ensemble de ces ampoules constitue la vésicule séminale, facilement reconnaissable par sa couleur blanchâtre et son aspect gonflé par l'abondance des spermatozoïdes qu'elle contient (Fig. 1.12 B). Le rôle essentiel de la vésicule séminale chez *C. fornicata* est la mise en réserve des spermatozoïdes produits dans le testicule en quantité suffisante pour l'accouplement. Les spermatozoïdes sont disposés de façon anarchique à l'intérieur des ampoules de la vésicule séminale mâle contrairement à leur disposition au sein du réceptacle séminale femelles (Fig. 1.12 C). Plusieurs travaux ont émis la possibilité d'un long stockage des

spermatozoïdes chez le genre *Crepidula* (Coe 1936, 1942, Hoagland 1975, 1978), néanmoins aucun suivi du taux de remplissage de la vésicule séminale, pendant au minimum un an, n'a été effectué.

Nous avons au cours de notre travail pendant 18 mois suivi le cycle de la vésicule séminale de *C. fornicata*, en calculant le taux moyen de remplissage des ampoules séminales - Second chapitre. Cela nous a permis de vérifier l'éventuelle présence d'une période de repos comme cela avait été décrit par Martin (1985).

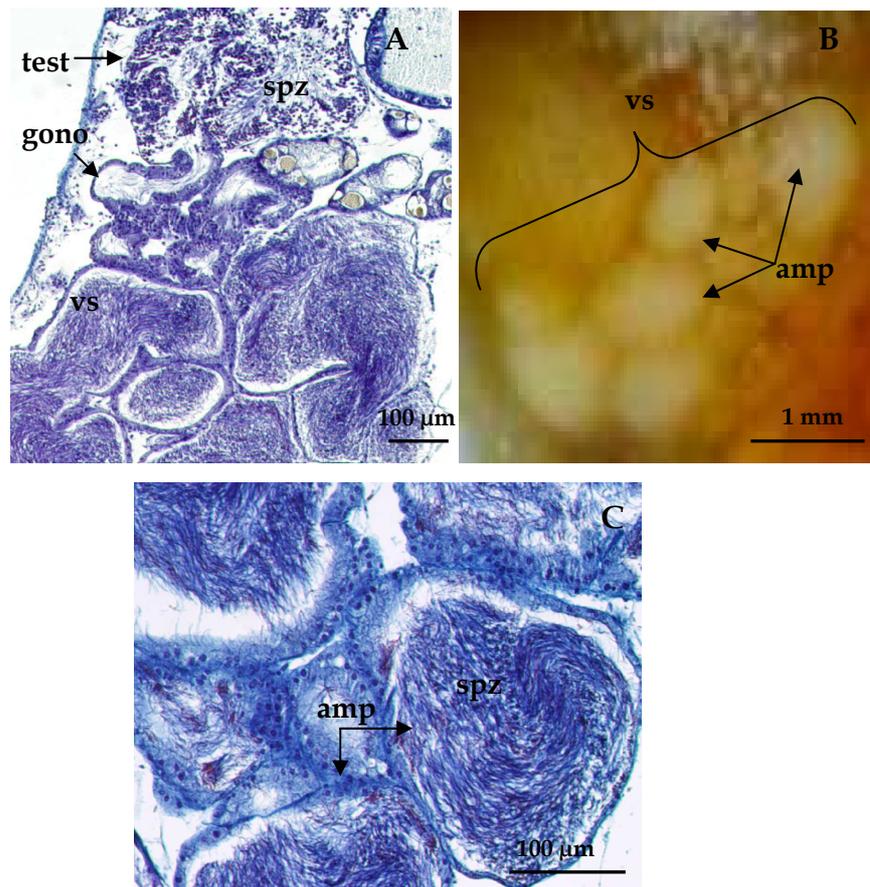


Figure 1.12. Description de la vésicule séminale (vs).

- (A) Coupe histologique, testicule (test) contenant les spermatozoïdes (spz) relié à la vésicule séminale par le gonoducte (gono)
- (B) Vue anatomique des ampoules (amp).
- (C) Disposition anarchique des spermatozoïdes à l'intérieur des ampoules.

Lors de l'accouplement, les spermatozoïdes relargués dans le vagin vont être stockés dans le réceptacle séminal où ils seront mis en réserve jusqu'à la fécondation. Le réceptacle séminal de la crépidule se présente sous la forme d'une dizaine d'ampoules rondes (Fig. 1.13 A), d'un blanc nacré, accolées à la partie postérieure de l'utérus. Une ampoule de réceptacle est une sorte de sphère limitée par une paroi épithéliale où viennent s'insérer les spermatozoïdes (Fig. 1.13 B). Cet entassement de spermatozoïdes au bord de l'épithélium délimite des zones régulières et concentriques : zone des têtes spermatisées, zone des pièces

intermédiaires et zone des flagelles au centre de l'ampoule (Fig. 1.13 C). La tête des spermatozoïdes est orientée vers l'épithélium très proche des noyaux cellulaires, gros et parfois multilobés (Fig. 1.13 C ; Conklin 1897, Silberzhan 1978, Voltzow 1994).

Nous avons pendant 18 mois étudié le cycle du réceptacle séminale de *C. fornicata* en notant la présence ou l'absence de spermatozoïdes à l'intérieur des ampoules séminales – Second chapitre. La nature des relations physiologiques entre les spermatozoïdes et l'épithélium ampullaire étudiée en microscopie électronique à transmission est en cours – Sixième chapitre.

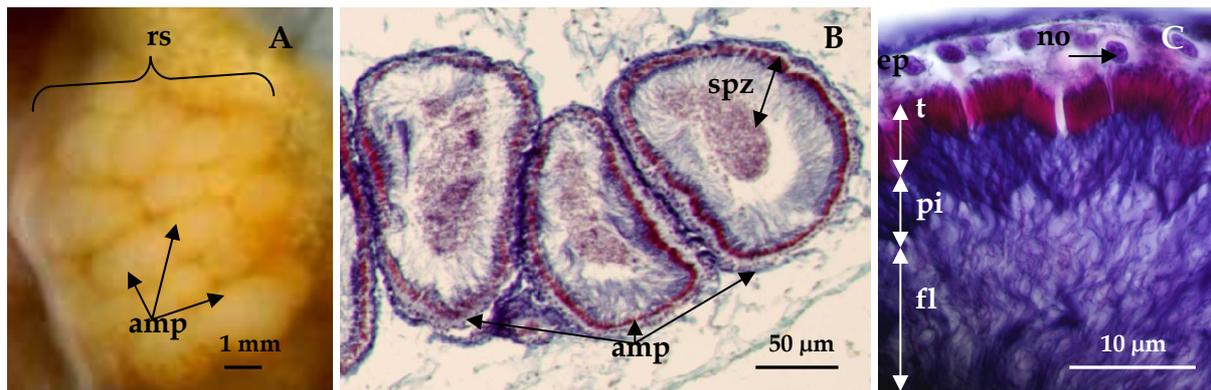


Figure 1.13. Description du réceptacle séminale (rs).

(A) Vue anatomique des ampoules (amp).

(B), (C) Coupes histologiques du réceptacle séminale, (B) les spermatozoïdes (spz) forment au sein des ampoules des zones concentriques, (C) les zones des têtes (t), très contrastées, des pièces intermédiaires (pi) et des flagelles (fl) sont bien visibles, la tête des spermatozoïdes est orientée vers les noyaux (no) de l'épithélium (ep) ampullaire.

b. Déroulement de l'accouplement

Le déroulement de l'accouplement chez la crépidule a été décrit par Le Gall (1980). Avant l'accouplement, le mâle déplace sa coquille grâce à la partie mobile de sa sole pédieuse vers la partie antérieure droite d'une coquille femelle sous-jacente. Il effectue ensuite de nombreux mouvements exploratoires grâce à ses tentacules pour identifier l'ouverture de la coquille femelle (Fig. 1.14 B). Le pénis s'étend ensuite en dehors de la coquille et se recourbe sous le bord droit de la coquille femelle (Fig. 1.14 C). Il va alors relarguer dans le vagin les spermatozoïdes stockés dans sa vésicule séminale. **Cette fécondation interne empêche la perte de gamètes dans la colonne d'eau** (Fig. 1.14 D ; Conklin 1897, Gould 1917a, Coe 1936).

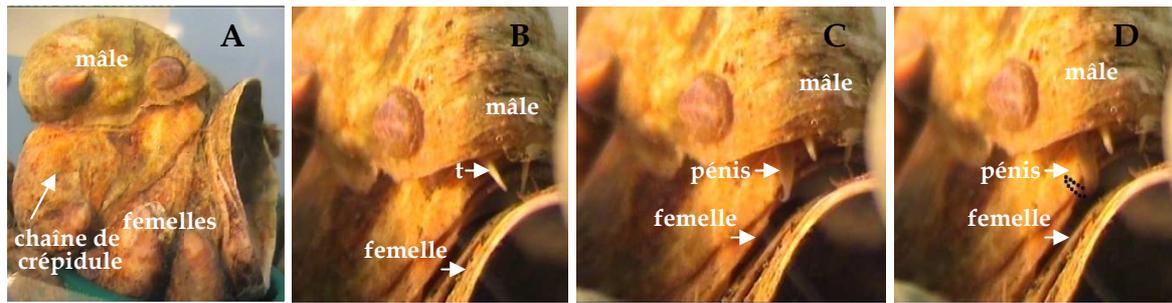


Figure 1.14. Déroulement de l'accouplement chez *Crepidula fornicata* de (A) à (D). Photos extraites d'une vidéo prise lors d'une copulation. t = tentacule.

Coe (1936) et Hoagland (1978) observent dans leurs élevages de crépidules des **accouplements multiples** sur une même femelle par plusieurs mâles de la même chaîne. Ces observations, ainsi que la présence chez la femelle d'un **réceptacle séminal** permettant le **mélange des spermés** laissent supposer qu'une même ponte pouvait être potentiellement fécondée par plusieurs mâles. Des tests de paternité utilisant des marqueurs microsatellites ont démontré que la **reproduction est réalisée à plus de 90 % par des mâles présents dans la même chaîne** que la femelle, alors que la participation de mâles externes à la chaîne reste limitée, due à la sédentarisation des individus et à la capacité limitée d'extension du pénis (Dupont *et al.* 2006, Proestou *et al.* 2008). La participation de plusieurs mâles à une même ponte permet de maintenir **une large diversité génétique au sein de la population** (Gaffney & Mc Gee 1992, Dupont *et al.* 2006).

C. Fécondation et encapsulation des œufs de *Crepidula fornicata*

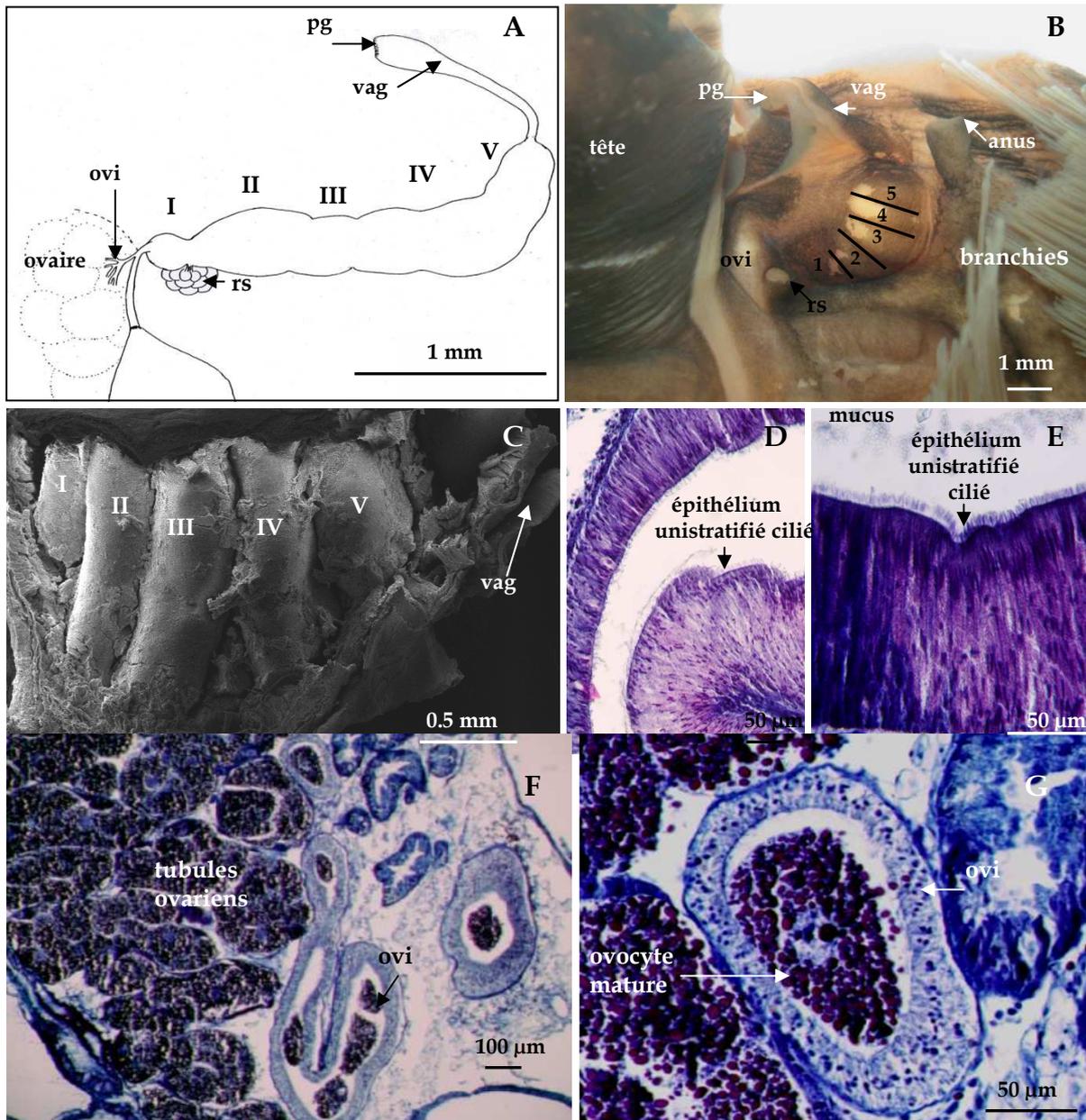
L'**utérus** est à la fois le lieu de fécondation des ovocytes matures et d'encapsulation des œufs fécondés. C'est un organe volumineux, de couleur jaunâtre, et facilement reconnaissable par ses segmentations externes (Fig. 1.15 A, C). Sur toute sa longueur, il est tapissé de la périphérie vers la lumière d'un épithélium unistrate, glandulaire et cilié (Fig. 1.15 D, E) et s'épaissit dans sa portion distale pour former le vagin (Fig. 1.15 A à C, Martin 1985). Contrairement à de nombreux gastéropodes, il ne contient pas de glande annexe. De sa région proximale vers sa région distale, l'utérus est divisé en cinq compartiments (I à V) (Fig. 1.15 A à C, Martin 1985), la zone I étant la partie où débouche l'oviducte ainsi que les ampoules du réceptacle séminal et la zone V la zone de transition avec le vagin. Les ovocytes matures arrivent dans l'utérus *via* l'**oviducte** qui prend naissance à la confluence des tubules

ovariens (Fig. 1.15 F, G). Ils sont ensuite fécondés par les spermatozoïdes relargués du **réceptacle séminal**. Puis, au cours de leur migration dans l'utérus, les œufs fécondés vont subir le processus d'encapsulation. Les zones I et II participent à la constitution du fluide intracapsulaire dans lequel baigneront les œufs, alors que les zones III, IV et V participent à l'édification des capsules ovigères fibreuses, minces et transparentes, qui protégeront les embryons lors de leur incubation (Martin 1985). Environ deux cent cinquante œufs fécondés sont réunis à l'intérieur d'une capsule. Une cinquantaine de ces capsules constituent une ponte (Conklin 1897, Chipperfield 1951, Coum 1979). Les capsules sont expulsées par le pore génital. Chaque capsule est fixée au substrat (*e.g.* coquille sous-jacente, caillou) par un long pédoncule, et mesure environ 1,5 mm de largeur et 1,4 mm de longueur (pédoncule non compris dans les mesures; Hoagland 1986).

Figure 1.15. Description histologique et anatomique de l'oviducte, de l'utérus et du réceptacle séminal chez la femelle *C. fornicata*.

(A)-(E) Détails de l'utérus et du vagin, (A) Schéma d'après Martin (1985); (B) Photographie après ouverture du manteau; (C) Photographie en microscopie électronique à balayage; (D), (E) Coupes histologiques montrant l'épithélium utérin.
pg = pore génital, rs = réceptacle séminal, vag = vagin.

(F), (G) Détails de l'oviducte (ovi) permettant le transfert des ovocytes matures vers l'utérus.



D. **Le développement embryonnaire et larvaire chez la crépidule**

Au sein de la famille des Calyptridés, il existe deux modes de développement embryonnaire distincts : le développement indirect ou benthopélagique, au cours duquel les embryons sont incubés dans les capsules ovigères avant d'être émis sous forme de larves véligères dans la colonne d'eau (Collin 2003), et le développement direct, sans phase larvaire pélagique mais avec incubation des pontes jusqu'à l'éclosion de juvéniles benthiques. Le **mode de développement embryonnaire de *C. fornicata* est de type indirect**, il se déroule en deux étapes. Les jeunes stades fragiles se développent tout d'abord de façon synchrone à l'intérieur de la ponte incubée par la mère puis, lorsqu'ils atteignent le stade véligère, toutes

les larves de la ponte sont émises en même temps dans la colonne d'eau grâce à l'ouverture des capsules sur toute leur longueur (Hoagland 1986). La ponte ainsi constituée est incubée par le femelle à la base du propodium pendant environ trois semaines (Fig. 1.16 A, B ; Coum 1979, Le Gall 1980). Les embryons encapsulés baignent dans le liquide périvitellin dans lequel ils peuvent se mouvoir (Coum 1979). Le nombre de capsules incubées semble être positivement corrélé à la longueur de coquille des femelles incubatrices du genre *Crepidula* (Conklin 1897, Gallardo 1977). Chaque femelle peut incuber des œufs de deux à quatre fois durant la longue période de ponte (Chipperfield 1951, Le Gall 1980, Richard *et al.* 2006), qui peut s'étendre du mois de février jusqu'à fin septembre (Richard *et al.* 2006). De plus, l'espèce *fornicata* montre une **fécondité relativement élevée** par rapport aux autres espèces du genre *Crepidula* (MacGinitie & MacGinitie 1964, Chaparro & Paschke 1990, Gallardo 1996), produisant de 10 000 à 28 000 œufs par ponte (Conklin 1897, Pandian 1969, Deslous-Paoli & Héral 1986, Richard *et al.* 2006).

Ce mode de développement permet **(1) une protection des jeunes embryons** contre la dessiccation, la prédation (Pechenik, 1979), le stress osmotique (Pechenik, 1982) et les attaques bactériennes (Pechenik *et al.* 1984) et **(2) une dispersion des larves expulsées**, qui, par leur transport naturel dans les courant maritimes, vont pouvoir aller coloniser de nouveaux habitats (Conklin 1897, Coum 1979, Blanchard 1997) et **maintenir la cohésion génétique** de cette espèce tout en limitant les possibilités de croisements entre individus apparentés (limitant donc les risques de dépression de consanguinité ; Pechenik 1999).

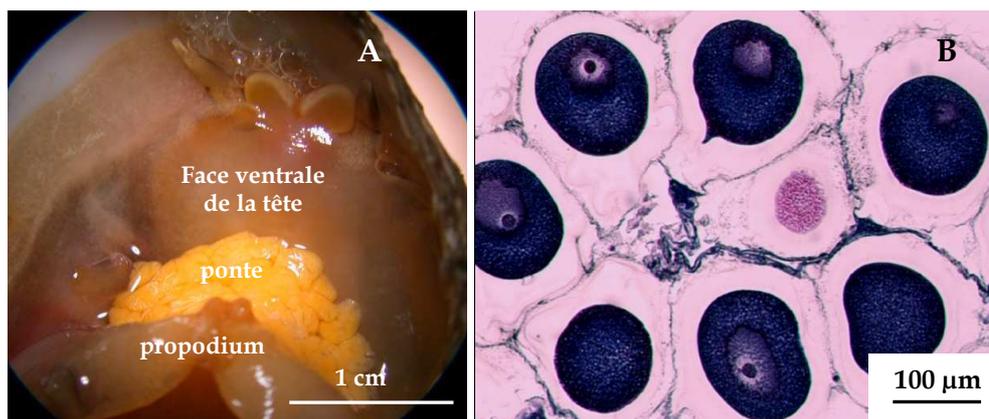


Figure 1.16. Incubation des œufs chez *C. fornicata*.

(A) Femelle incubant une ponte.

(B) Oeufs récemment fécondés réunis à l'intérieur d'une capsule ovigère.

Grâce à notre étude sur le cycle gamétogénique de *C. fornicata*, nous avons pu déterminer les processus sous-jacents à la formation des pontes chez *C. fornicata* - **Second chapitre.**

a. Le développement intracapsulaire

Si le développement intracapsulaire a été décrit pour plusieurs espèces du genre *Crepidula*, tout d'abord par des observations en microscopie optique (*Crepidula* sp. - Conklin 1897, 1902, *Crepidula adunca* - Moritz 1939), puis en microscopie électronique à balayage (MEB) (*Crepidula adunca* et *Crepidula lingulata* - Collin 2000; *Crepidula fecunda* - Chaparro *et al.* 2005), aucune étude à notre connaissance n'a étudié le développement intracapsulaire de *C. fornicata*.

Le développement intracapsulaire chez la crépidule se déroule sur une durée d'environ trois semaines (Le Gall 1980). Les premières étapes du développement embryonnaire sont similaires pour toutes les espèces du genre *Crepidula* (Conklin 1897, 1902, Henry *et al.* 2006). La segmentation des oeufs est spirale, totale, inégale (Henry *et al.* 2006). Jusqu'au stade 4 blastomères, les divisions sont synchrones (Fig. 1.17 A, B). Puis, chacun des 4 blastomères est découpé selon deux niveaux de taille différents. En effet, les divisions cellulaires sont plus rapides dans les micromères, blastomères animaux plus petits moins riches en vitellus, que dans les macromères, blastomères végétatifs (Fig. 1.17 C, D, E). La gastrulation s'effectue ensuite par épibolie avec une légère invagination (Fig. 1.17 F).

Les embryons fraîchement encapsulés dépendent des réserves nutritives lipidiques et polysaccharidiques qu'ils contiennent (Gallardo 1979). De plus, les embryons du genre *Crepidula* (développement de type indirect) développent l'habilité à se nourrir des particules présentes dans le liquide périvitellin, avant même la mise en place du vélum, par pinocytose et par internalisation grâce aux reins embryonnaires qui se mettent en place dès le stade trochophore (Conklin 1897, Hoagland 1979, 1986, Chaparro *et al.* 2002a, b, Ojeda & Chaparro 2004). Le fluide intracapsulaire est une réserve nutritive importante pour l'embryon, qui paraît s'enrichir en matière nutritive au cours du développement embryonnaire grâce à la dégradation mécanique ou chimique de la couche interne de la paroi capsulaire (Martin 1985, Rivest & Strathman 1995, Ojeda & Chaparro 2004, Maeda-Martinez 2008). Les débris présents dans le fluide intracapsulaire provenant des embryons ayant dégénérés (environ 10 %) constituent également une source nutritive pour les embryons sains (Hoagland 1986).

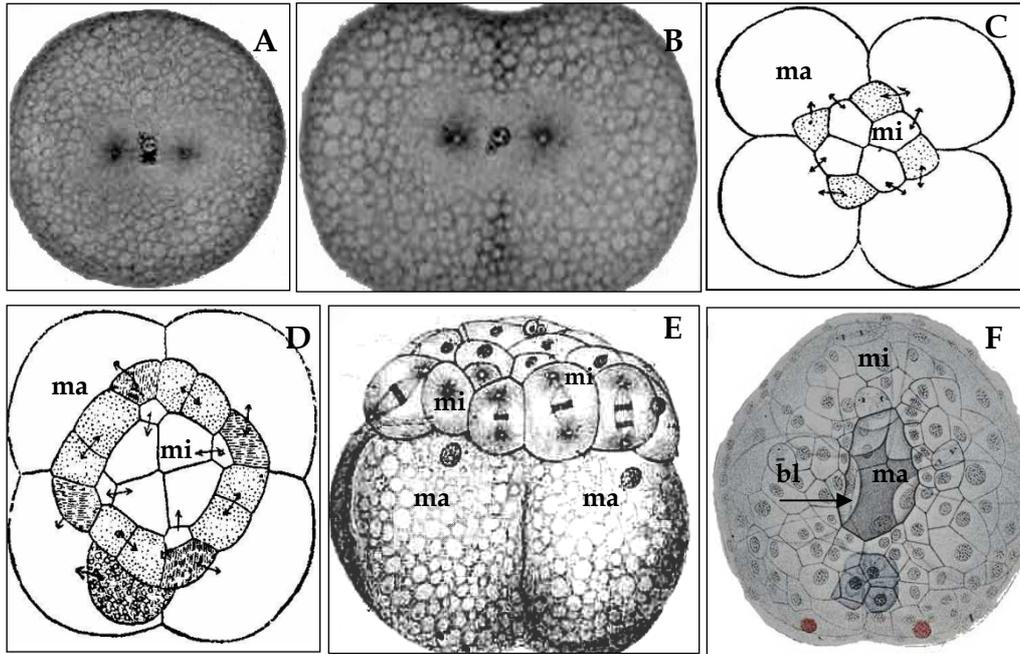


Figure 1.17. Différents stades du développement intracapsulaire de *Crepidula fornicata*, (shémas modifiés d'après Conklin 1897).

(A) Oeuf fécondé; (B) Embryon en division synchrone (Stade 2 cellules); (C), (D) Embryons en division asynchrone avec présence de macromères (ma) et de micromères (mi); (E) Embryon au stade blastula; (F) Embryon en gastrulation, formation du blastopore (bl).

En effectuant une excapsulation des embryons, suivie d'observations en microscopies optique et électronique à balayage, nous avons pu décrire les différents stades embryonnaires de *C. fornicata* à partir de la division cellulaire jusqu'au développement de la larve véligère prête à être émise dans la colonne d'eau - Cinquième chapitre.

b. Développement de la larve véligère dans la colonne d'eau

Le développement de la véligère dans la colonne d'eau a été décrit par Werner (1955). Après la période d'incubation, les jeunes larves véligères sont émises dans la colonne d'eau pour une période de 3 semaines à un mois. Leur coquille, d'une longueur d'environ 320µm (Pechenik 1984), transparente et spirale est accompagnée d'un opercule permettant la fermeture de celle-ci (Fig. 1.18 A). Le velum, l'opercule, le cœur (non visible sur le schéma car uniquement visible en vue de profil droit) et le pied sont présents (Fig. 1.18 A). Le tractus digestif est développé, l'estomac, le rein, l'intestin, la glande digestive et le stylet cristallin peuvent être observés par transparence à travers la coquille (Fig. 1.18 A). Pendant la phase planctonique, la coquille ainsi que le velum de la larve augmentent en taille. L'accroissement du velum permet le maintien de la flottabilité de la véligère dont le poids de la coquille augmente. La tête définitive se sépare ensuite du velum, les tentacules et la bouche sont alors nettement distinguables (Fig. 1.18 B). Les larves de *C. fornicata* atteignent la compétence à la

métamorphose à partir d'une longueur de coquille de 700-800 μm (Pechenik 1984) et sont reconnaissables anatomiquement notamment par un changement de la morphologie de la coquille et l'apparition des rudiments de la branchie (Fig. 1.18 B, C; Werner 1955, Pechenik 1980, Pechenik & Lima 1984). Des structures très fines observables au MEB ornentent la coquille, cette dernière passant de la forme spirale à la forme en 'chausson' caractéristique de l'adulte (Fig. 1.18 C). Le pied s'accroît de façon intense et se différencie en deux parties distinctes, le mésopodium et le propodium. La larve peut nager librement grâce à son velum ou ramper grâce au pied ; cette larve appelée pédivéligère est compétente à la métamorphose (Pechenik 1980, 1984, 1986 ; Fig. 1.18 C).

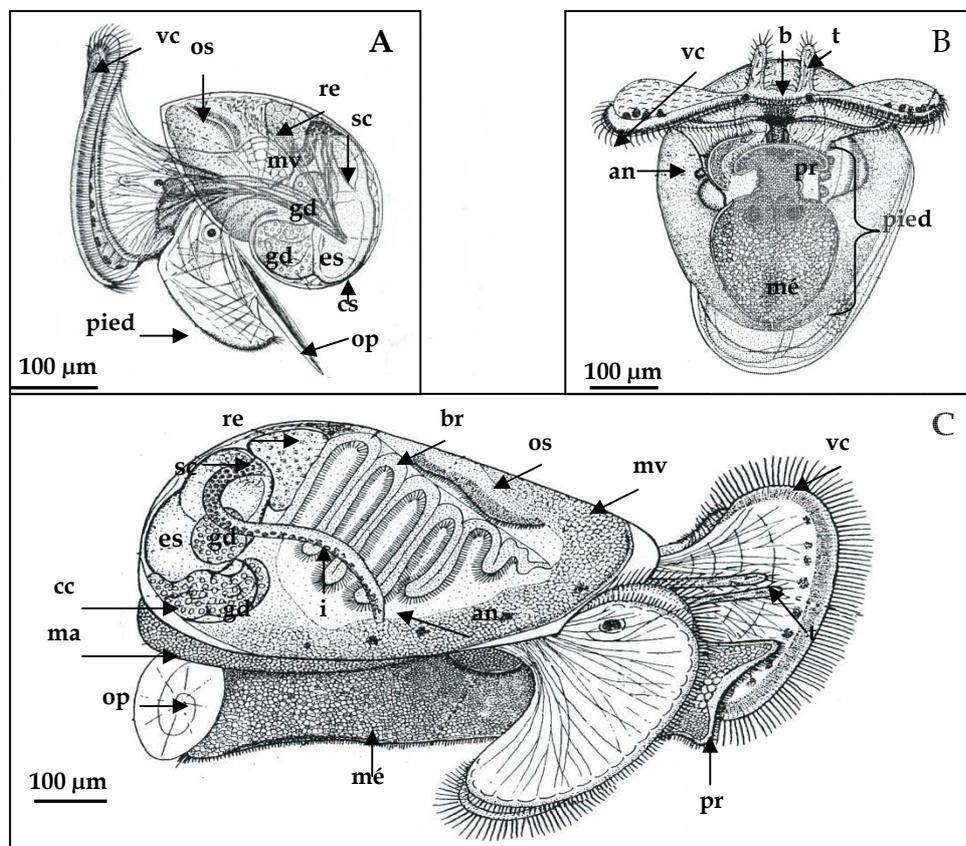


Figure 1.18. Développement de la larve de *Crepidula fornicata* dans la colonne d'eau (schémas modifiés d'après Werner 1948).

(A) Jeune larve véligère; (B) Larve véligère plus âgée; (C) Larve pédivéligère.

an = anus, b = bouche, br = branchie, cc = coquille en forme de 'chausson', coe = cœur, cs = coquille spiralée, es = estomac, gd = glande digestive, ma = manteau, mé = mésopodium, mv = masse viscérale, pr = propodium, op = opercule, os = osphradie, re = rein, sc = stylet cristallin, t = tentacule, vc = vélum cilié.

c. La métamorphose

L'inducteur majeur de la métamorphose chez le genre *Crepidula* est la présence de conspécifiques sur le site, qui diffuseraient dans l'eau des métabolites reconnaissables par les larves (MacGee & Targett 1989, Zhao & Qian 2002). Néanmoins, la présence d'autres coquilles et de débris de coquilles d'autres mollusques (Pechenik 1980) peut également induire leur métamorphose. À la métamorphose, le juvénile a une taille d'environ 1mm (Fig. 1.19 A, B).

En l'absence d'un substrat adéquat à la métamorphose, la crépidule peut retarder celle-ci jusqu'à 30 jours, aboutissant soit à la métamorphose spontanée des larves dans 95 % des cas, soit à leur mort pour seulement 5 % des larves (Fig. 1.20, Pechenik 1980, 1984). Lorsque la métamorphose est retardée, les larves de *C. fornicata* sont reconnaissables car elles continuent à croître, pouvant atteindre jusqu'à 1.4 mm de longueur de coquille (Fig. 1.20, Pechenik 1980). Les larves du genre *Crepidula* nouvellement compétentes tendent à répondre de façon plus spécifique aux sites favorables à leur installation, par rapport aux larves plus âgées qui deviennent moins discriminantes, se métamorphosant parfois sur n'importe quel site quand elles atteignent la fin de leur vie larvaire (Pechenik 1980; MacGee & Targett 1989).

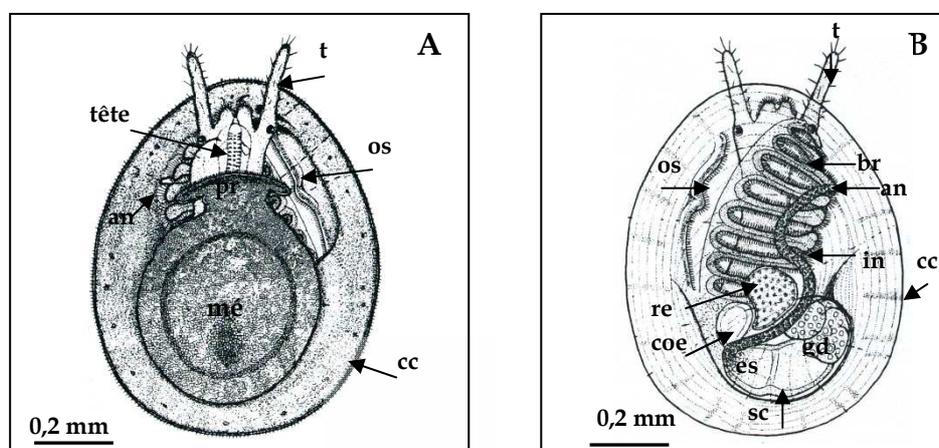


Figure 1.19. Anatomie d'un juvénile après la métamorphose (schémas modifiés d'après Werner 1948, 1955).

Juvénile en vue ventrale (A) et en vue dorsale (B). (B) Le contenu de la masse viscérale normalement non visible est représenté sur le schéma.

an = anus, br = branchie, cc = coquille en forme de 'chausson', coe = cœur, es = estomac, gd = glande digestive, mé = mésopodium, pr = propodium, os = osphradie, re = rein, sc = stylet cristallin, t = tentacule.

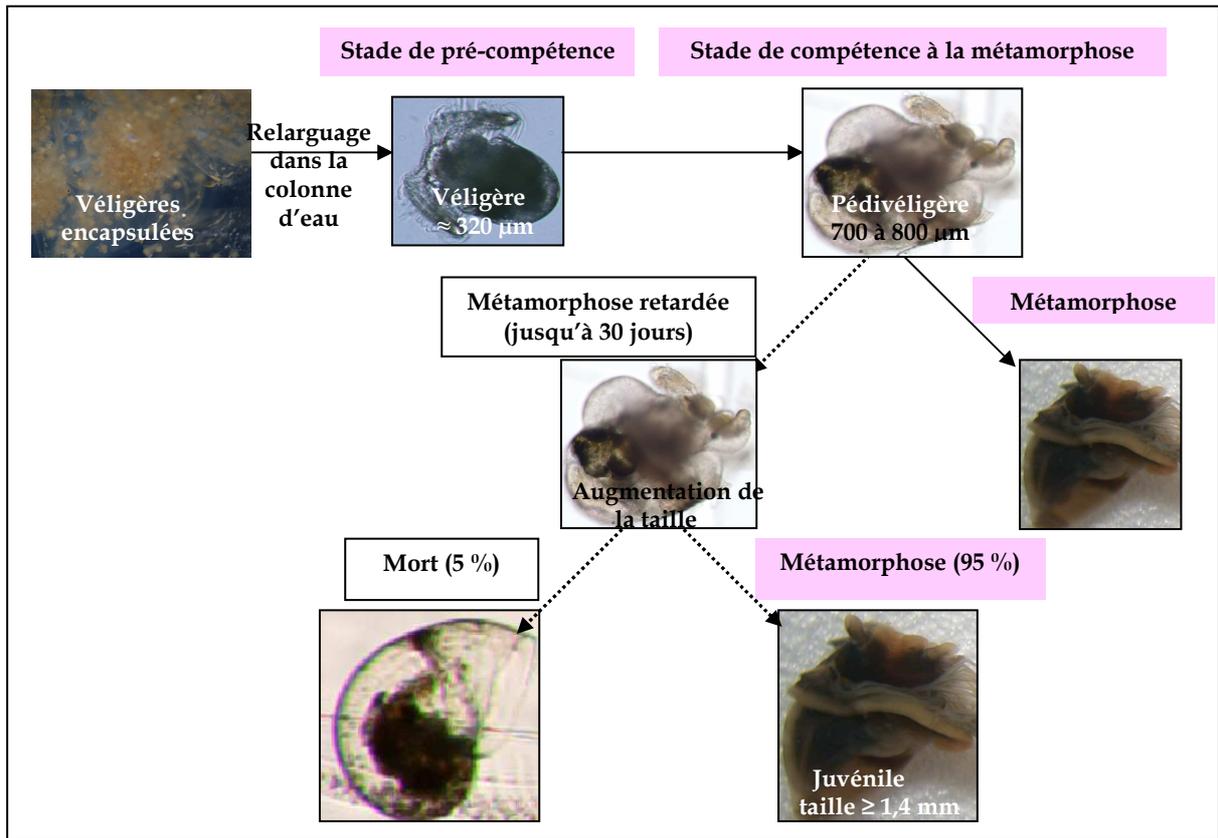


Figure 1.20. Les différentes étapes de la vie larvaire pélagique de *C. fornicata* jusqu'à la métamorphose (d'après Pechenik 1984).

1.5. UN ESPACE ENVAHI PAR LA CRÉPIDULE : LA BAIE DE BOURGNEUF

A. *Présentation de la baie de Bourgneuf: patrimoine biologique et ressources économiques*

La baie de Bourgneuf est située sur la façade atlantique française, au sud de l'estuaire de la Loire (Fig. 1.21 A). La baie est constituée de nombreuses vasières et marais qui constituent des zones d'attrait pour l'avifaune qui vient s'y alimenter et s'y reposer. Elle est ainsi classée parmi les **Zones Importantes pour la Conservation des Oiseaux (ZICO)**. De plus, située sur l'île de Noirmoutier, la réserve naturelle nationale des marais de Müllembourg, abritée du vent et des marées, représente en hiver un important reposoir de marée haute pour les limicoles, canards et bernaches, qui hivernent autour de l'île de Noirmoutier et en baie de Bourgneuf (Fig. 1.21 B). Outre les oiseaux, différents faciès d'habitats d'intérêt communautaire de la baie présentent des particularités biologiques et patrimoniales importantes justifiant leur classement en "Zones de Protection Spéciales" **Natura 2000**. En effet, on y retrouve des récifs d'hermelles parmi les plus imposants et étendus des côtes européennes (Fig. 1.21 C, Holt *et al.* 1998), des bancs de maërl constituant de véritables niches écologiques pour l'épifaune et l'endofaune (Grall & Hall-Spencer 2003) ou encore des herbiers à zostères (Fig. 1.21 D). Ces derniers constituent un habitat essentiel pour le développement de poissons (*e.g.* soles, mullets), de mollusques et de crustacés, pour le refuge d'oiseaux herbivores, et interviennent dans le recyclage des nutriments et dans la protection des côtes (Duarte 2000). La diversité des fonds et l'importance des ressources trophiques font de la baie une **zone halieutique** non négligeable. Elle sert de nourricerie fondamentale à l'échelle du Golfe de Gascogne à de nombreuses espèces de poissons plats (Le Pape *et al.* 2004) et constitue une zone de transit pour les poissons amphihalins tels l'anguille, la lamproie marine, l'alose ou encore le saumon atlantique (Desaunay *et al.* 1981).

La baie de Bourgneuf est un site important pour l'économie régionale de part l'exploitation des ressources marines *via* l'élevage de mollusques commerciaux, la pêche artisanale et la pêche à pied (Corlay & Robert, 1986). De nombreuses conditions sont en effet réunies pour faire de la baie un site propice aux cultures marines : un large estran, la présence de vasières, une eau de qualité et un climat tempéré (Haure & Baud 1995). Parmi les bassins conchylicoles français, la baie de Bourgneuf réalise plus de 95% de son chiffre d'affaire, avec une production d'environ 10,000 à 12,000 tonnes d'huître creuse *Crassostrea*

gigas par an (Fleury *et al.* 2003, Manger la Mer, 2009 (<http://manger-la-mer.org/les-crus-d-huitres-creuses-en>)).

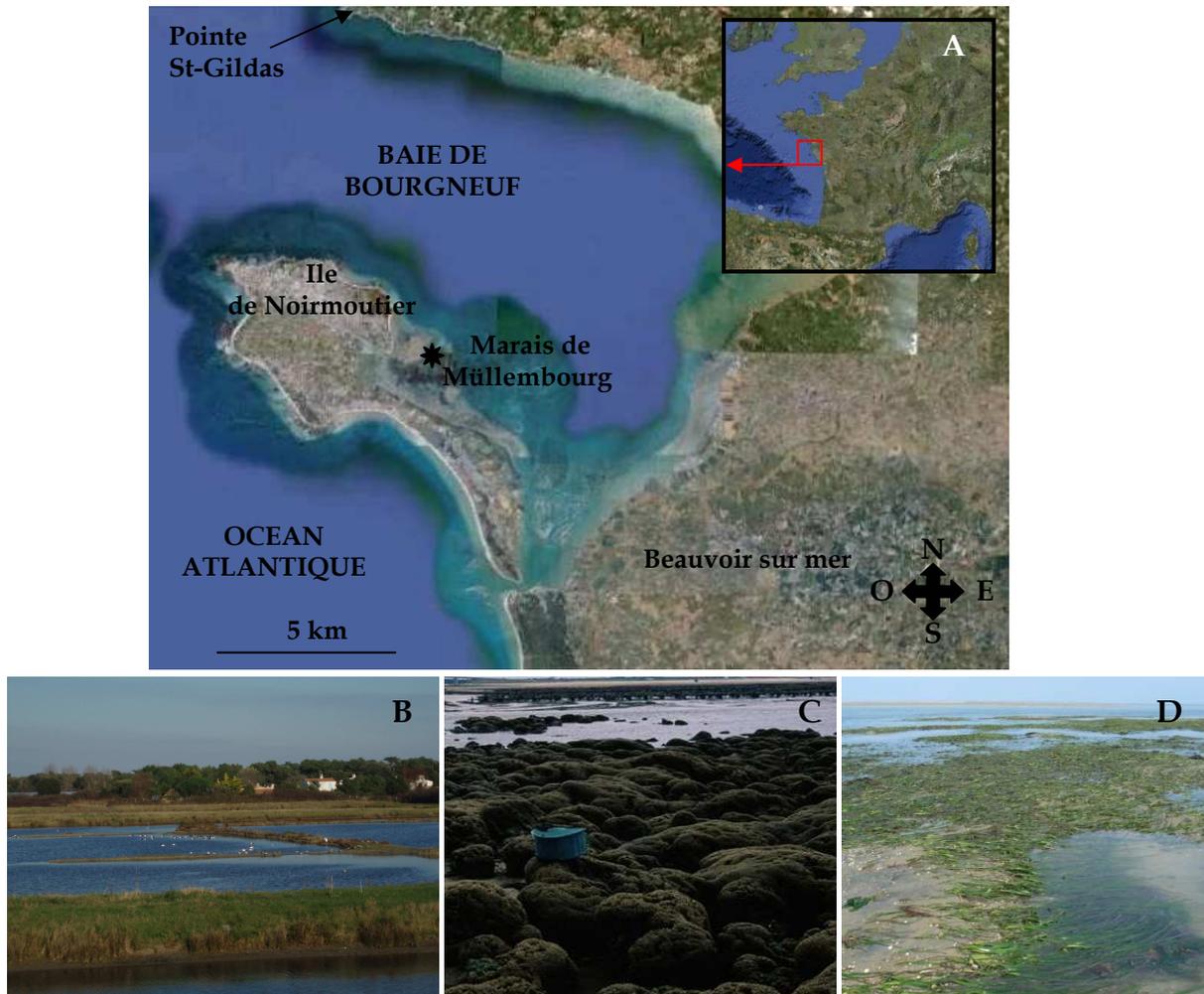


Figure 1.21. La baie de Bourgneuf.

(A) Carte géographique de la baie.

(B), (C), (D) Particularités biologiques de la baie; (B) Réserve naturelle nationale des marais de Müllembourg; (C) Récifs d'hermelles; (D) Herbiers à zostères.

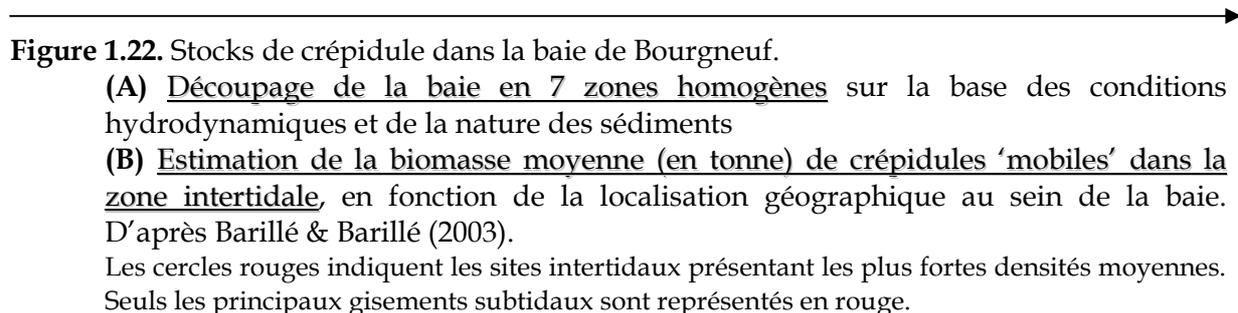
B. *Crepidula fornicata* dans la baie de Bourgneuf

Dans la baie de Bourgneuf, la présence de la crépidule est signalée dès 1964, du sud de l'estuaire de la Loire jusqu'à la pointe St Gildas (Marteil 1965). Néanmoins, c'est lors de la seconde vague invasive de cette espèce dans les années 1970 que la crépidule s'installe de façon pérenne dans la baie (Gruet *et al.* 1976, Blanchard 1995). Ce mollusque invasif est aujourd'hui extrêmement abondant sur la majorité des parcs ostréicoles ainsi que sur les zones de pêcheries d'organismes épibenthiques (de Montaudouin & Sauriau 1999, Thieltges *et al.* 2004). Contrairement à d'autres baies françaises colonisées, il faudra attendre presque quarante années après l'introduction de la crépidule dans la baie de Bourgneuf pour qu'une

estimation de son stock et de sa localisation géographique au sein de la baie soit réalisée par Barillé & Barillé, Sauriau (2003) et plus récemment Sauriau *et al.* (2006) :

Dans la zone intertidale, les crépidules peuvent être réparties en deux catégories : un stock sédentaire et un stock mobile. Le stock total de crépidules (mobile et sédentaire) atteint un tonnage de 5036. Les **crépidules sédentaires** sont généralement fixées sur des galets lourds, peu mobilisables par l'action de l'hydrodynamisme, elles représentent une biomasse limitée de 413 tonnes. Ce stock sédentaire est essentiellement localisé dans le secteur de la Bernerie (Fig. 1.22 A - Zone I). Le stock de **crépidules mobiles** est constitué de chaînes développées sur des coquilles vides d'individus, transportées à partir des stocks subtidaux vers l'estran, ainsi qu'au milieu des parcs ostréicoles sous l'influence des houles et des marées. La biomasse de ce stock mobile est importante, avec un tonnage de 4623, et est répartie de façon non homogène (Fig. 1.22 B). Ce stock est retrouvé sur les zones I, III, IV, VI et VII avec de fortes disparités de biomasse (Fig. 1.22 A, B). Les zones IV et VI, correspondant à des **zones de concessions ostréicoles, concentrent 78 % du stock mobile total** de la baie (Fig. 1.22 A, B).

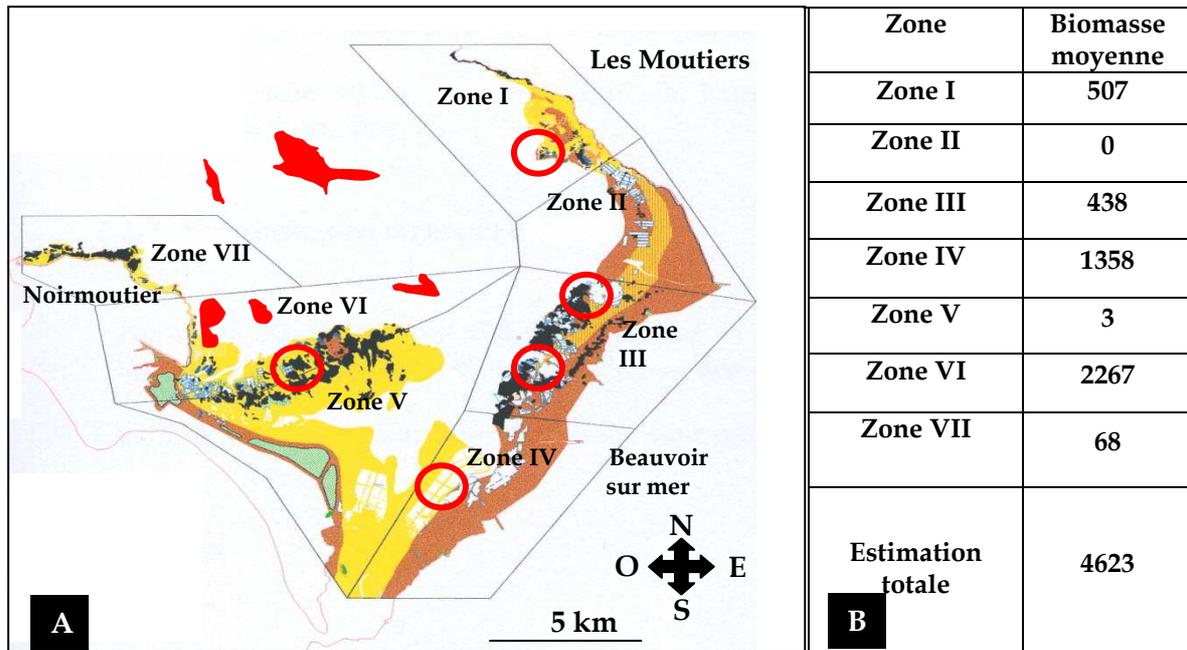
Le stock vivant subtidal ou stock des 'petits fonds' est estimé à 51000 tonnes, avec les densités les plus fortes identifiées au milieu de la baie, avec plus de 60 % du stock vivant de crépidule. À ce stock s'ajoutent des accumulations de coquilles vides qui servent de substrat de fixation aux larves et aux juvéniles. Cognie *et al.* (2008) ont observé la présence d'une forte proportion de femelles subtidales matures et incubantes face aux bouchots des Sableaux et face à la Pointe des Dames (nord-est de l'Île de Noirmoutier - Zone IV).

Figure 1.22. Stocks de crépidule dans la baie de Bourgneuf. 

(A) Découpage de la baie en 7 zones homogènes sur la base des conditions hydrodynamiques et de la nature des sédiments

(B) Estimation de la biomasse moyenne (en tonne) de crépidules 'mobiles' dans la zone intertidale, en fonction de la localisation géographique au sein de la baie. D'après Barillé & Barillé (2003).

Les cercles rouges indiquent les sites intertidaux présentant les plus fortes densités moyennes. Seuls les principaux gisements subtidaux sont représentés en rouge.



C. Conséquences de cette prolifération dans la baie

Les densités élevées de crépidules entraînent diverses conséquences dans les domaines conchylicoles, halieutiques et écologiques.

La crépidule, de part sa biomasse élevée dans le secteur subtidal, exerce une pression de filtration significative dans la mesure où la baie de Bourgneuf possède une capacité trophique limitée (Barillé-Boyer *et al.* 1997). A cet impact global s'ajoute une compétition trophique et spatiale locale exercée par les crépidules intertidales rencontrées au milieu des parcs ostréicoles (Barillé & Barillé 2003, Beninger *et al.* 2007, Decottignies *et al.* 2007 a, b). Les mauvaises performances de croissance des huîtres creuses observées depuis quelques années en baie de Bourgneuf résultent de causes multiples mais la crépidule par l'importance de son stock et son alimentation suspensivore contribue certainement à la dissipation des ressources trophiques disponibles sur lesquelles repose l'ostréiculture (Barillé & Barillé 2003). De plus, les crépidules se fixant sur les coquilles d'huîtres (Fig. 1.23 A) les nettoyages opérés localement dans les concessions ostréicoles sont coûteux en temps et en argent pour les professionnels (Blanchard 1997, 2001, Soulas *et al.* 2000).

Certains secteurs de pêche, traditionnellement exploités par dragage ou par chalutage, sont progressivement abandonnés du fait de l'augmentation du volume récolté de crépidules pouvant entraîner un colmatage des dragues (Fig. 1.23 B) et un allongement du temps de tri (Fig. 1.23 C) nécessaire avant la commercialisation des stocks dragués (*e.g.* coquilles Saint-Jacques, moules; Soulas *et al.* 2000, Blanchard 2001, 'NATURA 2000' en mer

2008). La présence massive de crépidules, y compris à même les fonds sableux conduit à la disparition progressive de ce secteur d'activité dans la baie.

Les zones de plus fortes concentrations de crépidules, abritées des plus fort courants, sont le plus souvent le siège d'un envasement important des fonds (Fig. 1.23 D). La présence de crépidules accélère l'accumulation de particules fines transitants au niveau du fond par le piégage qu'elles créent et par l'émission en grande quantité de biodépôts qui contribuent à l'envasement (Fig. 1.23 B, D). Ce phénomène altère la nature et la structure du benthos de façon irréversible et profitable à la crépidule (Ehrhold *et al.* 1998). Il entraîne une diminution de la biodiversité notamment chez les mollusques, les poissons indigènes, les crustacés (de Montaudouin & Sauriau 1999, Vallet *et al.* 2001) et une banalisation des fonds avec l'apparition d'une épifaune opportuniste, tels les ascidies et les polychètes tubicoles qui se fixent sur les coquilles de crépidules (de Montaudouin & Sauriau 1999). La prolifération incessante de la crépidule sur les zones de nurseries de la sole *Solea solea* entraîne une diminution du recrutement chez cette espèce (de Montaudouin & Sauriau 1999, Vallet *et al.* 2001, Le Pape *et al.* 2004).



Figure 1.23. Conséquences de la présence de la crépidule.

- (A) Crépidules fixées sur des huîtres - les flèches noirs indiquent les crépidules fixées.
- (B) Prélèvement à la benne sur un fond de crépidule montrant le phénomène d'envasement.
- (C) Opérations de nettoyage de mollusques colonisés par des crépidules. Photos provenant de la Fiche de synthèse d'habitat "Crépidule" - Avril 2009 Ifremer.
- (D) Tapis coquillier de crépidules entraînant un envasement du fond.

Dans la baie de Bourgneuf, il a été démontré pour une autre espèce invasive, les huîtres creuses férales, que le réchauffement de la température de l'eau entraînait une augmentation du succès reproducteur, du développement larvaire et du recrutement (Dutertre *et al.* 2010). Néanmoins, aucune étude n'a été effectuée sur l'impact du réchauffement climatique sur le succès de reproduction de la crépidule, pourtant d'importance capitale pour prévoir sa future expansion dans la baie, et le long des côtes atlantiques européennes.

Nous avons comparé le cycle sexuel de 2006-7 avec celui de données obtenues ultérieurement en 2000-1. Nous avons ainsi pu évaluer l'effet du réchauffement climatique sur la gamétogenèse de *C. fornicata* dans la baie et sur la durée des périodes de ponte - Troisième chapitre.

Bien que la crépidule pose de sérieux problèmes à la fois écologiques et économiques, très peu d'études se sont intéressés aux pathogènes procaryotes ou eucaryotes potentiellement hébergés par cette espèce invasive. Les quelques travaux effectués ont recherché la présence de trématodes, absents chez ce gastéropode (Prinz 2005, Thieltges *et al.* 2006). Néanmoins, la recherche de pathogènes chez cette espèce invasive est d'une importance primordiale. En effet, la crépidule étant extrêmement abondante sur les parcs ostréicoles et sur les zones de pêche de organismes épibenthiques, il y a un risque de transmission des pathogènes de *C. fornicata* vers ces espèces natives.

En examinant les lames histologiques lors de nos recherches sur le cycle sexuel de *C. fornicata*, nous avons détecté la présence d'un agent allogène infectant la glande digestive de cette espèce invasive. Nous avons étudié l'influence de la température de l'eau sur l'abondance de cet allogène de *C. fornicata* - Quatrième chapitre.

1.6. TECHNIQUES D'INTERVENTION POUR DIMINUER LA BIOMASSE DE LA CRÉPIDULE

A. Stratégie d'élimination de la crépidule

Les premières opérations de lutte contre l'invasion crépidulaire ont été réalisées à partir des années cinquantes, sans grand succès, dans le sud de l'Angleterre ainsi qu'aux Pays-Bas (Cole 1952, Fitzgerald 2007). Néanmoins, c'est le long des côtes atlantiques françaises que se sont concentrées l'essentielles des stratégies de diminution de la biomasse de cette espèce invasive les années 1980.

Les crépidules ont été mécaniquement récoltées, transportées, stockées puis traitées par diverses techniques tel l'exposition à l'air libre ou dans des fosses marines, l'enfouissement, l'étouffement, l'ébouillantage ou encore la cuisson. Cependant, la crépidule résiste à un grand nombre de ces techniques qui sont de plus très coûteuses et très problématiques en terme de pollution et d'hygiène publique (Blanchard & Thomas 1998, Soulas *et al.* 2000, Bonnet 2006, CREOCEAN 2006).

B. Essai de valorisation de la crépidule

En parallèle à ces stratégies d'élimination de la crépidule, des essais de valorisation agricole ou encore alimentaire de cette espèce ont été effectués. Dans les baies de Saint-Brieuc et de Cancale, un programme d'exploitation industrielle et de valorisation de la crépidule a été initié par l'association AREVAL, récoltant 50 000 tonnes de crépidules entre 2002 et 2006 au moyen d'une drague aspiratrice, pour une utilisation des coquilles en tant qu'amendement calcaire (Fig. 1.24 A, B, Soulas *et al.* 2000, Fitzgerald 2007). Néanmoins, en dépit d'un effort de prélèvement constant, le niveau de colonisation sur les sites dragués est resté conséquent. Des recolonisations s'opèrent en effet au niveau des zones nettoyées, dues à la dispersion de larves, de juvéniles et de chaînes de crépidules provenant des zones périphériques, sous l'action des tempêtes, des courants ou des passages d'engins de pêche (*e.g.* dragues et chaluts, Blanchard & Hamon 2006).

La valorisation de la crépidule pour l'alimentation animale et humaine a été expérimentée. L'élaboration de granulés pour les volailles, d'additifs alimentaires calcaires pour le bétail, de fourrage pour les poissons d'aquaculture, ou encore de nourriture pour les animaux de compagnie (Blanchard 2001, Fitzgerald 2007) n'ont pas été concluants du aux processus de préparation trop complexe (séparation des individus des chaînes et des chairs

des coquilles), et trop coûteux comparés à ceux déjà utilisés en routine avec d'autres ressources alimentaires (Fitzgerald 2007). L'utilisation de ce mollusque invasif pour l'alimentation humaine a souvent été soldée par des échecs. En Hollande, la pâte à base de chair de crépidule connue un vif succès durant la seconde guerre mondiale, mais celui-ci s'essouffla rapidement à la fin de la guerre. En Angleterre, en Espagne et au Maroc, les essais se sont également révélés infructueux (Fitzgerald 2007). Les coûts de préparation, les attitudes conservatrices des consommateurs et l'aspect peu attractif et élastique de la chair de la crépidule sont des points négatifs à sa commercialisation (Walne 1956, CREOCEAN 2006, Fitzgerald 2007). Néanmoins, l'usine 'Slipper Limpet Processing' installée depuis 2008 à Cancale a opté pour un décorticage à froid de la crépidule qui préserve la saveur et la texture de la chair. Renommé "Berlingot de mer" ou encore "Kokiaj", de nombreuses propositions de recettes à base de ce coquillage sont aujourd'hui disponibles (Fig. 1.24 F, G). Cependant, la tentative de commercialisation de ce nouveau produit est trop récente pour pouvoir estimer sa réussite économique.

L'utilisation de la chair de crépidule comme appât pour la pêche aux bars le long des côtes atlantiques françaises et anglaises est utilisé par quelques pêcheurs (Fig. 1.24 C-E). Les quelques témoignages sont positifs: le ramassage des crépidules sur l'estran est rapide et ne nécessite aucun investissement économique, de plus la chair de crépidule est un appât très efficace, qui peut se conserver indéfiniment dans un congélateur (Fishing Forum for Fishing, <http://www.fishing-forum.info/sea-fishing-tips-forum/9566-slipper-limpet-tutorial-part-1-harvesting.html>).

La crépidule contient de nombreux lipides et phospholipides, notamment la lécithine. (Barnathan *et al.* 2010). Leur plus fort taux est retrouvé au cours du mois de Janvier, lorsque les femelles possèdent un stock maximal d'ovocytes matures (Beninger *et al.* 2010a, b). Une valorisation est envisageable en tant que lécithine de haute qualité, un tensio-actif émulsifiant et dispersif important dans les industries agro-alimentaires et cosmétiques. De plus, la lécithine semble être de plus en plus appréciée pour ses propriétés biologiques, en particulier dans la lutte contre le psoriasis (Barnathan *et al.* 2010).

C. Action de lutte contre la crépidule dans la baie de Bourgneuf

La mise en œuvre d'actions de lutte contre les crépidules dans la baie de Bourgneuf s'est traduite par la création d'un comité de gestion spécifique, regroupant la SRC, l'Ifremer, l'Université de Nantes et le SMIDAP. Elle a abouti à la rédaction d'un projet de campagne expérimentale d'extraction de 10 000 tonnes de crépidules, concentrée sur le secteur du nord

de la baie (SMIDAP 2007). Ce projet intègre les opérations de collecte (pêche), de stockage temporaire à terre, de traitement et de valorisation locale ou non. Le dossier soumis pour avis et demande de financement au titre du Contrat de Projet Etat-Région (CPER 2007) 2007-2013, a reçu un budget de 3,720 millions d'euros pour les filières de la pêche et de l'aquaculture marine. Une partie de ce budget sera concédé à la lutte contre les compétiteurs présents dans la baie.



Figure 1.24. Moyens de diminuer la biomasse de la crépidule.

(A), (B) Projet Areval, récolte industrielle de la crépidule en Baie de Saint-Brieuc au moyen d'une barge aspiratrice (<http://www.ifremer.fr/delec/projets/habitats/crepidule/areval.htm>).

(C), (D), (E) Utilisation de la crépidule comme appât pour pêcher le bar, (C) Prélèvement de crépidules sur l'estran, (D) Séparation de la chair de la coquille, (E) Chairs récoltées, regroupées puis congelées (<http://www.fishing-forum.info/sea-fishing-tips-forum/9566-slipper-limpet-tutorial-part-1-harvesting.html>).

Utilisation de la crépidule pour l'alimentation humaine, crépidules décortiquées à froid (F) et verrine de 'berlingots' de mer (G) (<http://www.berlingot-de-mer.fr/index.html>)

Si plusieurs baies françaises tentent de limiter par un dragage pérenne la prolifération de la crépidule, la biomasse de cette espèce invasive reste tout de même élevée. Nous avons proposé une nouvelle stratégie de diminution de la biomasse de la crépidule, en étudiant sa faisabilité biologique - Cinquième chapitre.

1.7. INTÉRÊTS ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Les caractéristiques reproductrices de la *Crepidula fornicata* dans les eaux européennes participent à son succès invasif. Néanmoins, aucune étude sur les processus sous-jacents aux périodes de présence/absence de pontes n'a été effectuée chez cette espèce. Sur le plan fondamental, les recherches entreprises dans cette étude visent à approfondir significativement nos connaissances sur la reproduction de la crépidule et plus largement sur la famille des Calyptraeidae considérée comme exemple idéal pour l'étude de l'évolution des stratégies de vie, du développement, et de l'évolution du changement sexuel (Collin 2000). Les travaux de Le Gall (1980), bien qu'abondants et denses sur d'autres aspects de la reproduction de la crépidule, ne fournissent pratiquement aucune indication du cycle sexuel et de la gamétogenèse, pourtant d'importance capitale dans la perspective de l'évaluation de l'impact potentiel de la crépidule sur les écosystèmes colonisés. Cet aspect n'a pas non plus été abordé chez d'autres membres du genre *Crepidula* (Collin 2000, 2003, Chaparro *et al.* 2005). Il est vrai qu'il s'agit de l'aspect le plus complexe de la biologie reproductrice de l'espèce, caractérisée par un hermaphrodisme protandre. Une étude préliminaire dans la baie de Bourgneuf a révélée la complexité du problème: nécessité de prélèvements réguliers, mise au point d'une technique de coloration histologique adaptée à cette espèce, problèmes de vidage partiel des tubules gonadiques (Beninger & Barillé 2000). De telles recherches sur le cycle sexuel de la crépidule nous permettront d'évaluer l'effort relatif de reproduction de ce gastéropode invasif dans la baie de Bourgneuf.

Au-delà de la portée régionale de cette étude, qui nous éclaire sur l'invasion crépidulaire en baie de Bourgneuf, les approches méthodologiques et les résultats attendus seront très pertinents pour l'ensemble du littoral atlantique européen.

Le **second chapitre** décrit pour la première fois le cycle sexuel de *C. fornicata*. Pour cela, une analyse histologique des gonades mâles et femelles ainsi que des organes de stockage des spermatozoïdes (vésicule séminale chez les mâles et réceptacle séminale chez les femelles) a été effectuée sur 18 mois, de mars 2006 à septembre 2007, dans la baie de Bourgneuf. Celle-ci a été suivie par des observations en microscopie optique et des analyses stéréologiques des lames histologiques obtenues.

Dans le **troisième chapitre**, nous avons comparé les données obtenues pour le cycle sexuel de 2006 - 2007 avec des données non exploitées obtenues six années auparavant en 2000 - 2001 provenant de la même population de crépidules. Les variations historiques de

température et de chlorophylle *a* (chl *a*) dans la baie de Bourgneuf, ainsi que les variations de ces paramètres environnementaux pour les deux périodes d'échantillonnage ont été pris en compte et reliées aux cycles reproducteurs. Cela nous a permis d'évaluer la stabilité au cours du temps du cycle sexuel de *Crepidula fornicata* ainsi que l'effet du réchauffement de la température de l'eau et de la variation de la chl *a* dans la baie sur l'intensité du cycle de reproduction de cette espèce invasive.

Le **quatrième chapitre** décrit la présence d'un agent allogène dans la glande digestive de la crépidule. Cet agent allogène a été découvert lors de nos observations des lames histologiques effectuées pour décrire le cycle sexuel de la crépidule. Nous avons étudié l'influence de la température sur l'abondance de cet agent allogène.

Dans le **cinquième chapitre** nous présentons une nouvelle stratégie de diminution de la biomasse de la crépidule dans la baie de Bourgneuf, basée sur le broyage des crépidules draguées dans la zone sublittorale puis leur relargage directement en mer. Cette stratégie n'est faisable qu'à condition que le rejet à la mer ne contribue pas à l'extension des aires de répartition de cette espèce invasive. En effet, le risque de dissémination, par le biais des gamètes et/ou embryons et larves non broyés, doit être analysé avant de proposer cette approche à la minimisation de la biomasse de la crépidule. Notre étude examine la faisabilité biologique de cette stratégie de broyage en effectuant des fécondations externes et des élevages larvaires des embryons/larves mécaniquement excapsulés. Au-delà de l'aspect appliqué de cette étude, nous avons déterminé, en microscopie optique et en MEB, le développement intracapsulaire de la crépidule, encore non étudié à ce jour.

Dans le **sixième chapitre**, nous présentons nos travaux en cours sur l'ultrastructure des spermatozoïdes, du réceptacle séminal, et sur la nature des relations physiologiques entre les spermatozoïdes et l'épithélium ampullaire. Des photos en MEB et en MET, ainsi que des photos de coupes semi-fines sont présentées.

La **partie conclusive** nous permettra de synthétiser les connaissances acquises sur les bases biologiques de *Crepidula fornicata* et leurs implications dans la baie de Bourgneuf. Les perspectives de recherche ouvertes pour ces travaux sont également exposées.

SECOND CHAPITRE

ÉTUDE DU CYCLE SEXUEL DE L'ESPÈCE INVASIVE CREPIDULA FORNICATA DANS LA BAIE DE BOURGNEUF

CONTEXTE DES TRAVAUX

L'étude de la biologie reproductrice des espèces animales et végétales est d'une importance capitale pour comprendre leurs cycles biologiques. Connaître la stratégie reproductrice d'une espèce est un maillon essentiel dans la gestion des espèces d'intérêt commercial mais également des espèces invasives créant de sérieux impacts économiques et également écologiques (Adiyodi & Adiyodi 1989, Williamson 1996, Davis 2003, Barber & Blake 2006). Néanmoins, notre connaissance des différents aspects de la reproduction des mollusques invasifs estuariens et marins n'est pas très satisfaisante. Une meilleure connaissance des processus de reproduction de ces espèces invasives est une étape clé pour la compréhension du succès de la dispersion et de la prolifération de ces espèces dans leur nouvel environnement, permettant même dans certains cas le contrôle des populations établies (Myers *et al.* 2000).

La stratégie de reproduction de la crépidule favorise la reproduction avec plusieurs partenaires permettant d'éviter les effets délétères associés à la consanguinité et plus généralement d'augmenter la diversité génétique chez les jeunes (Dupont *et al.* 2006, Proestou *et al.* 2008). De plus, la larve pélagique parcourant plusieurs kilomètres par jour grâce aux courants maritimes (pendant 3 semaines à 1 mois) confère à ce gastéropode un important potentiel de dispersion à partir du foyer d'émission des larves (Blanchard 1997). La protandrie confère à *C. fornicata* un intérêt particulier: la capacité de changer de sexe facilite la colonisation de nouveaux habitats car elle réduit les risques de ne pas trouver de partenaire du sexe opposé pour la reproduction. Ces différentes caractéristiques assurent à la crépidule une **reproduction locale efficace** contribuant en grande partie à sa forte prolifération dans les zones infestées.

Le mode de reproduction de la crépidule a été le modèle le plus étudié parmi les prosobranches hermaphrodites protandres. En effet, dès la fin du XIX^{ème} siècle, un grand nombre de travaux décrivant la gonade, les tractus génitaux mais également les étapes et les facteurs intervenant lors de l'inversion sexuelle ont été réalisés aussi bien dans son aire native (Coe 1936, 1938a, 1938b, 1942, 1953, Wilczynski 1959, Hoagland 1978, Collin 1995) que dans ses aires d'introduction (Le Gall 1978, 1980, Martin 1985). Depuis ces dernières décennies, les recherches sur la reproduction de la crépidule ont été relativement abandonnées, alors que celles-ci présentent encore de nombreuses zones d'ombre. Aujourd'hui, les nombreuses investigations sur *C. fornicata* se sont principalement focalisées sur les conséquences de l'invasion de cette espèce et sur l'évaluation des effets de sa

prolifération sur les écosystèmes côtiers (Ehrold *et al.* 1998, Thouzeau *et al.* 2000, Vallet *et al.* 2001, Le Pape *et al.* 2004, Thieltges 2005a, b).

Pour une compréhension du processus invasif de *C. fornicata*, des informations précises sur son cycle reproducteur sont requises. Nos connaissances sur les aspects critiques de la reproduction de cette espèce invasive sont extrêmement limitées. Les travaux réalisés sur la reproduction, bien qu'abondants et denses sur d'autres aspects, ne fournissent pratiquement aucune indication du cycle sexuel et de la gamétogenèse pourtant d'importance capitale dans la perspective de l'évaluation de l'impact potentiel de la crépidule sur l'écosystème colonisé. Cet aspect n'a pas non plus été abordé chez d'autres membres du genre *Crepidula* (Collin 2000, 2003, Chaparro *et al.* 2005). **L'objectif de ce chapitre a donc été d'améliorer nos connaissances sur le cycle sexuel de *Crepidula fornicata* :**

Pour cela **(1)** des échantillonnages de crépidules ont été effectués de façon bimensuelle sur une longue période (18 mois) dans la baie de Bourgneuf, **(2)** après obtention de lames des testicules et des ovaires par une préparation histologique, des comptages stéréologiques ont été réalisés, sur un nombre de lames (mâle et femelle) statistiquement significatif.

Les cycles gamétogéniques mâle et femelle ont été reliés aux périodes de pontes et à la présence ou l'absence de spermatozoïdes dans leurs organes de stockage (vésicule séminale - mâle, réceptacle séminal - femelle).

ÉTUDE DU CYCLE SEXUEL DE *CREPIDULA* *FORNICATA*

D'après un article publié dans:

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2010, vol. 390, pp. 179-187,

✚ Ajout de la Figure 2.7 non présente dans la version publiée.

FIELD REPRODUCTIVE DYNAMICS OF THE INVASIVE SLIPPER LIMPET, *CREPIDULA FORNICATA*

Peter G. BENINGER, Alexandra VALDIZAN, Bruno COGNIE,
Priscilla DECOTTIGNIES

2.1. ABSTRACT

At least part of the invasive success of the slipper limpet, *Crepidula fornicata*, in European waters must be due to reproductive characteristics, yet the events underlying the easily-observed brooding and non-brooding periods have not yet been studied in this species. The reproductive system dynamics were therefore investigated using topological histology and quantitative histological techniques. Specimens were sampled twice monthly for 18 months from Bourgneuf Bay, France, a mid-latitudinal point in the European distribution of *C. fornicata*. Both the testicles and gonads showed active and resting phases, corresponding to the brooding and non-brooding periods, respectively. Maximum spermatozoan production corresponds to the female brooding period (female incubation of oviposited eggs, mid-March to late August), and allows males to possess full spermatozoan stocks at the height of fresh mature oocyte availability. The year-round presence of mature oocytes in the female gonad is misleading, since the histological aspect reveals that they are vestigial oocytes which slowly degenerate during the brooding period, possibly providing metabolites for the developing oocytes that become increasingly abundant during this period. A complete scheme of the *C. fornicata* reproductive cycle is presented, showing the events in the major reproductive organs.

The seminal vesicle shows high inter-month variability in sperm presence, suggesting year-round copulation and sperm storage in the seminal receptacle. The seminal receptacle shows a uniform covering of spermatozoa throughout the year, suggesting rapid renewal after fertilisation, again in line with multiple copulation throughout the year. Given the limited available space on the seminal epithelium, against which all spermatozoa abut, as well as polyandrous copulation, it is postulated that sperm competition may take place.

2.2. RÉSUMÉ

Le succès invasif de *Crepidula fornicata* dans les eaux européennes est du en partie à ces caractéristiques reproductrices. Néanmoins, si les périodes de ponte ont été reportées dans de multiples études, les processus gamétogénétiques à l'origine de la reproduction de cette espèce, quant à eux, n'ont jamais été décrits. Dans notre étude, nous avons étudié le cycle sexuel de cette espèce invasive, en effectuant une étude histologique des organes reproductifs. Des comptages stéréologiques des gamètes et des mesures des diamètres ovocytaires ont été réalisés. Les crépidules ont été échantillonnées deux fois par mois pendant 18 mois dans la baie de Bourgneuf (France), baie fortement colonisée par cette espèce invasive. La présence d'une phase active et d'une phase de repos a été observée aussi bien dans les testicules que dans les ovaires, correspondant respectivement à la période de présence et d'absence de ponte. La production maximale de spermatozoïdes s'étale de mi mars à fin août, correspondant à la période d'incubation des pontes par les femelles, permettant ainsi aux mâles de posséder un large stock de spermatozoïdes lorsque les ovocytes mûres sont prêts à être fécondés. Les ovocytes mûres ne sont pas présents tout au long de l'année dans l'ovaire, en effet, leur aspect histologique lors des périodes de ponte a révélé qu'il s'agissait d'ovocytes mûres vestigiaux, dont la lente dégénérescence pourrait probablement fournir des métabolites nécessaires aux ovocytes en développement, qui deviennent fortement abondants dans l'ovaire durant cette période. Un schéma exhaustif du cycle de reproduction de *C. fornicata* est présenté, montrant les principaux événements du cycle sexuel intervenants dans les différents organes reproducteurs.

La vésicule séminale montre de fortes variations des pourcentages de spermatozoïdes présents dans les ampoules en fonction des différents mois d'échantillonnage, suggérant une copulation continue au cours de l'année et un stockage du sperme dans le réceptacle séminal. Le réceptacle séminal montre un recouvrement uniforme des spermatozoïdes tout au long de l'année, suggérant un rapide renouvellement des

spermatozoïdes après la fécondation, grâce aux multiples copulations au long de l'année. Étant donné l'espace réduit disponible le long de l'épithélium séminal, contre lequel tous les spermatozoïdes sont accolés, et les accouplements multiples, il est fortement probable qu'une compétition spermique est lieu au sein du réceptacle séminal.

2.3. INTRODUCTION

Invasions of terrestrial, freshwater and marine habitats by non-indigenous species are occurring with increasing frequency throughout the world (Davis & Thomson 2000, Gouletquer *et al.* 2002, Wonham *et al.* 2005). The marine gastropod *Crepidula fornicata*, native to the East coast of the United States, is an involuntarily-introduced species that has progressively invaded the European coastline over the past decade, from the Mediterranean to Southern Norway (Blanchard 1997, Davis & Thompson 2000), notably in the shallow bays and estuaries where oyster farming is located. This recent rapid extension may be related to rising water temperatures, as has been observed for another temperate invader in these waters, *Crassostrea gigas* (Thieltges *et al.* 2004, Dutertre *et al.* 2010).

Along the Brittany coastline of France, sixty years after its introduction, *C. fornicata* populations constitute a considerable, and increasing, biomass (> 50,000 tons for Mont Saint-Michel, Saint-Brieuc, Brest and Bourgneuf Bays - Hamon & Blanchard 1994, Blanchard & Ehrhold 1999, Richard *et al.* 2006, Sauriau *et al.* 2006). *C. fornicata* can completely cover the sediment with up to several thousand individuals per square meter (Ehrhold *et al.* 1998, de Montaudouin & Sauriau 1999, Thieltges *et al.* 2004). Such high densities heavily impact the colonized habitat, irreversibly modifying the nature and structure of the bottom (Ehrhold *et al.* 1998, Grall & Hall-Spencer 2003), creating local competition for resources and space with suspension-feeders of commercial interest (oysters and scallops - Blanchard 1997, Beninger *et al.* 2007, Decottignies *et al.* 2007a, b) and disturbing both oyster farming and commercial fisheries relying on dredging (Blanchard 1997).

Notwithstanding a recent call for an effort to evaluate positive as well as negative ecological impacts of biological invasions, and notably for *C. fornicata* (Thieltges *et al.* 2006), the negative impacts of *C. fornicata* on commercial activities and on the marine environment have spurred attempts, as yet ineffective, to control its biomass (Blanchard 1995, 1997, Sauriau *et al.* 1998, 2006, Thieltges *et al.* 2004, Valdizan *et al.* 2009).

It is reasonable to suppose that the invasive success of the slipper limpet is at least partially related to its biological characteristics. Although potential predators such as crabs

and starfish exist locally, predation pressure is low (Coum 1979), possibly due to lack of familiarity with *C. fornicata* as a prey species. In addition, *C. fornicata* shows high ecological tolerance (Coum 1979). It is an opportunistic, generalist suspension-feeder (Barillé *et al.* 2006, Beninger *et al.* 2007, Decottignies *et al.* 2007a, b), and thus able to thrive under many different dietary conditions.

Proliferation and extension are consequences of reproduction. The reproductive traits of *C. fornicata* are thus of particular interest. The gregarious habit of *C. fornicata*, in addition to protandry with direct internal fertilization and sperm storage in both sexes (Coe 1936, Gaffney & MacGee 1992), are all characteristics which enhance reproductive success, compared with the broadcast spawning of most other suspension-feeding molluscs (Dupont *et al.* 2006). Although adult chains are sedentary, the pelagic larval stage enables natural dispersion and colonization of new habitats (Collin 2003, Dupont *et al.* 2006).

The reproductive success of *C. fornicata* is further enhanced by multiple spawning over the extended reproductive season (deduced from periods of brood presence), and the protection of early embryos through encapsulation and incubation (Pechenik 1979, Richard *et al.* 2006, Valdizan *et al.* 2009). However, understanding of *C. fornicata* reproductive biology is hampered by the lack of data on the underlying dynamics of reproduction. Neither the periods of gamete production, eventual resting phases, nor of gamete transfer to male and female storage organs, have been identified to date, such that it has not yet been possible to construct a realistic sequence of the pre-brooding events in *C. fornicata*. Indeed, although abundant histological and anatomical observations of the reproductive system have previously been performed in this species (Gould 1917a, b, 1952, Coe 1936), we are unaware of any data on the gametogenic cycle anywhere in the world. Such information is obviously of prime importance in order to understand the invasion process of this introduced species .

In the present study, we elucidate the field reproductive cycle of *C. fornicata* in 2006-2007, by examining the dynamics of tissue and gamete types in the various reproductive organs, as well as the occurrence of broods. We chose Bourgneuf Bay, France, as a study site, as it is a mid-latitudinal point in the European distribution of this species.

2.4. MATERIALS AND METHODS

A. *Specimen sampling and histological processing*

Bourgneuf Bay (French Atlantic coast, 46-47°N, 1-2°W) is a slipper limpet- invaded ecosystem, located south of the Loire estuary (Corlay & Robert 1986, Barillé-Boyer *et al.* 1997). Chains of *Crepidula fornicata* (L.) were sampled twice monthly from the intertidal, from March 2006 to September 2007. Five individual chains were collected, with a minimum of 50 slipper limpets for each monthly sample.

For each specimen, the visceral sac containing the entire gonad was removed and fixed in aqueous Bouin's fixative (Martoja & Martoja-Pierson 1967) for at least 1 month prior to dissection, thus avoiding gamete leakage when dissecting fresh slipper limpets. In order to control for eventual gametogenetic topological variability in the gonad, it was necessary to choose a readily-identifiable, topologically-invariable external anatomical marker for section locations (Morales-Alamo & Mann 1989). The anterior branch of the gonad was therefore sectioned in dorso-ventral planes passing through the heart (Fig. 2.1., B: 10 females and 5 males per sample). The sperm storage organs (i.e. the seminal receptacle for the females and the seminal vesicle for the males) were sectioned without respect to plane, as they were spherical and well-visible from the exterior (Fig. 2.1.A: 5 females and 5 males per sample). Samples were then dehydrated, embedded in paraffin, and 7 µm sections were cut and stained with a modified Masson's trichrome protocol (Martoja & Martoja-Pierson 1967, Gabe 1968). Observations, microphotographs, and analyses of the histological slides were performed using an Olympus light microscope, and image capture and processing software (LUCIA GF 4. 80).

B. *Reproductive dynamics analysis*

Stereological methods were used to determine volume fractions of different tissue types in the histological sections (Weibel *et al.* 1966, Briarty 1975, Morvan & Ansell 1988, Pazos *et al.* 1996, Mayhew 2000, Beninger *et al.* 2001). For each section of the ovary, stereological counts were performed on 3 randomly-chosen areas using a 10 × 10 point matrix on a microscope projector at 100X, as described in Beninger *et al.* (2001) for the archaeogastropod *Megathura crenulata*. Six tissue categories were counted: developing oocytes, mature oocytes, oocytes undergoing atresia, lysed oocytes, unoccupied tubule space, and inter-tubular space. Since male gonad tissue is scarce, irregular and small in the large visceral mass (Gould 1917a), counts were performed using a 20 × 20 point matrix at 200X on

3 randomly-chosen areas containing visible tubules. Six categories of male gonad tissue were counted: developing gametes, immature spermatozoa forming packets with their flagellae projecting toward the center of the tubule (heads and flagellae visible), mature spermatozoa in the tubule lumen, residual spermatozoa, unoccupied lumen, and inter-tubular space. Three counts were performed for each of the 3 randomly-chosen areas, and the means were calculated (with 95 % confidence intervals). For each sample, the means for all males were plotted, as were the means for all females.

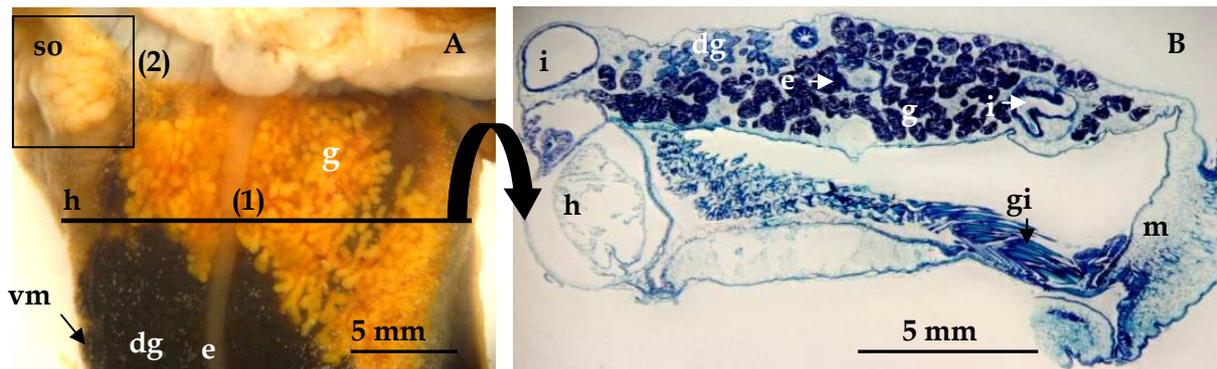


Figure 2.1. Anatomy of the anterior visceral mass (vm) of *Crepidula fornicata* (ventral view).
(A) Stereomicrograph showing the localisation of the sections performed (1) at the anterior branch of the gonad (g), (external marker = heart (h)), and (2) at the sperm storage organ (so, seminal vesicle in male, seminal receptacle in female).
(B) Histological section of the anterior branch of the gonad, showing anatomical relationship to surrounding structures. dg = digestive gland, e = esophagus, f = foot, gi = gill, i = intestine, m = mantle, p = pericardial sac.

Figure 2.1. Anatomie de la partie antérieure de la masse viscérale de *Crepidula fornicata* (vue ventrale).

- (A)** Photographie à la loupe binoculaire montrant la localisation des sections effectuées (1) à la branche antérieure de la gonade, (marqueur externe = cœur (h)), et (2) à l'organe de stockage des spermatozoïdes (so, vésicule séminale chez les mâles, réceptacle séminale chez les femelles);
(B) Section histologique de la branche antérieure de la gonade, montrant la gonade ainsi que les structures anatomiques présentes dans la masse viscérale. dg = digestive gland, e = esophagus, f = foot, gi = gill, i = intestine, m = mantle, p = pericardial sac.

C. Gamete status within the seminal receptacle and vesicle

The presence of histologically-intact spermatozoa in the ampullae of the sperm storage organs was monitored. Furthermore, for each male, the percentage occupation of 3 seminal vesicle ampullae was quantified using image analysis as described above; three counts were performed for each ampulla. For each ampulla the mean was calculated (with 95 % confidence intervals), and the mean for all the ampullae of the same male were calculated

(with 95 % confidence intervals). Subsequently, for each sampling date, the grand seminal vesicle mean for all of the males were plotted (with 95 % confidence intervals). This procedure was not possible in the seminal receptacle (= spermatheca) ampullae of females, since when present, spermatozoa abut and completely cover the ampulla epithelium, forming a single layer (Conklin 1897, Silberzhan 1978, Voltzow 1994). In females, therefore, only the presence or absence of a spermatozoan layer in the seminal receptacle ampullae was recorded.

D. **Brood Presence**

The incubation periods for *Crepidula fornicata*, identified by brood presence in 2006 and 2007 (Valdizan *et al.* 2009), were also used to assist in the interpretation of reproductive events.

E. **Determination of oocyte diameters**

Oocyte areas were measured for 20 oocytes for each female slide. In order to standardize the measurements, only oocytes in which the nucleus was visible were selected, and oocytes exhibiting obvious signs of degeneration were not chosen. Areas were automatically transformed by the image analyzer to give theoretical diameters, with the following equation: oocyte diameter (μm) = $2 \times \sqrt{(\text{oocyte area } (\mu\text{m}^2) / \pi)}$. For each sample, diameters from all females were pooled and used to determine the oocyte-size frequency distributions throughout the study.

F. **Data analysis**

Due to the exploratory nature of this work, no *a priori* hypotheses could be formulated. *A posteriori* tests (Kruskal-Wallis one-way non-parametric ANOVAs and Student-Newman-Keuls multiple range tests to detect significant differences in means over the course of the sampling period) were performed, but the results were uninterpretable, yielding many statistically-significant differences for which no corresponding chronological or physiological significance could be construed. We decided therefore to present the data graphically and construct our reasoning from the most obvious trends observed.

2.5. RESULTS

A. Males

a. Histological aspect

The testicular tubules showed two phases: active and resting. During the active phase, all stages of spermatogenesis were visible, and gamete maturation proceeded from the basal syncytium toward the tubule lumen. Latent oogonia could be observed along the basal syncytium, anticipating the subsequent sex reversal (Fig 2.2 A, B).

During the resting phase, the tubule lumen is dominated by the presence of degenerating male gametes and unoccupied space, yet developing gametes are still present along the tubule walls (Fig 2.2 C, D).

The seminal vesicles were replete with mature spermatozoa in all histological sections (Fig 2.2 E-G). The spermatozoa were randomly oriented, in contrast to the situation in the seminal receptacle (see below).

b. Reproductive cycle

Male tubules were scarce in the large visceral mass, as evidenced by the high percentages (41 % - 69 %) of inter-tubular tissue found throughout the sampling period; the lowest percentages corresponded to the periods of gametogenic activity, observed from April to early September 2006, and from March to late August 2007. During these periods, developing gametes, immature spermatozoa, and mature spermatozoa in the lumen occupied almost the entire gonad, with mean percentages (\pm 95 % CI) of 19.2 % (\pm 2.7), 10.5 % (\pm 1.7) and 13.9 % (\pm 1.6) respectively (Fig. 2.3 A). During the active periods, the percentage of mature spermatozoa was maximal with respect to the annual cycle, and no major decrease in these percentages was observed (Fig. 2.3 A). Unoccupied space (not shown) and degenerating spermatozoa (Fig. 2.4 A) were rare, with mean percentages (\pm 95 % CI) of 1.9 % (\pm 0.4) and 2.1 % (\pm 1.1) respectively.

A steady increase in degenerating gametes was observed beginning in July in both 2006 and 2007, with a maximum in October 2006 (data unavailable for 2007) (Fig. 2.4 A). The percentages decreased from October 2006 to April 2007, and the tail-end of such a decrease was also observed in March and April 2006 (Fig 2.4 A). Free mature spermatozoa occupied a low proportion of the tubule lumen during this gametogenically inactive phase (Fig. 2.4 A). Although developing gametes were present in relatively high proportions along the tubule

walls, they did not proceed to increase the proportions of mature gametes in succeeding months, indicating arrested development during this phase (Fig. 2.3 A).

c. Activity of the seminal vesicle

Decreases in the mean volume fraction of spermatozoa stored in the seminal vesicle ampullae indicate occurrences of copulation. Such decreases occurred frequently, with no discernable pattern over the course of the sampling period (Fig 2.5). The longest period of decrease was from mid-October to mid-December 2006, corresponding to the period of maximum spermatozoan atresia in the testicle (Fig. 2.5).

Figure 2.2. Histological sections of the testis and of the seminal vesicle of *Crepidula fornicata*.

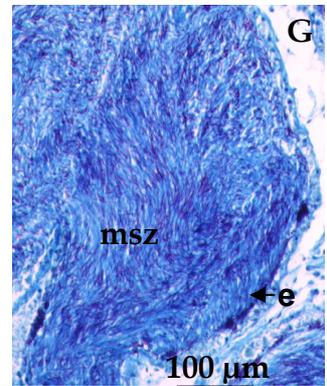
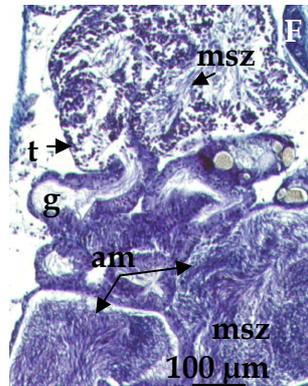
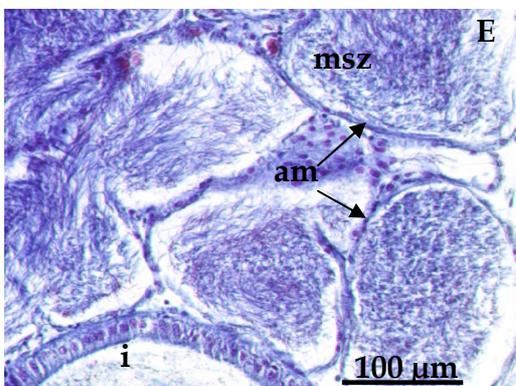
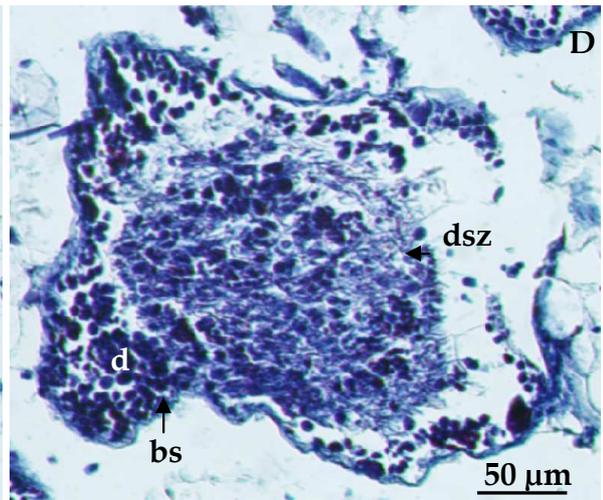
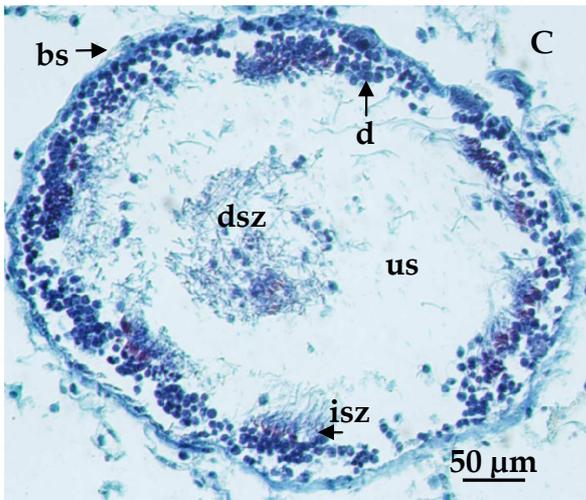
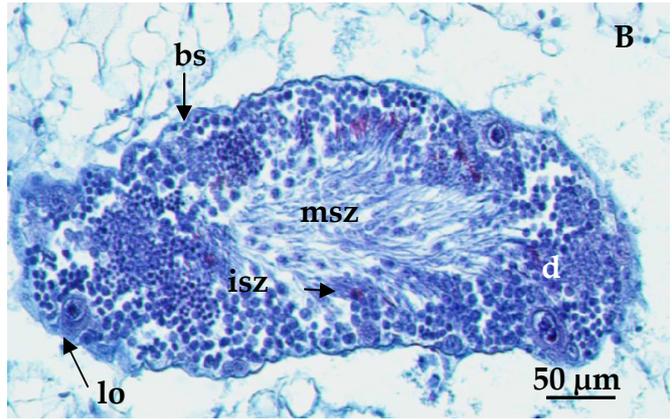
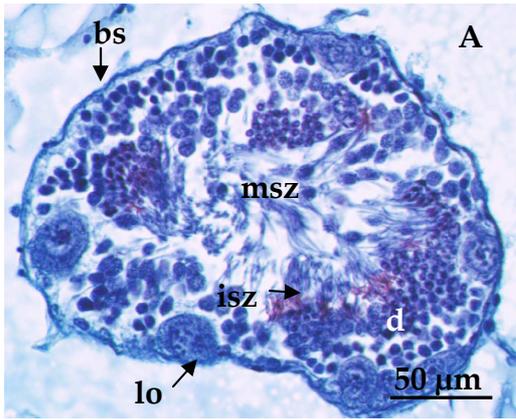
(A)-(D) Tubule of the testis. **(A), (B)** Tubule during the sexual activity period showing all stages of spermatogenesis from the basal syncytium (bs) to the center : developing gametes (d) forming a germinal layer, immature spermatozoa (isz) and free mature spermatozoa (msz) filling the lumen. Latent ovogonia (lo) are observed along the tubule walls. **(C), (D)** Tubule in degeneration, during the sexual rest period, showing: degenerating residual spermatozoa (dsz), unoccupied space (us). Developing gametes, still present, are scattered.

(E)-(G) Seminal vesicle. **(E)** Ampullae (am) of the seminal vesicle, near the intestine (i), filled with mature spermatozoa. **(F)** Detail of ampullae connected to the testis (t) by the gonoduct (g). **(G)** Detail of an ampulla showing the epithelial wall (e) and free mature spermatozoa in the center.

Figure 2.2. Sections histologiques du testicule et de la vésicule séminale de *Crepidula fornicata*.

(A)-(D) Tubules du testicule, **(A), (B)** Tubules durant la période d'activité sexuelle, montrant tout les stades de la spermatogenèse, de la lame basale (bs) vers la lumière: gamètes en développement (d) formant une couche germinale, spermatozoïdes immatures (isz) et spermatozoïdes matures (msz) libres remplissant le lumen. Des ovogonies en latence (lo) sont observées le long des parois des tubules; **(C), (D)** Tubules en dégénérescence durant la période de repos sexuel montrant: des spermatozoïdes résiduels dégénérés (dsz) et de l'espace unoccupé (us). Les gamètes en développement, toujours présents, sont dispersés.

(E)-(G) Vésicule séminale, **(E)** Ampoule (am) de la vésicule séminale, près de l'intestin (i), remplie de spermatozoïdes matures. **(F)** Détail d'une ampoule connectée au testicule (t) par le gonoducte (g). **(G)** Détail d'une ampoule montrant l'épithélium ampullaire (e) et des spermatozoïdes matures libres dans le lumen.



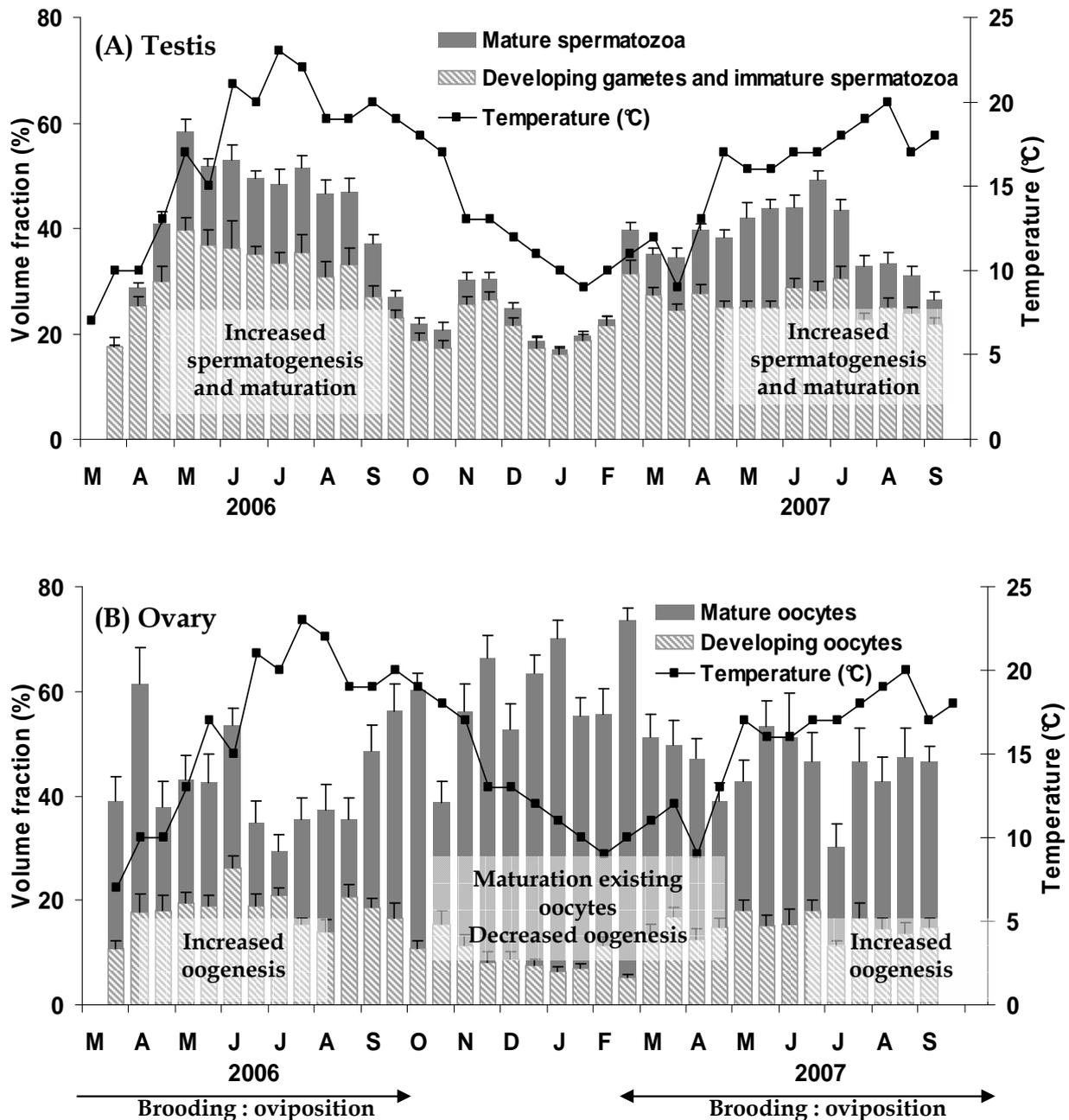


Figure 2.3. Stereological results for *Crepidula fornicata* gonads and water temperature from March 2006 to September 2007.

(A) Seasonal variations of mature spermatozoa and of developing gametes / immature spermatozoa percentages in the testis.

(B) Seasonal variations of mature oocytes and of developing oocytes percentages in the ovary.

Figure 2.3. Résultats stéréologiques pour la gonade de *Crepidula fornicata* et température de l'eau de mars 2006 à septembre 2007.

(A) Variations saisonnières des pourcentages de spermatozoïdes matures et de gamètes en développement / spermatozoïdes immatures dans le testicule.

(B) Variations saisonnières des pourcentages d'ovocytes matures et d'ovocytes en développement dans l'ovaire. Les flèches indiquent les périodes de pontes (Valdizan *et al.* 2009).

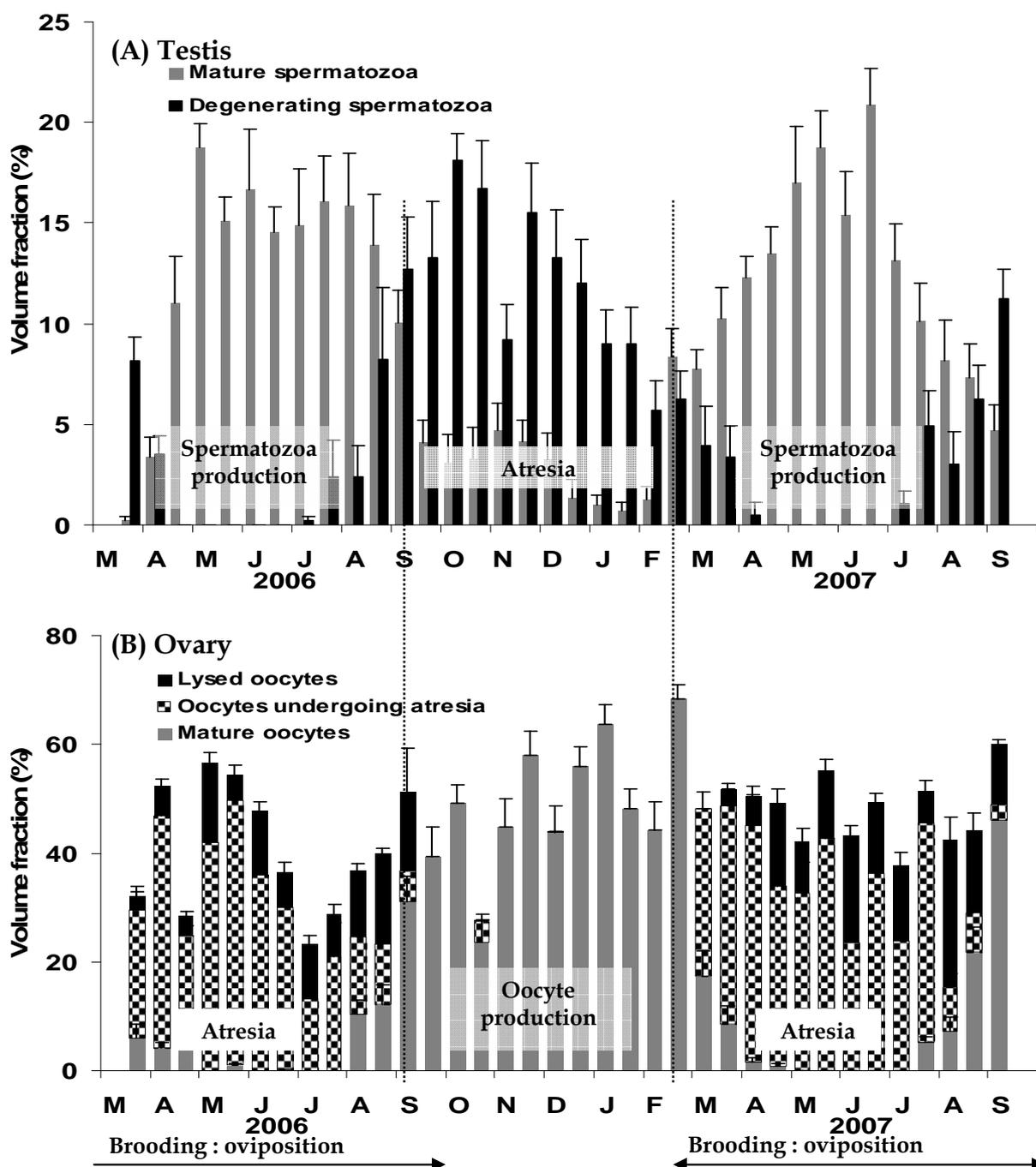


Figure 2.4. Stereological results for *Crepidula fornicata* from March 2006 to September 2007. (A) Seasonal variations of mature and degenerating spermatozoa percentages in the testis. (B) Seasonal variations of percentages of mature oocytes, oocytes undergoing atresia, and lysed oocytes in the ovary. Arrows, indicating brooding periods, are from Valdizan et al. (2009).

Figure 2.4. Résultats stéréologiques pour *Crepidula fornicata* de mars 2006 à septembre 2007. (A) Variations saisonnières des pourcentages de spermatozoïdes matures et en dégénérescences dans le testicule. (B) Variations saisonnières des pourcentages d'ovocytes matures, en cours de dégénérescence, et lysés dans l'ovaire. Les flèches indiquent les périodes de pontes (Valdizan et al., 2009).

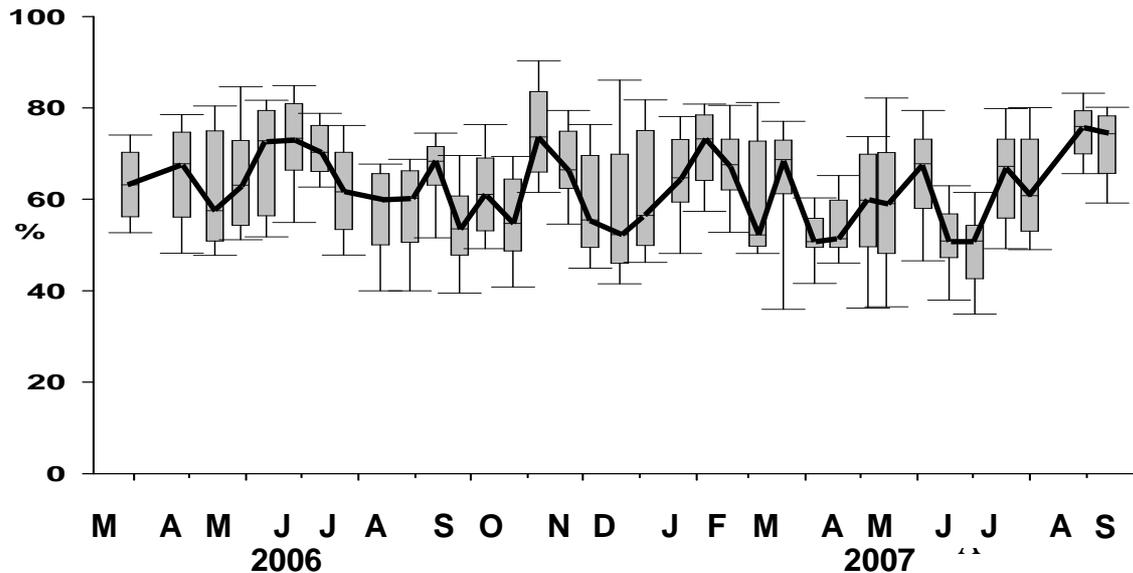


Figure 2.5. Percent occupation of spermatozoa within the seminal vesicle ampullae, from March 2006 to September 2007.

The boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, the line within the box marks the median, and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. Whiskers above and below the box indicates the 90th and 10th percentiles. The curve links all the medians.

Figure 2.5. Pourcentage d'occupation des spermatozoïdes à l'intérieur des ampoules de la vésicule séminale, de mars 2006 à septembre 2007.

La limite de la boîte la plus proche de zéro indique le 25ème percentile, la ligne dans la boîte marque la médiane et la limite de la boîte la plus loin de zéro indique le 75ème percentile. Les barres au-dessus et au-dessous de la boîte indiquent respectivement le 90ème et le 10ème percentile. La courbe relie toutes les médianes.

B. Females

a. Histological aspect

During brooding periods, tubules were dominated by the presence of mature oocytes undergoing atresia, characterised by irregular shapes, deformed appearances and sometimes cell membrane ruptures discharging vitellin droplets inside the tubules (Fig. 2.6 A-C), and by the presence in the tubule wall of high proportions of developing oocytes (Fig. 2.6 B, C). Lytic debris, coming from totally lysed oocytes, were scarce (Fig. 2.6 B, C), and did not seemed to spread throughout the tubules.

These characteristics may be contrasted with those of the non-brooding period (autumn 2006 - late winter 2007), in which the ovarian tubules were dilated and filled with voluminous mature oocytes (Fig. 2.6 D-F), while developing oocytes were rare, and sometimes totally absent (Fig. 2.6 E, F). The mature oocytes were characterized by their large size (not shown; mean \pm 95 % CI = 148.5 μ m \pm 1.4) and by the large density of very distinct

vitellin droplets, often as large as 10 μm in diameter, and dispersed in the cytosol rather than condensed (Fig. 2.6 F).

The ampullae of the seminal receptacle presented a uniform covering of mature spermatozoa conjoined to the inner epithelium (Fig 2.6 G-I). Only the basal nuclei were visible in the inner epithelium, suggesting a lack of cellular integrity at the interface with the spermatozoan heads.

b. Reproductive cycle

The histological profiles of the two ovarian periods described above indicate an active oogenic phase during the brooding periods, and a relatively inactive oogenic phase during the non-brooding period, as observed in the male gonad (Fig. 2.3).

The brooding phases were characterized by low percentages of intact mature oocytes (mean \pm 95 % CI = 1.9 % \pm 1.3, between March and late July 2006 and 2007), as illustrated in the histological profiles (Fig. 2.4 B). Indeed, the majority of the mature oocytes were undergoing atresia (mean \pm 95 % CI = 27.7 % \pm 5.4), and a minor proportion of them were totally lysed (mean \pm 95 % CI = 10.3 % \pm 2.5) (Fig. 2.4 B). The persistence of oocytes in degeneration during the brooding phases may indicate a very gradual atresia, favoring the survival and development of the developing oocytes. Indeed, the presence in high proportions of developing oocytes in the tubule wall was observed, with mean percentages (\pm 95 % CI) raising as far as 20 % (\pm 2.9) in April 2006 and 21 % (\pm 2.7) in May 2007 (Fig. 2.3 B), indicating an active oogenesis.

During the non-brooding winter phase, the percentages (\pm 95 % CI) of developing oocytes progressively decreased (from 13.8 % \pm 1.6 in September 2006 to 6.9 % \pm 0.8 in late January 2007) confirming the histological profile which indicated a reduced of the gametogenic activity, to the benefit of the maturation of these young oocytes. Indeed, the greatest proportions of mature oocytes were observed during the non-brooding winter phase with a mean percentage of (\pm 95 % CI) of 53.4 % (\pm 6.6), tapering off on either end of this phase (Fig. 2.4 B). The multiple minor decreases in the mature oocyte percentages during this period (Fig. 2.4 B) indicates that the bulk of the mature oocytes having been transferred to the uterus during the non-brooding period. Degenerating gametes (Fig. 2.4 B) and unoccupied areas (not shown) were small and rare, with mean percentages of 0.1 % and 0.18 % (\pm 0.1 and \pm 0.2, \pm 95 % CI), respectively.

Figure 2.6. Histological sections of the ovary and of the seminal receptacle of *Crepidula fornicata*.

(A)-(C) Ovary (o) during the brooding periods (2006 and 2007) showing the location inside tubules (t) of unoccupied space (us), developing oocytes (do), oocytes undergoing atresia (ao) and lysed oocytes (lo). The digestive gland (dg) and digestive tracts (d) are indicated in (A) and (D).

(D)-(F) Ovary during the period of oocyte maturation for the following brooding season (autumn 2006 to late winter 2007), showing dilated tubules filled with mature oocytes.

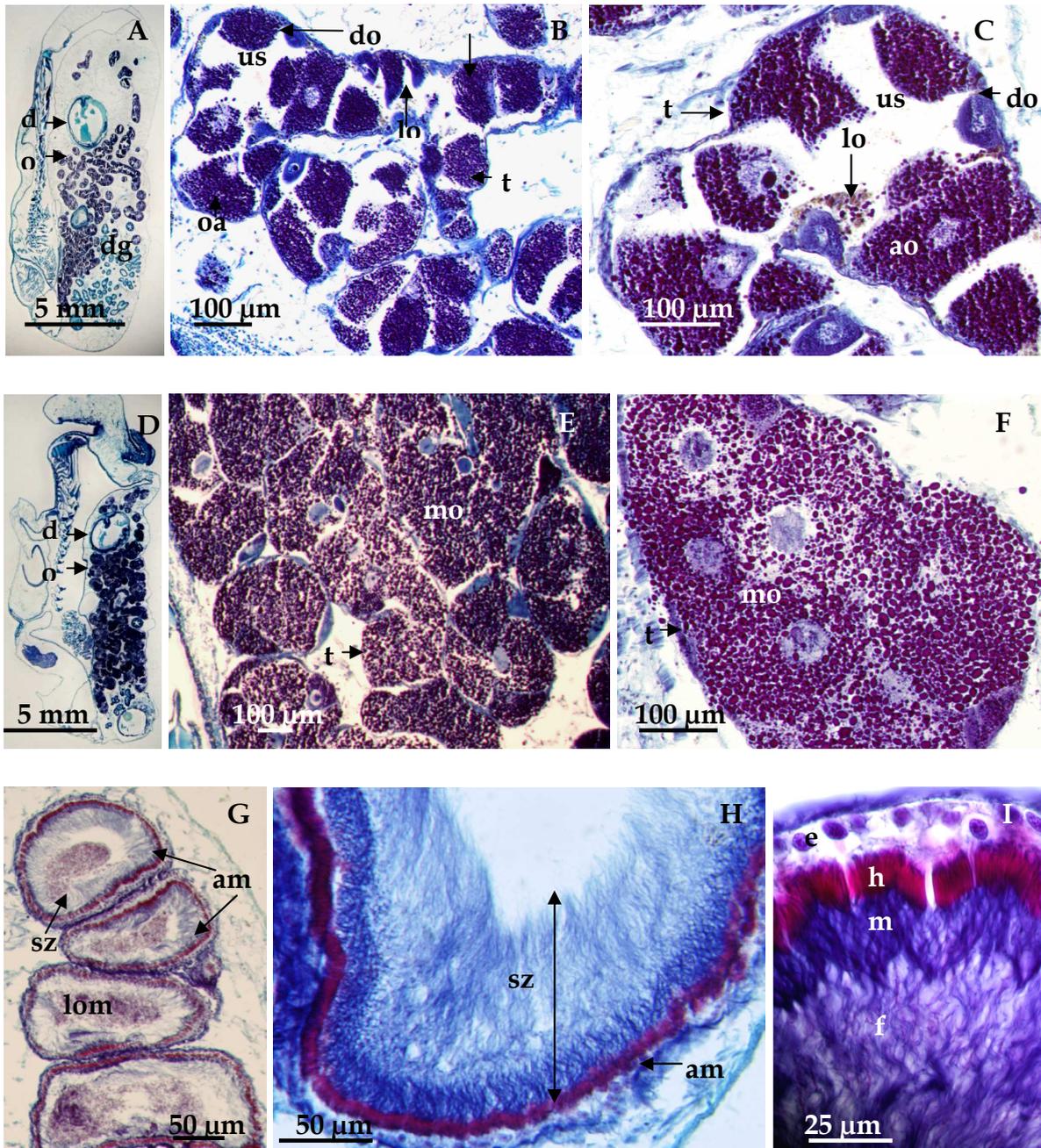
(G)-(I) Seminal receptacle, (G) Ampullae (am) of the seminal receptacle with spermatozoa (sz) conjoined to the epithelium, and luminal organic matter (lom); **(H), (I)** Detail of the epithelium (e) of an ampulla showing a single layer of conjoined spermatozoa, forming regular superposed zones corresponding to the three spermatozoan sections : h = head, m = midpiece and f = flagella. Note that the basal nuclei are visible in the ampulla epithelium.

Figure 2.6. Sections histologiques de l'ovaire et du réceptacle séminal de *Crepidula fornicata*.

(A)-(C) Ovaire (o) durant les périodes de ponte (2006 et 2007) montrant la présence à l'intérieur des tubules (t) d'espace inoccupé (us), d'ovocytes en développement (do), d'ovocytes en cours d'atrésie (ao) et d'ovocytes lysés (lo). La glande digestive (dg) et les conduits digestifs (d) sont indiqués en (A) et (D).

(D)-(F) Ovaire durant la période de maturation des ovocytes (automne 2006 jusqu'à fin hiver 2007), montrant des tubules dilatés remplis d'ovocytes matures.

(G)-(I) Réceptacle séminal, (G) Ampoule (am) du réceptacle séminal montrant des spermatozoïdes (sz) unis à l'épithélium, et de la matière organique (lom) présente dans la lumière; **(H), (I)** Detail de l'épithélium (e) de l'ampoule montrant une unique couche de spermatozoïdes unis à l'épithélium, formant des zones superposées correspondant aux trois parties du spermatozoïde: h = head, m = midpiece and f = flagella. Les noyaux basaux sont visibles au sein de l'épithélium ampullaire.



c. Oocyte diameters

The results of the size-frequency distributions of the oocyte diameters corroborate the sexual cycle tendency found with the stereological countings (fig. 2.6). Indeed, the greatest proportions of large mature oocytes (120 - 200 μm) were observed during the non-brooding winter period, whereas during brooding periods, very low proportions of large oocytes were observed, as the vestigial large oocytes were in degeneration. High proportions of developing oocytes (size $\leq 120 \mu\text{m}$) were also observed during brooding periods.

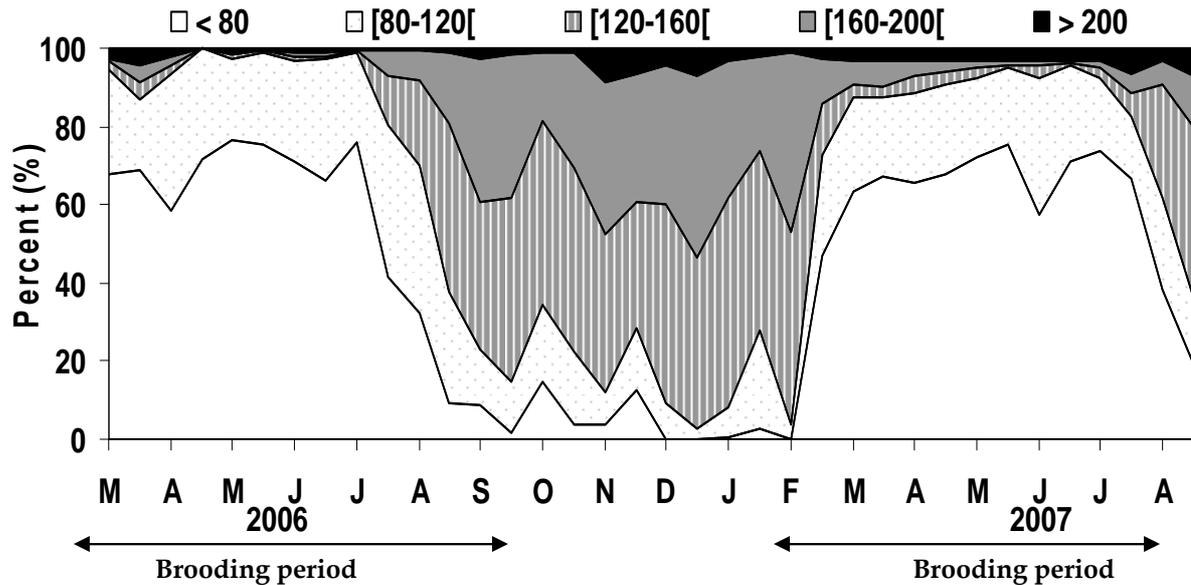


Figure 2.7. Size-frequency distributions of the oocyte diameters in *Crepidula fornicata* from March 2006 to September 2007.

Figure 2.7. Distribution des fréquences des diamètres ovocytaires chez *Crepidula fornicata* de mars 2006 à septembre 2007.

d. Activity of the seminal receptacle

The uniform spermatozoan cover of the seminal receptacle ampullae was observed throughout the sampling period, indicating continuous sperm storage by the female (Fig. 2.6 G, H, I).

1.6. DISCUSSION

A. Reproductive events underlying brooding and non-brooding phases

To our knowledge, the results of the present study constitute the first complete report on the reproductive cycle in *Crepidula fornicata*. As was observed in the present study, a distinct brooding period has been observed for *C. fornicata* at all of the sites at which broods have been monitored. A latitudinal effect appears to exist, with the later onsets of the brooding period in more northern latitudes (Richard *et al.* 2006). The present study documents the reproductive events underlying the brooding - non brooding periods.

Taking together the quantitative histological observations of both male and female *C. fornicata*, it is possible to construct an annual sequence of reproductive events (Fig. 2.8). Whereas the seminal vesicle and seminal receptacle do not show marked seasonal phases of

activity, both the testicle and the ovary show active and resting stages. A clear example of this is the arrested development of male gametes from late September 2006 to early February 2007. Although Coe (1936) showed a schematic of an active phase, no resting phase was mentioned. Here we present the histological aspect of both the active and the resting phase in *Crepidula fornicata* for the first time.

Testis	Sustained high spermatozoan production	Atresia Low spermatozoan production = Spermatogenic resting phase	Sustained high spermatozoan production
Seminal vesicle	Replete with spermatozoa (mean volume fraction $\geq 50\%$) High inter-month variability : indicator of copulation throughout the year		
Seminal receptacle	Uniform covering of spermatozoa conjoined to the internal epithelium No inter-month variability: spermatozoan storage for use upon ovulation - oviposition		
Ovary	Ovulation-oviposition Atresia of vestigial oocytes Increased oogenesis	Maximum oocyte maturation Multiple major transfers of oocytes to the uterus Decreased oogenesis = Oogenic resting phase	Ovulation-oviposition Atresia of vestigial oocytes Increased oogenesis
Broods	Oviposition - Incubation	No oviposition	Oviposition - Incubation

Figure 2.8. Summary of the field reproductive cycle of *C. fornicata* in Bougneuf Bay.

Figure 2.8. Synopsis du cycle de reproduction de *C. fornicata* dans la baie de Bourgneuf.

The alternating phases of the gonads largely conform to the alternating brooding and non-brooding periods of the females (Fig. 2.8), and show a close population synchrony in the timing of reproductive events (Fig. 2.8), notwithstanding a lack of such synchrony when considering only brooding events within a single chain (Richard *et al.* 2006). Female *C. fornicata* are here shown to invest heavily in oocyte production and vitellogenesis during the active oogenic phase in advance of the following brooding season. This strategy permits the

rapid production of broods as soon as the minimal water temperature (10°C) is attained to initiate oviposition (Werner 1948, Chipperfield 1951, Thieltges *et al.* 2004, Richard *et al.* 2006).

The period of most copulation occurs when the testis is in resting phase; this disposition favours renewal of the vesicle with freshly-generated sperm in the winter, although the amount of renewal is limited to about 25%.

B. Importance of the sperm storage organs

The exact reciprocal timing of the active and resting phases in males and females is enabled through the sperm storage organs, which allow the males to copulate throughout the year (as evidenced by the multiple and sequential decreases in spermatozoan volume of the seminal vesicle), and which also allow the females access to a sperm reservoir throughout the year (the seminal receptacle). Although the possibility of long - term sperm storage in the genus *Crepidula* was suspected by Coe (1936, 1942) and Hoagland (1975, 1978), this study constitutes the first histological demonstration that spermatozoa can viably exist in the seminal receptacle and vesicle of *C. fornicata* during winter. Metabolites for spermatozoan survival in the seminal vesicle may be provided by secretions of the epithelial cells (Martin 1985). It is also generally agreed that they are inactive at this stage, so that their energetic requirements are probably minimal (Runham 1988).

Storage of exogenous spermatozoa in the seminal receptacle, with much the same histological profile as that of *C. fornicata*, has been reported in other gastropods, from all higher taxonomic groups (Lind 1973, Beemann 1977, Trüb 1990, Baur 1994). In the present study, the seminal receptacle lining was observed to be uniformly covered with spermatozoa throughout the year. Our ongoing electron microscopic studies allow us to discard the possibility that the spermatheca is a site of excess spermatozoan resorption, as has been advanced for other gastropods (Luchtel *et al.* 1997). Two opposing scenarios may thus be proposed for the role of this organ. The first is that fertilization is effected by the female using the stored spermatozoa. In this scenario, the lack of an observed decrease in the spermatozoan covering would simply be due to the ephemeral nature of such an event, which was not observed on any of the sampling dates. Such a scenario would require rapid replacement of the sperm through a subsequent copulation, since the sampling period was two weeks, and the receptacle lining was always observed covered with sperm. The immediate advantage of such a scenario is that it allows the female to fertilize oocytes in accordance with the timing of their reproductive cycle, and in particular the timing of

brooding periods, thus avoiding oviposition when already incubating. The second scenario is that fertilization is effected primarily by the male immediately following copulation. In this scenario, the spermatozoa of the spermatheca would function only as a reserve in the event of non-copulation (e.g. mortality of males on the chain).

A third possible scenario also emerges from our observations and from previous studies in *C. fornicata*. The seminal receptacle may function as a reservoir not only for stored sperm from a previous copulation, but also as a theatre of sperm competition among spermatozoa from several males which have copulated with the same female. Evidence from many invertebrates possessing a seminal receptacle shows that this organ participates in diverse and complex ways in sperm competition (e.g. Elner & Beninger 1995, den Boer *et al.* 2010). Multiple paternity of single broods has been previously documented in *C. fornicata* (Gaffney & MacGee, 1992; Dupont *et al.* 2006), and it is possible that the site of sperm mixing and competition is the spermatheca, especially given the limited available space on the epithelial lining against which all spermatozoa abut. Molecular genetic studies on the spermatozoa found within the spermatheca should allow the elucidation of this interesting possibility.

2.7. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Mickaël Dutertre, Pierre Gaudin, Matthieu Le Pape, and Philippe Rosa for their technical assistance, and are grateful to Mad. Odile Aumaille for her help with histology. We thank the Conseil Général de la Loire - Atlantique for the attribution of a PhD grant to AV.

TROISIÈME CHAPITRE

EFFETS DU RÉCHAUFFEMENT DE L'EAU DANS LA BAIE DE BOURGNEUF SUR LE CYCLE DE REPRODUCTION DE *CREPIDULA FORNICATA*

CONTEXTE DES TRAVAUX

Les zones côtières présentent un des plus hauts niveaux de productivité biologique et une des plus fortes diversités de la biosphère (Mann 1982, Levinton 1995, Valiela 1995). Elles subissent pourtant une pression anthropique croissante qui altère les multiples biens et services qu'elle produit (Costanza *et al.* 1997). Cette pression anthropique affecte fortement les écosystèmes côtiers entraînant la perte et la dégradation d'habitats, la pollution des eaux ainsi que la surexploitation des stocks de poissons (EEA 2006). Le changement climatique global actuel a ajouté une pression supplémentaire sur les écosystèmes côtiers. En effet, l'augmentation de la température globale durant le XX^{ème} siècle a été la plus forte de ces 1000 dernières années (Robinson *et al.* 2005). Ce phénomène provoque l'accélération de la montée du niveau de la mer, des changements des conditions météorologiques (précipitations, orages) et augmente la température de l'eau (Robinson *et al.* 2005). Le changement climatique est une menace majeure pour la survie des espèces et pour l'intégrité des écosystèmes côtiers à travers le monde (Hulme 2005, ter Hofstede *et al.* 2010).

De plus, la majorité des prévisions estimant l'impact du réchauffement climatique sur les espèces invasives, suggère que celles-ci seront favorisées par ces changements, exacerbant leurs impacts sur les écosystèmes colonisés: **(1)** Augmentation de la compétition entre espèces invasives et espèces endémiques, réduisant les ressources et l'espace nécessaires à ces dernières; **(2)** Accroissement de l'altération des propriétés fondamentales des écosystèmes ; **(3)** Prédation et introduction de nouveaux agents allogènes pouvant infecter les espèces natives (Dukes & Mooney 1999). L'augmentation de la prolifération d'espèces invasives due à ce réchauffement planétaire est donc une forte menace pour l'environnement (Dukes & Mooney 1999; Stachowicz *et al.* 2002).

La diminution des températures hivernales et des températures estivales sur les côtes atlantiques européennes semblent faciliter l'établissement et la persistance sur ces côtes d'espèces invasives provenant de climat plus chaud, voir subtropicaux (Stachowicz *et al.* 2002, Nehls *et al.* 2006). Lors de l'introduction involontaire dans les années 1990 de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans la mer des Wadden, les individus n'étaient présents que de façon sporadique probablement due aux températures trop basses retrouvées dans ces eaux ne permettant pas à cette espèce de proliférer. Aujourd'hui, la population de *C. gigas* est devenue extrêmement abondante avec une biomasse atteignant plusieurs millions d'individus. Cette progressive invasion de l'huître creuse est liée à l'augmentation des températures estivales observée dans la mer des Wadden, permettant un fort taux de

recrutement des juvéniles (Diederich *et al.* 2005, Nehls *et al.* 2006). De même, dans la mer de Wadden, l'espèce invasive *Crepidula fornicata* est plus abondante et retrouvée dans de plus forte proportion par rapport aux années ayant suivi son introduction. Cela semble être dû à la diminution de la forte mortalité hivernale de cette espèce en raison de températures hivernales moins rigoureuses (Thieltges *et al.* 2003, Nehls *et al.* 2006).

Dans la baie de Bourgneuf, l'augmentation des températures de l'eau de mer durant le siècle dernier a augmenté le succès de reproduction chez une autre espèce invasive de la baie, l'huître creuse férale *Crassostrea gigas* (Cognie *et al.* 2006, Dutertre *et al.* 2010). Concernant *C. fornicata*, aucune donnée estimant l'effet de l'augmentation de la température dans la baie sur son succès invasif n'est disponible.

L'objectif de ce chapitre a été de déterminer l'effet du réchauffement de l'eau sur le succès de la reproduction de *Crepidula fornicata* dans la baie de Bourgneuf. Pour cela, nous avons examiné l'influence de la température de l'eau sur deux cycles sexuels de *C. fornicata* séparés par 6 années (2000-1 vs 2006-7).

RÉCHAUFFEMENT DE LA TEMPÉRATURE DE L'EAU ET SUCCÈS REPRODUCTEUR DE L'ESPÈCE INVASIVE *CREPIDULA FORNICATA*

Article révisé, envoyé à Marine Ecological Progress Series le 5 avril 2011.

EVIDENCE THAT RISING COASTAL SEAWATER TEMPERATURES INCREASE REPRODUCTIVE OUTPUT OF THE INVASIVE GASTROPOD *CREPIDULA FORNICATA*

Alexandra VALDIZAN, Bruno COGNIE, Priscilla DECOTTIGNIES,
Marianne CHANTREL, Peter G. BENINGER

3.1. ABSTRACT

Although water temperature is thought to be an important factor in the proliferation of the invasive slipper limpet, *Crepidula fornicata*, along the northern European Atlantic coast, evidence for this proposition is scarce. We used quantitative histology to compare the reproductive dynamics over two temporally- separated sexual cycles (2000-1 and 2006-7) from the same *C. fornicata* population, in Bourneuf Bay, France. Water temperature and Chl *a* data were also analyzed in relation to historical trends and to reproductive processes. Historical temperature data show a progressive warming trend, especially since 1995, when the slipper limpet problem began to be severe. Similarly, the incidence of high Chl *a* peaks increased markedly from 1996 onwards. Significantly higher water temperatures and more Chl *a* peaks were found for the 2006-7 sampling period compared to 2000-1, and corresponded to (1) an increase in duration of brood presence, most notably the appearance of broods earlier in the year, and (2) an increase in intensity of gametogenesis in 2006-7. These results support the hypothesis that increased Northern European water temperatures enhance the reproductive success of *C. fornicata*, both through more favorable gametogenic / brooding temperatures and through enhanced phytoplankton availability.

Key words: temperature, warming, proliferation, Chlorophyll *a*, invader, reproduction

3.2. RÉSUMÉ

La température de l'eau semble être un facteur important intervenant dans la prolifération de l'espèce invasive *Crepidula fornicata*, le long des côtes Atlantiques européennes. Néanmoins, peu de données sont disponibles sur l'effet de ce facteur environnemental. Nous avons utilisé la technique de l'histologie quantitative pour comparer les dynamiques de reproduction de deux cycles sexuels de *C. fornicata* séparés par plusieurs années (2000-1 et 2006-7), provenant de la même population de crépidules dans la baie de Bourgneuf, en France. Les données de la température de l'eau et de la concentration en chlorophylle *a* ont été également analysées et comparées aux données des tendances historiques de ces deux paramètres environnementaux et aux processus de reproduction. Les données historiques de la température montrent un réchauffement progressif, particulièrement à partir de 1995, coïncidant avec l'augmentation accrue des problèmes engendrés par la crépidule dans la baie. De même, la fréquence de pics élevés de chl *a* augmente nettement à partir de 1996. Des températures significativement supérieures et de plus nombreux pics de chl *a* ont été retrouvés pour la période de 2006-7 en comparaison avec 2000-1, et correspondent à **(1)** une augmentation de la durée de ponte, largement due à une apparition plus précoce des pontes au cours de la période de 2006-7, et **(2)** une augmentation de la gamétogenèse en 2006-7. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que l'augmentation de la température dans les eaux nord-européennes augmente le succès reproducteur de *C. fornicata* en favorisant la gamétogenèse et les périodes de ponte grâce aux températures élevées et à l'augmentation de la disponibilité du phytoplancton.

3.3. INTRODUCTION

The calyptraeid gastropod *Crepidula fornicata* has become a major invasive species along European Atlantic coasts, with a geographic range from Spain to Norway (Blanchard 1997, Davis & Thompson 2000). Its proliferation has considerably impacted the shallow, soft and mixed-bottom habitats in which it is found (Le Pape *et al.* 2004, Arbach Leloup *et al.* 2008). The abundance of *C. fornicata* heavily modifies the nature and the structure of the habitat (through biodeposition production and shell accumulation) to the advantage of this species (Ehrhold *et al.* 1998). Furthermore, it creates competition for food and space with economically-important suspension-feeders (oysters and scallops - *e.g.* Blanchard 1997, Beninger *et al.* 2007, Decottignies *et al.* 2007a, b) and disturbs both oyster farming and commercial bottom fisheries (additional cleaning operations before commercialisation of

molluscs, drag clogging on productive epibenthic shellfish sites, e.g. Blanchard 1997, 2001, Soulas *et al.* 2000).

Along the Brittany coast of France, sixty years after its introduction, *C. fornicata* populations constitute a considerable, and increasing, biomass. High densities have been reported in several bays, using different techniques (e.g. side-scan sonar, submarine videos, quantitative samplings, mapping): 160 000 tons in Mont Saint-Michel Bay (mean density 267 T km⁻² - Blanchard & Ehrhold 1999); 250 000 tons in Saint-Brieuc (mean density 313 T km⁻² - Hamon & Blanchard 1994); 128 000 tons in Brest (826 T km⁻² - Chauveau 1998); 51 000 tons in Bourgneuf Bay (146 T km⁻² - Sauriau 2003, Barillé & Barillé 2003, Sauriau *et al.* 2006). Despite several strategies applied to control its biomass (Blanchard & Thomas 1998, Soulas *et al.* 2000, Bonnet 2006), slipper limpet proliferation appears to be continuing unabated (Sauriau *et al.* 1998, Blanchard & Ehrhold 1999, Blanchard 2009, Valdizan *et al.* 2009).

Proliferation of an invasive species depends on its successful reproduction; it is therefore important to investigate the reproductive dynamics of *C. fornicata* in relation to environmental variables which most impact this process. Although the complex reproductive dynamics of *C. fornicata* has recently been documented (Beninger *et al.* 2010a, b), information on the eventual changes to such dynamics over recent years obviously requires at least two recent data sets, separated by an appreciable time interval. In the present study, therefore, an additional, previously unexploited data set from the same population of the Bourgneuf Bay (France) in 2000 - 2001 was analyzed in the same manner as in 2006 - 2007 (Beninger *et al.* 2010a, b), providing two data sets separated by a 6-year time interval.

Warming of water temperature may increase the success of invasive species by facilitating their geographic spread and by promoting more successful reproduction, larval development, and juvenile recruitment (Stachowicz *et al.* 2002, Thieltges *et al.* 2004, Diederich *et al.* 2005, Cognie *et al.* 2006, Dutertre *et al.* 2010). A pronounced positive effect of water warming on the reproduction of another invasive species *Crassostrea gigas* (feral oysters) has previously been documented (Cognie *et al.* 2006, Dutertre *et al.* 2010) for Bourgneuf Bay. It thus seems logical to investigate the same possibility for *C. fornicata*. We therefore investigated the relationship between temperature and the reproductive dynamics of a *C. fornicata* population in Bourgneuf Bay, a mid-latitudinal point in the European *C. fornicata* distribution, at two chronologically-spaced points in recent time: 2000-2001 and 2006-2007.

3.4. MATERIALS AND METHODS

A. Specimen sampling, histological preparation and reproductive dynamics analysis

Crepidula fornicata specimens were hand-collected in the intertidal of Bourgneuf Bay (Fig. 3.1), a slipper limpet - invaded ecosystem, located south of the Loire estuary (Barillé & Barillé 2003, Valdizan *et al.* 2009, Beninger *et al.* 2010a, b). A minimum of 50 slipper limpets were sampled once or twice per month from late June 2000 to late June 2001, and twice per month from late March 2006 to September 2007. Stacks of approx. 4-5 individuals were selected, in order to ensure equal representation of males and females (the bottom 2 generally female, the rest either male or transitional in this protandric species). The topological and quantitative histological protocol followed that of Beninger *et al.* (2010a, b). Masson trichrome stain, photomicrography, and stereological counting were performed. Stereological methods were used to determine volume fractions of different tissue types in the histological sections (Weibel *et al.* 1966, Briarty 1975, Morvan & Ansell 1988, Pazos *et al.* 1996, Mayhew 2000, Beninger *et al.* 2001). For each section of the ovary, stereological counts were performed on 3 randomly-chosen areas using a 10 × 10 point matrix on a microscope projector at 100X, as described in Beninger *et al.* (2001) for the archaeogastropod *Megathura crenulata*. In females, six tissue categories were counted: developing oocytes, mature oocytes, oocytes undergoing atresia, lysed oocytes, unoccupied tubule space, and inter-tubular space. Since male gonad tissue is scarce, irregular and small in the large visceral mass (Gould 1917a), counts were performed using a 20 × 20 point matrix at 200X on 3 randomly-chosen areas containing visible tubules. Five categories of male gonad tissue were counted: developing gametes, immature spermatozoa, mature spermatozoa, residual spermatozoa, unoccupied lumen, and inter-tubular space in males. Three counts were performed for each of the 3 randomly-chosen areas, and the means were calculated (with 95 % confidence intervals). For each sample, the means for all males were plotted, as were the means for all females.

Samples from December 2000 (males and females) and from late June 2001 (females only) could not be counted, due to gamete leakage from tubules close to the plane of biopsy (the only tubules visible at this location in the gonad in these months). For each sample, the presence or absence of incubated egg capsules (brooding) was noted and used to assist in the interpretation of reproductive events.

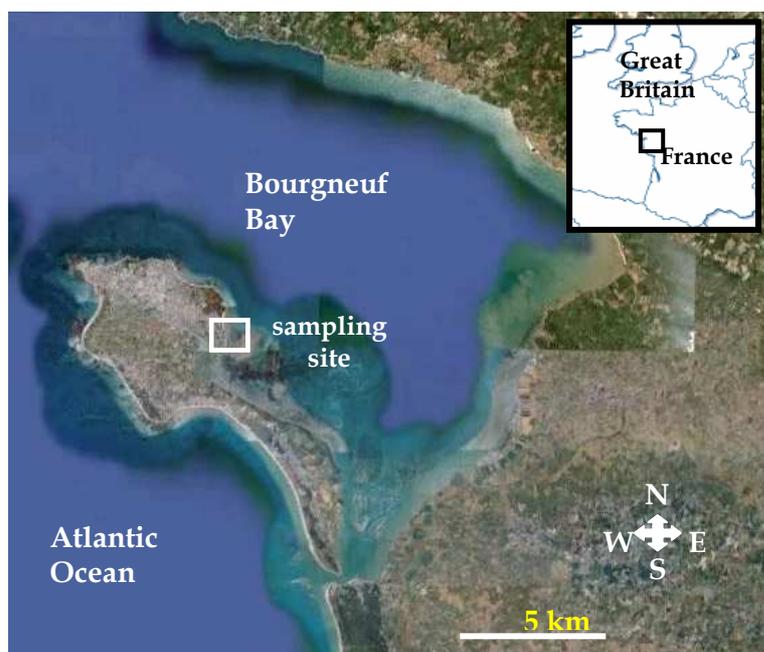


Figure 3.1. Map showing location of study area and sampling site of slipper limpets, *Crepidula fornicata*, in Bourgneuf Bay (Google Earth® image).

Figure 3.1. Carte montrant la localisation de l'aire d'étude et le site d'échantillonnage des crépidules, *Crepidula fornicata*, dans la baie de Bourgneuf (image provenant de Google Earth®).

B. Water temperature over the sampling periods, historical water temperature and chlorophyll *a* data

The REPHY (REseau PHYtoplancton <http://www.ifremer/envlit/surveillance/rephy.htm>) is a long-term survey of French coastal waters conducted by the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER (IFREMER), since 1984. Bimonthly measurements of temperature and chlorophyll *a* (chl *a*, µg.L⁻¹) were extracted from the REPHY Quadrige database, for the two sampling periods in Bourgneuf Bay.

Water temperatures (WT) prior to 1984 were calculated between January 1970 and December 2007, using the following regression (Haure & Baud 1995):

$$WT = 0.8703 \times AT + 0.036 \times TC - 0.0969$$

Atmospheric temperatures (AT) were obtained from Météo-France's Climathèque database (Noirmoutier station, 2°15'24''W, 47°00'18''N) and tidal coefficients (TC) using the Marées dans le monde 2.02© software. Chl *a* data for Bourgneuf Bay were extracted from the REPHY Quadrige database, from 1996 to 2007. No chl *a* values were available prior to 1996.

C. Data analysis

SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific) was used to check the normality and homoscedasticity of data distributions and subsequent statistical analyses. Annual means of environmental factors were compared between 2000-1 and 2006-7 by Student t-tests. ANOVA was performed when stereological countings, historical water temperatures and historical chl *a* data were normal and variances homogeneous, or Kruskal-Wallis test was performed when data were non-normally distributed and characterized by heterogeneous variances. All tests were followed by multiple comparison Tukey tests to detect significant differences in means ($P < 0.05$) of gamete volume fractions between 2000-1 and 2006-7, and of temperature and chl *a* over time. A non-parametric linear regression was used to detect an eventual change in historical water temperatures over time.

3.5. RESULTS

A. Gametogenic cycle stability of *C. fornicata*, 2000 - 2001 vs 2006 - 2007

a. Males

The 2000-2001 male sexual cycle presents the same general profile as previously described for 2006-2007 (Beninger *et al.* 2010a, b): (1) a period of high spermatozoan production in spring - summer (Fig. 3.2), characterized by the presence of all stages of spermatogenesis from the basal syncytium to the gonad tubule lumen, (2) a period of spermatozoan atresia in autumn - winter (Fig. 3.2), characterised by the presence of a large proportion of degenerating gametes in the tubule lumen.

As observed in Beninger *et al.* (2010a, b) for 2006-2007, the mean percentage of developing gametes (spermatocytes and immature spermatozoa) in 2000-2001 was significantly greater during the high spermatozoan production periods than during the period of atresia (Fig. 3.2; Tukey tests; $F = 8.2$; $n = 17$; $df = 13$; $P < 0.001$). Nevertheless, throughout the sampling interval, the developing gamete proportions were significantly lower for 2000 - 2001, compared to 2006 - 2007 (Fig. 3.2; Tukey tests; $F = 22$; $n = 19$; $df = 27$; $P < 0.001$), with mean percentages ($\pm 95\%$ CI) of, respectively, 15.7 % (± 2.4) in 2000 - 2001, and 26.1 % (± 2.2) in 2006 - 2007. Despite the low spermatogenesis observed for 2000-2001, the mature spermatozoa proportions inside the tubules during spermatozoan production periods were highly similar to those found for 2006-2007 (Fig. 3.2; Tukey tests; $F = 1.12$; $n =$

21; df = 5; P = 0.348), with mean spermatozoan percentages (\pm 95 % CI) of 16.9 % (\pm 5.5) for 2000-2001 and 14.4 % (\pm 2.2) for 2006-2007.

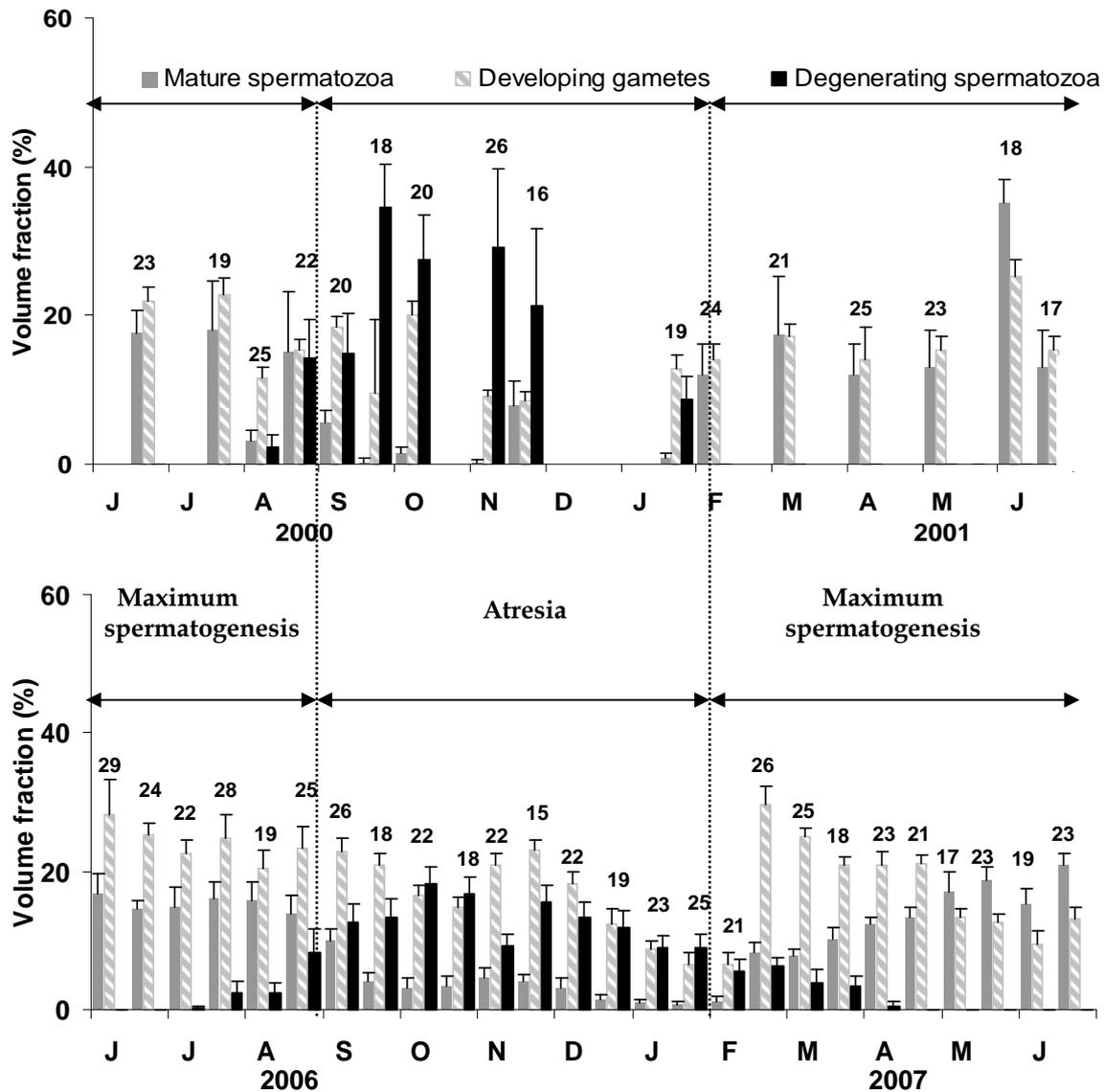


Figure 3.2. Stereological results for *Crepidula fornicata* testis. Volume fractions of mature spermatozoa, developing gametes (spermatocytes and immature spermatozoa) and degenerating spermatozoa in the testis, June 2000 - June 2001 (one or two samples per month), and June 2006 - June 2007 (two samples per month), means \pm 95 % confidence intervals.

Dotted lines delineate common phases of the reproductive cycle in 2000-1 and 2006-7. Data unavailable in December 2000, due to gamete leakage from tubules close to the plane of biopsy (the only tubules visible at this location in the gonad in these months). Sample sizes are indicated above each confidence intervals.

Figure 3.2. Résultats stéréologiques pour le testicule de *Crepidula fornicata*. Fractions volumiques de spermatozoïdes matures, de gamètes en développement (spermatocytes et spermatozoïdes immatures) et de spermatozoïdes en dégénérescence dans le testicule de juin 2000 à juin 2001 (un à deux échantillonnages/mois), et juin 2006 à juin 2007 (deux échantillonnages/mois), moyennes \pm IC à 95 %.

Les lignes en pointillé délimitent les différentes phases du cycle reproducteur en 2000-1 et 2006-7. Donnée non disponible en décembre 2000, du à un vidage des gamètes des tubules au niveau du plan de coupe (les seuls tubules visibles à cet endroit dans la gonade pour ce mois). La taille des échantillons est indiquée au dessus des intervalles de confiance.

b. Females

The 2000-2001 female sexual cycle presents the same general profile as previously described for 2006-2007 (Beninger *et al.* 2010 a, b): **(1)** a period of oocyte atresia in spring - summer (Fig. 3.3), characterised by the presence of oocytes slowly degenerating and sometimes totally lysed inside the tubules, **(2)** a period of oocyte maturation in autumn - winter (Fig. 3.3), characterized by the presence of large mature oocytes filled with vitellin droplets in the gonad tubules.

Beninger *et al.* (2010 a, b) observed that female gamete production followed a clear annual cycle in 2006-2007, with developing oocyte percentages (mean \pm 95 % CI) significantly greater during brooding periods (13.5 % \pm 2) than during the non-brooding period (10.2 % \pm 2.6) (Fig. 3.3, Tukey tests; $F= 64.12$; $n = 21$; $df= 71$; $P < 0.001$). In contrast, the percentages of developing oocytes for 2000-2001 were statistically much lower, with mean developing oocyte percentages as little as four times less than in 2006-2007 (Tukey tests; $n = 23$; $F= 22.6$; $df= 24$; $P < 0.001$); no distinct variations of the developing oocyte proportions throughout the sampling period were observed (Fig. 3.3).

As was observed for the male gametes, despite the low oogenesis found for 2000-2001, the mature oocyte percentages observed during the oocyte maturation period were similar to those found in the same period for 2006-2007, with mean percentages (\pm 95 % CI) of 47.1 % \pm 10.6 for 2000-2001 and 47.5 % \pm 7.5 for 2006-2007 (Fig. 3.3, Tukey tests; $F = 1.43$; $n = 23$; $df = 7$; $P = 0.19$). Multiple minor decreases in the mature oocyte percentages were observed for both sampling periods during the non-brooding period, indicating that the bulk of the mature oocytes had been transferred to the uterus during the non-brooding period (Fig. 3.3; Beninger *et al.* 2010 a, b).

Periods of brood presence were markedly shorter in 2000 - 2001 (late March - late July) than in 2006 - 2007 (mid-February - late October; Figs. 3.5, 3.6). As brood presence was recorded approximately every 2 weeks, it was not possible to determine the exact date of initiation or termination of brooding. Figs. 3.5 and 3.6 therefore show the dates at which broods were actually observed, and dotted lines indicate the earliest possible date of brooding, based on the observation of the previous sampling date, and of maximum date of brood presence, based on the observation of the following observation date.

Figure 3.3. Stereological results for *Crepidula fornicata* ovary.

Volume fractions of mature oocytes, developing oocytes, atresic oocytes and lysed oocytes in the ovary, June 2000 - June 2001 (one or two samples per month) and June 2006 - June 2007 (two samples per month), means \pm 95 % confidence intervals. Dotted lines delineate common phases of the reproductive cycle in 2000-1 and 2006-7.

Data unavailable in December 2000 and in late June 2001 due to gamete leakage from tubules close to the plane of biopsy (the only tubules visible at this location in the gonad in these months). Sample sizes are indicated above each confidence intervals.

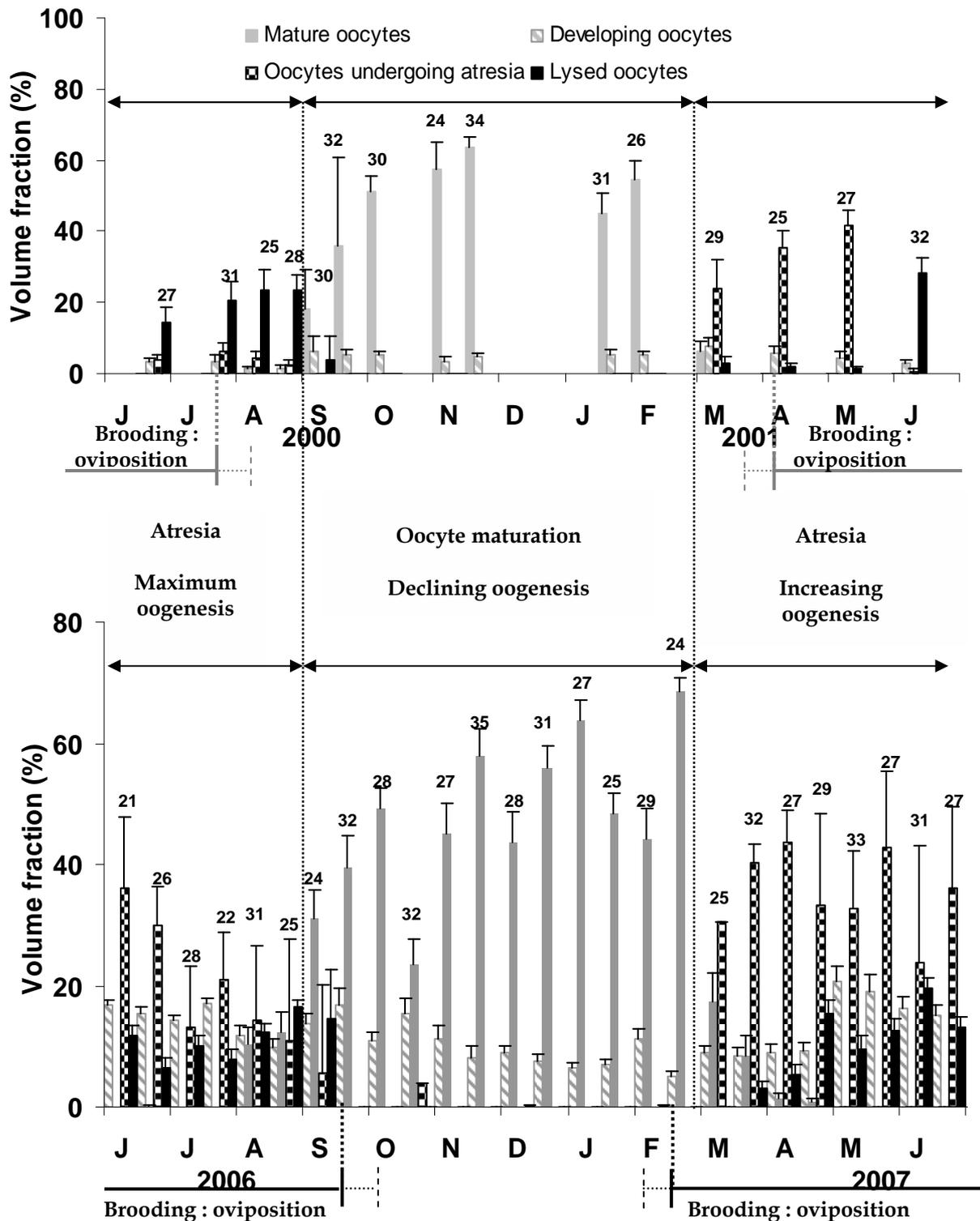
Brooding periods are indicated below the graph. Solid lines represent all dates at which broods were observed, while the dotted portions represent the maximum possible brooding period length (end of brooding season) and the earliest possible onset of brooding (see text).

Figure 3.3. Résultats stéréologiques pour l'ovaire de *Crepidula fornicata*.

Fractions volumiques d'ovocytes matures, en développement, en atresie et lysés dans l'ovaire de juin 2000 à juin 2001 (un à deux échantillonnages/mois), et juin 2006 à juin 2007 (deux échantillonnages/mois), moyennes \pm IC à 95 %. Les lignes en pointillé délimitent les différentes phases du cycle reproducteur en 2000-1 et 2006-7.

Données non disponibles en décembre 2000 et fin juin 2001, du à un vidage des gamètes des tubules au niveau du plan de coupe (les seuls tubules visibles à cet endroit dans la gonade pour ces mois). La taille des échantillons est indiquée au dessus des intervalles de confiance. Les périodes de ponte de 2000-1 et 2006 -7 sont ajoutées (2006-7: Valdizan *et al.* 2009).

Les périodes de ponte sont indiquées sous le graphique. Les lignes pleines représentent toutes les dates où la présence de ponte a été observée, tandis que les portions pointillées représentent la plus période de ponte la plus longue possible (fin de la saison de ponte) et le démarrage le plus précoce possible de la période de ponte (voir texte).



B. Environmental variations

a. Historical variations in water temperature and chlorophyll a

Historical annual and warmest-month calculated mean water temperatures are presented for Bourgneuf Bay from 1970 to 2007 (Fig. 3.4 A). For each of the years during this time period, the date from which the water temperature threshold necessary to activate

brooding in *Crepidula fornicata* was attained (10°C: Werner 1948, Chipperfield 1951, Thieltges *et al.* 2004, Richard *et al.* 2006) is also shown (Fig. 3.4 B).

Figure 3.4 A shows a significant warming of annual mean water temperatures ($r^2 = 0.639$, $p < 0.001$) and of warmest month water temperatures from 1970 to 2007 ($r^2 = 0.485$, $p < 0.001$) (Tukeytests; $F = 17.09$; $n = 183$; $df = 35$; $P < 0.001$). Indeed, in the period 1970-1994, only 8/26 (30.8 %) of the annual mean water temperatures were above 13.5°C, whereas from 1995 to 2007, 12/13 (92 %) of the annual mean water temperatures were above this value. Similarly, in the period 1970-1994, only 8/26 (30.8 %) of the warmest month temperatures were above 17.5 °C, while from 1995 to 2007, 11/13 (84 %) were above this value.

Figure 3.4 B shows that from 1970 to 1985, the period at which water temperature attained the 10°C brooding activation threshold was in the month of March in only 6/16 years (37 %), whereas in the period 1986-2008, this temperature was attained in the month of March or February in 19/22 years (86 %).

Figure 3.5 shows a significant increase of the chl *a* concentrations from 1996 to 2007 (Tukey tests; $F = 2.06$; $n = 10$; $df = 11$; $P = 0.024$). Indeed, from 1996 to 2001, only 5.55 % of the chl *a* concentrations were above 5 µg.L-1, whereas from 2002 to 2007, 12.5 % of the chl *a* concentrations were above this value. Furthermore, in the 6 years 2002-7, there were 10 elevated values (> 5 µg.L-1), vs 5 elevated values in the 6 years 1996-2001.

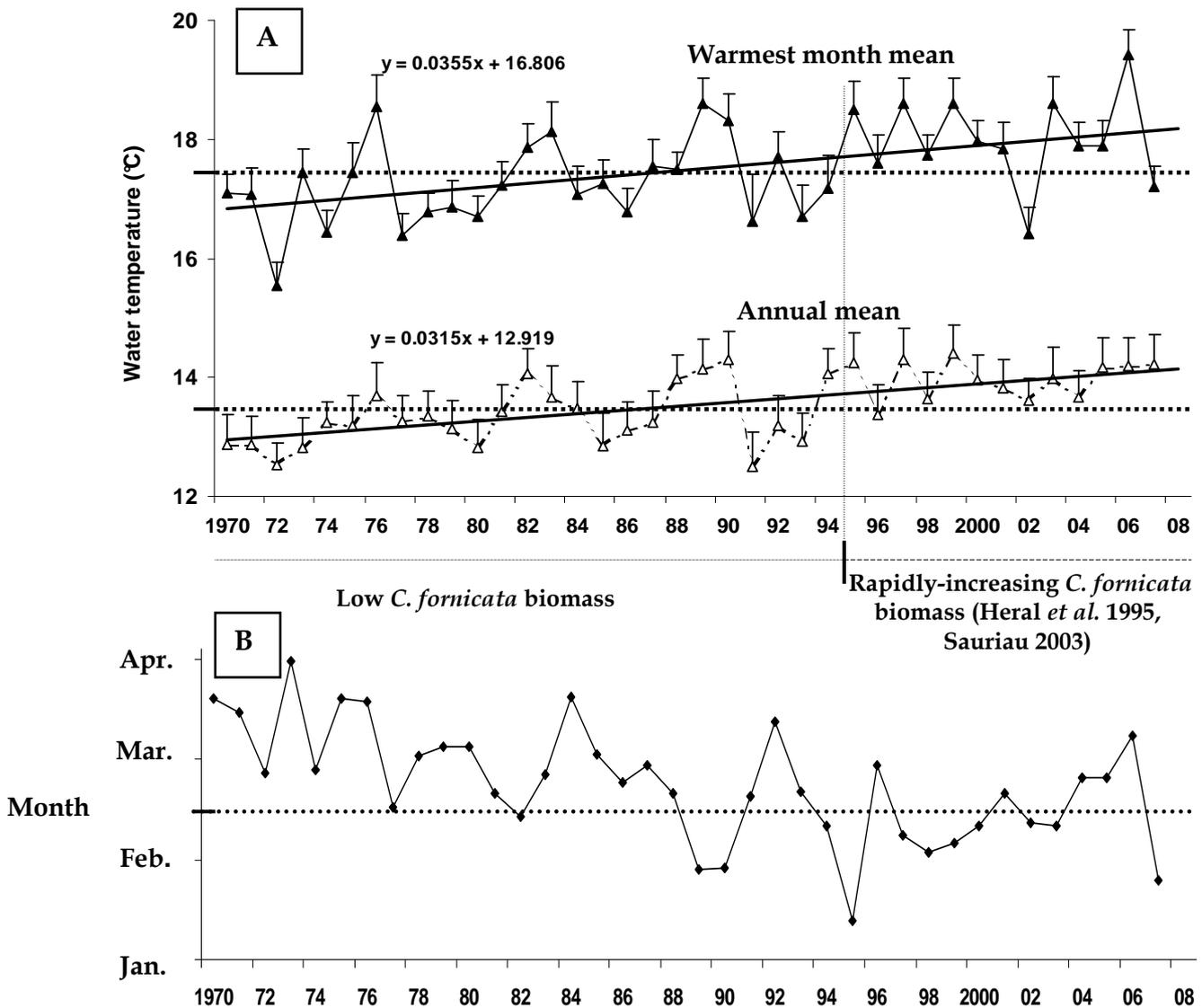


Figure 3.4. Historical variations in water temperature in Bourgneuf Bay since the proliferation of *Crepidula fornicata* in the 1970's (Météo-France, Climathèque data base, Noirmoutier).

(A) Annual mean and warmest month mean. Dotted lines denote temperatures which clearly separate earlier and more recent values. Both linear regressions are shown as continuous lines and equations are presented.

(B) Date from which water temperatures exceed the 10°C threshold necessary to activate brooding. Dotted line marks the mid-point of the 4 - month interval.

Figure 3.4. Variations historiques de la température de l'eau dans la baie de Bourgneuf depuis la prolifération de la crépidule dans les années 70 (Météo-France, base de données Climathèque data, Noirmoutier).

(A) Moyenne annuelle et moyenne des mois les plus chaud. Les lignes en pointillé dénotent les températures qui séparent nettement les valeurs les plus anciennes des plus récentes. Les deux régressions linéaires sont indiquées avec des lignes continues et les équations sont présentées.

(B) Date à partir de laquelle la température de l'eau dépasse le seuil des 10°C nécessaire à l'activation de la période des pontes. Les lignes en pointillé indiquent le point moyen pour les 4 mois d'intervalles.

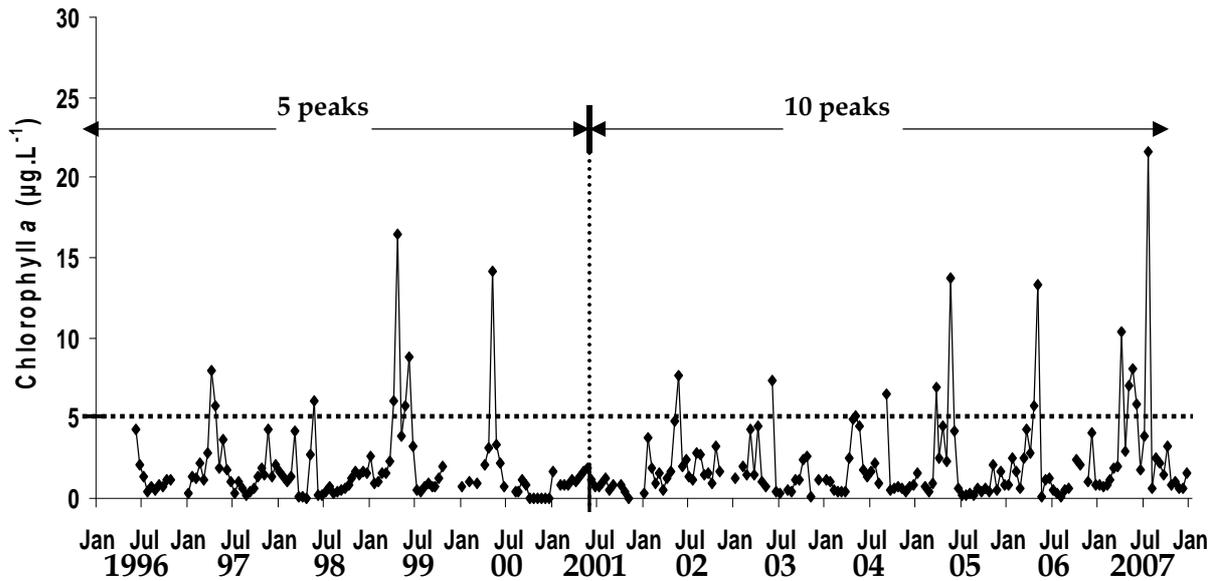


Figure 3.5. Historical variations in chlorophyll *a* in Bourgneuf Bay since the accelerating increase in slipper limpet biomass, 1996-2007.

Horizontal dotted line denotes chlorophyll *a* concentrations which clearly separate low chlorophyll *a* values ($< 5 \mu\text{g.L}^{-1}$) from elevated ($> 5 \mu\text{g.L}^{-1}$) chlorophyll *a* values. In the 6 years 2002-7, there were 10 elevated values, vs 5 elevated values in the 6 years 1996-2001.

Figure 3.5. Variations historiques de la chlorophylle *a* dans la baie de Bourgneuf depuis l'augmentation de la biomasse des crépidules, 1996-2007.

La ligne en pointillée horizontale indique la concentration en chl *a* qui sépare nettement les plus faibles valeurs en chl *a* ($< 5 \mu\text{g.L}^{-1}$) des valeurs les plus élevées ($> 5 \mu\text{g.L}^{-1}$). Durant les 6 années allant de 2002 à 2007, on retrouve 10 valeurs élevées vs 5 valeurs élevées durant les 6 années allant de 1996 à 2001.

b. Influence of temperature and chlorophyll *a* on the reproductive cycle of *Crepidula fornicata*

Less favourable temperature conditions were found for the 2000-2001 samplings. Temperatures (Fig. 3.6) for this period were statistically lower than for 2006-2007 (t-test, $P = 0.005$), with respectively annual means ($\pm 95\%$ CI) of $14.5^\circ\text{C} (\pm 1.4)$ and $15.7^\circ\text{C} (\pm 1.5)$.

Both in 2000-2001 and in 2006-2007, the initiation of *C. fornicata* brooding coincided precisely with fluctuations of this environmental variable (Fig. 3.6). First appearance of incubated broods in 2001 and 2007 began when water temperature reached the minimum threshold of 10°C (Fig. 3.6).

Chl *a* values were statistically much higher in 2007 compared to 2001 (t-test, $P = 0.014$; Fig. 3.7). As was the case for the temperature data, this corresponded to a greater intensity of gametogenesis in 2006-7 (see preceding). Slightly higher values of chl *a* ($1 < \mu\text{g.L}^{-1} \leq 2$) were observed in early spring 2007 compared to 2001, at the same time as water temperature exceeded the 10°C threshold, and coinciding with the one-month earlier initiation of

brooding in 2007. Furthermore, more abundant food was available in 2007 (t-test, $P = 0.002$), with 3 peaks of chl *a* above a concentration of $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ observed from the end of spring till summer (April, June, late July) whereas no chl *a* values above $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ were observed during this period in 2001.

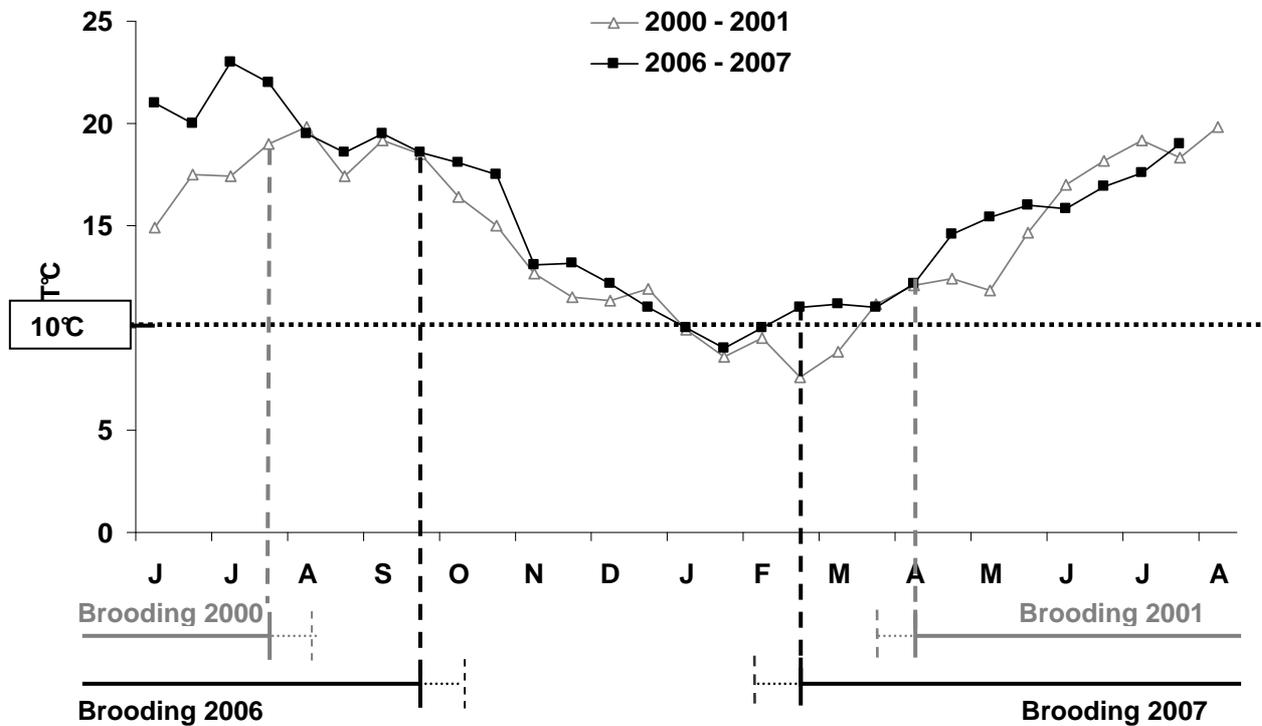


Figure 3.6. Water temperatures for the two sampling periods, June 2000-early August 2001, and June 2006-early August 2007.

Horizontal dotted line corresponds to the minimal threshold required to activate the brooding process (10°C). Vertical dashed lines show correspondence between this threshold and the beginning of brood incubations.

Brooding periods are indicated below the graph. Solid lines represent all dates at which broods were observed, while the dotted portions represent the maximum possible brooding period length (end of brooding season) and the earliest possible onset of brooding (see text).

Figure 3.6. Température de l'eau pour les deux périodes d'échantillonnage, juin 2000-début août 2001, et juin 2006-début août 2007

La ligne en pointillée horizontale correspond au seuil de température minimal nécessaire pour activer le procédé de ponte (10°C). Les lignes verticales en tiret montre la correspondance entre ce seuil et le début d'incubation des pontes.

Les périodes de ponte sont indiquées sous le graphique. Les lignes pleines représentent toutes les dates où la présence de ponte a été observée, tandis que les portions pointillées représentent la plus période de ponte la plus longue possible (fin de la saison de ponte) et le démarrage le plus précoce possible de la période de ponte (voir texte).

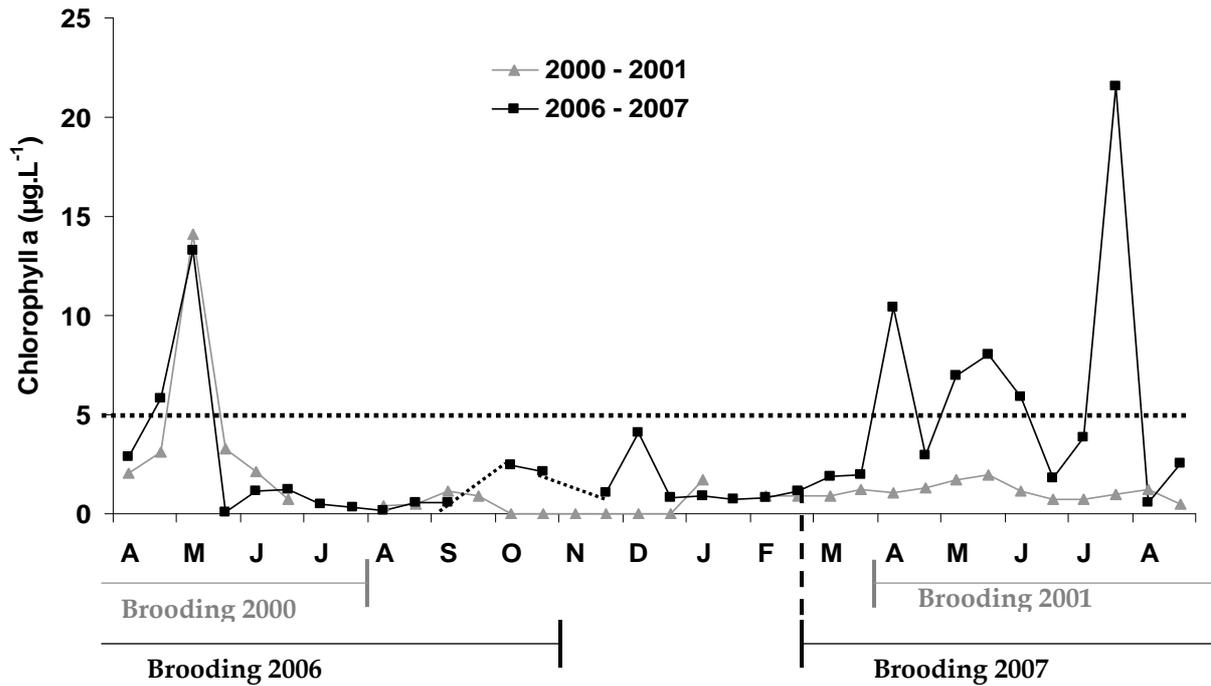


Figure 3.7. Chlorophyll *a* concentration from April 2000-August 2001, and April 2006-August 2007 (2006-2007 brooding periods data from Valdizan *et al.*, 2009).

Data for late September and November 2006 not available. Horizontal dotted line denotes chlorophyll *a* concentrations which clearly separate low chlorophyll *a* values (< 5 µg.L⁻¹) from elevated (> 5 µg.L⁻¹) chlorophyll *a* values.

Figure 3.7. Concentration en chlorophylle *a* d'avril 2000 à août 2001, et d'avril 2006 à Août 2007 (périodes de ponte pour 2006-2007: Valdizan *et al.*, 2009).

Les données pour la fin septembre et novembre 2006 ne sont pas disponibles. La ligne en pointillée horizontale indique la concentration en chl *a* qui sépare nettement les plus faibles valeurs en chl *a* (< 5 µg.L⁻¹) des valeurs plus élevées (> 5 µg.L⁻¹).

3.6. DISCUSSION

A. Reproductive cycles

The results of the present study demonstrate that although the same basic chronological pattern of reproductive activity was observed in both 2000-2001 and in 2006-2007 in the Bourgneuf Bay *C. fornicata* population, important differences in duration and intensity of gametogenesis and oviposition are evident. These differences are: (1) earlier initiation, and possibly later termination of brooding period in 2006-7 compared to 2000-1, and (2) greater intensity of reproductive activity in 2006-7 compared to 2000-1.

a. Extended periods of brood presence

The period of brood presence was significantly longer in 2006-2007 than in 2000-2001; consequently, the release of larvae to the water column and subsequent benthic recruitment was possible for a much longer period in 2006-7. Given the spatial and trophic competition between cultured/feral cupped oysters, *Crassostrea gigas*, and *C. fornicata* in this bay and elsewhere along the European coast (Blanchard 1997, Barillé *et al.* 2006, Beninger *et al.* 2007, Decottignies *et al.* 2007a, b, Blanchard *et al.* 2008), this extended brooding period could be particularly important. Normal *C. gigas* spawning in Bourgneuf Bay occurs from May to July (Dutertre *et al.* 2009, 2010), so the appearance of *C. fornicata* larvae as early as February would permit the benthic recruitment of this species well in advance of *C. gigas* (which spawned in May in both 2005 and 2006 - Dutertre *et al.* 2009), and may be a factor in the recent proliferation of *C. fornicata* in habitats where it competes with *C. gigas*.

The extension of brooding to October in 2006, compared to July in 2000, also underscores the increased length of brooding period in 2006-7. It also enables benthic recruitment to continue after the heavy mortalities which typically occur in naturally-recruiting *C. gigas* populations (Mackin 1961, His & Robert 1985, His & Seaman 1992, Dégremont *et al.* 2007, Dutertre *et al.* 2010), again enhancing the competitive position of *C. fornicata*.

b. Greater intensity of reproductive activity

The various phases of *C. fornicata* gametogenesis were markedly more intense in 2006-7 compared to 2000-1, resulting in a gamete production (for males and females) twice as high compared to 2000-2001. It may be argued that the gamete residence time in the tubules differed between the years; however, the breeding period was initiated earlier in 2006-7 than in 2000-1, so if a shorter gamete residence time did exist for one of the 2 time periods, it would probably be for 2006-7, and not 2000-1. The fact that more gametes were observed in the tubules in 2006-7 belies this possibility, so our interpretation appears valid.

This increased fecundity probably translated to greater larval numbers and benthic recruitment in 2006-7 compared to 2000-1. The combined effect of both an extended brooding season and increased propagule numbers may be expected to accentuate the proliferation of *C. fornicata* in Bourgneuf Bay, and by the same token, provide a competitive advantage to this species with respect to the co-occurring *C. gigas*.

It has been suggested that control of molluscan recruit numbers is essentially top-down, and independent of recruit input (Menge 2000, Severns 2007). However, several factors may attenuate this paradigm, especially in the case of invasive *Crepidula fornicata*.

First, there is the possibility of swamping potential predators with recruiting animals (eg. Hollebone & Hay 2007), such that many of the excess recruits will survive and hence contribute to proliferation. Second, the availability of predators may be a determining factor. Previous mudflat studies have implicated mainly decapod crustaceans in predation on juveniles (and these were juvenile bivalves – Beukema *et al.* 1998, Seitz & Lipcius 2001), whereas at our study site, no evidence of such predators was observed (no live individuals, and only very few empty carapaces). The alternative mudflat predators, shorebirds, may exert relatively low predation pressure due to issues of timing and duration (migration stopovers), and, something which may greatly influence bird predation on juveniles but which is often overlooked, international differences in hunting regulations. Shorebirds are hunted in France, and this produces very skittish assemblages on the mudflats, which may spend much less time foraging than they do in countries where hunting is forbidden.

Finally, there is the particular case of *Crepidula fornicata*. Some studies have suggested that the indigenous submarine potential predators do not seem to have learned either (1) that *Crepidula fornicata* is a potential food source, or (2) how to prey upon it (Coum 1979, Blanchard 1995, 1997, Sax & Brown 2000). Top-down control for this particular species in the invaded habitat thus seems unlikely.

B. Influence of water temperature and chlorophyll a on reproductive cycle

Temperature is considered the single most important factor in controlling reproduction in opisthobranch gastropods (Hadfield & Switzer-Dunlap 1984). The higher water temperatures and chl *a* values at the study site in 2006-7 compared to 2000-1 coincided with a greater intensity of gametogenesis. Both of these variables are known to influence gametogenic activity in molluscs (Stanley, 1967; Barber & Blake, 2006).

For both sampling periods, the *Crepidula fornicata* brooding started when the 10°C threshold was reached, as has been observed in previous studies (Werner, 1948; Chipperfield, 1951; Thieltges *et al.*, 2004; Richard *et al.*, 2006). This value probably reflects the minimal water temperature required for larval survival and development in the water column (Estrella Klinzing & Pechenik 2000, Zhao *et al.* 2003). The warmer water temperatures in late winter - early spring in 2007, compared to 2001, allowed this threshold to be attained one month earlier in 2007.

The historical chl *a* data show that elevated values are much more frequent after 2001 than before this date. This time frame corresponds to the most elevated mean annual

temperature values. These results suggest that elevated chl *a* values are related to elevated temperature values. While availability of food is undoubtedly important to reproduction (Sastry 1979, Barber 1984, Barber & Blake 2006), the results of the present study show that the shift in initiation of brooding could not be imputed to the chl *a* values alone, since even higher values were found at periods prior to initiation of brooding. Water temperature therefore appears to be a determining factor in the initiation of brooding in *C. fornicata*, while the intensity of gametogenesis may be related to food availability.

Although the initiation of oviposition appears to be dependant on water temperature, this variable does not appear to affect the termination of oviposition, which happened in late July 2000, compared to late October in 2006. Termination of incubation is therefore probably controlled by the availability of fertilized oocytes, and ultimately of energy stores acquired from feeding.

The highly significant water temperature elevation between 1970 and 2007, and especially 1995–2007 (ter Hofstede *et al.* 2010, our study) coincides with the accelerating increase in slipper limpet presence over the same period (Héral *et al.* 1995, Sauriau, 2003). This temperature increase appears to have allowed the activation of brooding earlier in the season, especially after 1989, when the 10°C brooding activation threshold was attained 1 - 3 months earlier than before 1989. As noted previously (Beninger *et al.* 2010a, b), earlier brooding would allow *C. fornicata* larvae to recruit much earlier than an important competitor in this bay, *Crassostrea gigas*. The *C. fornicata* larvae might thus suffer reduced mortality prior to benthic recruitment, and as juveniles enjoy a competitive advantage over the later-recruiting oysters. Previous studies have identified trophic competition between the larvae of these two species (Blanchard *et al.* 2008), and our work in progress indicates that the competition for food resources in the adults of these two species (Decottignies *et al.* 2007a, b) is mirrored in the juvenile stages (Decottignies *et al.* in prep.).

Global warming is expected to continue for decades in the mid- and high latitudes of the Northern hemisphere (Shneider 2001, Hawkins *et al.* 2003), so it is likely that this warming will enhance the reproductive success of *Crepidula fornicata* in Bourgneuf Bay, and probably over its European range, in the years to come. Indeed, on southern coasts of Chile where water temperatures are already always above the 10°C threshold (Velasco & Navarro 2005), *Crepidula fecunda*, which has the same reproductive and developmental characteristics as *Crepidula fornicata*, appears to brood almost year-round (Chaparro *et al.* 2005). Furthermore, the warming of coastal waters can enhance invasions by permitting the colonization of invasive species previously restricted to lower latitudes (Carlton, 2000). In the

Wadden sea, the population of *C. fornicata*, once poorly established, has recently increased contemporaneously with coastal water temperatures, and the decrease in winter severity (Thieltges *et al.* 2004, Nehls *et al.* 2006). Warming coastal waters may also provide increased pulses of particulate organic matter, as observed in the present study, allowing the assimilated energy to be directed toward increased reproduction. Invasive animal species are more likely to be generalists than specialists, indirectly facilitating adaptation to new climates (Rejmánek & Richardson 1996). Indeed, *C. fornicata* shows many generalist characteristics: a pelagic larval stage which enables dispersion and colonization of new habitats (Blanchard 1997, Collin 2003, Dupont *et al.* 2006), a large tolerance to a wide range of environmental variables (e.g. temperature, salinity, turbidity, substrates - Coum 1979); and generalist suspension-feeding larval and adult stages able to thrive under many different dietary conditions (Barillé *et al.* 2006, Beninger *et al.* 2007, Decottignies *et al.* 2007a, b, Blanchard *et al.* 2008). Global warming of coastal water temperatures will probably favour *Crepidula fornicata*, and its attendant ecological impacts in Bourgneuf Bay and all along the Atlantic European coasts, including competitive interactions with native species (e.g. oysters, mussels, scallops), ecosystem effects (e.g. modification of the nature and structure of the bottom) and economic effects (e.g. shellfish culture and dredge fisheries - Hellmann *et al.* 2008). Furthermore, global warming could work together with other stressors (e.g. habitat alteration, pollution - Rogers & MacCarty 2000) to reduce populations of endemic species, while increasing populations of *Crepidula fornicata*, already abundant in Bourgneuf Bay (Barillé & Barillé 2003, Sauriau *et al.* 2006) and many other European coastal habitats (Hamon & Blanchard 1994, Blanchard & Ehrhold 1999, Richard *et al.* 2006, FitzGerald 2007).

C. Strength of data

Data from 2 time intervals were reported in the present study. We therefore compare two sample sets, 2000-1 and 2006-7, with 50 data points for each month of each period. Furthermore, the two-pronged approach used here reinforces the strength of the data:

1) We are unaware of any other marine gastropod studies which have looked at the stability of reproductive cycles over such large time intervals. We therefore believe the data presented is the most convincing to date, allowing us to conclude that reproduction has been positively affected over the time interval.

2) With respect to concluding that the changes in reproductive intensity, precocity, and duration were probably due to temperature and Chl *a* effects, here we use

the proven minimum threshold temperature to initiate brooding (Werner 1948, Chipperfield 1951, Thieltges *et al.* 2004, Richard *et al.* 2006), field-validated in the 2001 and 2007 early spring periods, and historical temperature data, to show that early initiation of brooding has been possible since 1989, and that this effectively corresponds to the increasing proliferation of *C. fornicata* in Bourgneuf Bay. We believe this argument substantial enough to at least underscore the relationship, and constitute evidence for a temperature effect. Given the total lack of any similar data for any other location, this study should serve as a starting point for further investigations into the biological bases of the *Crepidula fornicata* expansion and proliferation on the European Atlantic coast.

3.7. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Marie Cousin, Pierre Gaudin, Philippe Rosa and Annaëlle Bargain for their technical assistance, and are grateful to Mad. Odile Aumaille for her help with histology. We thank the Conseil Général de la Loire - Atlantique for the attribution of a PhD grant to AV.

QUATRIÈME CHAPITRE

ÉTUDE D'UN AGENT ALLOGÈNE PRÉSENT DANS LA GLANDE DIGESTIVE DE L'ESPÈCE INVASIVE *CREPIDULA FORNICATA*

Preliminary remark : terminology

The agent observed in the *Crepidula fornicata* digestive gland cells during the histological study of the slipper limpet has not yet been identified. Although it is intracellular, no symptoms of systemic pathology could be detected in the host; we therefore decided to refer to this agent as an *allogen*.

Remarque préliminaire : terminologie

L'agent observé dans les cellules de la glande digestive de *Crepidula fornicata* lors de l'examen des coupes histologiques pour l'étude du cycle reproducteur n'ayant pu être identifié, nous avons décidé de le désigner sous le nom d'allogène. Bien qu'occupant l'intérieur des cellules de la glande digestive des crépidules, aucun symptôme pathologique systémique n'a été observé, d'où la précaution dans la dénomination de cet agent.

4.1. ABSTRACT

Invasive species may be vectors for the introduction of allogenic agents to the invaded ecosystem, or they may serve as new alternate hosts for pre-existing parasites. An intense and generalized allogen infestation of the invasive gastropod *Crepidula fornicata* was observed in Bourgneuf Bay, France, in 2000-1 and 2006-7. To our knowledge, no such allogen had previously been reported in this host.

The rapidly-increasing population of slipper limpets in Bourgneuf Bay suggests that this allogen is not particularly detrimental to slipper limpet proliferation. In view of the high densities of slipper limpets in many European coastal habitats, further research should focus on identification of this allogen (via TEM and DNA analysis), and on determining its origin (East or West Atlantic or both). Increasing water temperatures, both seasonally and inter-annually, enhance this allogen's proliferation in the digestive gland of *Crepidula fornicata*.

4.2. RÉSUMÉ

Les espèces invasives peuvent être des vecteurs d'introduction d'agents allogènes dans les écosystèmes qu'elles colonisent, ou peuvent également servir de nouveaux hôtes pour des parasites pré-existants. Une infestation intense et généralisée par un agent allogène a été observée chez le gastéropode invasif *Crepidula fornicata*, dans la baie de Bourgneuf durant nos deux périodes d'échantillonnage 2000-1 et 2006-7. A notre connaissance, aucun allogène de ce type n'a été précédemment reporté chez cet hôte.

La rapide augmentation de la biomasse des crépidules dans la baie de Bourgneuf suggère que cet agent n'est pas particulièrement préjudiciable à la prolifération de C.

fornicata. Etant donné les fortes densités de crépidules retrouvées dans plusieurs habitats des côtes européennes, d'autres recherches devraient identifier ce pathogène (via MET et analyses ADN) et rechercher son origine (Atlantique Est et/ou Ouest). L'augmentation des températures de l'eau, saisonnière et interannuelle, augmente la prolifération de cet allogène dans la glande digestive de *Crepidula fornicata*.

4.3. INTRODUCTION

Bien que le taux d'invasions marines ne cesse de croître (Ruiz *et al.* 1997, Cohen & Carlton 1998), très peu d'études se sont intéressées aux allogènes de ces espèces marines invasives (Torchin *et al.* 2002). En effet, ces agents allogènes peuvent se développer sur leur nouvelle aire d'introduction et être transmis aux espèces natives, ou les espèces invasives peuvent fonctionner comme de nouveaux hôtes aux allogènes pré-existants. Dans ces deux cas, les dynamiques hôte-allogène peuvent être modifiées au sein de l'écosystème colonisé (Lafferty & Kuris 1996, Myers *et al.* 2000, Torchin *et al.* 2002, Prenter *et al.* 2004, Thieltges *et al.* 2009). Les travaux sur les agents allogènes, en majorité sur un groupe de macro-parasites dominants, les trématodes, ont démontré que l'augmentation de la température de l'eau, due au réchauffement climatique, accroît leur capacité de transmission et de prolifération, augmente leur abondance et accélère leur développement (Poulin 2006, Poulin & Mouritsen 2006, Thieltges & Rick 2006, Studer *et al.* 2010). Cela pourrait causer de sérieux problèmes physiologiques et éventuellement une hausse de la mortalité chez les espèces natives infestées par ces agents allogènes introduits.

Le gastéropode marin *Crepidula fornicata* est natif des côtes Nord-Est du Nord de l'Amérique (Hoagland 1977, Blanchard 1997). Des introductions involontaires de cette espèce invasive ont eu lieu durant le XX^{ème} siècle le long des côtes Atlantiques Européennes, fixée sur les coques des navires, ou sur les huîtres (*Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*) importées pour la culture commerciale (Blanchard 1997, Davis & Thompson 2000). *C. fornicata* est aujourd'hui considérée comme une espèce invasive (*sensu* Davis & Thompson 2000). Elle a un fort impact sur l'écologie et l'économie des habitats colonisés (Blanchard 1997, Ehrold *et al.* 1998, Thieltges 2005a, b, Thieltges *et al.* 2006, Decottignies *et al.* 2007a, b, Blanchard *et al.* 2008).

La prolifération de *C. fornicata* diminue le taux de parasites dans les écosystèmes européens colonisés. En effet, ces suspensivores invasifs ingèrent les cercaires de trématodes présents dans la colonne d'eau, sans se faire eux-mêmes infecter (Prinz 2005, Thieltges *et al.* 2006).

Durant une étude sur les dynamiques de reproduction de *C. fornicata* (Beninger *et al.* 2010a, b), la présence d'un agent potentiellement allogène a été détecté dans la glande digestive de chaque crépidule examinée, durant nos deux périodes d'échantillonnage (2000-1 et 2006-7). Dans la baie de Bourgneuf, une augmentation significative des températures de l'eau a été observée particulièrement depuis 1995 (Dutertre *et al.* 2010, Valdizan *et al.* submitted). Nous avons donc étudié **(1)** le taux d'infestation de *C. fornicata* mâles et femelles au cours de l'année 2006-7, en rapport avec les variations saisonnières de température, ainsi que **(2)** le taux d'infestation de *C. fornicata* mâles et femelles entre ces deux périodes d'échantillonnage, en rapport avec les variations de température inter-annuelles.

4.4. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Echantillonnage et procédé histologique

Les chaînes de *Crepidula fornicata* ont été récoltées une à deux fois par mois dans la zone intertidale de la baie de Bourgneuf (côte Atlantique française, 46-47°N, 1-2°W), baie fortement colonisée par les crépidules (Barillé & Barillé 2003, Valdizan *et al.* 2009, Beninger *et al.* 2010a, b) de juin 2000 à juillet 2001 et de mars 2006 à septembre 2007. Un minimum de 50 crépidules a été échantillonné à chaque prélèvement. Chaque crépidule a été sortie de sa coquille, uniquement la masse viscérale a été conservée et fixée dans du liquide de Bouin (Martoja & Martoja 1967) pendant au moins un mois avant d'être disséquée, afin d'éviter un vidage partiel de la masse viscérale. Avant d'effectuer le processus histologique, la masse viscérale a été sectionnée dans un plan dorso-ventral passant par le cœur (Fig. 4.1 A, B). Cela permet d'obtenir des sections histologiques représentant la même région de la masse viscérale (incluant la glande digestive, la gonade, les filaments branchiaux et l'intestin Fig. 4.1 C). Les échantillons ont ensuite été déshydratés, enrobés dans de la paraffine, les sections de 7µm obtenues ont été colorées en utilisant un protocole trichrome de Masson modifié (Martoja & Martoja-Pierson 1967, Gabe 1968, Beninger *et al.* 2001).

Les observations, les microphotographies, les analyses, et les calculs des taux d'infestation des sections histologiques mâles et femelles ont été effectués avec un microscope optique Olympus et un logiciel permettant le traitement d'image (LUCIA GF 4.80) (Fig. 4.1 D, E).

B. Taux d'infestation de la glande digestive, influence de la température de l'eau

Pour chaque section de la masse viscérale, le comptage des agents allogènes dans la glande digestive a été effectué sur 3 aires de la lame, contenant des tubules digestifs visibles,

choisies de façon aléatoire. Pour chaque aire, les comptages ont été effectués sur un minimum de 5 tubules digestifs en utilisant une matrice de points (20 × 20) adapté sur l'écran de l'ordinateur à un grossissement de 200X. Simultanément, le périmètre de chaque tubule a été calculé pour pouvoir standardiser le comptage des agents allogènes: le nombre d'agent allogène par tubule a été converti en nombre d'agent pour un tubule digestif de 100 µm.

Figure 4.1. Anatomy and histological profiles of the anterior visceral mass of *Crepidula fornicata*.

(A), (B) Stereomicrographs showing the localisation of the sections performed; h = heart (external anatomical marker); **(A)** dorsal view, mv = visceral mass **(B)** ventral view, foot removed. go = gonad
(C)-(E) Histological profiles showing **(C)** gonad tubules, digestive gland tubules (tgd), intestine (i), and gill (br); **(D), (E)** male and female sections, respectively, showing infected digestive gland tubules. Note absence of allogen agents (ag) in the gonad tubules. gd = digestive gland, ov = ovary, test = testis.

Figure 4.1. Anatomie et profils histologiques de la partie antérieure de la masse viscérale de *Crepidula fornicata*.

(A), (B) Photographies prises à la loupe binoculaire montrant la localisation des sections effectuées, h = coeur (marqueur externe anatomique); **(A)** vue dorsale, mv = masse viscérale **(B)** vue ventrale, pied enlevé. go = gonade
(C)-(E) Profils histologiques montrant **(C)** les tubules de la gonade (go), les tubules de la glande digestive (tgd), l'intestin (i) et la branchie (br); **(D), (E)** Respectivement sections mâle et femelle, montrant les tubules de la glande digestive infectés par l'agent allogène (ag). On remarque l'absence d'agents allogènes dans les tubules de la gonade. gd = digestive gland, ov = ovaire, test = testicule.

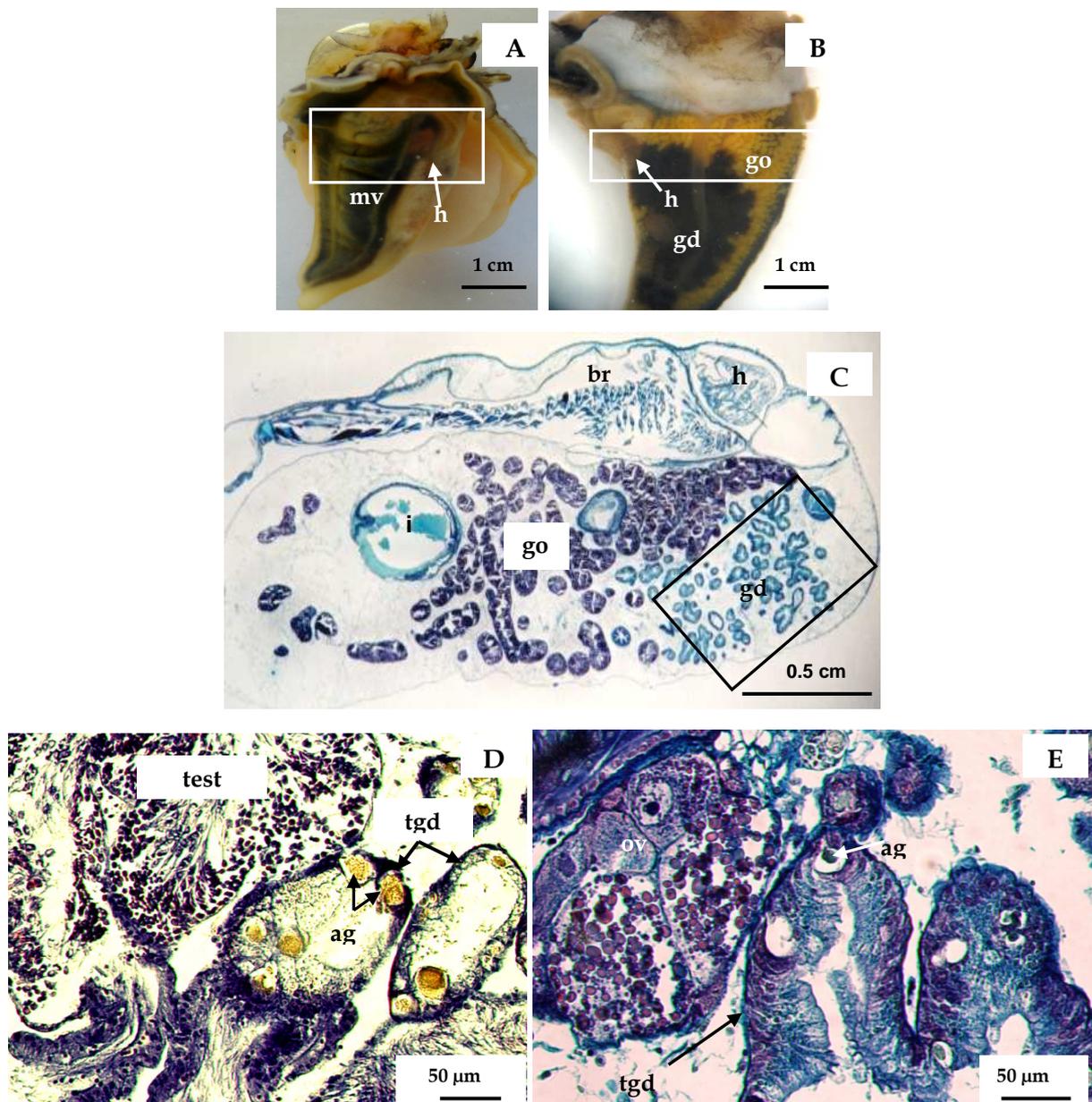


Figure 4.1.

C. Analyses statistiques

Tous les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific). La normalité (tests de normalité Kolmogorov-Smirnov) et l'hétéroscédacité ont été vérifiées pour chaque test. Des ANOVA (one-way) ont été effectuées lorsque les données des taux d'agents allogènes étaient normales et leurs variances homogènes, ou des tests de Kruskal-Wallis ont été effectués lorsque les données n'étaient pas normalement distribuées et que leurs variances étaient hétérogènes. Ces tests ont été suivi par des tests de Student-Newman-Keuls pour détecter les différences significatives entre les moyennes ($P < 0,05$).

4.5. RESULTATS

Les agents allogènes (ag) apparaissent sphériques, d'une couleur brun clair à foncé, d'un diamètre moyen de $13,84 \pm 0,74 \mu\text{m}$ (Figs 4.2 A, B). Ils ont été observés à l'intérieur des cellules des tubules de la glande digestive (cgd) et semblaient être entourés par une vacuole parasitophore (pv, Figs. 4.2 C, D).

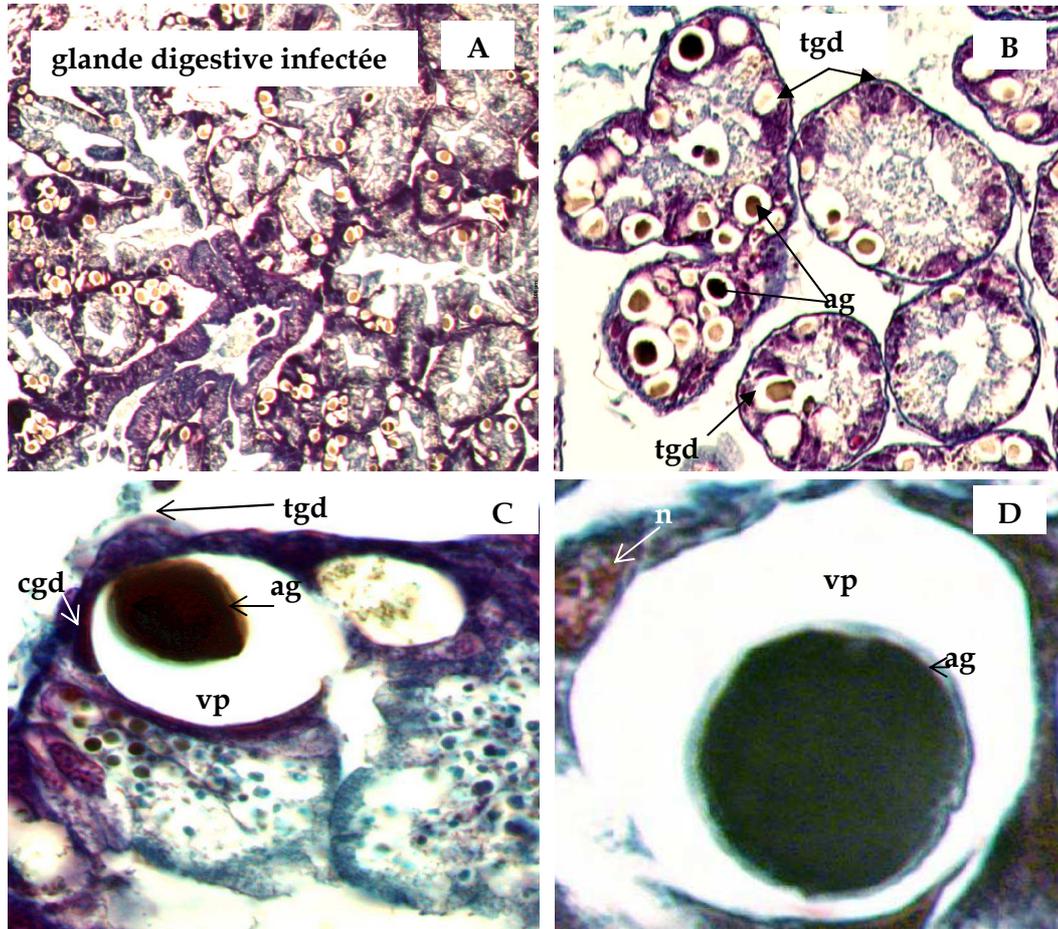


Figure 4.2. Allogenic agent in the digestive gland of *C. fornicata*.

(A), (B) Digestive gland infected (A), detail of infected digestive gland tubules (tgd) infected with the allogen (ag), lodged inside the digestive gland cells (cgd) (B).
 (C), (D) Allogen inside digestive tubule cells, note presence of putative parasitophorous vacuole (vp), around the allogen, host cell nucleus (n) is observed in (D).

Figure 4.2. Présence de l'agent allogène dans la glande digestive de *C. fornicata*.

(A), (B) Vue de la glande digestive infectée (A), et détail de tubules digestifs (tgd) infectés par l'agent allogène (ag), logé à l'intérieur des cellules de la glande digestive (cgd) (B).
 (C), (D) Agent allogène à l'intérieur d'une cellule de tubule digestif. L'allogène semble être entouré par une vacuole parasitophore - like (vp) entourant l'agent allogène; le noyau (n) de la cellule hôte est visible en (D).

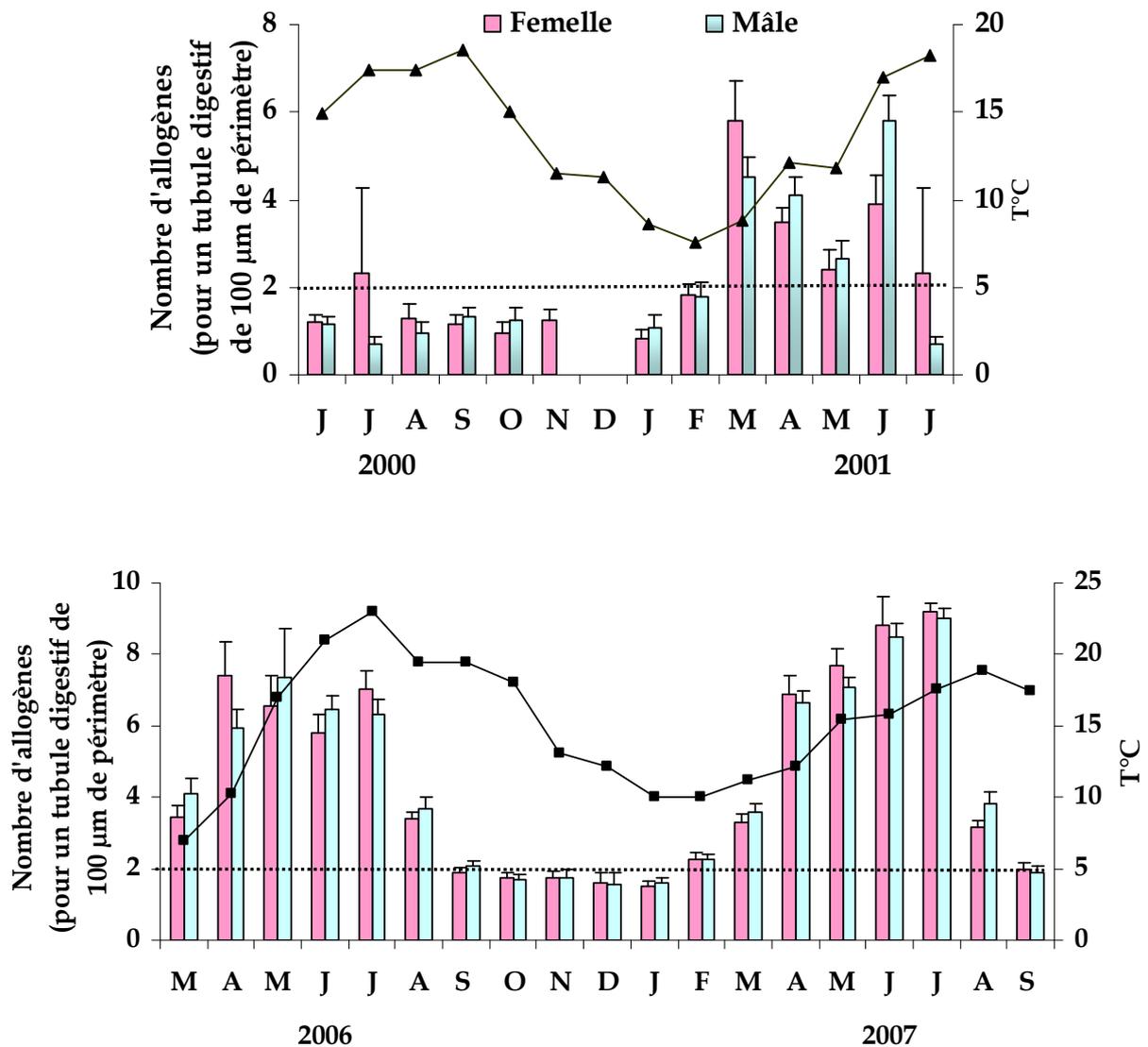


Figure 4.3. Mean (\pm IC 95%) number of allogenes infecting male *C. fornicata* male and female digestive gland, for each sampling. Black curves correspond to the temperature variations at sampling dates.

(A) 2000 - 2001

(B) 2006 - 2007

Figure 4.3. Moyenne (\pm 95% CI) du nombre d'agents allogènes infestants la glande digestive chez les mâles et les femelles de *C. fornicata* pour chaque échantillonnage. Les courbes noires correspondent aux variations de température pour chaque échantillonnage.

(A) 2000 - 2001

(B) 2006 - 2007

Les mâles comme les femelles sont tous deux infectés dans des proportions quasi-similaires (valeur $p=0,45$). L'agent allogène infecte donc à la fois les femelles et les mâles des chaînes de crépidules.

Le même type d'évolution du taux d'agents allogènes est retrouvé pour les deux échantillonnages (juin 2000 à juillet 2001 et mars à septembre 2006-7) : de septembre 2000 et

2006 à février 2001 et 2007, lorsque les températures sont les plus basses, le taux d'allogènes est égal ou en dessous de 2 puis, il augmente significativement à partir d'avril-mars 2001 et 2007 ($p < 0.001$), jusqu'à des valeurs pouvant atteindre jusqu'à 18 agents allogènes par tubule, puis il redescend vers juillet-août en dessous de 2 allogènes par section de tubule digestif.

Si l'évolution des taux d'agents allogènes est similaire pour les deux échantillonnages, néanmoins, une augmentation hautement significative ($p < 0.001$) des taux d'allogènes lors des périodes estivales en 2006-7 est observée par rapport à ceux retrouvés en 2000-1. Cela semble être dû à l'augmentation significative des températures de l'eau de la baie de Bourgneuf ($p < 0.001$), comme démontré dans le Chapitre 3.

4.6. DISCUSSION

To our knowledge, the results of the present study constitute the first report of the presence of an allogenic agent in the digestive glands of *Crepidula fornicata*. The identity of this allogen should be identified by electron microscopic studies and DNA analysis. Informed suggestions evoke the possibility of a viral agent (Drs. Susan Bower and Michael Hines, pers. comm.). The allogen's presence throughout the year in all *C. fornicata* sampled, suggests that slipper limpet infestation is pervasive and permanent.

It is noteworthy that, despite the close proximity of the gonad to the digestive gland, no allogen infestation was detected in this organ. The reproductive potential of *Crepidula fornicata* is therefore not directly compromised by this allogen, and the overall physiological condition of the slipper limpets does not seem to be severely compromised, despite the heavy degree of infestation. These observations are congruent with the rapid proliferation of this invasive species on the European Atlantic coast (Hamon & Blanchard 1994, Blanchard & Ehrhold 1999, Richard *et al.* 2006, Sauriau *et al.* 2006). Considered a "pest" species, any negative effects of the allogen on *C. fornicata* are not particularly alarming. However, the possibility of transmission to other, non - pest species would be cause for concern in the heavily anthropically - impacted European coast. At present, we may affirm that sympatric cultured Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) do not present such allogens in their visceral masses (unpublished observations of histological preparations in Dutertre *et al.*, 2009, 2010). Similarly, eventual transmission of *C. fornicata* allogen to humans would also be worrisome, especially in light of efforts to reduce slipper limpet populations through exploitation, notably for human consumption (Soulas 1996, Blanchard 2001, Fitzgerald 2007, Valdizan *et al.* 2009).

The recent warming trend of water temperatures in Bourgneuf Bay seems to favour not only the proliferation of *Crepidula fornicata*, but also that of its allogen. This observation is congruent with published works on parasites (mostly trematodes) which demonstrate that rising coastal water temperatures, due to global warming, promote their transmission and proliferation, increase their local abundance, and accelerate their development (Poulin 2006, Poulin & Mouritsen 2006, Thieltges & Rick 2006, Studer *et al.* 2010). In Bourgneuf Bay, the significant rise in water temperature, observed most acutely since 1995 (Dutertre *et al.* 2010, Valdizan *et al.* submitted) might therefore enhance *C. fornicata* physiology and facilitate the allogen transmission to other species, including those of commercial interest, with as-yet unknown consequences.

Further studies in other slipper limpet infested Bays might be interesting in order to see if this allogen is also present in their digestive gland.

4.7. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Philippe Rosa and Annaëlle Bargain for field assistance, and Mad. Odile Aumaille for her help with histology. We thank the Conseil Général de la Loire - Atlantique for the attribution of a PhD grant to AV.

CINQUIÈME CHAPITRE

ÉTUDE D'UNE STRATÉGIE DE DIMINUTION DE LA BIOMASSE DE *CREPIDULA FORNICATA*, ET ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT INTRACAPSULAIRE

CONTEXTE DES TRAVAUX

L'installation d'espèces envahissantes constitue un problème environnemental majeur, qui n'a cessé d'augmenter au cours de ces 40 dernières années (Carlton 1992, Carlton & Geller 1993, Gouletquer *et al.* 2002, Bax *et al.* 2003). Le taux d'invasion biologique, de même que la diversité et le nombre d'envahisseurs n'ont jamais été aussi élevés et les conséquences de ces invasions n'ont jamais été aussi graves qu'aujourd'hui (Ruiz *et al.* 1997, Bax *et al.* 2003). Les Nations Unies ont déclaré dans la Convention sur la Diversité Biologique (2007) qu'il était illégal d'introduire des espèces exotiques de façon risquée et non planifiée. Néanmoins, une introduction d'espèces exotiques peut être envisagée par les États membres, après avoir effectué une étude approfondie de l'estimation des impacts potentiels de cette nouvelle espèce sur sa nouvelle aire d'introduction (Gouletquer *et al.* 2002).

De nombreuses stratégies de régulation des espèces invasives ont été mises en place, au niveau national, européen et mondial pour limiter les effets résultants de leur prolifération (Ray 2005, Fitzgerald 2007, IFREMER 2008, Valdizan *et al.* 2009). Néanmoins, il est de loin préférable et plus économique d'empêcher l'invasion avant qu'elle ait lieu, ou au début de l'installation de l'espèce, plutôt que d'essayer d'éradiquer l'espèce une fois qu'elle s'est établie. En effet, les stratégies d'éradication d'espèces invasives nouvellement introduites dont les populations sont réduites à un habitat encore limité et dont la biomasse et le taux de reproduction sont encore limités se déroule en majorité avec succès (Bax *et al.* 2002). Néanmoins, dans de nombreux cas, les espèces marines introduites ne sont pas détectées assez tôt pour empêcher leur implantation. La gestion de peuplements déjà implantés d'espèces envahissantes marines est généralement plus complexe et fait intervenir une plus large gamme d'options, ce qui rend plus difficile la prise de décisions (Clout & Veitch 2002, Gouletquer *et al.* 2002). Dans de nombreux cas, la faisabilité d'une stratégie d'éradication ou de diminution de la biomasse d'une espèce invasive établie doit être au préalable étudiée, pour évaluer les risques potentiels de cette technique sur l'environnement. En Australie, pour éradiquer la moule zébrées *Dreissena polymorpha*, les autorités ont eu recours à des produits chimiques, néanmoins cela a engendré de fortes mortalités des espèces indigènes (Ferguson 2000, Bax *et al.* 2002).

Différentes méthodes ont été utilisées pour réduire la biomasse de populations d'espèces marines invasives déjà établies dans leurs aires d'introduction (Soulas *et al.* 2000, Blanchard 2001, Fitzgerald 2007). Si la diminution de leurs effectifs est possible, ces activités doivent être poursuivies indéfiniment et à grands frais (Blanchard 2001).

Dans notre étude, nous avons observé le risque de prolifération accrue dans les années à venir de *C. fornicata* dans les eaux atlantiques européennes dues notamment à l'efficacité de son cycle sexuel (Second chapitre) et à l'impact positif du réchauffement climatique sur l'extension de cette espèce (Troisième chapitre). Pour tenter de limiter cette prolifération et répondre à une demande des professionnels de la pêche et de la conchyliculture de plus en plus forte, de nombreuses techniques d'élimination et / ou de valorisation de cette "peste" ont été testées sur les côtes atlantiques françaises (Premier chapitre). Néanmoins, si certaines techniques permettent de contrôler localement sa biomasse, aucune stratégie n'a encore permis de diminuer la prolifération de cette espèce. S'il semble illusoire de vouloir éradiquer la crépidule de nos côtes, il est néanmoins primordial de rechercher de nouvelles stratégies permettant de limiter la biomasse croissante de *C. fornicata* pour faire face aux nuisances subies par les écosystèmes colonisés et aux problèmes socio-économiques engendrés par sa prolifération.

Nous proposons dans ce chapitre **une stratégie innovante du contrôle de la biomasse de *C. fornicata***, par dragage, broyage, et rejet direct des broyats sur les sites colonisés de la baie de Bourgneuf. Néanmoins, un tel broyage en mer des crépidules draguées dans la zone sublittorale n'est envisageable qu'à condition que le rejet à la mer ne contribue pas à l'extension de l'aire de répartition de cette espèce dans la baie. En effet, le risque de dissémination, par le biais de rejet de gamètes et / ou de larves non broyées viables, doit être analysé avant de proposer cette approche à la minimisation de la biomasse de la crépidule. Notre étude examine la faisabilité biologique du broyage en mer des stocks de crépidules sublittorales par le biais de fécondations externes et d'élevages d'embryons et de larves mécaniquement excapsulés. Par principe de précaution, nous avons réalisé ces expériences dans des conditions *in vitro* très favorables à la survie et au développement de cette espèce. De plus, pour effectuer des élevages de stades homogènes nous avons étudié le **déroulement du développement embryonnaire intracapsulaire**, non décrit dans la littérature à notre connaissance, par l'observation au microscope électronique à balayage des différents stades excapsulés.

Les résultats de cette étude seront très pertinents à la fois dans la recherche appliquée pour contribuer à la diminution des stocks de cette espèce invasive dans la baie de Bourgneuf ainsi que pour l'ensemble du littoral atlantique européen et, également fondamentale pour découvrir le déroulement du développement intracapsulaire de *Crepidula fornicata*.

FÉCONDATIONS EXTERNES ET ÉLEVAGES D'EMBRYONS EXCAPSULÉS: ÉVALUATION DES RISQUES LIÉS AU DRAGUAGE, BROYAGE ET RELARGUAGE SUR SITE DE *CREPIDULA FORNICATA*

D'après un article publié dans :

Aquatic Living resources, 2009, vol. 22, n°1, pp. 21-28

✚ Ajout des Figures 5.3 à 5.6, 5.8 et 5.9 non présentes dans la version publiée. Des photos MEB supplémentaires du développement intracapsulaire de la crépidule ont également été ajoutées (Fig. 5.2).

EXTERNAL FERTILIZATION AND EXCAPSULAR DEVELOPMENT IN *CREPIDULA FORNICATA*: EVALUATING THE RISK OF INVASION CONTROL BY DREDGING, CRUSHING, AND ON-SITE REJECTION

Alexandra VALDIZAN, Peter G. BENINGER, Bruno COGNIE,
Priscilla DECOTTIGNIES

5.1 ABSTRACT

Strategies for biomass control are actively sought in response to proliferation of the introduced, suspension-feeding gastropod *Crepidula fornicata* along European coasts. Among these, dredging, crushing and on-site rejection may only be envisaged if the risk of further dissemination through the release of gametes and of excapsulated embryos/larvae is found to be nil or extremely low. This study evaluates such risk using three approaches: **(1)** determination of the periods of brood presence/absence, **(2)** external fertilizations of gametes obtained by gonad stripping, **(3)** cultures of mechanically-excapsulated embryos and larvae.

A period of near- or total brood absence was observed between September 2006 and January 2007. The few zygotes (1.5 % to 7.5 %) obtained from external fertilizations did not proceed beyond the 4-cell stage. Excapsulated young embryos and mid-stages died in less than 4 days of culture. Despite their ability to swim, grow and feed, excapsulated veligers all died before metamorphosis. No juveniles were obtained from external fertilizations and

excapsulated cultures, indicating that the release of crushed catches directly at sea does not present a dissemination risk from the standpoint of gamete or prematurely-excapsulated larval dispersal. Furthermore, by carrying out the crushing operations during the period of brood absence, the dissemination risk becomes inexistant.

Negative ecological impact of such operations could be offset by attraction of motile predators, as yet unaccustomed to this introduced species, and their subsequent generalization to live slipper limpets and invasive feral *Crassostrea gigas*. At the very least, this biomass reduction approach would concentrate bottom habitat unavailability to restricted zones, freeing up the rest of the subtidal for other, formerly displaced species, as well as reducing the pressure on the trophic carrying capacity of affected habitats.

5.2. RÉSUMÉ

La prolifération du gastéropode suspensivore *Crepidula fornicata* le long du littoral européen a généré le développement de nombreuses stratégies de contrôle de sa biomasse. Parmi elles, le dragage, broyage et relargage sur site des crépidules n'est envisageable qu'à condition que le risque additionnel de dissémination lié au rejet de gamètes et /ou d'embryons /larves excapsulés soit nul ou extrêmement faible. Trois études ont été effectuées pour évaluer ce risque: **(1)** détermination des périodes de présence / absence de pontes, **(2)** fécondations externes de gamètes obtenus par 'stripping' des gonades, **(3)** cultures d'embryons et de larves mécaniquement excapsulés.

Une période d'absence totale de ponte a été observée entre Novembre 2006 et Janvier 2007. Les quelques zygotes obtenus (de 1.5 % à 7.5 %) à partir des fécondations externes n'ont pas survécu au-delà du stade 4 cellules. Les jeunes embryons et les stades intermédiaires excapsulés sont morts en moins de quatre jours de culture. Malgré leur capacité à nager, croître et se nourrir, toutes les véligères excapsulées sont mortes avant la métamorphose. Aucun juvénile n'a donc été obtenu à partir des fécondations externes et des cultures de propagules excapsulées, indiquant que le relargage de crépidules broyées en mer ne présente pas de risques de dissémination par les gamètes et par les larves prématurément excapsulées à partir du site de rejet. De plus, en effectuant les opérations de broyage durant la période d'absence de pontes (3 mois environ), le risque de dissémination devient nul.

Les impacts écologiques négatifs générés par de telles opérations pourraient être compensés par l'attraction de prédateurs, encore non accoutumés à cette espèce introduite, sur les sites de rejet, stimulant peut être ainsi leur prédation sur les stocks abondants de crépidules vivantes et d'huîtres sauvages *Crassostrea gigas*. De plus, le rejet de broyats serait

concentré sur des zones délimitées, permettant ainsi de libérer les habitats du reste de la zone subtidale pour d'autres espèces autrefois déplacées et de réduire la pression trophique exercée par la crépidule sur les habitats infestés.

5.3 INTRODUCTION

The introduced slipper limpet *Crepidula fornicata* (Linné 1758) has proliferated along European coasts over the past fifty years (Blanchard 1997), considerably impacting the shallow, soft and mixed-bottom habitats in which it is found (Le Pape *et al.* 2004; Arbach Leloup *et al.* 2008). The abundance of *C. fornicata* creates additional competition for resources and space with other suspension-feeders (Blanchard 1997, Beninger *et al.* 2007, Decottignies *et al.* 2007a, b), and modification of the nature and the structure of the habitat (through biodeposition production and shell accumulation) to the advantage of this species (Ehrhold *et al.* 1998). It is now considered an invasive species *sensu stricto* (Davis & Thompson 2000).

Several factors have been evoked to explain the successful invasion of *Crepidula fornicata*: wide ecological tolerance, the absence of habituated predators, and in particular its reproductive strategy (Blanchard 1995, 1997). The aggregation of individuals in chains, combined with protandric sexuality, internal fertilization and gamete storage promote reproductive success (Coe 1936, Dupont *et al.* 2006). In addition, the protection of early developmental stages through encapsulation and incubation minimizes the loss and the predation of propagules in the plankton (Pechenik 1979).

The economic and ecological impacts of this invasive species have spurred attempts at localizing, estimating and controlling its biomass (Blanchard 1995, 1997, Sauriau *et al.* 1998 2006, Thieltges *et al.* 2004). Mechanical removal has been proposed and implemented (Blanchard & Thomas 1998, Soulas *et al.* 2000, Bonnet 2006). However, on-shore transport, storage, and disposal of dredged slipper limpets is cost-prohibitive and very problematic in terms of pollution and public hygiene (Soulas *et al.* 2000, CREOCEAN, 2006). Despite numerous attempts, including utilisation as a food species, no economically successful use for this product has been found (Soulas 1996, Fitzgerald 2007).

An alternative solution to landing dredged slipper limpets is the release of shipboard-crushed catches directly at sea. Obviously, such a procedure can only be envisaged if the crushing operation efficiently kills the dredged adult slipper limpets, which is the starting assumption for the present study. The legal framework for such a procedure is the 1972 London Convention and its 1996 Protocol, and the specific modalities adopted by each signatory country. Beyond this legal context, however, is the eminently biological question of

the possibility of further dissemination of slipper shells through the release of intact capsules, gametes or excapsulated embryos/larvae which survive the treatment. Propagules within intact capsules removed from incubation do not survive when the capsules are exposed to natural seawater (Hoagland 1986). However, since capsules are incubated on a hard substrate beneath the females, surrounded by the concave shell, crushing involves appressing the shell to the substrate, potentially excapsulating the propagules contained therein.

The present study thus evaluates the risk of dissemination by following (1) the periods of brood presence, in order to avoid crushing operations during these periods, (2) the development of eggs fertilized externally, (3) the development of excapsulated embryos and larvae.

5.4 MATERIALS AND METHODS

A. *Crepidula fornicata* sampling

Stacks of 5 adult *Crepidula fornicata* were collected bimonthly from the intertidal at Noirmoutier Island, Bourgneuf Bay (French Atlantic coast, 46-47°N, 1-2°W) from March 2006 to November 2007. For fertilization and culture experiments, slipper limpets sampled from April 2007 to August 2007 were used. They were transferred to the laboratory, placed in flowing sea-water (15 °C - 35 ‰) and fed with *Dunaliella salina* and *Isochrysis galbana* for 3 days prior to the experiments.

B. *Periods of brood presence*

For each female sampled, ($n \geq 30$ per sample), the presence or absence of incubated egg capsules was noted. This method allows the determination of brooding periods and the percentage of brooding females. For each brooding female, the egg capsule colour was assessed to evaluate the frequency of each brood type following the Chipperfield scale (1951), modified to standardize the colours using the Pantone™ 2001 universal color guide (Beninger *et al.* 1993): young broods containing developing embryos are yellow (100c) to orange (136c) while older broods containing veligers are light brown (4675c) to dark brown (411c).

C. *External fertilizations*

Gametes were obtained by stripping the gonad of 5 males and 10 females. Mature eggs (diameter approx. 170 μm – Collin 2003), were separated from immature eggs using a 150 μm sieve. Males were chosen on the basis of spermatozoan mobility under light microscopy. Mature, immature oocytes and spermatozoa were then rinsed with 0.45 μm filtered seawater.

Experimental fertilizations were performed using mature eggs, with immature egg fertilizations as controls. Mature or immature oocytes were suspended in beakers containing 100 ml seawater at 20°C, and oocyte concentration was determined. Spermatozoan suspensions were adjusted to obtain different spermatozoa-to-egg ratios from 1 : 1 to 50 : 1 (5 treatments). Each treatment had five replicates. First cleavage division in *Crepidula* appears in egg capsules 4 to 24 hours after fertilization and is followed by the second cleavage after 18 hours (Conklin 1897, Henry 2006). Consequently, beaker contents were observed with a binocular microscope every two hours during the first day of experiment and then regularly during the following 72 hours under light microscope. For each beaker, fertilization efficiency was assessed as the percentage of fertilized eggs, distinguishable from non-fertilized eggs at the first cleavage division.

D. *Determination of intracapsular developmental stages*

In order to assess the viability and extracapsular development of homogeneous stages, embryos and larvae were excapsulated from 50 broods and observed using both inverted light microscopy and scanning electron microscopy (SEM). Samples for SEM were relaxed in 7.5 % MgCl_2 , fixed directly in slightly hyperosmotic 2.5 % glutaraldehyde in 0.2M sodium cacodylate buffer (pH 7.2), dehydrated in a graded series of ethanol, and dried using hexamethyldisilizine (HMDS, protocol for mollusks – Cannuel & Beninger 2006). The specimens were mounted on a stub, sputter-coated with gold and palladium, and viewed with a JEOL JSM 6400F SEM.

E. *Culture of excapsulated embryos and larvae*

a. Culture method

Culture of excapsulated embryos and larvae were performed in favourable conditions for the development of *Crepidula fornicata* (Pechenik 1984, Pechenik & Lima 1984). Capsules were carefully opened, and propagules of homogeneous stage were transferred to

polypropylene tanks containing 10 l of 0.45 μm filtered seawater at initial concentrations of 6.5 - 21 propagules ml^{-1} . Gentle bubbling was used to maintain the propagules in suspension. Salinity was 35 ‰, and water temperature was maintained at 18°C, the mean temperature found in Bourgneuf Bay from April to August, the months of sampling and experimental culture (IFREMER REPHY data from 1995 to 2003 - 'Bois de la Chaise' sampling station) and within the temperature range allowing the survival, growth and spontaneous metamorphosis of naturally hatched veligers in the laboratory (Pechenik 1984, Pechenik & Lima 1984). Although several types of inducer accelerate metamorphosis in *Crepidula fornicata*, normal metamorphosis also occurs without such inducers (Pechenik 1980, 1984). No inducers were used in the present study. The rearing tanks were emptied, washed and refilled every 2-3 days, at which times propagules were provided with *Isochrysis galbana* in log phase growth at approximately 1×10^5 cell ml^{-1} or at comparable cell volume with a mixed diet of three species of *Isochrysis galbana*, *Dunaliella salina*, *Thalassiosira pseudonana* (1 : 1 : 1). The algal densities used were above the critical cell density for larvae of *Crepidula fornicata* (Pechenik 1980). For each intracapsular developmental stage, 4 (veliger stage) or 5 cultures (young stage and mid-stage) were performed. Excapsulated veliger cultures were divided into two duplicates: (1) veligers fed with a unialgal diet (U1 and U2), and (2) veligers fed with a trialgal diet (T1 and T2).

b. Algal consumption

Algal concentrations in the tanks were calculated just after feeding the embryos and larvae at T0 and then 2, 4, 6 and 8 hours after feeding. For each container, the water was mixed before samplings were performed. Algal concentration, based on three samples, was then determined using a glass hemacytometer (Neubauer). Cell consumptions were calculated from the decline of phytoplankton concentration over time and expressed as cells eaten propagule⁻¹ hour⁻¹. No natural algal mortality was observed in the few hours following their addition to the tanks.

c. Mortality and growth

After each water change, 1 or 2 ml sample was pipetted at random in all the tanks to evaluate mortality of the propagules and to determine growth and development of the excapsulated veligers. Thirty individual measurements of the longest shell axis were carried out using a compound microscope and LUCIA GF 4.80 image analysis software, and growth rates were calculated as μm shell growth day⁻¹. The presence of competent veligers (*sensu*

Pechenik 1980, 1984, Pechenik & Heyman 1987: "brimmed veligers" 700 - 800 μm shell length at 18 - 20°C) was monitored.

F. **Statistical analysis**

All statistical tests were run using SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific). Normality (Kolmogorov-Smirnov normality tests) and heteroscedasticity were verified for each test. One-way ANOVA was performed when the fertilization rate, the algal consumption or the veliger growth data were normal and variances homogeneous, or Kruskal-Wallis test was performed when data were non-normally distributed and characterized by heterogeneous variances. These tests were followed by Student-Newman-Keuls multiple range tests to detect significant differences in means ($P < 0.05$).

5.5. RESULTS

A. **Periods of brood presence**

Brood capsules were found over most of the sampling period, from the first sample in March 2006 to September 2006, and from February 2007 to October 2007 (Fig. 5.1). Maximum presence of capsules was observed from April to July 2006 and from March to August 2007, with a mean brood frequency of 69.1 % (95% CI \pm 13) and 67.5 % (95% CI \pm 11) of total females, respectively. The presence of older and young broods was concomitant and continuous during the brooding season, indicating that there was no brood synchronisation among *Crepidula fornicata* females. Broods were rare or absent in September and October for both years (brood frequency : 0 % to 10.9%), and were not observed in November, December and January.

B. **Intracapsular development baseline**

Development was synchronous for all the propagules of the same brood. Based on SEM observations, three major stages of intracapsular development were subsequently easily distinguishable under light microscopy (Fig. 5.2): **(1)** early embryos from the 2-cell stage to the gastrula stage (Fig. 5.2, A-C); **(2)** mid-stages, from trochophores to the veliger transition (Fig. 5.2, D, E, F); and **(3)** intracapsular veliger-stage larvae (Fig. 5.2, G-I).

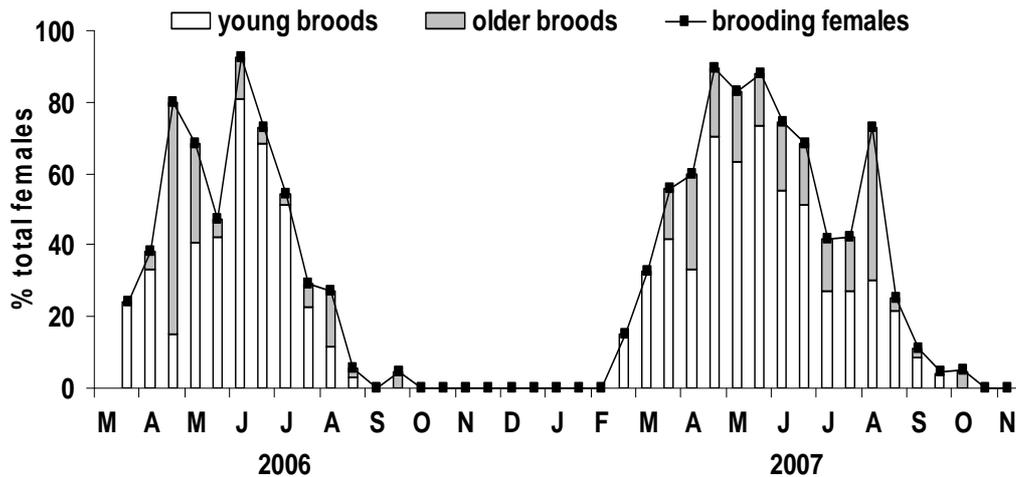


Figure 5.1. Evolution of the percentage of brooding females (curve) within the female population of *Crepidula fornicata*, and frequency of young and older broods (cumulative histograms), between mid-March 2006 and November 2007.

Figure 5.1. Evolution du pourcentage de femelles incubatrices (courbe) parmi les femelles de la population de *Crepidula fornicata*, et fréquence des pontes jeunes et plus âgées (histogramme cumulatif), entre mi-mars 2006 et Novembre 2007.

Figure 5.2. Major stages of the intracapsular development of *Crepidula fornicata*.

(A) to (L) Early embryos, SEM of (A) A 2-cell embryo; (B) A 4-cell embryo; (C), (D), (E) Multi-cell embryos; (F), (G), (H) Embryos in gastrulation, ba = blastopore; (I), (J), (K), (L) Light micrograph of embryos in division.

(M) to (T) Mid-stages, SEM of (M) a ciliated gastrula, pc = patches of cilia; (N), (O), (P) trochophores in veliger-stage transition showing the beginning of the lateral extension of the velum, psh = presumptive shell, p.v = presumptive velum, light micrograph of (Q), (R) ciliated gastrula, (S), (T) trochophores in veliger-stage transition.

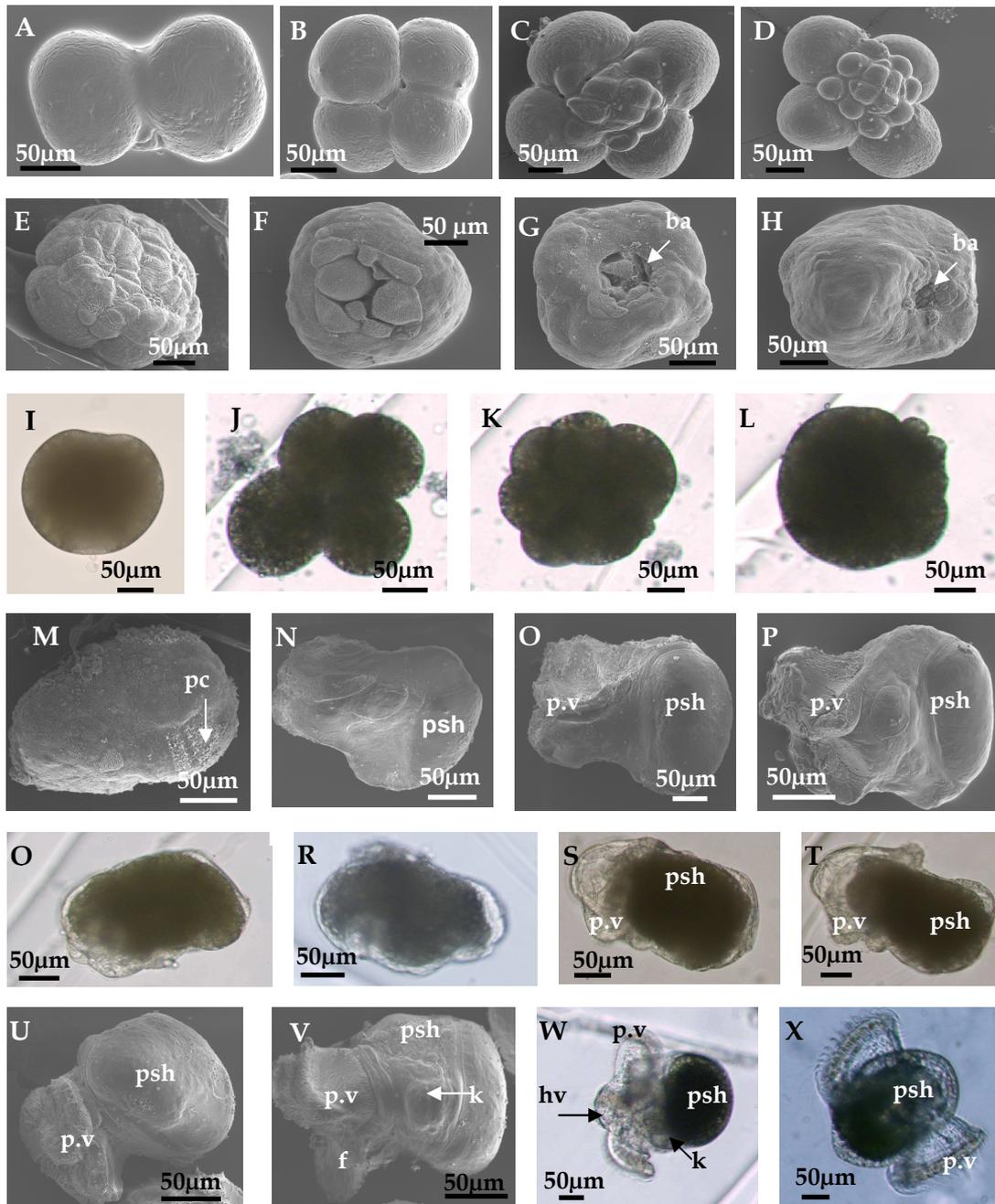
(U) to (X) Intracapsular veligers, SEM of (U), (V) intracapsular veligers, f = foot, hv = head vesicle, k = embryonic kidney, sh = shell, v = velum, light micrograph of (W), (X) intracapsular veliger.

Figure 5.2. Principaux stades du développement embryonnaire intracapsulaire de *Crepidula fornicata*.

(A) à (L) Jeunes embryons, photographies en MEB (A) embryon au stade 2 cellules; (B) embryon au stade 4 cellules; (C), (D), (E) embryons en stade avancé de division; (F), (G), (H) embryons en gastrulation, ba = blastopore; photographies en microscopie optique (I), (J), (K), (L) embryons en cours de division.

(M) à (T) Stades intermédiaires, photographies en MEB (M) gastrula ciliée, pc = patches of cilia; (N), (O), (P) trochophores en cours de transformation en larves véligères, montrant le début de l'extension latérale du vélum, photographies en microscopie optique (Q), (R) gastrulas ciliées, (S), (T) trochophores en cours de transformation en larves véligères, psh = presumptive shell, p.v = presumptive velum.

(U) à (X) Véligères intracapsulaires, photographies en MEB (U), (V) véligères intracapsulaires; f = foot, hv = head vesicle, k = embryonic kidney, sh = shell, v = velum Photographies en microscopie optique (W), (X) véligères intracapsulaires.



B. **External fertilizations**

No fertilizations were obtained for the control treatments (immature oocytes) and for the experimental treatment (mature oocytes) with a spermatozoa-to-oocyte ratio of 1 : 1 (Figure 5.3, Table 5.1). Low fertilization success was observed when the spermatozoa-to-oocyte ratios ranged between 5 : 1 to 50 : 1 (Figure 5.3, Table 5.1), with a mean % of fertilization efficiency between 1.4 to 7.5. No significant differences were found between the fertilization efficiencies obtained for the different spermatozoa-to-oocyte ratios ($p = 0.053$),

but a tendency was observed, revealing higher values of fertilization for the spermatozoa-to-oocyte ratio of 10 : 1 compared to the other treatments.

Subsequent to the few successful fertilizations, small proportions of the fertilized eggs survived during the embryonic development (Table 5.1): 19 % to 100 % of the zygotes reached 2-cell stage (Fig. 5.4), and only 5 % to 7 % reached 4-cell stage (Fig. 5.4). Embryonic development did not proceed beyond these stages.

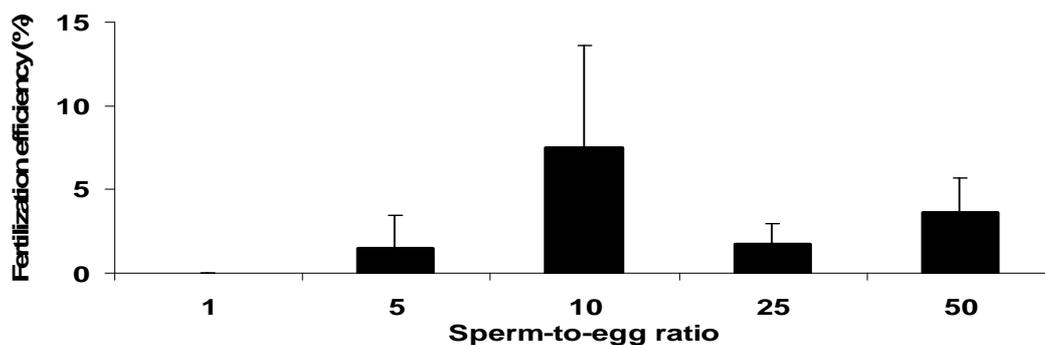


Figure 5.3. *Crepidula fornicata*: fertilization efficiencies at different sperm-to-egg ratios (means \pm 95 % CI, n = 5).

Figure 5.3. *Crepidula fornicata*: efficacité des fécondations pour différents ratios de spermatozoïdes - ovocytes (moyenne \pm 95 % IC, n = 5).

Table 5.1. *Crepidula fornicata* external fertilizations: embryo survival and early development.

Tableau 5.1. Fécondations externes de *Crepidula fornicata*: survie des embryons et développement.

Sperm : egg	% fertilized oocytes (X \pm 95 % CI; n = 5)	Mean % survival to developmental stage			
		First division	2 cells	4 cells	8 cells
1 : 1	0	0	0	0	0
5 : 1	1.49 (\pm 2.0)	100	46	0	0
10 : 1	7.5 (\pm 6.0)	100	20	0	0
25 : 1	1.71 (\pm 1.2)	100	19	5	0
50 : 1	3.61 (\pm 2.1)	100	100	7	0

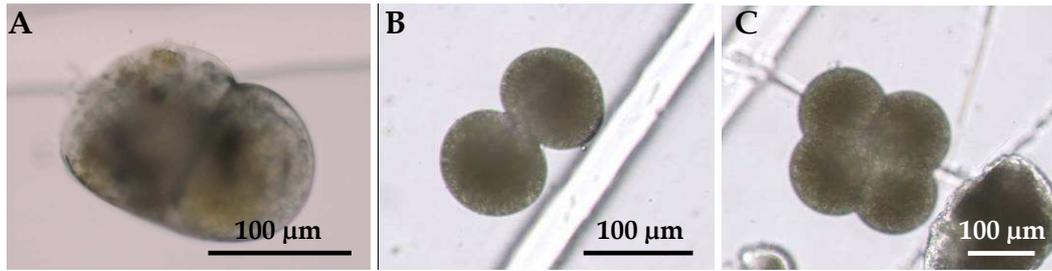


Figure 5.4. Light micrographs of the embryonic stages obtained following external fertilizations (mature oocytes).

(A) First division; (B) 2 - cell embryo; (C) 4 - cell embryo. Scale bar = 100 microns.

Figure 5.4. Photographies en microscopie optique des stades embryonnaires obtenus après les fécondations externes.

(A) embryon en cours de 1ère division; (B) embryon au stade 2 cellules; (C) embryon au stade 4 cellules. Barre d'échelle = 100 microns.

C. Cultures of excapsulated embryos and larvae

a. Culture of excapsulated early embryos and mid-stages

No feeding was observed in these cultures (no significant decline in algal concentrations over time, $0.056 \leq p \leq 0.778$, for the different cultures). From day 1 to day 4, mortality in all cultures reached 100 % (figure 5.5). Early embryos disintegrated in less than 24 hours, and mid-stages which were actively moving at the beginning of the cultures, were observed expelling yolk and disintegrating by day 1 or 2. Propagule densities decreased rapidly, the totality of the cultures were lost on day 4. No veligers were obtained.



Figure 5.5. Evolution of embryonic densities in the cultures of excapsulated early and mid - stage embryos.

Figure 5.5. Evolution de la densité embryonnaire dans les cultures de jeunes embryons et d'embryons en stades intermédiaires.

b. Culture of excapsulated veligers

i. Algal consumption

Following addition to the culture flasks, algal concentrations decreased with time in all treatments ($p = 0.04$, $p = 0.001$, $p = 0.016$ and $p = 0.029$ respectively for U1, U2, T1 and T2), indicating consumption by the veligers (Figure 5.6). Mean algal consumptions from day 1 to day 3 ranged from 0.01 to 0.13 cells veliger⁻¹ hour⁻¹ for the unialgal diet cultures and from 0.1 to 0.21 cells veliger⁻¹ hour⁻¹ for the trialgal diet cultures. These low consumptions, which never exceeded 0.3 cells veliger⁻¹ hour⁻¹, ceased completely after day 4.

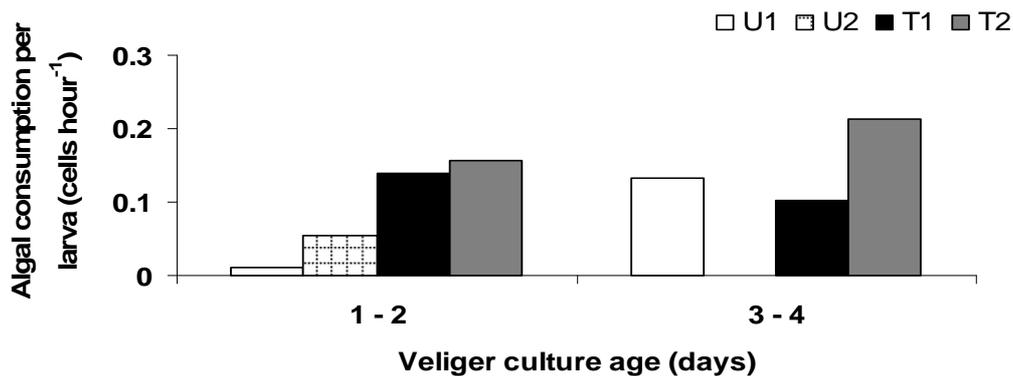


Figure 5.6. Larval algal consumptions from day 1 to day 4 in the four cultures of excapsulated veligers : U1, U2, T1, T2. No confidence intervals ($n = 1$).

Figure 5.6. Consommation algale par larve, du jour 1 au jour 4, dans les quatre cultures de véligères excapsulées: U1, U2, T1, T2. Pas d'intervalle de confiance ($n = 1$).

ii. Veliger concentration and growth

All veligers swam consistently in the batches after excapsulation. Mean shell lengths increased significantly over the treatment durations ($p = 0.001$ for the four cultures, Fig. 5.7) accompanied by morphological changes such as velum growth, loss of the embryonic kidneys and the head vesicle, the progressive transparency of the shell and the appearance of the tentacles (Fig. 5.8 A). Veligers of U1, U2, T1 and T2 grew uniformly during the first eight days of culture, with a mean shell size (\pm CI) comprised between 354 and 365 μm (± 13 and 13.5) at day 0 and between 421 and 438 μm (± 25 and 17.5) at day 8 (Fig. 5.3), corresponding to a mean growth rate of 8.2 to 10.5 $\mu\text{m day}^{-1}$ (Table 5.2). Nevertheless, larval mortality was high in all cultures (Table 5.2, Fig. 5.9). Indeed, most of the excapsulated veligers became progressively less active, and visibly lost a considerable amount of tissue (Fig. 5.8 B, C) before a mass mortality at day 8. For U1, U2 and T2, larval mortality was 69.7 %, 46.7 % and 47.6 %, respectively, on day 4 and reached 100 % after day 8 (Table 5.2, Fig. 5.9). No competent veligers were obtained. For T1, from day 1 to day 7, larval mortality was below 50 % (Table 5.2), and between day 7 and day 9 the larval concentration decreased 40 fold (8 ml⁻¹

to 0.2 ml⁻¹; Fig. 5.9). The remaining veligers were placed in a 1l beaker, where the larval concentration continued to decrease with respectively 0.01 ml⁻¹ and 0.005 ml⁻¹ at days 11 and 15 (Fig. 5.9). At day 18, two brimmed veligers, of shell sizes of 762 µm and 784 µm, were observed in this final culture but they rapidly died before reaching metamorphosis (Fig. 5.8 D). The totality of the excapsulated veligers thus disappeared by day 20 (Table 5.2, Fig. 5.9), and no viable juveniles were obtained.



Figure 5.7. Mean (\pm 95 % confidence interval, n = 30) shell growth in the four cultures of excapsulated veligers : U1, U2, T1, T2.

Figure 5.7. Moyenne (\pm 95 % IC, n = 30) de croissance des coquilles pour les quatres cultures de véligrès excapsulées : U1, U2, T1, T2.

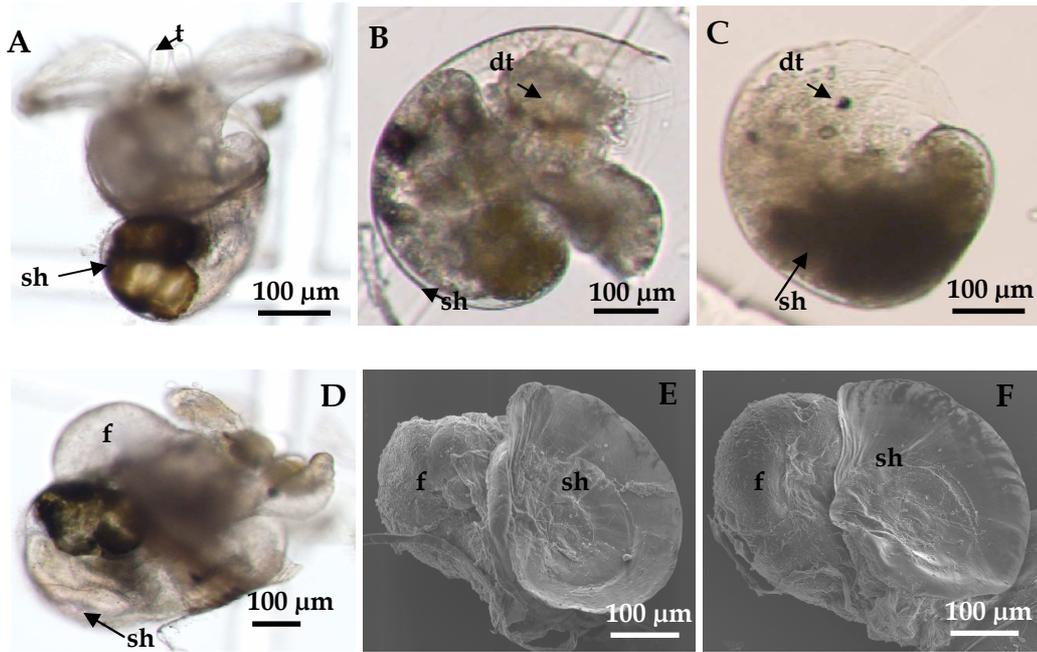


Figure 5.8. Cultures of excapsulated veligers.

Light micrographs of Excapsulated veligers, (A) showing transparent shell and tentacles, sh = shell, t = tentacles; (B) Excapsulated veliger showing substantial loss of tissue, dt = degraded tissue, (C) Empty shell, (D) Brimmed veliger. SEM of Brimmed veligers (E), (F) f = foot. Scale bar = 100 microns.

Figure 5.8. Cultures de velligères excapsulées.

Photographies en microscopie optique de Velligères excapsulées, (A) possédant une coquille transparente et des tentacules, sh = shell, t = tentacles; (B) Velligère excapsulée montrant une perte importante de tissu, dt = degraded tissue; (C) Coquille vidée; (D) Velligère compétente à la métamorphose.

Photos MEB de Velligères compétentes à la métamorphose (E), (F) f = foot. Barre d'échelle = 100 microns.

Table 5.2. Mortality and growth rate of excapsulated veliger cultures. d = day

Tableau 5.2. Mortalité et taux de croissance dans les cultures de velligères excapsulées.

Cultures	Mean % mortality						Growth rate from d ₀ to d ₈ (µm day ⁻¹)
	d ₀	d ₄	d ₈	d ₁₂	d ₁₆	d ₂₀	
U1	0	69.7	98.6	100	100	100	8.2
U2	0	46.7	99.8	100	100	100	9.2
T1	0	17.6	97.0	99.9	99.9	100	9.0
T2	0	47.6	87.6	100	100	100	10.5

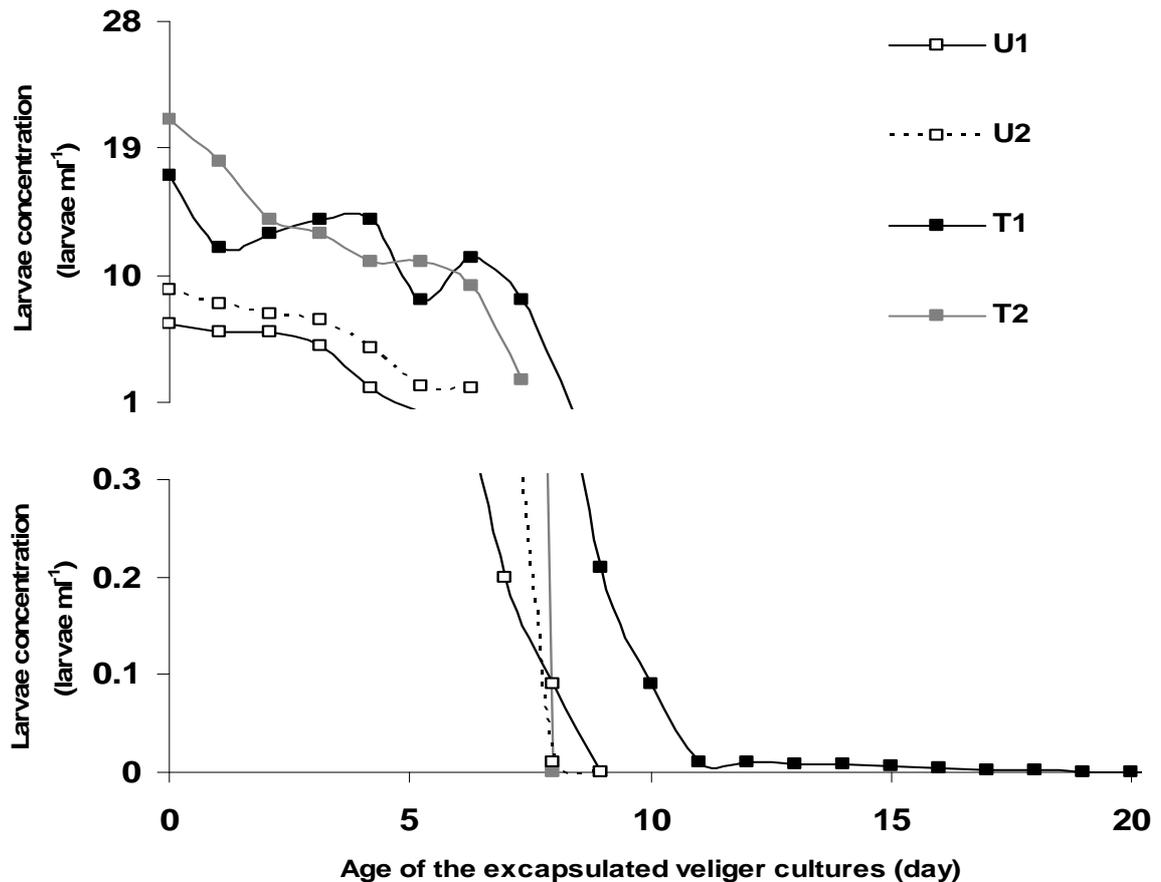


Figure 5.9. Larval densities per batch (larvae ml⁻¹) in the four cultures of excapsulated veligers : U1, U2, T1, T2.

Figure 5.9. Densités larvaires par bac (larve ml⁻¹) pour les quatres cultures de véligères excapsulées : U1, U2, T1, T2.

5.6. DISCUSSION

The very low rates of external fertilization obtained (means < 8 %) using mature gametes, indicate that an extra-uterine fertilization is very difficult to achieve in *C. fornicata*. Several factors provided during normal internal fertilization may be necessary, e.g. the mucus secretions which normally accompany the mature eggs in the uterus lumen, and the protected environment in which gametes develop and are transferred to the uterus, either directly from the ovaries (female) or from the male tract and then the seminal receptacles where spermatozoa are stored (Coe 1936, Martin 1985).

A. Viability of non-capsulated / excapsulated embryos and mid-stages

The aborted development of the few embryos obtained from the external fertilizations suggests that the 'embedding' of the fertilized eggs in the uterus is essential to the survival of the subsequent embryos. The rapid disintegration of the excapsulated embryos and mid-stages is congruent with studies on *Crepidula fecunda*, which showed that excapsulated embryos were unable to capture and ingest suspended food particles, due to lack of a velum at this stage (Chaparro *et al.* 2002a, b). Similarly, Pechenik *et al.* (1984) showed low survival of pre-shelled embryos of the marine prosobranch *Nucella lapillus* after excapsulation.

Encapsulation protects the embryos of marine invertebrates against microorganisms, predation, osmotic stress and desiccation (Pechenik 1979, 1982). In addition, the intracapsular fluid provides the early embryos and mid-stages of Calyptraeidae a concentrated 'package' of major ions necessary for their initial development (Maeda-Martinez 2008), and it has been suggested that the organic matter contained in this fluid might provide extra-nutrients to the embryos (Ojeda & Chaparro 2004).

Given the above, it is clear that non-capsulated and excapsulated embryos and mid-stages do not present a dissemination risk after a crushing, dumping at sea, since no viable juveniles were obtained under the very favourable rearing conditions of the present study.

B. Viability of excapsulated veligers

Excapsulated veligers were capable of swimming and feeding, suggesting that the abilities of swimming and of removing particles from the water are acquired during the intracapsular phase, with the development of the velum, as previously observed in *Crepidula fecunda* (Chaparro *et al.* 2002a, b). However, our observations demonstrate that despite this anatomical disposition, feeding functionality is extremely limited, since the highest algal consumption calculated was 0.21 cells veliger⁻¹ hour⁻¹, compared to mean values of 3000 to 15000 cells veliger⁻¹ hour⁻¹ for cultures of naturally-hatched veligers of *Crepidula fornicata* raised in the same conditions of temperature and of algal concentration and of the same range of size (400 µm - 800 µm) (Pechenik 1980, Blanchard *et al.* 2008). A similar observation has been made for *C. fecunda* (Chaparro *et al.* 2002a).

The extreme (total) mortality of excapsulated *Crepidula fornicata* veligers, observed in the present study, may be contrasted with that of naturally-hatched veligers reared under similar conditions, with only 5 % mortality at metamorphosis, and even these being due to

the desiccation of metamorphosed individuals crawling above the water levels of the batches (Pechenik 1980, 1984). Moreover, the growth rates for the four excapsulated veliger cultures (values comprised between 8.2 $\mu\text{m d}^{-1}$ and 10.5 $\mu\text{m d}^{-1}$) were only $\frac{1}{2}$ to $\frac{1}{4}$ of the average growth rate observed in naturally-hatched larvae raised in similar conditions of temperature (18°C - 20°C) and algal concentration (1 - 2 x 10⁵ cells ml⁻¹) (24.5 $\mu\text{m d}^{-1}$ - Pechenik 1980; 45.3 $\mu\text{m d}^{-1}$ - Pechenik 1984; 40.1 $\mu\text{m d}^{-1}$ - Pechenik & Lima 1984).

In view of these results, it may be concluded that prematurely-excapsulated veligers do not present a dissemination risk. Recent work on *Crepidula fecunda* suggests that intracapsular veligers are dependant on organic components, mostly proteins, in the intracapsular fluid (Ojeda & Chaparro, 2004), and this may be the cause of the massive mortalities of prematurely-excapsulated *C. fornicata* veligers.

C. *Biological feasibility of dredging, crushing, and on-site rejection of Crepidula fornicata*

It is difficult, if not impossible, to guarantee that a given event will never occur. However, the results of the present study show that the dumping at sea of crushed stacks of *Crepidula fornicata* does not present a dissemination risk from the standpoint of gamete or prematurely-excapsulated larval dispersal. Since it was necessary to ensure that the larvae studied were indeed intracapsular, it was not possible to include larvae immediately prior to hatching, hence the risk from the penultimate larval stages is not known. As brood deposition is not synchronous within a *C. fornicata* population (Richard *et al.* 2006, present study), it is impossible to avoid the penultimate larval stage in a dredging strategy. However, it may be surmised that the mortalities of such larvae would be high following crushing and ship-board storage of the crushed animals prior to dumping, in addition to natural mortality of *Crepidula fornicata* larvae in the field after dumping (about 50 % per day - Pechenik & Levine 2007). Furthermore, the crushing operations could be performed during the periods of absence of broods, which occur from early to mid-winter throughout the worldwide distribution of *C. fornicata* (Richard *et al.* 2006). In the Bourgneuf Bay, this period extends from November to January (present study). The dissemination risk becomes inexistant.

Although the shipboard release of crushed *C. fornicata* might engender ecological problems such as bottom anoxia, these might be offset by the attraction of motile predators not accustomed to *C. fornicata* as a food source (eg crabs, rays, starfish, which have not yet

produced effective predation strategies on this introduced species). This might then stimulate predation, both on slipper limpets and on the abundant stocks of feral oysters (*Crassostrea gigas*) which have also begun to pose serious proliferation problems and which may be presumed to compete with farmed oysters. Although oyster farmers could have concerns about the subsequent increase in predator numbers, it must be remembered that inaction will not alleviate their anxieties either, and that the increased number of predators (whose juveniles might enter the oyster-bags) might be offset by the advantage of increased predation on farmed oyster competitors.

The crushed biomass could also be dumped on existing concentrations of live slipper limpets, such that any ensuing bottom anoxia would not alter bottom habitat availability for other species, and even help to reduce live slipper shell biomass. Finally, it must be remembered that the goal is to reduce the impact of slipper limpets on carrying capacity of both trophic resources and habitat; concentration of bottom habitat unavailability to limited areas (dumping zones) will free up the rest of the subtidal for other species such as flatfish, displaced by the slipper limpet populations.

5.7. Acknowledgements

The authors thank Marine Briand, Philippe Rosa, Pierre Gaudin for their technical assistance, and are grateful to Alain Barreau for his help with scanning electron microscopy. We thank the Conseil Général de la Loire - Atlantique for the attribution of a PhD grant to AV, and the Conseil Régional des Pays de la Loire for funding this work.

SIXIÈME CHAPITRE
TRAVAUX EN COURS - ONGOING WORKS

Crepidula fornicata: Nature des relations physiologiques entre les spermatozoïdes et l'épithélium du réceptacle séminal & Étude ultrastructurale de la morphologie des spermatozoïdes

Physiological organization of the seminal receptacle and sperm storage in the invasive species *Crepidula fornicata* / Ultrastructural morphology of *C. fornicata* spermatozoa

6.1. CONTEXTE DES TRAVAUX EN COURS

Au cours de l'évolution, de nombreux animaux se sont dotés d'une structure reproductive efficace qui permet à la femelle de stocker pour de longues périodes les spermatozoïdes reçus lors de la copulation avec le mâle. Dans la majorité des espèces possédant une fécondation interne, à l'exception de la plupart des mammifères, les femelles possèdent des organes fortement spécialisés pour le stockage de sperme (ex: Poissons: Kadow 1954, Insectes: Davey 1958, Amphibiens: Boisseau & Joly 1975, Arachnides: Thomas & Zeh 1984, Annélides: Adiyodi 1988, Oiseaux: Shugart 1988; Mollusques: Baur 1998, Reptiles: Olsson & Medsen 1998).

Dans notre étude (Chapitre 3), nous avons pour la première fois observé la présence continue de spermatozoïdes dans le réceptacle séminal de *C. fornicata* pendant les 18 mois d'échantillonnage. Les photographies prises en microscopie optique, montrent que les spermatozoïdes sont unis à l'épithélium des ampoules séminales, formant des zones superposées correspondant aux trois parties du spermatozoïdes: la tête, la pièce intermédiaire et le flagelle.

Dans le second chapitre, nous avons observé un stockage de spermatozoïdes dans les ampoules du réceptacle séminal de *Crepidula fornicata* pendant les 18 mois de nos prélèvements. Néanmoins, nous avons actuellement très peu de connaissances sur l'ultrastructure de cet organe chez *C. fornicata* et sur les bases des mécanismes anatomiques / physiologiques qui permettent aux spermatozoïdes d'être stockés dans les ampoules séminales. **Nous avons donc commencé à étudier la nature des relations physiologiques entre les spermatozoïdes et l'épithélium du réceptacle séminal.**

De nombreux problèmes se posent quant à la taxonomie et à la phylogénie dans de nombreux groupes d'animaux. Healy a étudié chez les mollusques l'ultrastructure des

spermatozoïdes et les a comparé avec les taxons pré-établis. Ses nombreux travaux (Healy 1983, 1986, 1987, 1988, 1993, 1996) ont démontré l'intérêt de l'étude de la morphologie des spermatozoïdes dans l'étude de la taxonomie et /ou la phylogénie des Mollusques. En particulier, des investigations ont révélé que des espèces proches morphologiquement pouvaient être différenciées en comparant l'ultrastructure de leurs spermatozoïdes.

Nous avons démarré une étude ultrastructurale des spermatozoïdes de *Crepidula fornicata* pour étudier (1) l'ultrastructure de leurs morphologies et (2) vérifier si le positionnement phylogénétique de cette espèce invasive, déterminé sur la base de ses caractères morphologiques, coïncide avec celui basé sur l'ultrastructure de ses spermatozoïdes.

6.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. Études ultrastructurales en microscopie électronique à balayage (MEB)

Pour l'observation des réceptacles séminaux, des coupes transversales des ampoules séminales préalablement enrobées dans de la paraffine ont été traitées par la technique décrite par Prieur (1981). Après un déparaffinage avec du Roti®-Histol, les échantillons ont été déshydratés dans des bains d'alcool de degré croissant en éthanol, puis séchés en utilisant de l'hexamethyldisalazine (HMDS, protocole utilisé pour les mollusques- Cannuel & Beninger 2006). Les échantillons ont été montés sur des plots et métallisés (or et palladium) avant l'observation au MEB JEOL JSM 6400F.

Pour l'observation des spermatozoïdes, le sperme a été collecté par scarification du réceptacle séminal. Le sperme, préalablement fixé dans une solution de glutaraldéhyde à 2.5 % en tampon cacodylate de sodium (0.1 M; PH 7,3; 1100 milliosmoles) a été disposé sur des anodisques dans des boîtes de pétri contenant de l'Agar, à 37 °C pendant 1 heure. Ensuite les anodisques ont été rincés plusieurs fois dans du tampon phosphate (PH 7,3), déshydratés, puis l'alcool a été substitué par du Fréon. Les anodisques ont ensuite été montés sur des plots, puis le protocole classique de préparation des échantillons pour le MEB a été utilisé (Chapitre 5).

B. Études ultrastructurales en microscopie électronique à transmission (MET)

Pour les observations en MET, des échantillons de 1mm³ des réceptacles séminaux ont été fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 2.5 % en tampon cacodylate de sodium 0.1 M, PH 7,3 ajusté à 1100 milliosmoles par addition de chlorure de sodium, durant au moins 1 heure à 4°C. Les échantillons ont ensuite été rincés plusieurs fois dans le tampon cacodylate 0,1M, avant une post-fixation de 1h à +4°C par une solution de tétr oxyde d'osmium à 1% en tampon cacodylate. Les échantillons sont ensuite déshydratés à température ambiante par des bains successifs d'éthanol de degré croissants: 70° (3×5 min), 95°C (3×10 min) et 100° (3×15 min). Ils sont imprégnés par un mélange volume à volume d'oxyde de propylène et de résine SPURR pendant 1h30 puis de résine pure pendant 12h avant leur inclusion en résine. La polymérisation s'effectue à 60°C pendant 48h. Des coupes ultra-fines, de 600nm d'épaisseur, recueillies sur des grille cuivre-rhodium (Mesh 300) sont

contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb (Reynolds 1963), puis observées au MET.

6.3. RÉSULTATS & CONCLUSIONS PRÉLIMINAIRES

A. *Nature des relations physiologiques entre les spermatozoïdes et l'épithélium du réceptacle séminal*

Nos études en cours nous ont permis d'obtenir de premières photos en MEB et en MET des réceptacles séminaux et d'observer la nature des relations physiologiques entre les spermatozoïdes et l'épithélium de cet organe de stockage.

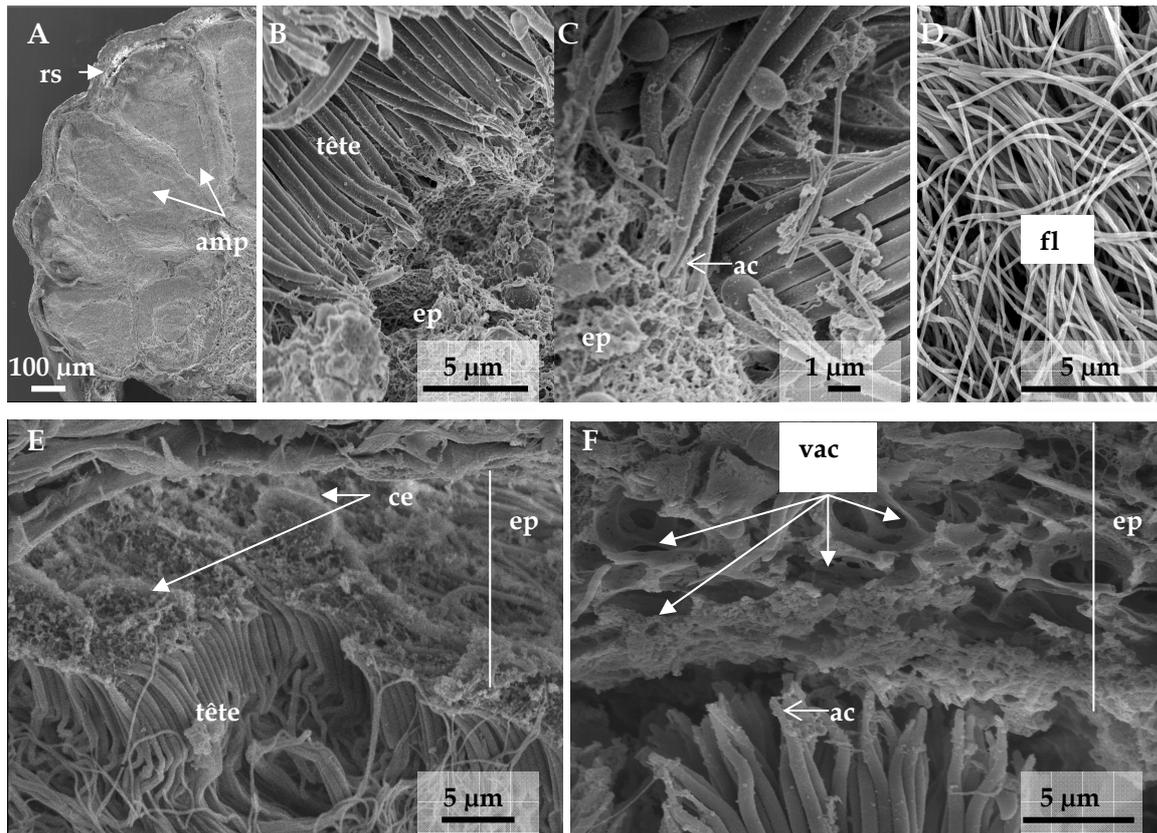
Au sein du réceptacle séminal (Fig 6.1 A), les têtes des spermatozoïdes semblent accolées à l'épithélium ampullaire (Figs 6.1 A, B). Le centre de l'ampoule est rempli par les flagelles des spermatozoïdes (Figs 6.1 C). L'épithélium ampullaire semble évoluer au cours du stockage du sperme, **(1)** de nombreux noyaux sont observables dans l'épithélium ampullaire sur la Figure 6.1 E, les têtes des spermatozoïdes sont très proches des noyaux **(2)** l'épithélium ampullaire observé sur la Figure 6.1 F comporte de nombreuses vacuoles intracellulaires, laissant penser à une dégénérescence de celui-ci. De plus la relation spermatozoïdes/épithélium semble se relâcher.

Figure 6.1. Observations au MEB du réceptacle séminal de *Crepidula fornicata*.

(A) Coupe transversale d'un réceptacle séminal (rs) composé de plusieurs ampoules (amp). **(B), (C)** Les têtes des spermatozoïdes semblent être accolées à l'épithélium ampullaire (ep) sur toute sa longueur. Détail d'une ampoule séminale **(C)**, les acrosomes (ac) des spermatozoïdes sont directement fixés dans l'épithélium. **(D)** Amas de flagelles (fl) au centre d'une ampoule séminale. **(E), (F)** Détails de l'épithélium ampullaire. L'épithélium est constitué de nombreuses cellules épithéliales (ce), les têtes des spermatozoïdes sont à proximité de celles-ci **(E)**. L'épithélium semble être en dégénérescence, il comporte de nombreuses vacuoles intracellulaires (vac) **(F)**.

Figure 6.1. SEM observations of the seminal receptacle of *Crepidula fornicata*.

(A) Transversal section of a seminal receptacle (rs), note the presence inside this structure of many seminal ampula (amp). **(B), (C)** Spermatozoa heads (tête) seemed to be joined to the ampular epithelium (ep) and completely covering it. Detail of an ampula **(C)**, note acrosomes (ac) fixed directly into the epithelium. **(D)** Flagella (fl) pile at the center of the seminal ampula. **(E), (F)** Detail of the ampular epithelium. Epithelium with numerous epithelial cells (ce), spermatozoan heads are at their near proximity **(E)**. The ampular epithelium seems to be degenerated, note the many intracellular vacuoles (vac) inside it **(F)**.



La paroi de l'ampoule du réceptacle séminal (Fig. 6.2) est constituée d'un épithélium composé de cellules comprenant de gros noyaux allongés ovoïdes parfois multilobés à chromatine dense (Fig. 6.2), de nombreuses vacuoles intracellulaires indiquant un début de dégénérescence des cellules épithéliales, et des fibrocytes qui permettent probablement l'évacuation du sperme lors de la fécondation des ovocytes dans l'utérus. Les acrosomes des spermatozoïdes, (observés en coupe longitudinale, transversale, ou oblique) sont à proximité de cet épithélium. La plupart des spermatozoïdes sont directement insérés dans le cytoplasme des cellules épithéliales (Fig. 6.2).

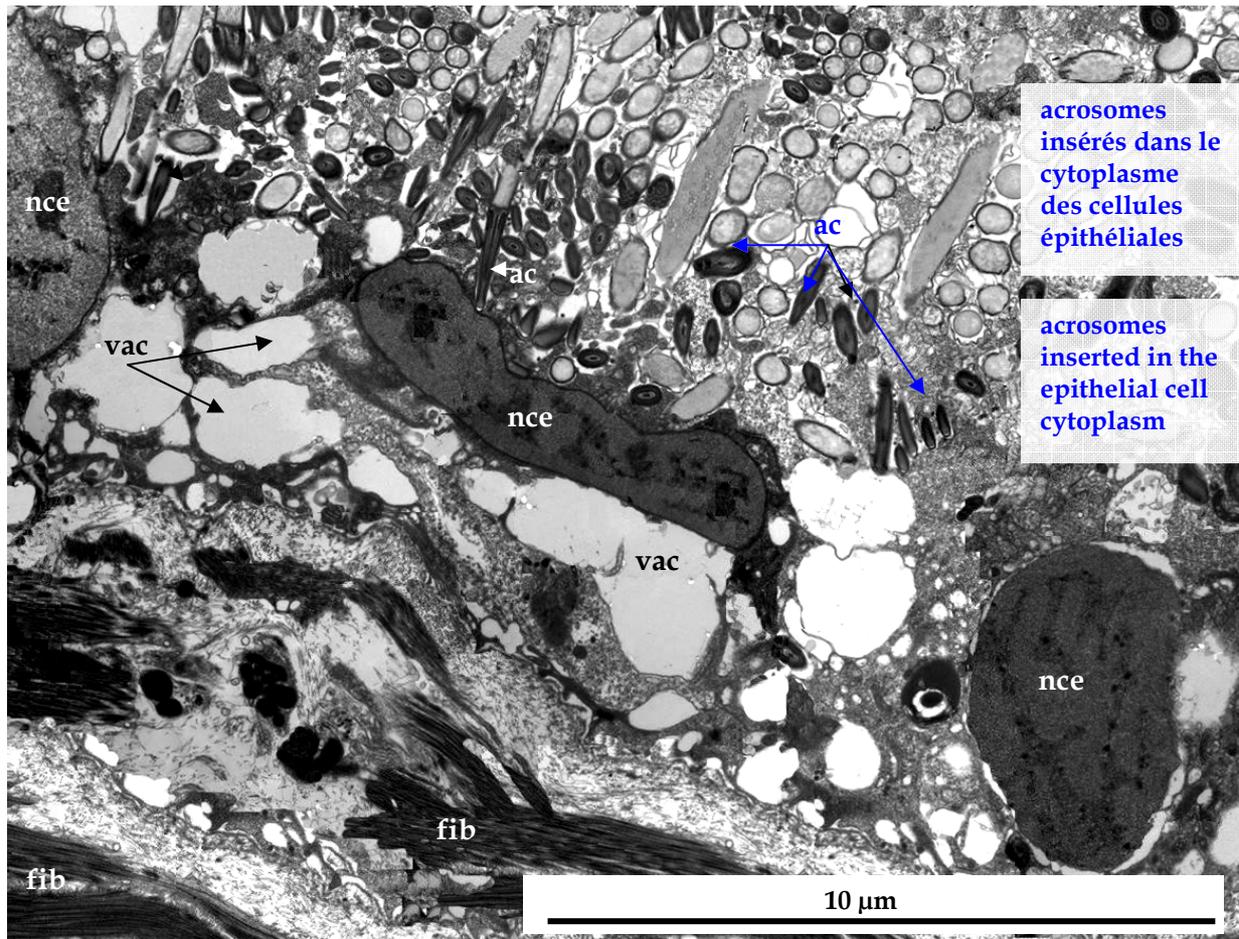


Figure 6.2. Coupe transversale, observée au MET, de l'épithélium ampullaire et de la zone d'insertion des spermatozoïdes chez *Crepidula fornicata*. ac = acrosome, fib = fibrocyte, nce = noyau d'une cellule épithéliale, vac = vacuole.

Figure 6.2. MET observation of the ampullar epithelium and of the spermatozoan insertion zone in *Crepidula fornicata*.

Epithelial cells have elongated ovoid nucleus (nce), sometimes multilobated, with dense chromatine. Most acrosomes (ac) are inserted in the epithelial cell cytoplasm. Presence of intracellular vacuoles (vac) might indicate the beginning of the epithelial cell degeneration. Fibrocytes (fib) are present at the periphery of the ampulla, probably permitting evacuation of sperm for fertilization.

Différents stades de l'évolution de la paroi du réceptacle séminal ont été observés. Dans la Figure 6.3, de A à C, une augmentation du nombre de vacuoles intracellulaires est observée, envahissant progressivement tout le cytoplasme. Le réseau emprisonnant les spermatozoïdes paraît se relâcher. Nous pouvons supposer que les spermatozoïdes présents dans l'ampoule sont alors transférés vers l'utérus pour féconder les ovocytes. L'épithélium ampullaire semble avoir la capacité de se régénérer après sa destruction (Fig. 6.3 C), et pourrait ainsi recevoir de nouveau spermatozoïdes provenant d'une autre copulation; néanmoins d'autres photos MEB sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Figure 6.3. Différents stades d'évolution de la paroi des ampoules du réceptacle séminal de *C. fornicata*.

(A) - (C) Dégénérescence progressive de l'épithélium :

(A) Epithélium non dégénéré. Les spermatozoïdes ne semblent pas être insérés très profondément dans le cytoplasme des cellules épithéliales, peu de vacuoles intracellulaires (vac) sont visibles. Des réticulums endoplasmiques (re) sont observés. fib = fibrocyte.

(B), (C) Dégénération de l'épithélium. Les vacuoles intracellulaires envahissent le cytoplasme, elles sont plus nombreuses et plus grosses, les acrosomes (acr) des spermatozoïdes sont insérés dans le cytoplasme des cellules épithéliales mais également à proximité des noyaux (nce). La paroi de l'ampoule est en dégénérescence **(B)**.

Néanmoins la formation d'un nouvel épithélium ampullaire est observée, qui permettra à l'ampoule de se régénérer après sa dégénération (C).

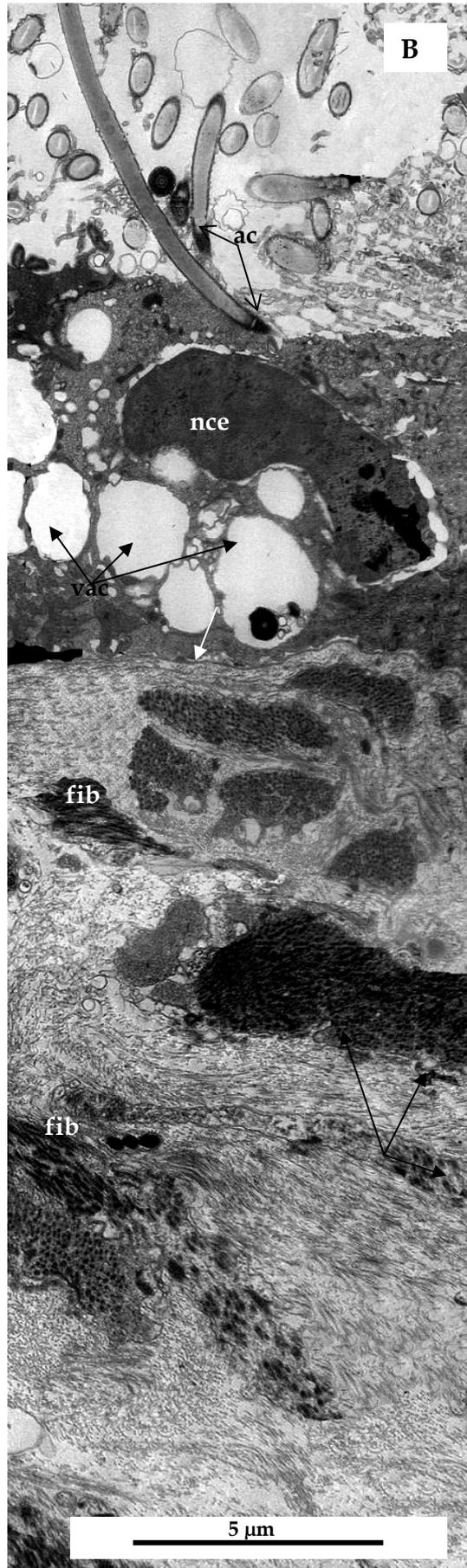
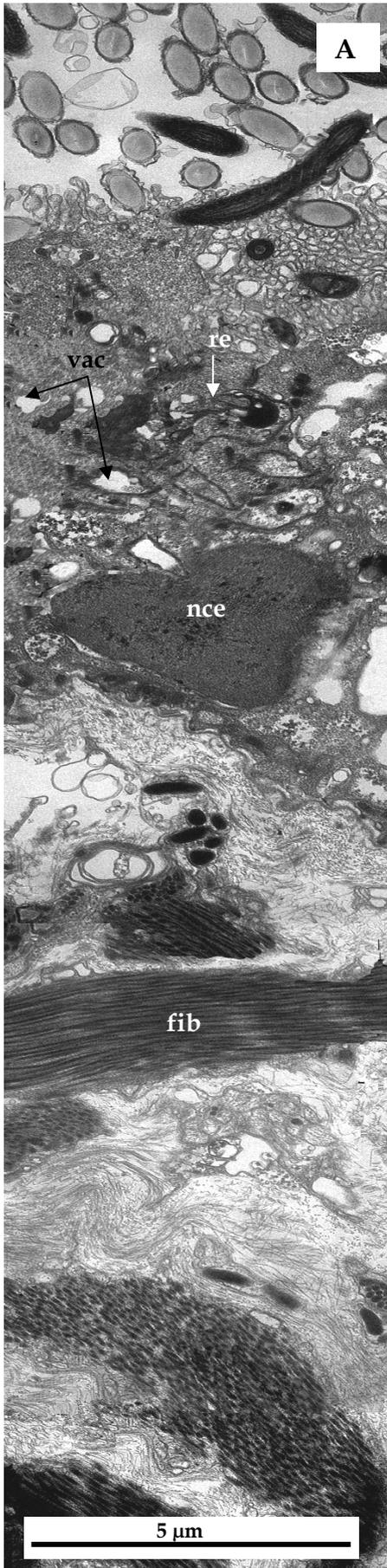
Figure 6.3. Different evolution stages of the seminal receptacle wall in *C. fornicata*.

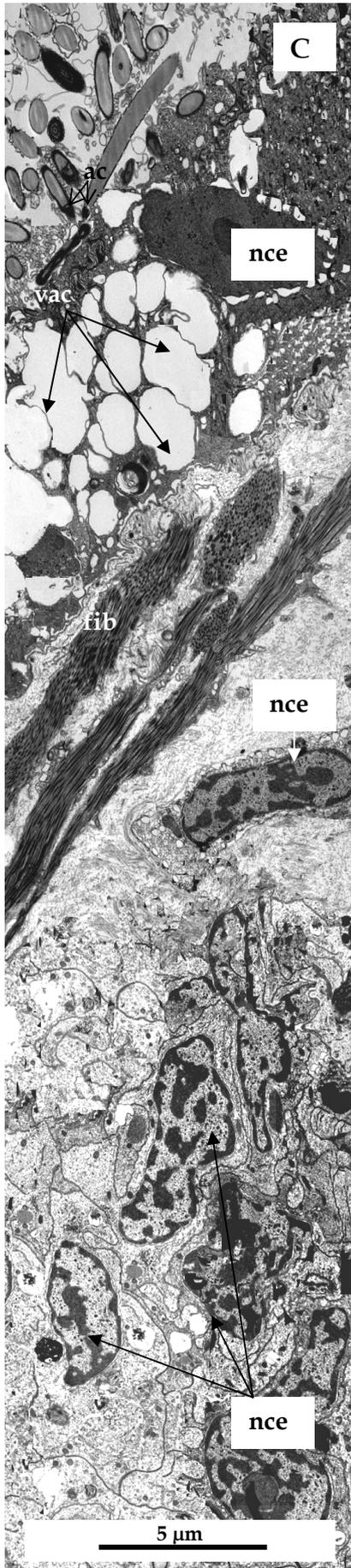
(A) - (C) Progressive degeneration of the ampullar epithelium :

(A) Epithelium not degenerated. Spermatozoa are not deeply inserted in the epithelial cells cytoplasm. Intracellular vacuoles (vac) are rare. Note the presence of endoplasmic reticulums (re). fib = fibrocyte.

(B), (C) Degeneration of the epithelium. Intracellular vacuoles are numerous and large, they have invaded a large part of the epithelial cells cytoplasm. Spermatozoan acrosomes (acr) are inserted in the rest of cytoplasm and also near the epithelial cells nucleus (nce). The ampullar wall is in degeneration **(B)**.

Note the formation of a new ampullar epithelium, permitting regeneration of ampulla after their degeneration (C).





formation
d'un nouvel
épithélium

formation of
a new
epithelium

B. Étude ultrastructurale de la morphologie des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes de *C. fornicata* sont fusiformes (Figs. 6.4 A à C), ils ne sont pas adaptés pour nager au sein de la colonne d'eau, ils sont peu motiles (Coe 1942). Cela peut être dû à l'adaptation de cette espèce caractérisée par une fécondation interne : les spermatozoïdes se déplacent uniquement dans les fluides visqueux des conduits génitaux, ils n'ont donc pas besoin d'être très motiles.

Les photos MEB nous ont servi à déterminer la longueur et la largeur de chaque partie du spermatozoïde : l'acrosome, le noyau, la pièce intermédiaire et le flagelle.

Tableau 6.1. Taille des différentes parties constituant le spermatozoïde de *C. fornicata*.

Table 6.1. Size of the different parts of *C. fornicata* spermatozoan. acr= acrosome, nu = nucleus, pi = midpiece, fl = flagella.

	Acrosome (acr)	Noyau (nu)	Pièce intermédiaire (pi)	Flagelle (fl)
Longueur ($\mu\text{m} \pm \text{IC } 95 \%$) Length ($\mu\text{m} \pm 95 \%$ CI)	1,63 $\mu\text{m} \pm 0.1$	16 $\mu\text{m} \pm 1.12$	30 $\mu\text{m} \pm 3.5$	90 $\mu\text{m} \pm 5.51$
Largeur ($\mu\text{m} \pm \text{IC } 95 \%$) Width ($\mu\text{m} \pm 95 \%$ CI)	0,13 $\mu\text{m} \pm 0.12$	0,7 $\mu\text{m} \pm 0.18$	0,3 $\mu\text{m} \pm 0.3$	0,22 $\mu\text{m} \pm 0.23$

Figure 6.4. Observation en MEB de la structure d'un spermatozoïde de *Crepidula fornicata*.

- (A) Vue de l'acrosome (acr), de la membrane contenant le noyau (n) et du début de la pièce intermédiaire (pi),
- (B) Détail de l'acrosome,
- (C) Jonction entre l'acrosome et le noyau,
- (D) Jonction entre le noyau et la pièce intermédiaire,
- (E) Détail de la pièce intermédiaire,
- (F) Jonction entre la pièce intermédiaire et le flagelle.

Figure 6.4. SEM observation of *Crepidula fornicata* spermatozoan structure.

- (A) Spermatozoan with the acrosome (acr), the membrane containing the nucleus (n) and the midpiece (pi) start,
- (B) Acrosome detail,
- (C) Acrosome - nucleus junction,
- (D) Nucleus - midpiece junction,
- (E) Midpiece detail,
- (F) Midpiece - flagellum (fl) junction.

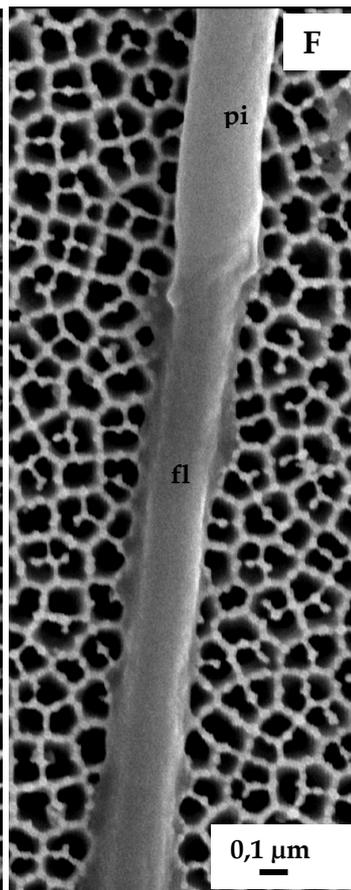
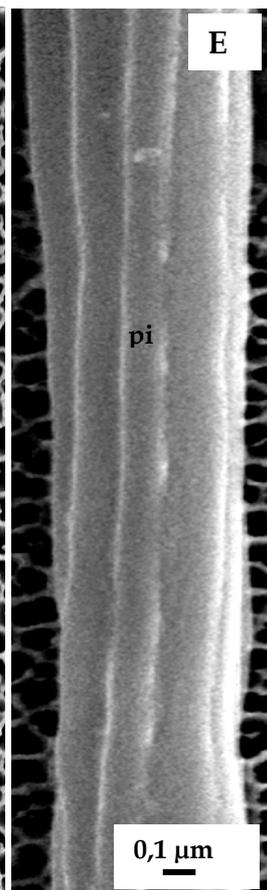
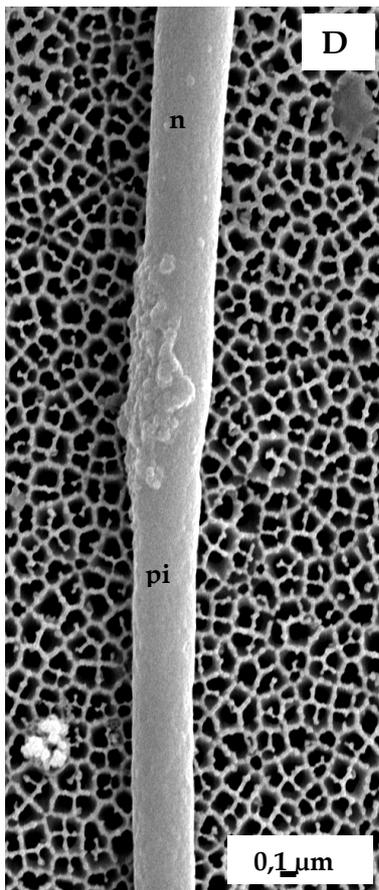
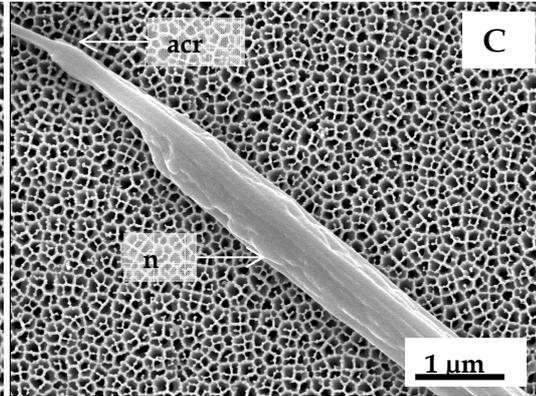
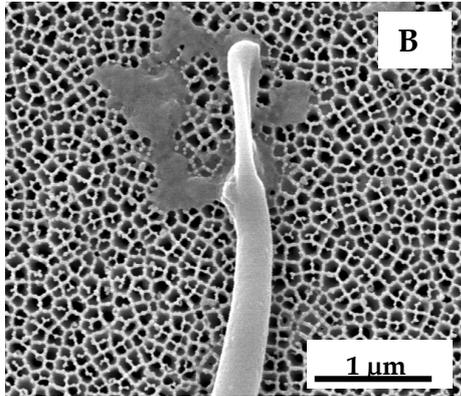
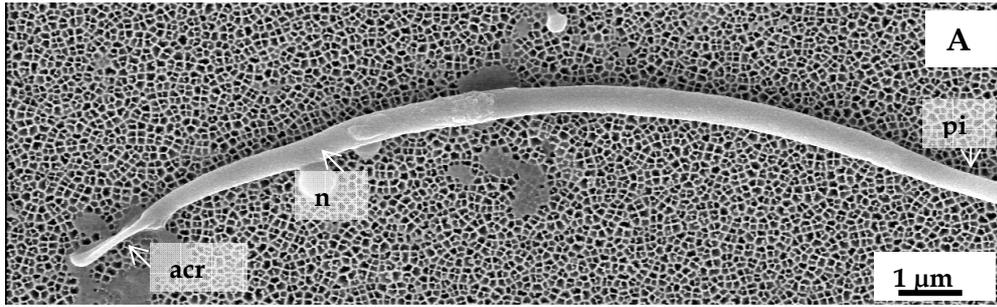


Figure 6.5. Observation en MET de la structure d'un spermatozoïde de *Crepidula fornicata*.

(A) Coupe longitudinale de l'acrosome (acr) et du début du noyau (n), esa = espace sub-acrosomial, pb = plateau basal, va = vésicule acrosomial, (B) Coupe transversale de l'acrosome dans sa partie distale, (C) Coupe transversale au niveau du noyau (n).

(D) Coupes transversales de pièces intermédiaires (pi) et de pièces principales de flagelles (fl), (E) Coupe transversale de la pièce intermédiaire: l'axonème (ax) est typique (structure de microtubule 9 + 2) et des mitochondries (mi) l'entourent.

(F) Coupes longitudinales au niveau de la pièce principale du flagelle, entouré par une gaine de glycogène (gly), (G), (H) Coupes transversales au niveau de la pièce principale du flagelle, l'axonème est entouré par une gaine de glycogène.

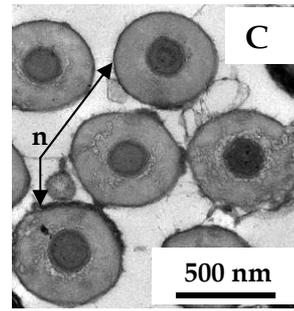
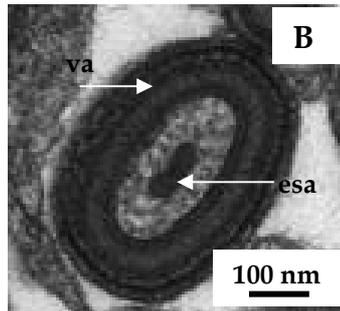
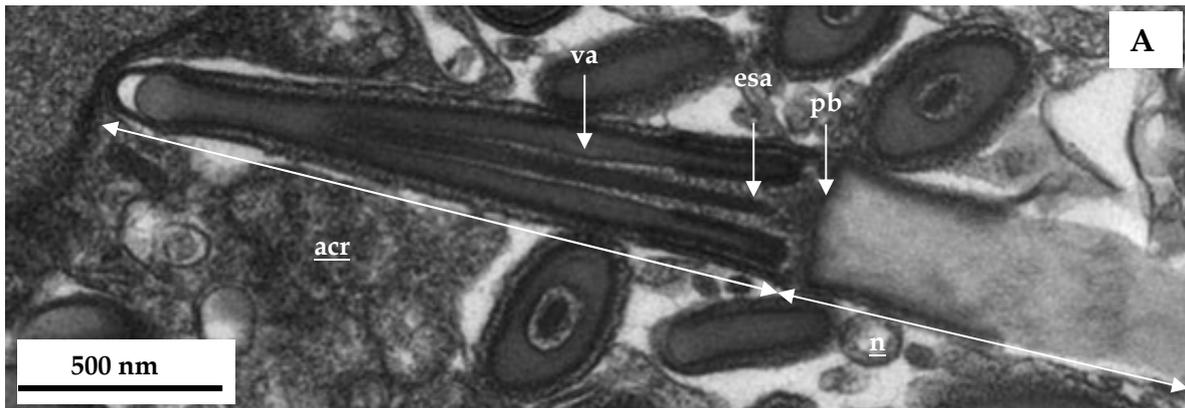
Figure 6.5. TEM observation of *Crepidula fornicata* spermatozoa structure.

(A) Transverse section through the acrosome (acr) and the beginning of the nucleus (n), esa = sub-acrosomal space, pb = basal plate, va = acrosomal vesicle, (B) Cross-section through the acrosome in its distal part, (C) Cross-section through the nucleus (n).

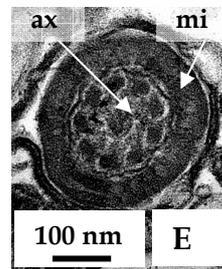
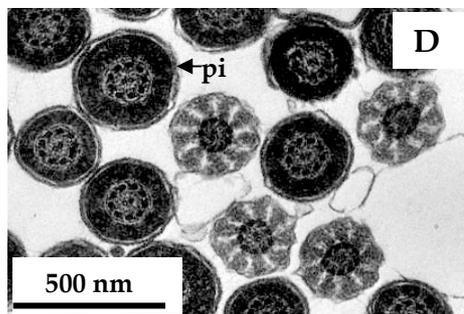
(D) Cross-sections through midpieces (pi) and flagella (fl) glycogene piece (gly), (E) Cross-section through the midpiece, axoneme (ax) present the typical 9 + 2 microtubule structure and is surrounded by mitochondrias (mi).

(F) Tranverse sections through flagella glycogen piece, (G), (H) Cross-section through the flagellum glycogen piece.

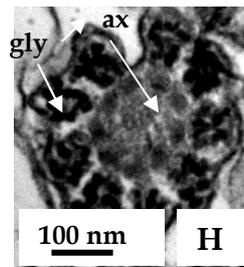
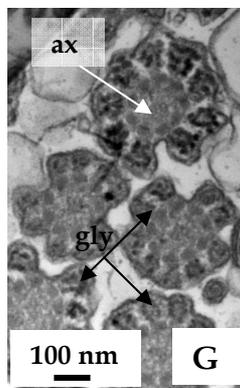
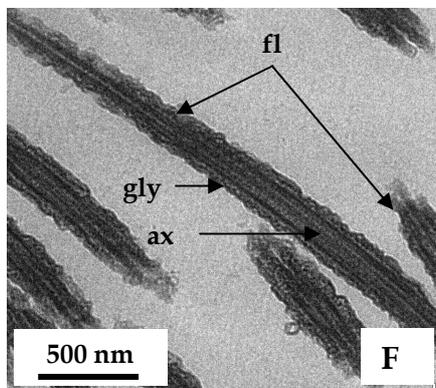
Tête / Head



Pièce intermédiaire



Flagelle



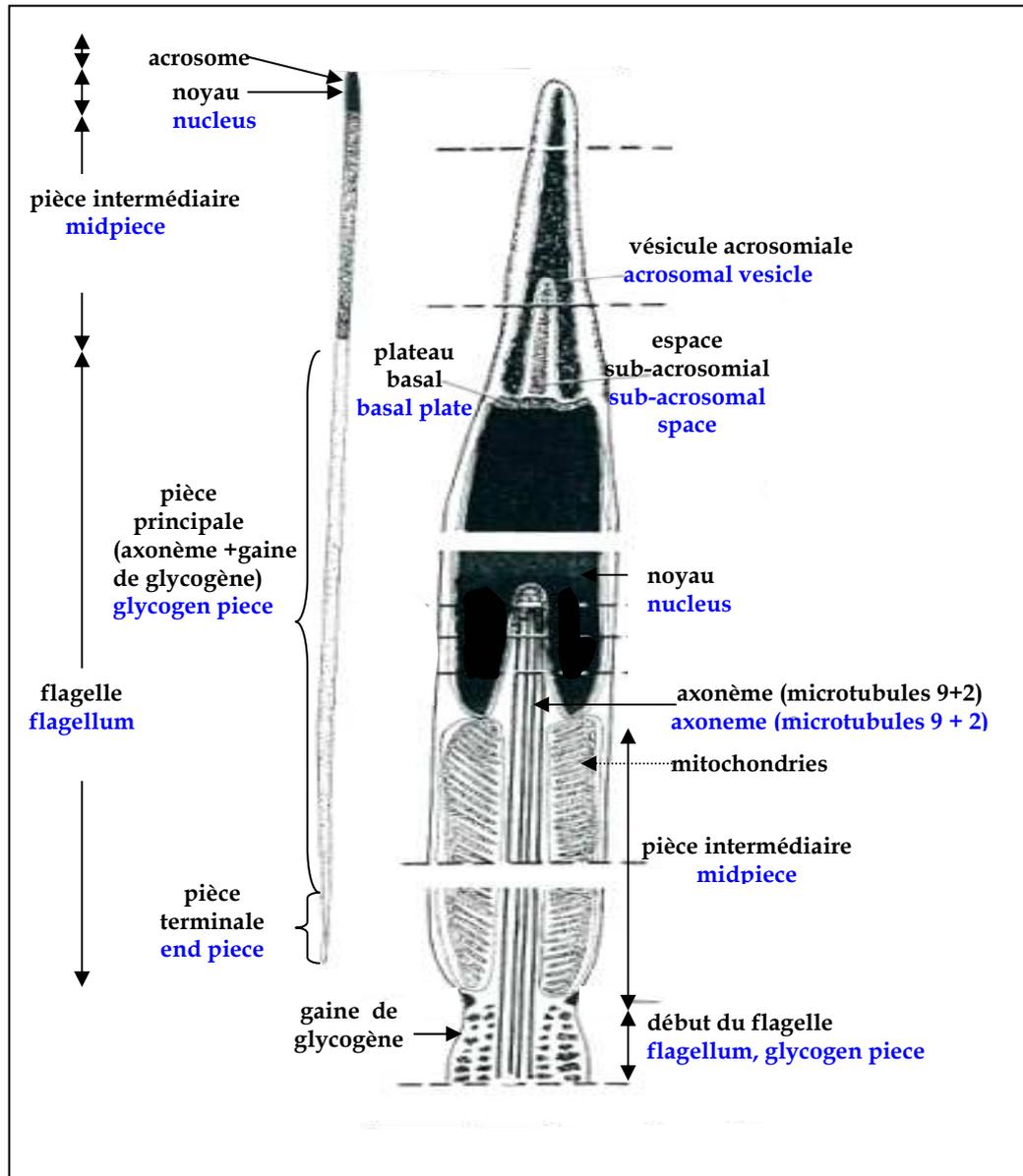


Figure 6.6 Schéma d'un spermatozoïde Caenogastropoda, possédant une structure similaire à celle des spermatozoïdes de *C. fornicata* (modifié d'après Healy 1996).

Figure 6.6 Caenogastropoda spermatozoon scheme, similar structure that *C. fornicata* spermatozoa (modified from Healy 1996).

Grâce a nos observations en MEB et en MET de la structure morphologique du spermatozoïde de *Crepidula fornicata* et en nous aidant du travail de synthèse de Healy (1996), nous avons pu classer la crépidule dans le groupe 2 de l'ordre des Caenogastropoda. Ce groupe est caractérisé par la présence de paraspermatozoïdes dans le tractus génital mâle, comme observé chez la crépidule (résultats provenant d'observations histologiques non publiées). Nous retrouvons donc pour la crépidule la même classification phylogénétique, précédemment déterminée sur des critères morphologiques.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

L'étude du cycle sexuel de *Crepidula fornicata* réalisée dans cette thèse a permis d'améliorer nos connaissances sur **la dynamique de reproduction** de cette espèce invasive ainsi que sur **l'impact du réchauffement climatique** sur son succès reproducteur. Ce travail de thèse nous a éclairé sur **le développement intracapsulaire** des embryons et des larves ainsi que sur la **morphologie ultrastructurale des spermatozoïdes et du réceptacle séminal** (spermathèque). Des données originales ont été obtenues sur **un agent allogène**, encore inconnu, infectant les cellules épithéliales de la glande digestive de *C. fornicata* ; l'impact du réchauffement climatique sur le taux d'infestation de cet organisme chez les crépidules a été analysé. S'agissant d'un aspect plus appliqué, nous avons proposé **une nouvelle stratégie de diminution de la biomasse** de cette "peste". **Ces données sont à la fois pertinentes pour notre site d'étude, la baie de Bourgneuf, mais également pour l'ensemble des côtes Atlantiques européennes.**

La dynamique de reproduction de *C. fornicata* est augmentée par le réchauffement des eaux de la baie de Bourgneuf. Le réchauffement climatique va vraisemblablement continuer pendant des décennies dans les moyennes et fortes latitudes de l'hémisphère Nord (Shneider 2001, Hawkins *et al.* 2003). Nous pourrions donc nous attendre à ce que dans les années à venir l'augmentation des températures de l'eau accroisse significativement le succès reproducteur de *Crepidula fornicata* dans la baie de Bourgneuf mais également le long des côtes Atlantiques européennes. Outre une probable augmentation de la gamétogenèse chez cette espèce invasive, les périodes de pontes risquent de s'allonger augmentant le recrutement de juvéniles et donc de la biomasse de crépidules dans les écosystèmes colonisés. Il serait intéressant d'effectuer des études similaires dans d'autres baies envahies par *C. fornicata* pour avoir un aperçu global des risques futurs et de l'ampleur des effets négatifs de cette espèce invasive sur l'écologie et l'économie.

L'agent allogène retrouvé dans la glande digestif de *Crepidula fornicata* semble avoir un impact relativement faible sur cette espèce invasive. Néanmoins, il reste primordial de l'identifier et d'évaluer son risque de transmission et ses potentiels conséquences physiologiques sur d'autres espèces de la baie, mais également sur l'homme, depuis la récente commercialisation de la crépidule pour l'alimentation humaine. Nous avons observé la présence de cet allogène dans la lumière du tube digestif (observations histologiques personnelles), il est donc fortement probable qu'il soit relargué dans les fèces de *Crepidula fornicata*. Des analyses ADN pourraient donc être effectuées en prélevant les allogènes

retrouvés dans les fèces de *C. fornicata*. Ces analyses ADN couplées à des observations en microscopie électronique à transmission de cet allogène nous permettrait d'identifier cet agent.

Malgré les opérations de dragage effectuées dans les baies envahies par *Crepidula fornicata* (Soulas *et al.* 2000, Fitzgerald 2007), le niveau de colonisation sur ses sites reste conséquent. **Un dragage suivi d'un broyage et d'un relargage dans la colonne d'eau des coquilles broyées de crépidules semblent être une bonne alternative.** Une zone de forte concentration de femelles incubantes a été détectée dans la baie de Bourgneuf (Cognie *et al.* 2007), un essai sur ce site nous permettrait d'évaluer l'efficacité de cette technique innovante. Néanmoins, depuis la réalisation de cette étude, une nouvelle valorisation de la crépidule, économiquement viable, a été mise en place: pour l'alimentation humaine, la crépidule est aujourd'hui renommée "Berlingot de mer" ou encore "Kokiaj". Des travaux de valorisations des composés biochimiques de la crépidule pour la cosmétologie sont également en cours. S'il semble illusoire d'éradiquer totalement *C. fornicata*, notre stratégie couplée à ses nouvelles valorisations pourraient limiter sa biomasse ainsi que l'impact de la crépidule sur les côtes Atlantiques européennes.

Nos travaux en cours nous ont permis d'obtenir de **premiers résultats pertinents sur l'ultrastructure des spermatozoïdes et le fonctionnement du réceptacle séminal.** La survie des spermatozoïdes dans le réceptacle séminal reste assez floue, elle pourrait être permise par l'ingestion par pinocytose des éléments nutritifs contenus dans le cytoplasme des cellules de l'épithélium. Néanmoins des expériences supplémentaires sont nécessaires pour affirmer ou infirmer cette hypothèse. La présence de paraspermatozoïdes dans le testicule et dans la vésicule séminale, puis leur absence dans le réceptacle séminale de la femelle (résultats provenant d'observations histologiques non publiées) reste encore un mystère. Quelle peut bien être la/les fonction(s) de ces paraspermatozoïdes longilignes? Les paraspermatozoïdes des Prosobranches, lors de leur dégénération, pourraient avoir un rôle dans la nutrition et/ou dans la stimulation des vrais spermatozoïdes (Healy 1986). Il serait intéressant d'effectuer des coupes histologiques au niveau de la gouttière ciliée et du pénis du mâle, et dans le vagin et l'utérus de la femelle. Une telle étude nous permettrait de savoir dans quelle structure anatomique les paraspermatozoïdes sont dégradés. Des études additionnelles biochimiques de ces paraspermatozoïdes pourraient nous renseigner sur l'éventuelle présence de substances nutritives, qui seraient alors ingérées par les spermatozoïdes avant leur stockage dans le réceptacle séminal.

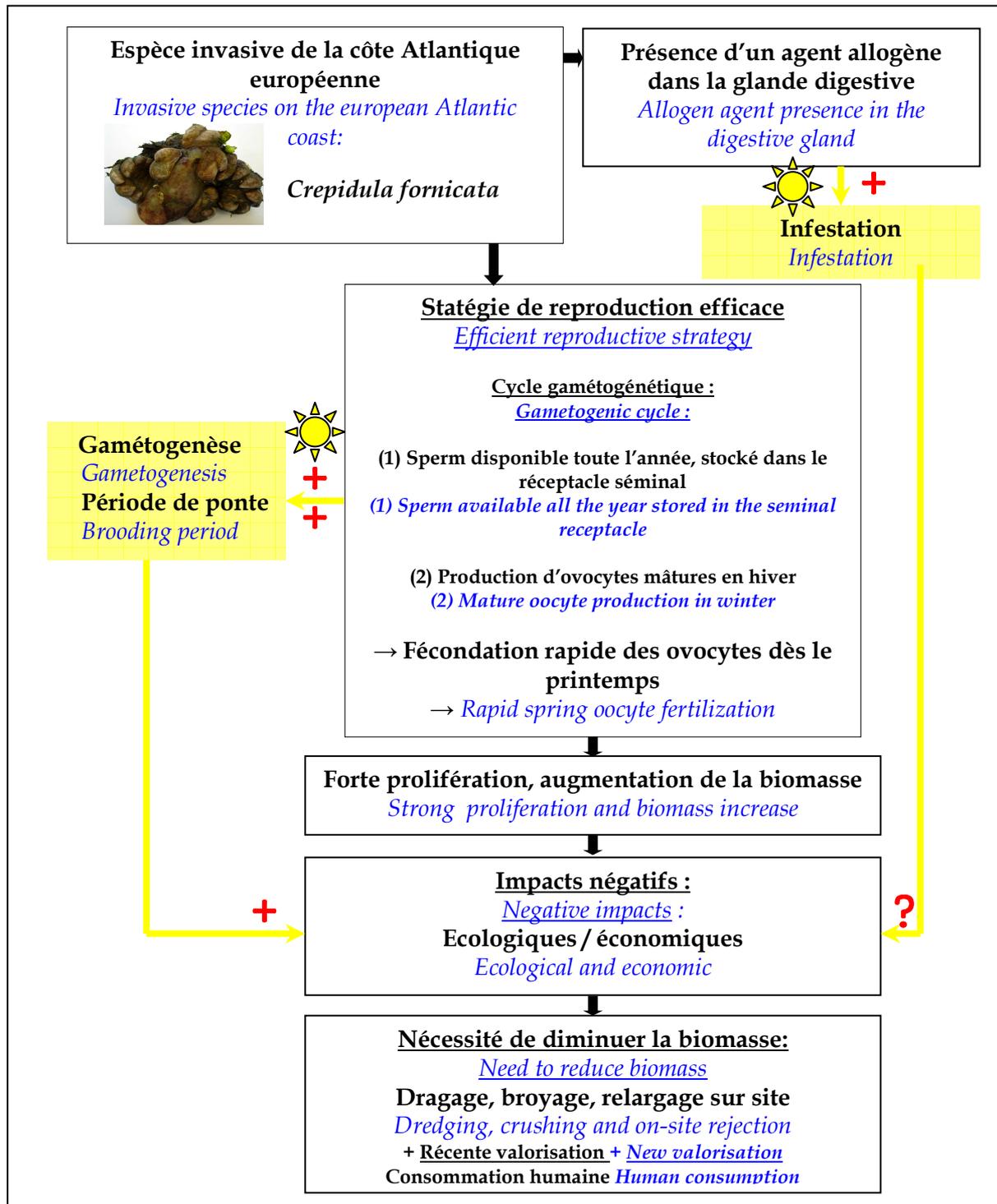


Figure c 1. Rôle de la reproduction dans le succès invasif de *Crepidula fornicata* et impact du réchauffement climatique. + = augmentation, ☀ = réchauffement climatique, ? = effet encore inconnu.

Figure c 1. Reproduction function in *Crepidula fornicata* invasive success and global warming impact. + = increasing, ☀ = global warming, ? = impact still unknown.

Ce travail de thèse nous a permis de mettre en évidence les conséquences du réchauffement climatique sur la dynamique de reproduction et sur le taux d'infestation de l'agent allogène de *Crepidula fornicata*. Les impacts de cette espèce invasive sur les écosystèmes colonisés risquent d'augmenter de façon significative. Une limitation de la biomasse de la crépidule par sa destruction ou par sa valorisation semble donc indispensable, comme l'illustre la Figure c 1.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LITERATURE CITED

- A-

- Anderson R.M. (1978) The regulation of host population growth by parasitic species. *Parasitology* 76: 119-157.
- Arbach Leloup F., Desroy N., Le Mao P., Pauly D. & Le Pape O. (2008) Interactions between a natural food web, shellfish farming and exotic species: The case of the Bay of Mont Saint Michel (France). *Est. Coast. Shelf. Sci.* 76: 111-120.
- Adiyodi K.G. (1988) Annelida. In: Adiyodi K.G. & Adiyodi R.G. (Eds) Reproductive biology of invertebrates, III, Accessory sex glands. Wiley, Chinchester, U.K.
- Adiyodi K.G. & Adiyodi R.G. (1989) Series preface. In: Adiyodi, K.G. & Adiyodi, K.G. (Eds) Reproductive Biology of Invertebrates. John Wiley and Sons.

- B-

- Barber B.J. (1984) Reproductive energy metabolism in the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (Say). PhD thesis, University of South Florida, Tampa.
- Barber B.J. & Blake N.J. (2006) Reproductive Physiology. In: Shumway S.E. & Parsons G.J. (Eds) Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture Second Edition Developments in Aquaculture and Fisheries Science. New York Elsevier.
- Barillé L. & Barillé A-L. (2003) Estimation du stock de crépidules dans la zone intertidale de la baie de Bourgneuf. Rapport de l'Université de Nantes pour la section régionale conchylicole des Pays de la Loire: 54 pp.
- Barillé L., Cognie B., Beninger P.G., Decottignies P. & Rincé Y. (2006) Feeding responses of the gastropod *Crepidula fornicata* to changes in seston concentration. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 322: 169-178.
- Barillé-Boyer A-L., Haure J. & Baud J-P. (1997) L'ostréiculture en baie de Bourgneuf. Relation entre le croissance des huîtres *Crassostrea gigas* et le milieu naturel : Synthèse de 1986 à 1995. Rapport Scientifique et Technique de la Direction des Ressources Vivantes de l'Ifremer, Station Bouin: 173pp.
- Barnathan G., Beninger P.G., Biard J-F., Buzin F., Dagorn F., Decottignies P. & Wielgosz-Collin G. (2010) Recherche de produits de valorisation permettant de couvrir les coûts de réduction de la biomasse de la crépidule (*Crepidula fornicata*) en baie de Bourgneuf. Restitution d'une première partie des travaux au comité scientifique et technique du SMIDAP: 21 pp.
- Baur B. (1994) Multiple paternity and individual variation in sperm precedence in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 35: 413-421.

- Baur B. (1998). Sperm competition in molluscs. In: Birkhead R. & Møller (Eds) Sperm competition and sexual selection. Academic Press, San Diego, CA: 255-305.
- Bax N., Hayes K., Marshall A., Parry D. & Thresher (2002) Man-made as sheltered islands for alien marine organisms: Establishment and eradication of an alien invasive marine species. In: Veitch C.R. & Clout (Eds) Turning the tide: The eradication of island invasives. IUCN SSC Invasive Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland & Cambridge, UK: 26-39.
- Bax N., Williamson A., Agüero M., Gonzalez E. & Geeves W. (2003) Marine invasive alien species: a threat to global biodiversity. *Mar. Policy* 27: 313-323.
- Beeman R.D. (1977) Gastropoda: Opisthobranchia. In: Giese A.C. & Pearse J.S. (Eds.) *Reproduction of Marine Invertebrates*, Vol. IV. Academic Press, New York: pp. 115-179.
- Beninger P.G., St-Jean S., Poussart Y. & Ward J.E. (1993) Gill function and mucocyte distribution in *Placopecten magellanicus* and *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia): the role of mucus in particle transport. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 98: 275-282.
- Beninger P.G. & Barillé L. (2000) Analyse de la compétition potentielle huîtres/crépidules en baie de Bourgneuf: caractéristiques de base de la filtration et de la reproduction Rapport d'activité SMIDAP: 42 pp.
- Beninger P.G., Cannuel R., Blin J.-L., Pien S. & Richard O. (2001) Reproductive characteristics of the archaeogastropod *Megathura crenulata*. *J. Shellfish Res.* 20: 301-307.
- Beninger P.G., Decottignies P., Guiheneuf F., Barillé L. & Rincé Y. (2007) Comparison of particle processing by two introduced suspension feeders: selection in *Crepidula fornicata* and *Crassostrea gigas*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 334: 165-177.
- Beninger P.G., Valdizan A., Decottignies P. & Cognie B. (2010a) Field reproductive dynamics of the invasive slipper limpet, *Crepidula fornicata*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 390: 179-187.
- Beninger P.G., Valdizan A., Decottignies P. & Cognie B. (2010b) Corrigendum to "Field reproductive dynamics of the invasive slipper limpet, *Crepidula fornicata*". *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 390: 179-187.
- Beukema J.J., Honkoop P.J.C. & Dekker R. (1998) Recruitment in *Macoma balthica* after mild and cold winters and its possible control by egg production and shrimp predation. *Hydrobiol.* 375/376: 23-34.
- Blanchard M. (1995) Origine et état de la population de *Crepidula fornicata* (Gastropoda Prosobranchia) sur le littoral français. *Haliotis* 24: 75-86.
- Blanchard M. (1997) Spread of the slipper limpet *Crepidula fornicata* (L. 1758) in Europe: current state and consequences. *Sci. Mar.* 61: 109-118.
- Blanchard M. & Thomas G. (1998) Suivi des opérations de nettoyage des bancs de crépidules (*Crepidula fornicata*) sur le littoral de Fouras (Charente-Maritime), en mai 1995. Rapport Ifremer/DEL 98/06: 12p.

- Blanchard M. & Ehrhold A. (1999) Cartographie et évaluation du stock de crépidules (*Crepidula fornicata* L.) en baie du Mont Saint-Michel. *Haliotis* 28: 11-20.
- Blanchard M. (2001) Récolte, traitement et valorisation de la crépidule. Rapport Ifremer/DEL: 4pp.
- Blanchard M., Blanchet A., Gaffet J.D. & Hamon D (2001) Dynamique de population de la crépidule (*Crepidula fornicata*) en baie de Saint-Brieuc (Manche-Ouest). Rapport scientifique RST/DEL/00.08/Ifremer, Brest, France: 60 pp.
- Blanchard M. & Hamon D. (2006) Bilan du suivi de l'exploitation industrielle de la crépidule en Bretagne Nord (Baies de Saint-Brieuc et du Mont Saint Michel). Rapport de fin de contrat Ifremer/Areval, R Int Dyneco/EB/06-01: 42 pp.
- Blanchard M., Pechenik J.A., Giudicelli E., Connan J.-P & Robert R. (2008) Competition for food in the larvae of two marine molluscs, *Crepidula fornicata* and *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 21: 197-205.
- Blanchard M. (2009) Recent expansion of the slipper limpet population (*Crepidula fornicata*) in the Bay of Mont-Saint-Michel (Western Channel, France). *Aquat. Living. Resour.* 22:11-19.
- Boisseau C. & July J. (1975) Transport and survival of spermatozoa in female amphibia. In: Hafez E.S.E & Thibault C.G. (Eds) *The biology of spermatozoa*. Karger, Basel, Switzerland.
- Briarty L.G. (1975) Stereology: methods for quantitative light and electron microscopy. *Sci. Prog.* 62: 1-32.
- Bonnet M. (2006) Etude préalable à la mise en oeuvre d'une gestion collective des déchets conchylicoles. Comité scientifique et technique du SMIDAP, (Syndicat Mixte pour le Développement de l'Aquaculture et de la Pêche dans les Pays de la Loire), restitution des travaux 2005: 3p.
- BRITEXA SARL (2010) Le Berlingot de mer: naturellement bon!
<http://www.berlingot-de-mer.fr/index.html>

- C -

- Cannuel R. & Beninger P.G. (2006) Gill development, functional and evolutionary implications in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae). *Mar. Biol.* 149(3): 547-563.
- Carlton J.T. (1985) Transoceanic and interoceanic dispersal of coastal marine organisms: the biology of ballast water. *Oceanogr. Mar. Biol.* 23: 313-371.
- Carlton J.T. (1989) Man's role in changing the face of the ocean: biological invasions and implications for conservation of near-shore environments. *Conserv. Biol.* 3: 265-273.

- Carlton J. (1992) Introduced marine and estuarine mollusks of North America: an end-of-the-20th-century perspective. *J. Shellfish Res.* 11: 489-505.
- Carlton J.T. & Geller J.B. (1993) Ecological roulette: The global transport of nonindigenous marine organisms. *Science* 261: 78-82
- Carlton J.T. (1996) Pattern, process, and prediction in marine invasion ecology. *Biol. Conserv.* 78: 97-106.
- Carlton J.T. (2000) Global change and biological invasions in the oceans In: Mooney H.L. & Hobbs R. (Eds) *Invasive species in a changing world*. Island Press, Covelo, California.
- Chaparro O.R. & Paschke K.A. (1990) Nurse egg feeding and energy balance in embryos of *Crepidula dilatata* (Gastropoda: Calyptraeidae) during intracapsular development. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 65: 183-191.
- Chaparro O.R., Soto A.E. & Bertran C.E. (2002a) Velar characteristics and feeding capacity of encapsulated and pelagic larvae of *Crepidula fecunda* Gallardo, 1979 (Gastropoda, Calyptraeidae). *J. Shellfish Res.* 21: 233-237.
- Chaparro O.R., Thompson R.J. & Pereda S.V. (2002b) Feeding mechanisms in the gastropod *Crepidula fecunda*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 234: 171-181.
- Chaparro O.R., Saldivia C.L., Pereda S.V., Segura C.J., Montiel Y.A. & Collin R. (2005) The reproductive cycle and development of *Crepidatella fecunda* (Gastropoda: Calyptraeidae) from Southern Chile. *J. Mar. Biol. Ass. UK* 85: 157-161.
- Chauvaud L. (1998) La coquille Saint-Jacques en rade de Brest: un modèle biologique d'étude des réponses de la faune benthique aux fluctuations de l'environnement. Thèse de doctorat de l'université de Bretagne Occidentale (Brest), France.
- Chipperfield P.N.J. (1951) The breeding of *Crepidula fornicata* (L.) in the river Blackwater, Essex. *J. Mar. Biol. Ass. UK.* 30: 49-71.
- Clout M.N. & Veitch C.R. (2002) Book preface: Turning the tide of biological invasion: the potential for eradicating invasive species. In: Veitch C.R. & Clout (Eds) *Turning the tide: The eradication of island invasives*. IUCN SSC Invasive Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland & Cambridge, UK: 1-3.
- Coe W.R. (1935) Sexual phases in prosobranch molluscs of the genus *Crepidula*. *Science* 81: 570-571.
- Coe W.R. (1936) Sexual phases in *Crepidula*. *J. Exp. Zool.* 72: 455-477.
- Coe W.R. (1938a) Conditions influencing change of sex in mollusks of the genus *Crepidula*. *J. Exp. Zool.* 77: 401-424.
- Coe W.R. (1938b) Influence of association on the sexual phases of gastropods having protandric consecutive sexuality. *Biol. Bull.* 75: 274-285.

- Coe W.R. (1942) Influence of natural and experimental conditions in determining shape of shell and rate of growth in gastropods of the genus *Crepidula*. J. Morphol. 71: 35-51.
- Coe W.R. (1948) Nutrition and sexuality in protandric gastropods of the genus *Crepidula*. Biol. Bull. 94: 158-160.
- Coe W.R. (1953) Influences of association, isolation, and nutrition on the sexuality of snails of the genus *Crepidula*. J. Exp. Zool. 122: 5-19.
- Cognie B., Haure J. & Barillé L. (2006) Spatial distribution in a temperate coastal ecosystem of the wild stock of the farmed oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture 259: 249-259.
- Cognie B., Decottignies-Cognie P., Rosa P. & Gaudin P. (2008) Dynamique de la population de *Crepidula fornicata* de la baie de Bourgneuf, Comité scientifique et technique du SMIDAP, restitution des travaux 2007.
- Cohen A.N. & Carlton J.T. (1998) Accelerating invasion rate in a highly invaded estuary. Science 279: 555-558.
- Cole H.A. (1952) The american slipper limpet (*Crepidula fornicata* L.) on cornish oyster beds. Fish. Investigations 17: 1-13.
- Colgan D.J., Ponder W.F., Beacham E. & Macaranas J (2007) Molecular phylogenetics of Caenogastropoda (Gastropoda: Mollusca). Mol. Phylogenet. Evol. 42: 717-737.
- Collin R. (1995) Sex, size, and position: A test of models predicting size at sex change in the protandrous gastropod *Crepidula fornicata*. Am. Nat. 146: 815-831.
- Collin R. (2000) Phylogeny of the *Crepidula plana* (Gastropoda: Calyptraeidae) cryptic species complex in North America. Can. J. Zool. 78: 1500-1514.
- Collin R. (2003) Worldwide patterns in mode of development in Calyptraeid gastropods. Mar. Ecol. Prog. Ser. 247: 103-122.
- Conklin E.G. (1897) The embryology of *Crepidula*. J. Morph. 13: 1-230.
- Conklin E.G. (1902) Karyokinesis and cytokinesis in the maturation, fertilization and cleavage of *Crepidula* and other Gasteropoda. I. Karyokinesis. II. Cytokinesis. Acad. Nat. Sci. 12: 1-121.
- Corlay J.-P. & Robert J.-M. (1986) Les cultures marines en baie de Bourgneuf. Cah. Nantais 27: 103-169.
- Costanza R., d'Arge R., de Groot R., Farber S., Grasso M., Hannon B., Limburg K., Naeem S., O'Neill R.V., Paruelo J., Raskin R.G., Sutton P. & van den Belt M. (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. Nature 387: 253-260.
- Coum A. (1979) La population de crepidules (*Crepidula fornicata*) en rade de Brest, écologie et dynamique. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, France.

CREOCEAN (2006) Projet d'extraction et de transformation de la crépidule en rade de Brest. Brest Métropole Océane, Contrat de baie - rade de Brest : 37pp.

- D -

- Davey K.G. (1958) The migration of spermatozoa in the female of *Rhodnius prolixus*. Stal. J. Exp. Biol. 30: 694-701.
- Davis M.A. & Thompson K. (2000) Eight ways to be a colonizer; two ways to be an invader: a proposed nomenclature scheme for invasion ecology. Bull. Ecol. Soc. Am. 81: 226-230.
- Davis M.A. (2003) Biotic globalization: Does competition from introduced species threaten biodiversity? BioScience 53: 481-489.
- de Montaudouin X. & Sauriau P.G. (1999) The proliferating Gastropoda *Crepidula fornicata* may stimulate macrozoobenthic diversity. J. Mar. Biol. Assoc. UK. 79: 1069-1077.
- Decottignies P. (2006) Mécanismes d'alimentation et régimes trophiques de deux mollusques suspensivores invasifs en baie de Bourgneuf, *Crassostrea gigas* et *Crepidula fornicata* : comparaison et implications. Thèse de Doctorat, Université de Nantes, France.
- Decottignies P., Beninger P.G., Rincé Y. & Riera P. (2007a) Trophic interactions between two introduced suspension-feeders, *Crepidula fornicata* and *Crassostrea gigas*, are influenced by seasonal effects and qualitative selection capacity. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 342: 231-241.
- Decottignies P., Beninger P.G., Rincé Y., Robins R.J. & Riera P. (2007b) Exploitation of natural food sources by two sympatric, invasive suspension-feeders: *Crassostrea gigas* and *Crepidula fornicata*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 334: 179-192.
- Dégremont L., Ernande B., Bédier E. & Boudry P. (2007) Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. Aquaculture 262: 41-53.
- den Boer S. P. A., Baer B. & Boomsma J.J. (2010) Seminal fluid mediates ejaculate competition in social insects. Science 327: 1506 - 1509.
- Deslous-Paoli J.M. & Héral M. (1986) *Crepidula fornicata* L. (gastéropode, Calyptraeidae) dans le bassin de Marennes-oléron: composition et valeur énergétique des individus et des pontes. Oceanol. Acta 9: 305-311.
- Desaunay Y., Perddou J-B. & Beillois P. (1981) Etude des nurseries de poissons du littoral de la Loire-Atlantique. Sci. Pêche 319: 1-23.
- Diederich S., Nehls G., van Beusekom J.E.E. & Reise K. (2005) Introduced Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the northern Wadden Sea: invasion accelerated by warm summers? Helgoland Mar. Res. 59: 97-106.
- Duarte C.M. (2000) Marine biodiversity and ecosystem services: an elusive link. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 250: 117-131.

Dukes J.S. & Mooney H.A. (1999) Does global change increase the success of biological invaders? *Trends Ecol. Evol.* 14: 135-139.

Dupont L., Richard J., Paulet Y.M., Thouzeau G. & Viard F. (2006) Gregariousness and protandry promote reproductive insurance in the invasive gastropod *Crepidula fornicata*: evidence from assignment of larval paternity. *Mol. Ecol.* 15: 3009-3021.

Dutertre M., Beninger P.G., Barillé L., Papin M., Rosa P. Barillé A-L. & Haure J. (2009) Temperature and seston quantity and quality effects on field reproduction of farmed oysters, *Crassostrea gigas*, in Bourgneuf Bay, France. *Aquat. Living Resour.* 22: 319-329.

Dutertre M., Beninger P.G., Barillé L., Papin M., & Haure J. (2010) Rising water temperatures, reproduction and recruitment of an invasive oyster, *Crassostrea gigas*, on the French Atlantic coast. *Mar. Environ. Res.* 69: 1-9.

- E -

EEA (2006) The changing faces of Europe's coastal areas. European Environment Agency, Report 6: 112 pp.

Ehrenfeld D.W. (2003) Globalisation: effects on biodiversity, environment and society. *Conser. & Society* 1: 99-111.

Ehrhold A., Blanchard M., Auffret J.-P. & Garlan T. (1998) Conséquences de la prolifération de la crépidule (*Crepidula fornicata*) sur l'évolution sédimentaire de la baie du Mont-Saint-Michel (Manche, France). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science* 327: 583-588.

Elnor R.W. & Beninger P.G. (1995) Multiple reproductive strategies in snow crab, *Chionoecetes opilio*: Physiological pathways and behavioral plasticity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 193: 93-112.

Estrella Klinzing M.S. & Pechenik J.A. (2000) Evaluating whether velar lobe size indicates food limitation among larvae of the marine gastropod *Crepidula fornicata*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 252: 255-279.

- F -

Ferguson R. (2000) The effectiveness of Australia's response to the black striped mussel incursion in Darwin, Australia. A report of the Marine Pest Incursion Management Workshop. Department of environment and Heritage, Commonwealth of Australia, Canberra, Australia, Research report 13.

Fishing Forum for Fishing (2007) Slipper Limpet tutorial - Part 1 - Harvesting, <http://www.fishing-forum.info/sea-fishing-tips-forum/9566-slipper-limpet-tutorial-part-1-harvesting.html>

Fitzgerald A. (2007) Slipper limpet utilisation and management, final report. Port of Truro Oyster Management Group: 101pp.

Fleury P.G., Simmonne C., Claude S., Palvadeau H., Guilpain P., D'Amico F., Le Gall P., Vercelli C. & Pien S. (2003) Réseau Mollusques des Rendements Aquacoles (REMORA - huître creuse) - résultats des stations nationales 2002, Rapport IFREMER: 49 pp.

Franc A. (1968) Sous-Classe des Prosobranches. In: Grassé P.P. (Ed.) Traité de zoologie. Anatomie, systématique, biologie. Tome V, Fasc. III Mollusques, gastéropodes et scaphopodes. Masson, Paris: 40-324.

Fretter V. & Graham A. (1962) The reproductive system. Ray Society, London.

- G -

Gabe M. (1968) Techniques histologiques. Masson, Paris.

Gaffney P.M. & McGee B. (1992) Multiple paternity in *Crepidula fornicata* (Linnaeus). The Veliger 35: 12-15.

Gallardo C.S. (1977) Two modes of development in the morphospecies *Crepidula dilatata* (Gastropoda : Calyptraeidae) from Southern Chile. Mar. Biol. 39: 241-251.

Gallardo C.S. (1979) Especies gemelas del genero *Crepidula* (Gastropoda, Calyptraeidae) en la costa de Chile; una redescrpcion de *C.dilatata* Lamarck y descripcion de *C.fecunda* n. sp. Stud. Neotrop. Fauna E. 14: 215-226.

Gallardo C.S. (1996) Reproduction in *Crepidula philippiana* (Gastropoda, Calyptraeidae) from Southern Chile. Stud. Neotrop. Fauna E. 31: 117-122.

Gould H.N. (1917a) Studies on sex in the hermaphrodite mollusc *Crepidula plana*. I. History of the sexual cycle. J. Exp. Zool. 23: 1-69.

Gould H.N. (1917b) Studies on sex in the hermaphrodite mollusk *Crepidula plana*. II. Influence of the environment on sex. J. Exp. Zool. 23: 225-250.

Gould H.N. (1952) Studies on sex in the hermaphrodite mollusk *Crepidula plana*. IV. Internal and external factors influencing growth and sex development. J. Exp. Zool. 119: 93-163.

Gouletquer P., Bachelet G., Sauriau P.-G. & Noel P. (2002) Open Atlantic coast of Europe - a century of introduced species into French waters. In: Leppäkoski E. *et al.* (Eds.) Invasive Aquatic Species of Europe. Kluwer Academic Publishers, Netherlands: pp. 276-290.

Grall J. & Hall-Spencer J.M. (2003) Problems facing maerl conservation in Brittany. Aquat. Conserv. 13: 55-64.

Grizel H. & Héral M. (1991) Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). ICES J. Mar. Sci. 47: 399-403.

Gruet Y., Héral M. & Robert J-M. (1976) Premières observations sur l'introduction de la faune associée au naissain d'huîtres japonaises *Crassostrea gigas* (Thunberg), importé sur la côte atlantique française. Cah. Biol. Mar. 17: 173-184.

Gruet Y. & Baudet J. (1997) Les introductions d'espèces d'invertébrés marins. In: Dauvin J.C. (Ed) Les biocénoses marines et littorales françaises des côtes Atlantique, Manche et Mer du Nord: synthèse menaces et perspectives. Laboratoire de Biologie des Invertébrés Marins et Malacologie -Service du Patrimoine Naturel / IEGB/ MNHN, Paris: 242-250.

- H -

Hadfield M.G. & Switzer-Dunlap M. (1984) Opisthobranchs. In: Tompa A.S., Verdonk N.H. & Van Den Biggelaar J.A.M. (Eds) The Mollusca, Vol. 7. Reproduction. Orlando, Academic Press : 209-350.

Hamon D. & Blanchard M. (1994) Etat de la prolifération de la crépidule (*Crepidula fornicata*) en baie de Saint-Brieuc. Rapport Ifremer-DEL 94 14.

Harley C.D.G., Hughes A.R., Hultgren K.M., Miner B.G., Sorte C.J.B., Thornber C.S., Rodriguez L.F., Tomanek L. & Williams S.L. (2006) The impacts of climate change in coastal marine systems. Ecol. Lett. 9: 228-241.

Hastings A., Cuddington K., Davies K.F., Dugaw C.J., Elmendorf S., Freestone A., Harrison S., Holland M., Lambrinos J., Malvadkar U., Melbourne B.A., Moore K., Taylor C. & Thomson D. (2005) The spatial spread of invasions: new developments in theory and evidence. Ecol. Lett. 8: 91-101.

Haure J. & Baud J.P. (1995) Approche de la capacité trophique dans un bassin ostréicole (baie de Bourgneuf). Rapport Interne Ifremer/DVR 95/16/RA-Bouin.

Hawkins S.J., Southward A.J. & Genner M.J. (2003) Detection of environmental change in a marine ecosystem - evidence from the Western English Channel. Sci. Total Environ. 310: 245-256.

Heal G.M. (2002) Biodiversity and Globalization. Columbia University Business School. New York.

Healy J.M. (1983) Ultrastructure of Euspermatozoa of cerithiacean gastropods (Prosobranchia: Mesogastropoda). J. Morph. 178: 57-75.

Healy J.M. (1986) Euspermatozoa and paraspermatozoa of the relict cerithiacean gastropod, *Campanile symbolicum* (Prosobranchia, Mesogastropoda). Helgol. Mar. Res. 40: 201-218.

Healy J.M. (1987) Spermatozoan ultrastructure and its bearing on gastropod classification and evolution. Aust. Zool. 24: 108-114.

- Healy J.M. (1988) Sperm morphology in *Serpulorbis* and *Dendropoma* and its relevance to the systematic position of the Vermetidae (Gastropoda). *J. Mollus. Stud.* 54: 295-308.
- Healy J.M. (1993) Transfer of the gastropod family Plesiotrochidae to the Campaniloidea based on sperm ultrastructure evidence. *J. Mollus. Stud.* 59: 135-146.
- Healy J.M. (1996) Molluscan sperm ultrastructure: correlation with taxonomic units within the Gastropoda, Cephalopoda and Bivalvia. In: Taylor J. (Ed) Origin and evolutionary radiation of the Mollusca. Oxford University Press, The Malacological Society of London: 99-113.
- Heiler K.C.M., Von Oheimb P.K., Ekschmitt K. & Albrecht C. (2008) Studies on the temperature dependence of activity and on the diurnal activity rhythm of the invasive *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Mollusca* 26: 73-81.
- Heller J. (1993) Hermaphroditism in molluscs. *Biol. Linn. J. Soc.* 48: 19-42.
- Hellmann J.J., Byers J.E., Bierwagen B.G. & Dukes J.S. (2008) Five potential consequences of climate change for invasive species. *Conser. Biol.* 22: 534-543.
- Henry J.Q, Perry K.J, Martindale M.Q (2006) Cell specification and the role of the polar lobe in the gastropod mollusc *Crepidula fornicata*. *Dev. Biol.* 297:295-307.
- Héral M. (1986) L'ostréiculture française traditionnelle. In: Barnabé, G. (Ed) Aquaculture, Vol. 1. Lavoisier, Paris: pp. 346-397.
- Héral M., Prou J., Sauriau P-G. & Gouletquer P. (1995) Gestion des bassins conchylicoles. Séminaire franco-canadien sur les maladies et problèmes environnementaux liés à l'aquaculture des mollusques.
- His E. & Robert R. (1985) Développement des véligères de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. Etudes sur les mortalités larvaires. *Rev. Trav. Inst. P. Mar.* 47: 63-88.
- His E. & Seaman M.N.L. (1992) Effects of temporary starvation on the survival, and on subsequent feeding and growth, of oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Mar. Biol.* 114: 277-279.
- Hoagland K.E. (1975) Reproductive strategies and evolution in the genus *Crepidula* (Gastropoda: Calyptraeidae). Harvard University.
- Hoagland K.E. (1977) Systematic review of fossil and recent *Crepidula* and discussion of evolution of the Calyptraeidae. *Malacologia* 16: 353-420.
- Hoagland K.E. (1978) Protandry and the evolution of environmentally-mediated sex change : a study of the Mollusca. *Malacologia* 17: 365-391.
- Hoagland K.E. (1979) The behavior of three sympatric species of *Crepidula* (Gastropoda : Prosobranchia) from the Atlantic, with implications for evolutionary ecology. *The Nautilus* 94: 143-149.

Hoagland K.E. (1986) Patterns of encapsulation and brooding in the Calyptraeidae (Prosobranchia : Mesogasteropoda). Am. Malac. Bull. 4: 173-183.

Hollebone A.L. & Hay M.E. (2007) Propagule pressure of an invasive crab overwhelms native biotic resistance. Mar. Ecol. Prog. Ser. 342:191-196.

Holt T.J., Rees E.I., Hawkins S.J. & Seed R. (1998) Biogenic reefs: an overview of dynamic and sensitivity characteristics for conservation management of marine SACs. Marine SACs Project, Scottish Association for Marine Science, Oban:79 pp.

Hudson P.J., Dobson A.P. & Newborn D. (1998) Prevention of population cycles by parasite removal. Science 282: 2256-2258.

Hulme P.E. (2005) Adapting to climate change: is there scope for ecological management in the face of a global threat? J. Appl. Ecol. 42: 784-794.

- I -

IFREMER (2008) Dynamique et santé des écosystèmes côtiers estuariens: Projet AREVAL.
<http://www.ifremer.fr/delec/projets/habitats/crepidule/areval.htm>

- K -

Kadow P.E. (1954) An analysis of sexual behavior and reproductive physiology in the guppy, *Lebistes reticulatus* (Peters). Thesis, New York University, New York.

- L -

Lafferty K.D. & Kuris A.M. (1996) Biological control of marine pests. Ecology 77: 1989-2000.

Le Cam S. (2009) Grégarité, changement de sexe et polyandrie : modalités de la reproduction chez une espèce invasive *Crepidula fornicata*. Thèse de doctorat de l'université de Pierre et Marie Curie (France).

Le Gall P. (1978) Sex ratio et déterminisme sexuel chez *Crepidula fornicata* (Phil). Haliotis 9 :31-34.

Le Gall P. (1980) Etude expérimentale de l'association en chaîne et de son influence sur la croissance et la sexualité chez la crépidule *Crepidula fornicata* (Mollusque mésogastéropode). Thèse de Doctorat, Université de Caen, France.

Le Pape O., Guérault D. & Désaunay Y. (2004) Effect of an invasive mollusc, American slipper limpet *Crepidula fornicata*, on habitat suitability for juvenile common sole *Solea solea* in the Bay of Biscay. Mar. Ecol. Prog. Ser. 277: 107-115.

Lee R.E. (2008) Chapter 8, Apicomplexa. In: Phycology, Fourth edition Cambridge University Press, England: 310-313.

- Levinton J.S. (1995) Marine Biology - Function, biodiversity, ecology. Oxford University Press, New York: 420 pp.
- Lind H. (1973) The functional significance of the spermatophore and the fate of spermatozoa in the genital tract of *Helix pomatia*. J. Zool. 169: 279-301.
- Lodge D.M. (1993) Biological invasions: Lessons for ecology. Tree 8: 133-137
- Lubet P. & Streiff W. (1969) An experimental study of the effect of nerve ganglia on morphogenesis of the penis and the genital duct of *Crepidula fornicata* Phil. (Gastropod Mollusk). In: Wolff E. & Lender T. (Eds) Invertebrate Organ Cultures. Gordon & Breach, New York: 135-152.
- Lubet P. & Le Gall P. (1972) Recherches préliminaires sur la structure des populations de *Crepidula fornicata* Philb., mollusques mésogastéropodes. Bull. Soc. Zool. Fr. 97: 211-222.
- Luchtel D.L., Martin A.W., Deyrup-Olsen I. & Boer H.H. (1997) Gastropoda: Pulmonata. In: Harrison F.W. & Kohn A.J. (Eds.) Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol. VI B, Mollusca II. Wiley-Liss, New York: pp. 459-718.

- M -

- MacGee B.L. & Targett N.M. (1989) Larval habitat selection in *Crepidula* (L.) and its effect on adult distribution patterns. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 131: 195-214.
- MacGinitie N. & MacGinitie G.E. (1964) Habitats and breeding seasons of the shelf limpet *Crepidula norrisiarum* Williamson. Veliger 7: 34.
- Mackin J.G. (1961) Mortalities of oysters. Proc. Nat. Shell. Assoc. 50: 21-40.
- Maeda-Martínez A. (2008) Osmotic and ionic concentration of the egg capsule fluid of *Crepidula fornicata* in relation to embryonic development. Mar. Biol. 154: 643-648.
- Manger la Mer (2009) Huîtres creuses - Les différents crus en France.
<http://manger-la-mer.org/les-crus-d-huitres-creuses-en>
- Mann K.H. (1982) Ecology of coastal waters, Vol.8. University of California Press, Berkeley: 322 pp.
- Marteil L. (1965) Extension de l'aire géographique de *Crepidula fornicata* L. pendant l'année 1964. Sci. Pêche 135: 5-6.
- Martin M.-C. (1985) Etude expérimentale de l'inversion sexuelle et de la morphogénèse génitale femelle chez un mollusque hermaphrodite protandre *Crepidula fornicata* L. (Mésogastéropode). Thèse de doctorat, Université de Caen, France.
- Martoja R. & Martoja-Pierson M. (1967) Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson, Paris.

- May R.M. & Anderson R.M. (1978) Regulation and stability of host-parasite population interactions: II. Destabilizing processes. *J. Anim. Ecol.* 47: 249-267.
- Mayhew T.M. (2000) 3D structure from thin sections: applications of stereology. *Eur. Micro. Anal.* 11: 17-20.
- Menge B.A. (2000) Top-down and bottom-up community regulation in marine rocky intertidal habitats. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 250:257-289.
- Morales-Alamo R. & Mann R. (1989) Anatomical features in histological sections of *Crassostrea virginica* as an aid in measurements of gonad area for reproductive assessment. *J. Shellfish Res.* 8: 71-82.
- Moritz C.E. (1939) Organogenesis in the gasteropod *Crepidula adunca* sowerby. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 43: 217-248.
- Morvan C. & Ansell A.D. (1988) Stereological methods applied to reproductive cycle of *Tapes rhomboides*. *Mar. Biol.* 97: 355-364.
- Murie J. (1911) 'Slipper limpet' or 'boat shell' (*Crepidula fornicata*): its introduction and influence on Kent and Essex oyster-beds. *Zool.* 15: 401-415.
- Myers J.H., Simberloff D., Kuris A.M. & Carey J.R. (2000) Eradication revisited: dealing with exotic species. *Trends Ecol. Evol.* 15: 316-320.

- N -

- NATIONS UNIES (2007) Marine and coastal biodiversity: Invasive alien species, <http://www.cbd.int/marine/IAS.shtml>
- NATURA 2000 en mer (2008) Notes sur les activités et usages sur les sites Natura 2000 en mer en Pays de la Loire: 12 pp. <http://appcj.wifeo.com/natura-2000.php>
- Naylor R., Williams S.L. & Strong D.R. (2001) Aquaculture- a gateway for exotic species. *Science et Pêche* 294: 1655-1656.
- Nehls G., Diederich S., Thieltges D.W. & Strasser M. (2006) Wadden Sea mussel beds invaded by oysters and slipper limpets: competition or climate control? *Helgoland Mar. Res.* 60: 135-143.
- Newell R.C. & Kofoed L.H. (1977) The energetics of suspension-feeding in the gastropod *Crepidula fornicata* L. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 57: 161-181.

- O -

- Ojeda J.A. & Chaparro O.R. (2004) Morphological, gravimetric, and biochemical changes in *Crepidula fecunda* (Gastropoda: Calyptraeidae) egg capsule walls during embryonic development. *Mar. Biol.* 144: 263-269.

- Olsson M. & Madsen T. (1998) Sexual selection and sperm competition in reptiles. In: Birkhead R. & Møller (Eds) Sperm competition and sexual selection. Academic Press, San Diego, CA: 503-577.
- Orton J.H. (1909) On the occurrence of protandric hermaphroditism in the Mollusc *Crepidula fornicata* P. Roy. Soc. Lond. 81: 468-484.
- Orton J.H. (1922) The phenomena and conditions of sex-change in the oyster (*Ostrea edulis*) and *Crepidula*. Nature 2754: 212-214.
- Orton J.H. (1924) English enemies of the american slipper-limpet, *Crepidula fornicata*. Nature 114: 312.

- P -

- Pandian T. (1969) Yolk utilisation in the gastropod *Crepidula fornicata*. Mar. Biol. 3: 117-121.
- Pazos A.J., Román G., Acosta C.P., Abad M. & Sánchez J. (1996) Stereological studies on the gametogenic cycle of the scallop, *Pecten maximus*, in suspended culture in Ria de Arousa (Galicia, NW Spain). Aquaculture 142: 119-135.
- Pechenik J.A. (1979) Role of encapsulation in invertebrate life histories. Am. Nat. 114: 859-870.
- Pechenik J.A. (1980) Growth and energy balance during the larval lives of three prosobranch gastropods. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 44: 1-28.
- Pechenik J.A. (1982) Ability of some gastropod egg capsules to protect against low-salinity stress. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 63: 195-208.
- Pechenik J.A. (1984) The relationship between temperature, growth rate, and duration of planktonic life for larvae of the gastropod *Crepidula fornicata* (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 74: 241-257.
- Pechenik J.A. & Lima G.M. (1984) Relationship between growth, differentiation, and length of larval life for individually reared larvae of the marine gastropod, *Crepidula fornicata*. Biol. Bull. 166: 537-549.
- Pechenik J.A., Chang S.C. & Lord A. (1984) Encapsulated development of the marine prosobranch gastropod *Nucella lapillus*. Mar. Biol. 78: 223-229.
- Pechenik J.A. (1986) Field evidence for delayed metamorphosis of larval gastropods: *Crepidula plana* (Say), *C. fornicata* (L.), and *Bittium alternatum* (Say). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 97: 313-319.
- Pechenik J.A. & Heyman W.D. (1987) Using KCl to determine size at competence for larvae of the marine gastropod *Crepidula fornicata* (L.). J. Exp. Mar. Biol. 112: 27-38.

- Pechenik J.A. & Levine S.H. (2007) Estimates of planktonic larval mortality using the marine gastropods *Crepidula fornicata* and *C. plana*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 344: 107-118.
- Pimm S.L., Russell G.J., Gittleman J.L. & Brooks T.M. (1996) The future of biodiversity. *Biol. Conserv.* 75: 310-310.
- Poulin R. (2006) Global warming and temperature-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology* 132: 143-151.
- Poulin R. & Mouritsen K.N. (2006) Climate change, parasitism and the structure of intertidal ecosystems. *J. Helminthol.* 80: 183-191.
- Prenter J., MacNeil C., Dick J.T.A & Dunn A.M. (2004) Roles of parasites in animal invasions. *Trends Ecol. Evol.* 19: 385-390.
- Prieur D. (1981). Les relations entre Mollusques Bivalves et bactéries hétérotrophes en milieu marin. Etude analytique et expérimentale. Thèse de doctorat, Brest: 266PP.
- Prinz K. (2005) Parasiten zwischen den Wirten: Ökologie von Cercarien digener Trematoden im Wattenmeer. Master thesis, Philipps University, Marburg.
- Proestou D.A., Goldsmith M.R. & Twombly S. (2008) Patterns of male reproductive success in *Crepidula fornicata* provide new insight for sex allocation and optimal sex change. *Biol. Bull.* 214: 194-202.

- R -

- Ray G.L. (2005) Invasive animal species in marine and estuarine environments: biology and ecology. *Aquatic Nuisance Species Research Program*: 64pp.
- Rejmanek M. & Richardson D.M. (1996) What attributes make some plant species more invasive? *Ecology* 77: 1655-1661.
- Richard J., Huet M., Thouzeau G. & Paulet Y.-M. (2006) Reproduction of the invasive slipper limpet, *Crepidula fornicata*, in the Bay of Brest, France. *Mar. Biol.* 149: 789-801.
- Rivest B.R. & Strathmann R.R. (1995) Uptake of protein by an independently evolved transitory cell complex in encapsulated embryos of neritoidean gastropods. In: Wilson, W.H.; Strickler, S.A. & Shin, GL (Eds) *Reproduction and Development of Marine Invertebrates*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Robinson R.A., Learmonth J.A., Hutson A.M., MacLeod C.D., Sparks T.H., Leech D.I., Pierce G.J., Rehfish M.M. & Crick H.Q.P. (2005) Climate change and migratory species. *Research Report for Defra, CR0302 BTO*, 414: 304 pp.
- Rogers C.E. & MacCarty J.P. (2000) Climate change and ecosystems of the mid-Atlantic Region. *Climate Res.* 14: 235-244.

- Rosell D., Uriz M.-J. & Martin D. (1999) Infestation by excavating sponges on the oyster (*Ostrea edulis*) populations of the Blanes littoral zone (north-western Mediterranean Sea). *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 79: 409-413.
- Ruesink J.L., Lenihan H.S., Trimble A.C., Heiman K.W., Micheli F., Byers J.E. & Kay M.C. (2005) Introduction of non-native oysters: Ecosystem effects and restoration implications. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36: 643-689.
- Ruiz G.M., Carlton J.T., Grosholz E.D. & Hines A.H. (1997) Global invasions of marine and estuarine habitats by non-indigenous species: mechanisms, extent, and consequences. *Am. Zool.* 37: 621-632.
- Runham N.W. (1988) Mollusca. In: Adiyodi K.G. & Adiyodi R.G. (Eds) *Reproductive biology of invertebrates Volume 3: Accessory sex glands* A Wiley-Interscience publication: 113-188.

- S -

- Sastry A.N. (1979) Pelecypoda (excluding Ostreidae). In: Giese A.C. & Pearse J.S. (Eds) *Reproduction of Marine Invertebrates*. Academic Press, New York:113-292.
- Sauriau P.G., Pichocki-Seyfried C., Walker P., De Montaudouin X., Palud C. & Héral M. (1998) *Crepidula fornicata* (mollusque, gastéropode) en baie de Marennes-Oléron : cartographie des fonds par sonar à balayage latéral et estimation des stocks. *Oceanol. Acta* 21: 353-362.
- Sauriau P.G. (2003) Mise en place d'un protocole d'échantillonnage et dépouillement des prélèvements faunistiques pour l'estimation du tonnage de crépidules dans la baie de Bourgneuf : campagne 2003. Rapport final de prestation de service n°780995 CNRS - SRC Pays de la Loire.
- Sauriau P.G., Walker P., Barillé L., Barillé A.-L., Gruet Y. & Davenne E. (2006) La crépidule en baie de Bourgneuf: état du stock quarante ans après son introduction et enjeux pour l'ostréiculture de demain. In: Chaussade J. & Guillaume J. (Eds) *Pêche et Aquaculture. Pour une exploitation durable des ressources vivantes de la mer et du littoral*, Presses Universitaires de Rennes: 241-252.
- Sax D.F. & Brown J.H. (2000) The paradox of invasion. *Global. Ecol. Biogeogr.* 9:363-371.
- Schneider S.H. (2001) What is 'dangerous' climate change?. *Nature* 411: 17-19.
- Seitz R.D. & Lipcius R.N. (2001) Variation in top-down and bottom-up control of marine bivalves at differing spatial scales. *ICES J. Mar. Sci.* 58:689-699.
- Severns P. (2007) Does standing water and predator presence structure a wetland terrestrial mollusc community? *Wetlands* 27:964-971.
- Shugart G.W. (1988) Uterovaginal sperm-storage glands in sixteen species with comments on morphological differences. *Auk*. 105: 379-385.

- Silberzahn N. (1977) Elevage en laboratoire de larves de crépidule: premiers résultats concernant l'apparition de la gonade. *Haliotis* 6: 261-266.
- Silberzahn N. (1978) Aspect cytologique du réceptacle séminal de la crépidule. *Haliotis* 9: 49-52.
- Silberzahn N. (1980) La vitellogénèse chez *Crepidula fornicata* (Mollusque Prosobranchie). *Bull. Soc. Zool. France* 105: 409-412.
- SMIDAP (2007) A- Qualité des milieux et gestion des ressources: Restauration du DPM conchylicole de la baie de Bourgneuf: 13.
<http://smidap.pagesperso-orange.fr/documents/RAPCAR20072008.pdf>
- Smith A.M. (1991) The role of suction in the adhesion of limpets. *J. Exp. Biol.* 161: 151-169.
- Snowden E. (2007) *Cliona celata*. A sponge. Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme. Plymouth. Mar. Biol. Assoc. UK.
- Soulas M. (1996) Valorisation industrielle des crépidules en Bretagne. *La Pêche Maritime* 1393: 139-143.
- Soulas M., Blanchard M., Hamon D. & Halary C. (2000) Projet d'exploitation de la crépidule en Bretagne Nord en vue de la restauration des fonds colonisés. In: Drévès L.K. & Chaussepied M. (Eds) *Restauration des écosystèmes côtiers*, Brest, Ifremer: 30-242.
- Stachowicz J.J., Terwin J.R., Whitlatch R.B. & Osman R.W. (2002) Linking climate change and biological invasions: Ocean warming facilitates nonindigenous species invasions. *Nat. Acad. Sci.* 99: 15497-15500.
- Stanley C.A. (1967) The commercial scallop *Pecten maximus* in Northern Irish waters. PhD thesis, Queen's University of Ireland, Belfast, Ireland.
- Studer A., Thieltges D.W. & Poulin R. (2010) Parasites and global warming: net effects of temperature on an intertidal host-parasite system. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 415: 11-22.

- T -

- ter Hofstede R., Hiddink J.G. & Rijnsdorp A.D. (2010) Regional warming changes fish species richness in the eastern North Atlantic Ocean. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 414: 1-9.
- Thieltges D.W., Strasser M. & Reise K. (2003) The American slipper limpet *Crepidula fornicata* (L.) in the northern Wadden Sea 70 years after its introduction. *Helgoland Mar. Res.* 57: 27-33.
- Thieltges D. W., Strasser M., Van Beusekom J. E. E. & Reise K. (2004) Too cold to prosper-- winter mortality prevents population increase of the introduced American slipper limpet *Crepidula fornicata* in northern Europe. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 311: 375-391.

- Thieltges D.W. (2005a) Benefit from an invader: American slipper limpet *Crepidula fornicata* reduces star fish predation on basibiont European mussels. *Hydrobiologia* 541: 241-244.
- Thieltges D.W. (2005b) Impact of an invader: epizootic American slipper limpet *Crepidula fornicata* reduces survival and growth in European mussels. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 286: 13-19.
- Thieltges D.W. & Rick J. (2006) Effect of temperature on emergence, survival and infectivity of cercariae of the marine trematode *Renicola roscovita* (Digenea: Rencolidae). *Dis. Aquat. Organ.* 73: 63-68.
- Thieltges D., Strasser M. & Reise K. (2006) How bad are invaders in coastal waters? The case of the American slipper limpet *Crepidula fornicata* in Western Europe. *Biol. Invasions* 8: 1673-1680.
- Thieltges D., Reise K., Prinz K. & Jensen K. (2009) Invaders interfere with native parasite-host interactions. *Biol. Inv.* 11: 1421-1429.
- Thomas R.H. & Zeh D.W. (1984) Sperm transfer and utilization strategies in arachnids: ecological and morphological constraints. In: Smith R.L. (Ed) *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*. Academic Press, New York: 179-221.
- Thouzeau G., Chauvaud L., Grall J. & Guérin L. (2000) Rôle des interactions biotiques sur le devenir du pré-recrutement et la croissance de *Pecten maximus* (L.) en rade de Brest. *Cr. Acad. Sci. III-Vie* 323: 815-825.
- Tompkins D.M. & Begon M. (1999) Parasites can regulate wildlife populations. *Parasitol.Today* 15: 311-312.
- Torchin M.E., Lafferty K.D. & Kuris A.M. (2002) Parasites and marine invasions. *Parasitology* 124: 137-151.
- Trüb H. (1990) Züchtung von Hybriden zwischen *Viviparus ater* und *V. contectus* (Mollusca: Prosobranchia) im Zürichsee und ökologische Untersuchungen in einer gemischten Population im Gardasee. Thesis, University of Zurich, Switzerland.

- V -

- Valdizan A., Beninger P.G., Cognie B. & Decottignies P. (2009) External fertilization and excapsular development in *Crepidula fornicata*: evaluating the risk of invasion control by dredging, crushing, and on-site rejection. *Aquat. Living Resour.* 22: 21-28.
- Valdizan A., Cognie B., Decottignies P., Chantrel Marianne & Beninger P.G. (submitted) Evidence that rising coastal seawater temperatures increase reproductive output of the invasive gastropod *Crepidula fornicata*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*
- Valiela I. (1995) *Marine ecological processes*, 2nd edition. Springer, New York: 686 pp.

Vallet C., Dauvin J-C., Hamon D. & Dupuy C. (2001) Effect of the introduced common slipper shell on the suprabenthic biodiversity of the subtidal communities in the Bay of Saint-Brieuc. *Conser. Biol.* 15: 1686-1690.

Velasco L.A. & Navarro J.M. (2005) Feeding physiology of two bivalves under laboratory and field conditions in response to variable food concentrations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 291: 115-124.

Voltzow J. (1994) Gastropoda: Prosobranchia. In: Harrison F.W. & Khon A.J. (Eds.) *Microscopic Anatomy of Invertebrates, V: Mollusca*. Wiley and Sons, New York: pp. 111-252.

- W -

Walne P.R. (1956) The biology and distribution of *Crepidula fornicata* in Essex rivers. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Fisheries Investigations II, Series XX. 6: 1-50.

Weibel E.R., Kistler G.S. & Scherle W.F. (1966) Practical stereological methods for morphometric cytology. *J. Cell Biol.* 30: 23-38.

Werner B. (1948) Die amerikanische Pantoffelschnecke *Crepidula fornicata* L. im nordfriesischen Wattenmeer. *Zool. Jahrb. Allg. Zool.* 77: 449-488.

Werner B. (1955) Über die Anatomie, die Entwicklung und Biologie des Veligers und der Veliconcha von *Crepidula fornicata* L. (Gastropoda Prosobranchia). *Helgoland Mar. Res.* 5: 169-217.

Wilczynski J.Z. (1959) Sex behaviour and sex determination in *Crepidula Fornicata* L. *J. Exp. Biol.* 36: 34-39.

Williamson M.H. (1996) *Biological invasions*. Chapman & Hall, London: 244pp.

Williamson M.H. & Fitter A. (1996) The characters of successful invaders. *Biol. Conserv.* 78: 163-170.

Wonham M.J., O'Connor M. & Harley C.D.G. (2005) Positive effects of a dominant invader on introduced and native mudflat species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 289: 109-116.

Wright W.G. (1988) Sex change in the Mollusca. *Trends Ecol. Evol.* 3: 137-140.

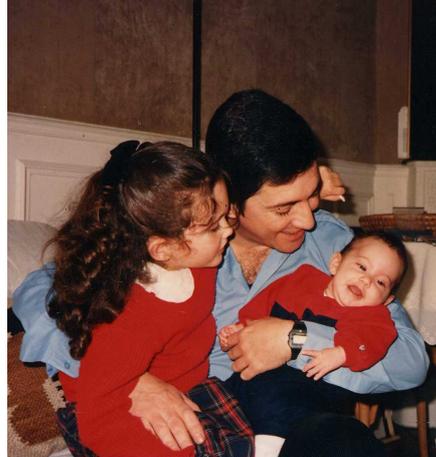
- Z -

Zibrowius H. (1994) Introduced invertebrates: examples of success and nuisance in the European Atlantic and Mediterranean. In: Boudouresque *et al.* (Eds) *Introduced species in European Coastal Waters*. European Commission, Luxembourg: 44-49.

Zhao B. & Qian P-Y. (2002) Larval settlement and metamorphosis in the slipper limpet *Crepidula onyx* (Sowerby) in response to conspecific cues and the cues from biofilm. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 269: 39-51.

Zhao B., Qiu J-W. & Qian P-Y. (2003) Effects of food availability on larval development in the slipper limpet *Crepidula onyx* (Sowerby). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 294: 219-233.

A nos souvenirs, en Guinée Equatoriale, à Paris, au Congo, au Pérou, à notre amour infini les uns pour les autres malgré les orages de nos vies. A nous quatre...



A mon papa, à ta vie avec les indiens péruviens, à ton combat pour un monde meilleur, à ton courage face à la maladie, à ton acharnement pour rester sur cette terre pour pouvoir m'appeler 'Docteur Valdizan'. Je t'aime papa.



BASES BIOLOGIQUES DE LA PROLIFÉRATION D'UN GASTÉROPODE INVASIF DE LA CÔTE ATLANTIQUE EUROPÉENNE, *CREPIDULA FORNICATA*

La prolifération de *Crepidula fornicata* est évidemment due, pour une part inconnue, à ses capacités de reproduction. Le présent travail a détaillé, pour la première fois, les événements sous-jacents du cycle reproducteur de cette espèce, en baie de Bourgneuf, identifiant et mettant en lumière la place importante de l'atrésie dans ce cycle.

Parallèlement, un agent allogène a été observé pour la première fois dans la glande digestive de *C. fornicata*. L'effort de reproduction et le taux d'infestation de l'agent allogène ont été corrélés avec le réchauffement récent des eaux de la baie. Des expériences de fécondation et de développement ont démontré le déroulement des jeunes stades incubés. Ces travaux, menés sur des jeunes stades issus de fécondations externes ou d'excapsulations, soulignent le caractère obligatoire de la fécondation interne et de l'incubation, permettant d'envisager une méthode de contrôle de la biomasse de *C. fornicata* moins onéreuse que les pratiques actuelles.

Des investigations plus fines du système reproducteur, à l'aide de la microscopie électronique, ont permis d'élucider des aspects auparavant inconnus: le stockage des spermatozoïdes dans la spermathèque, la morphologie et l'ultrastructure des spermatozoïdes. Ces informations éclairent des sujets tels la phylogénie et le stockage des spermatozoïdes.

Certains aspects de la reproduction de *Crepidula fornicata* présentent des avantages par rapport à l'huître *Crassostrea gigas*, élevée dans des habitats colonisés par la crépidule, et cette dernière se révèle être un réservoir d'agents allogènes potentiellement transmissibles aux espèces sympatriques.

Mots-clés : espèce invasive, *Crepidula fornicata*, cycle gamétogénique, agent allogène, réchauffement climatique, développement intracapsulaire, stratégie de contrôle de la biomasse

BIOLOGICAL BASIS OF AN INVASIVE GASTROPOD PROLIFERATION ALONG THE EUROPEAN ATLANTIC COASTS, *CREPIDULA FORNICATA*

Crepidula fornicata proliferation is in part due to its reproductive capacities. Our work has detailed, for the first time, the gametogenic cycle of the reproduction of this species in Bourgneuf Bay, showing the importance of gamete atresia in this cycle.

At the same time, an allogen agent was observed for the first time in *C. fornicata* digestive gland. Both reproductive effort and allogen agent infestation rate have been correlated to the recently water warming in the Bay. Fertilization and development experiments have demonstrated the unfold of young stages incubated. These works, on young stages coming from external fertilizations or excapsulations, underline the importance of internal fertilization and incubation, permitting to consider a strategy of *C. fornicata* biomass control, less costly than actual techniques.

More precise investigations on the reproductive system, using electronic microscopy, have permitted to elucidate aspects that were still unknown: spermatozoïde storage in the spermatheca, morphology and ultrastructure of spermatozoïdes. These informations explain subjects like phylogeny and sperm storage.

Certain aspects of *Crepidula fornicata* reproduction present advantages compared to the oyster *Crassostrea gigas*, produced habitats colonized by in *C. fornicata*, and this invasive species may harbour a subset of allogen agent than can potentially be transmitted to sympatric species.

Key words : invasive species, *Crepidula fornicata*, gametogenic cycle, allogen agent, global warming, intracapsular development, biomass control strategy