



Grégarité, changement de sexe et polyandrie : modalité de la reproduction chez une espèce invasive *Crepidula fornicata*

Sabrina Le Cam

► To cite this version:

Sabrina Le Cam. Grégarité, changement de sexe et polyandrie : modalité de la reproduction chez une espèce invasive *Crepidula fornicata*. Biologie du développement. Paris 6, 2009. Français. NNT : . tel-01110473

HAL Id: tel-01110473

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01110473>

Submitted on 28 Jan 2015

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

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

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Diversité du vivant

Présentée par

Mlle Sabrina LE CAM

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

GREGARITE, CHANGEMENT DE SEXE ET POLYANDRIE : MODALITES DE LA REPRODUCTION CHEZ UNE ESPECE INVASIVE *CREPIDULA FORNICATA*

le 14 Mai 2009 devant le jury composé de

Ms. Rachel Collin, Professeur Associé, STRI, USA	(Rapporteur)
M. Patrice David, Chargé de recherche, CNRS, Montpellier	(Rapporteur)
M. Dominique Davoult, Professeur, Université Pierre et Marie Curie	(Examineur)
M. Yves Marie Paulet, Professeur, Université de Bretagne Ouest, Brest	(Examineur)
Mme Frédérique Viard, Chargée de recherche, CNRS, Roscoff	(Directrice de thèse)

“Why study life histories? Life histories lie at the heart of biology, no other field brings you closer to the underlying simplicities that unite and explain the diversity of living things and the complexities of their life cycles.”

Stephen C. Stearns in *The Evolution of Life Histories* (1992) Oxford University Press

SOMMAIRE

PARTIE I : INTRODUCTION GENERALE 1

I-A. Enjeux écologiques et évolutifs liés à la présence d'un stade larvaire.....	3
I-A-1. Avantages & désavantages associés à la présence d'un stade larvaire	5
I-A-2. Variabilité des traits d'histoire de vie des descendants.....	6
I-B. La polyandrie : une stratégie reproductive commune chez les espèces sessiles.....	7
I-B-1. Quels sont les avantages de la polyandrie ?	8
I-B-2. Compétition spermatique et choix cryptique femelle.....	10
I-B-3. Cas particulier de la polyandrie chez les espèces benthopélagiques.....	11
I-C. Hermaphrodisme séquentiel : perspectives théoriques et constat empirique.....	13
I-C-1 La théorie de l'allocation au sexe et l'hypothèse de l'avantage à la taille	13
I-C-2 Invariance de la taille relative au changement de sexe ?	17
I-C-3 Les facteurs modulant la taille au changement de sexe.....	18
I-D. Présentation du modèle d'étude et des questions abordées au cours de cette thèse : dispersion larvaire, polyandrie et protandrie chez <i>Crepidula</i> sp.	23
I-D-1. La polyandrie au sein du genre <i>Crepidula</i>	26
I-D-2. la protandrie en milieu naturel : étude d'une population introduite de <i>Crepidula fornicata</i>	29

PARTIE II : LA POLYANDRIE AU SEIN DU GENRE CREPIDULA : Caractérisation des patrons de paternités en population naturelle par des assignations génétiques 35

CHAPITRE II-A : Relation entre polyandrie et variabilité du taux de croissance larvaire chez <i>C. fornicata</i>	42
II-A-1 : Contexte de l'étude	42
II-A-2: Synopsis de l'article 1	46
II-A-3: Article 1 « Fast vs. slow larval growth in an invasive marine mollusc: does paternity matter? »	49
CHAPITRE II-B : Liens entre mode de dispersion, grégarité et polyandrie au sein du genre <i>Crepidula</i>	62
II-B-1 : Contexte de l'étude	62
II-B-2 Synopsis de l'article 2	67
II-B-3. Article 2 « Isolation of 11 microsatellite markers in <i>Crepidula convexa</i> (Gastropoda, Calyptraeidae) for parentage analyses ».	69
II-B-4 Synopsis de l'article 3.	75
II-B-5 Article 3 « Paternity and sex change in the sessile marine gastropod <i>Crepidula convexa</i> : comparison with other protandrous <i>Crepidula</i> species »	79

PARTIE III : LA PROTANDRIE EN MILIEU NATUREL : Etude d'une population introduite de *Crepidula fornicata*..... 107

CHAPITRE III-A : Etude du lien entre reproduction et recrutement dans une population de <i>Crepidula fornicata</i> de la baie de morlaix	112
III-A-1 : Introduction	112
III-A-2 : Matériels et méthodes	116
III-A-3: Résultats.....	121
III-A-4 : Discussion.....	136
CHAPITRE III-B : Relations entre la dynamique de changement de sexe et la dynamique démographique dans une population naturelle en Baie de Morlaix.....	146
III-B-1: Synopsis de l'article 4	146
III-B-2. Article 4 «Sex change response to unpredictable recruitment processes in the invasive and protandrous mollusc <i>Crepidula fornicata</i> ».	149
CHAPITRE III-C : Effet d'un épibionte sur la fertilité femelle et implication potentielle sur la dynamique de changement de sexe dans une population de <i>Crepidula fornicata</i>.....	182
III-C-1 : Contexte de l'étude	182
III-C-2: Synopsis de l'article 5	185
III-C-3. Article 5 « Can invasive populations of <i>Crepidula fornicata</i> be a reservoir of the harmful cryptogenic boring sponge <i>Cliona celata</i> ?».	187

PARTIE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 215

IV-A. Synthèse des résultats	217
IV-B. Perspectives	223
IV-B-1. Relation entre protandrie, polyandrie et cycle de vie	223
IV-B-2. Communication entre individus : Etudes des facteurs proximaux impliqués dans l'agrégation et la reconnaissance du sexe	223
IV-B-3. Patrons de changement de sexe et succès reproducteur mâle.....	228

ANNEXE II-B-1: Diagramme synoptique des différentes étapes relatives au développement de marqueurs microsatellites.

ANNEXE II-B-2: Conditions d'amplification des 6 locus microsatellites utilisés pour réaliser les analyses de paternité chez *Crepidula convexa*.

ANNEXE II-B-3: Fréquences alléliques et diversité géniqueans les populations de Nahant et Barnastable de *Crepidula convexa*.

PARTIE I

INTRODUCTION GENERALE

Les invertébrés marins offrent une des plus larges gammes de traits d'histoire de vie chez les animaux, notamment en ce qui concerne les cycles de développement et les modalités de la reproduction (Giese & Pearse 1974). L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier différentes caractéristiques associées à la reproduction d'un mollusque gastéropode, *Crepidula fornicata*, à cycle benthopélagique (i.e. alternance d'une phase benthique et larvaire au cours du cycle de vie). Je me suis en particulier intéressée à deux propriétés de cette espèce : la polyandrie (i.e. fécondation d'une femelle par plusieurs mâles) et la protandrie (i.e. changement de sexe d'un individu de mâle vers femelle au cours de sa vie).

Dans cette introduction, je ferai une brève revue des connaissances sur les traits d'histoire de vie qui font l'objet des études présentées dans les différents articles constituant les chapitres de ce manuscrit de thèse. Je m'attacherai plus précisément à présenter les implications éco-évolutives et les liens entre la présence d'une phase larvaire, la protandrie et la polyandrie chez les invertébrés marins.

I-A. ENJEUX ECOLOGIQUES ET EVOLUTIFS LIES À LA PRESENCE D'UN STADE LARVAIRE

Au sein des invertébrés marins, une majorité d'espèces, **70% en zone côtière tempérée** selon Thorson (1950), se distingue par un cycle de vie benthopélagique (Figure I-1). Chez ces espèces, la phase adulte est souvent sessile ou très peu mobile, faisant de la phase larvaire (stade libre dans la colonne d'eau) le vecteur majoritaire voire exclusif de la dispersion. La durée de cette phase larvaire est très variable selon les espèces : inférieure ou de l'ordre d'une journée chez certaines, par exemple moins d'un jour chez l'ascidie coloniale *Diplosoma listerianum* (Marshall *et al.* 2003a), elle peut durer plusieurs années chez d'autres, comme le montre l'exemple étonnant de Strathmann & Strathmann (2007) qui ont observé une durée de vie larvaire de plus de 4 années chez le gastéropode *Fusitriton oregonensis*. Différents travaux ont également montré que la durée de la vie larvaire pélagique était variable au sein d'une espèce donnée : Amar *et al.* (2007) ont notamment montré chez une espèce de corail (*Stylophora pistillata*) que les larves émises tôt dans la saison de reproduction avaient une phase larvaire plus longue que celles émises à la fin de cette saison. Enfin, cette variabilité dans la durée de la vie larvaire est également observée au sein d'une même descendance, comme illustré par le gastéropode *Alderia modesta* chez qui sont trouvées pour une même ponte à la fois des larves spontanément métamorphosées (i.e. ayant perdu les

PHASE LARVAIRE PELAGIQUE

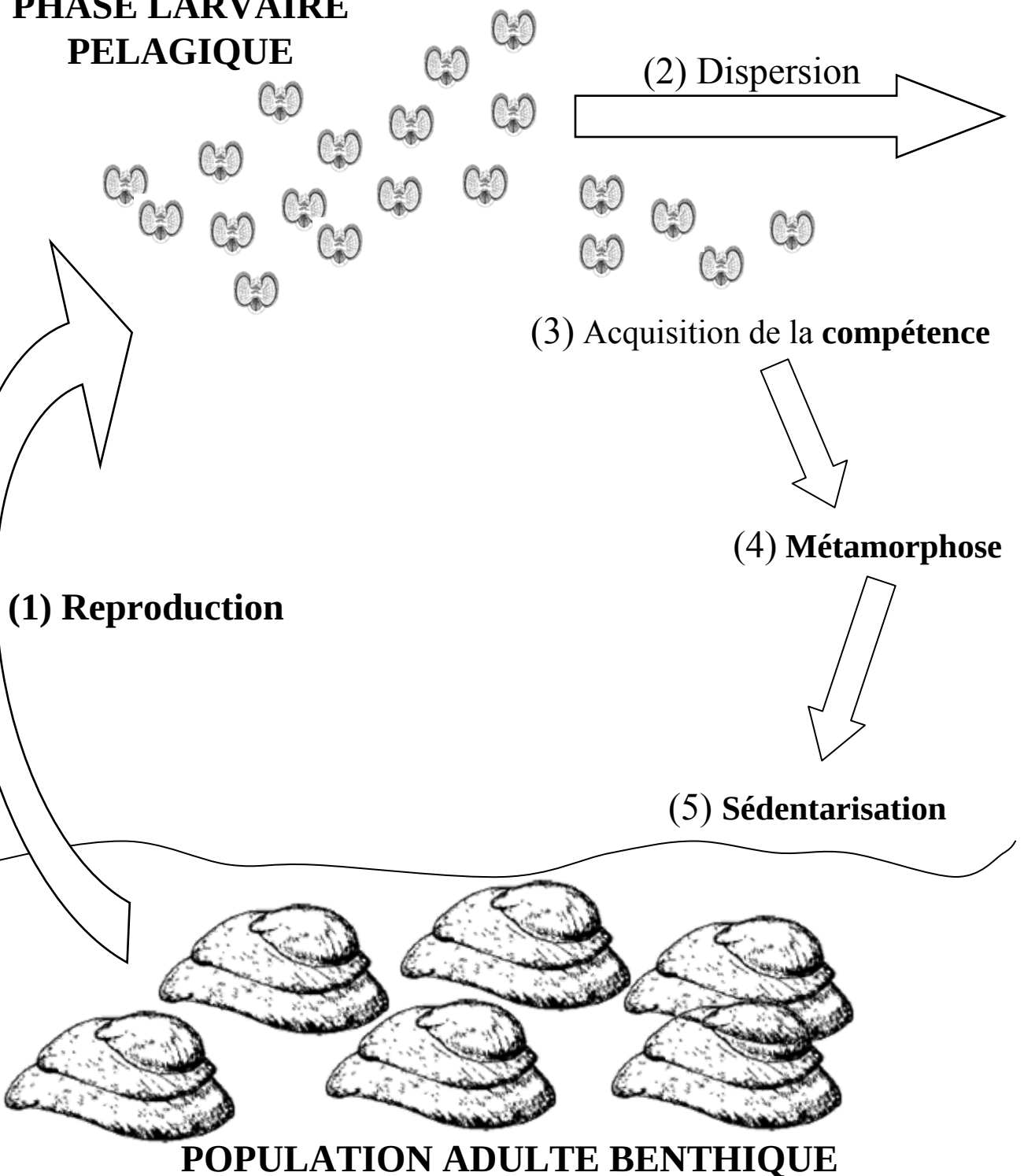


Figure I-1: Exemple de cycle de vie benthopélagique: suite à la reproduction des adultes (1), les larves sont émises dans la colonne d'eau où elles peuvent être transportées loin de la population source (dispersion (2)) ou rester à proximité. Au cours de son développement, la larve acquiert les structures qui lui permettront de se métamorphoser (étape généralement appelée « acquisition de la compétence » (3) à la métamorphose). La métamorphose larvaire (4) est un processus caractérisé par la perte des caractéristiques larvaires et l'apparition des caractères juvéniles conduisant à la sédentarisation des juvéniles (5) dans les populations benthiques (i.e. du fond).

caractéristiques morphologiques larvaires) avant l'émission ou peu après, et d'autres se sédentarisant uniquement en réponse à la présence d'une algue verte, constituant exclusif du régime alimentaire des adultes (Krug 2001)

Cette variabilité inter- et intra-spécifique a des conséquences écologiques et évolutives majeures. Par exemple, une méta-analyse réalisée par Eckert (2003), se basant sur l'évolution temporelle de la densité des populations adultes de 570 espèces marines benthiques intertidales et subtidales, a permis de mettre en évidence que les populations d'espèces à phase larvaire planctonique présentaient des fluctuations démographiques faibles en comparaison des espèces à développement direct (sans phase dispersive pélagique). Johnson *et al.* (2001) ont quant à eux observé que l'hétérogénéité spatiale dans l'abondance des individus au sein des populations était plus importante chez les espèces dépourvues de phase larvaire planctonique par rapport aux espèces benthopélagiques. A une échelle intra-spécifique, la dynamique du pool larvaire a, par ailleurs, des conséquences importantes sur la dynamique des populations adultes ou le maintien de la connectivité entre populations d'une espèce donnée (Shanks *et al.* 2003).

I-A-1. AVANTAGES & DESAVANTAGES ASSOCIES A LA PRESENCE D'UN STADE

LARVAIRE

L'évolution d'un mode larvaire dispersif est soumise à un compromis entre des avantages liés à une dispersion effective et les risques associés à l'imprévisibilité du milieu pélagique. Dans le cadre d'une revue des avantages et désavantages de la phase larvaire chez les espèces marines benthiques, Pechenik (1999) souligne que l'avantage apparent majeur est la possibilité de dispersion permettant d'établir des patrons de **connectivité** entre populations et de maintenir la **cohésion génétique d'une espèce** tout en **limitant les possibilités de croisements entre individus apparentés** (donc limitant les risques de dépression de consanguinité). La dispersion peut également réduire les risques d'extinction à une échelle régionale via la capacité de **colonisation de nouveaux habitats**. De plus, du fait de leurs spécificités morphologiques et écologiques, l'alternance entre une phase benthique et une phase larvaire réduit aussi la **compétition** pour les ressources entre individus apparentés. Cependant, ces avantages sont contrebalancés par des risques associés au transport d'individus hors d'habitats favorables ainsi qu'à une augmentation de la vulnérabilité aux stress environnementaux et à la prédation. Ces coûts se traduisent par des taux de **mortalité**

larvaire probablement élevés *in situ* (voir revue de Morgan 1995). La cause majeure de cette forte mortalité est la **variabilité de l'environnement pélagique** à l'origine, entre autre, de stress physiologiques, de conditions variables de ressources en nourriture et de processus de compétition ou de prédation (Morgan 1995). La forte fertilité souvent documentée chez des espèces benthopélagiques a été suggérée comme une compensation évolutive de cette mortalité larvaire (Thorson 1950, Strathmann 1985). Les modalités de la reproduction peuvent ainsi être un élément important dans le maintien d'une phase larvaire chez les espèces à cycle benthopélagique.

I-A-2. VARIABILITE DES TRAITS D'HISTOIRE DE VIE DES DESCENDANTS

Dans une récente revue sur les incidences évolutives de la taille des descendants chez les invertébrés marins, Marshall *et al.* (2008) soulignent que ce caractère, très variable à la fois entre espèces et au sein des espèces, affiche également une variabilité intra-descendance substantielle chez un grand nombre d'espèces. Notamment, chez les espèces planctotrophes (i.e. présentant une phase larvaire pélagique qui se nourrit de plancton), ce paramètre peut influencer la durée de la phase larvaire ou la survie post-métamorphose (e.g. Hart 1995, Marshall *et al.* 2003b).

Plus directement, les caractéristiques larvaires modulant la durée de la période pélagique comme par exemple le taux de croissance ou le délai à la métamorphose (période durant laquelle la larve en mesure de se métamorphoser, i.e. compétente, retarde ce processus) sont également variables au sein des descendances. A titre d'exemple, Maldonado & Young (1999) ont observé que les larves d'une même descendance chez l'éponge *Sigmadocia caerulea*, se sédentarisent dans un intervalle de temps s'étalant entre 2 et 70 heures. Le délai à la métamorphose varie également, entre 5 et 55 jours chez les larves de *Crepidula fornicata* élevées à 20°C, comme l'a montré François Rigal (2009), dans le cadre d'expériences en laboratoire réalisées au cours de sa thèse.

Les paramètres environnementaux biotiques et abiotiques du milieu dans lequel évoluent les larves sont souvent variables et imprévisibles. Par exemple, la température qui est un facteur clé pour le développement larvaire (O'Connor *et al.* 2007) varie au rythme des saisons voire des marées ainsi que dans l'espace, par exemple en fonction de thermoclines. Ces patrons de variation intra-ponte dans la taille de la descendance a des implications écologiques et évolutives importantes car cette variabilité phénotypique pourrait permettre

une meilleure adaptation aux conditions environnementales fluctuantes rencontrées en milieu marin. **Cette variabilité dans les traits d'histoire de vie embryonnaires et larvaires pourrait correspondre à une stratégie de reproduction des femelles, par le biais d'investissement maternel différentiel à la descendance** (Toonen & Pawlik 2001, Marshall & Keough 2008). Ce type de stratégie, dite de « bet-hedging » (i.e. répartition des risques), peut se révéler particulièrement avantageux, permettant de réduire le risque de mortalité de la descendance et donc d'augmenter le succès reproducteur des femelles. Le fait de produire des larves qui vont se métamorphoser près de la population parentale ou vont participer à une dispersion plus lointaine peut par exemple permettre de maximiser les chances que certaines d'entre elles survivent aux éventuels changements des conditions environnementales locales. A côté d'un investissement reproducteur maternel différentiel, le fait que plusieurs mâles contribuent à une descendance donnée (i.e. paternité multiple ou polyandrie) peut également conférer une variabilité des traits de la descendance (Yasui 1998).

I-B. LA POLYANDRIE : UNE STRATEGIE REPRODUCTIVE COMMUNE CHEZ LES ESPECES SESSILES

Le développement rapide des techniques d'analyses moléculaires et leur utilisation dans les études de comportement et de dynamique des populations chez les animaux ont permis de révéler des « secrets bien gardés de la Nature ». Les assignations de paternité ont notamment mis en évidence que la polyandrie, c'est-à-dire la fécondation de la descendance d'une femelle par plusieurs mâles pendant une même période de reproduction, était fréquente dans le monde animal (Maynard Smith 1964, Birkhead 1998, Zeh & Zeh 2001). Les invertébrés marins ne dérogent pas à cette règle: Baur (1998), en réalisant une revue des données de la littérature, suggère que cette stratégie de reproduction y est très répandue. Par ailleurs, les taux de polyandrie mesurés au sein d'une espèce donnée peuvent être très importants chez ces invertébrés marins. Par exemple, Toonen (2004) a estimé la fréquence des femelles polyandres à 92% dans une population de crabe porcelaine *Petrolisthes cinctipes*. De même, chez le mollusque gastéropode, *C. fornicata*, Dupont *et al.* (2006) ont montré en analysant 18 descendance issues de femelles prélevées dans trois populations bretonnes, que 78% des mères avaient une descendance résultant de fécondations multiples.

I-B-1. QUELS SONT LES AVANTAGES DE LA POLYANDRIE ?

La polyandrie augmente la variabilité génétique de la descendance mais elle génère aussi des coûts pour les femelles (ex. coût de copulation) et des conflits post-copulatoires. Une grande variété d'hypothèses, reposant sur l'existence de bénéfices matériels ou d'avantages génétiques, a été proposée pour expliquer la sélection de la polyandrie par les femelles.

Concernant les bénéfices matériels, l'hypothèse avancée est que les femelles, en s'accouplant avec de nombreux mâles, pourraient augmenter leur survie et/ou leur fécondité de façon directe. Ces bénéfices peuvent correspondre à un apport en sperme, un soin parental mâle supplémentaire ou un accès au territoire mâle, des défenses chimiques anti-prédateurs sexuellement transmissibles ou encore des nutriments issus de cadeaux nuptiaux (voir Newcomer *et al.* 1999 pour revue). En parallèle de ces avantages directs, la polyandrie serait également la source de bénéfices génétiques pour les femelles car elle pourrait contribuer à engendrer des descendants de meilleure viabilité ou « qualité » (Jennions & Petrie 2000). Chez beaucoup d'espèces, les femelles ne semblent pas recevoir d'apports matériels substantiels de la part des mâles (Neff & Pitcher 2005), dans ces cas, les hypothèses liées à des **bénéfices génétiques** (pour revue voir Yasui 1998, Arnqvist & Nilsson 2000, Jennions & Petrie 2000, Zeh & Zeh 2001, Neff & Pitcher 2005, Simmons 2005) pourraient être privilégiées. Ces hypothèses sont notamment:

- **L'hypothèse dite de « trading-up »** (littéralement « glissement vers le haut ») s'applique lorsque les femelles s'engagent dans un nouvel accouplement pour compenser un précédent partenaire de faible qualité. Ce cas de figure a historiquement été mis en évidence chez des animaux socialement monogames comme certaines espèces d'oiseaux (Møller 1992) chez lesquelles les femelles s'associent socialement avec un mâle, ce qui leur procure un avantage direct en terme de soin parental, et s'engagent dans des accouplements « extra couple » afin de sélectionner un partenaire de qualité supérieure. Cette stratégie n'est cependant pas limitée aux seules espèces socialement organisées en « couple », il repose sur le choix pré-copulatoire des femelles qui est possible dès lors qu'elles sont en mesure d'apprécier la qualité des mâles par exemple au travers de traits sexuels secondaires. Lorsque rien ne distingue la qualité des mâles « aux yeux » des femelles, les accouplements multiples peuvent être sélectionnés. Les hypothèses suivantes de bénéfices génétiques sont alors avancées.

• **L'hypothèse de la qualité mâle intrinsèque:** la polyandrie est un préalable à la possibilité de compétition spermatique. Ainsi, en s'accouplant avec plusieurs mâles, les femelles augmentent la probabilité de rencontre d'un mâle de « bonne qualité » et réduisent ainsi le risque d'allouer toutes les ressources à la reproduction avec un partenaire de « mauvaise qualité ». Dans ce cas de figure, les mécanismes entraînant la sélection des pères ont lieu soit par la mise en contact de plusieurs spermes (*in copula*) soit par des mécanismes post copulatoires (voir paragraphe I-2-2)

• **L'hypothèse de la diversité de la descendance :** la paternité multiple peut également être sélectionnée dans la mesure où elle entraîne une augmentation de la diversité génétique de la descendance ce qui pourrait augmenter la valeur sélective globale d'une descendance. En effet, lorsque plusieurs types de ressources sont disponibles en quantité limitée, une diversité accrue des descendants peut d'une part réduire la compétition au sein d'une ponte si l'on suppose que les préférences de chaque individu pourront être variables et que la compétition entre frères est plus intense qu'entre demi-frères. Par ailleurs, la diversité dans la descendance peut aussi constituer une assurance à la reproduction pour les femelles en augmentant la probabilité de survie d'au moins une partie de la progéniture lorsque les conditions environnementales sont variables et imprévisibles.

Dans ce contexte, l'effet paternel sur la descendance peut être de trois natures : un **effet additif**, où les « bons gènes » mâles induisent une augmentation de la qualité de la descendance indépendamment des caractéristiques génétiques maternelles. L'effet paternel peut aussi être **non additif** lorsqu'il dépend de l'interaction entre les génomes maternel et paternel (Simmons 2005), par exemple dans les cas d'évitement de la consanguinité ou de compatibilité génétique. L'avantage génétique pour la femelle découlant de ces effets paternels s'applique principalement dans le cadre des deux premières hypothèses ; celles-ci concernent des stratégies résultant en un biais de la fécondation envers certains mâles par des mécanismes pré ou post-copulatoires. Concernant la troisième hypothèse, l'effet paternel repose sur **l'interaction entre le génome paternel et l'environnement** et résulte des performances différentielle entre les descendants selon leur géniteur et le milieu dans lequel ils évoluent (Garcia-Gonzalez & Simmons 2007).

I-B-2. COMPETITION SPERMATIQUE ET CHOIX CRYPTIQUE FEMELLE

Les premières études sur les conséquences de la polyandrie portaient essentiellement sur les compétitions pré-copulatoires entre mâles. Le rôle de la femelle ne fut réellement pris en considération que plus tardivement, par exemple par Eberhard & Cordero (1995). Ces auteurs soulignaient que l'influence des femelles sur la dynamique de la sélection sexuelle post-copulatoire avait été, à tort, largement ignorée. En effet, les facteurs modulant l'intensité de la compétition entre mâles sont en partie déterminés par les femelles, notamment par l'anatomie de leur partie reproductrice, leur physiologie ou leur comportement, plutôt que par les caractéristiques spermatiques et reproductrices des autres mâles. **Ainsi, il a été de plus en plus reconnu que les femelles avaient un rôle actif dans le choix du (des) partenaire(s).** Par exemple, chez le criquet *Gryllus bimaculatus*, Bretman *et al.* (2003) ont comparé le succès reproducteur de mâles apparentés et non apparentés à la femelle lorsqu'ils étaient soumis au même schéma de copulations et ont pu mettre en évidence, par des analyses moléculaires, un mécanisme d'évitement d'incompatibilité génétique lié à la consanguinité. Les mâles non apparentés à la mère avaient en moyenne un meilleur succès à la reproduction, particulièrement lorsqu'ils étaient les premiers à s'accoupler avec la femelle (précédence spermatique). Quand la paternité ne peut pas être prédite par la méthode simple du dénombrement du nombre de copulations (Thornhill 1983), on parle de **choix cryptique femelle** : une fois que la femelle a copulé avec plusieurs mâles, des mécanismes ou des structures femelles favorisent un mâle ayant un trait particulier par rapport aux autres. Il ne faut pas pour autant remettre en question la compétition mâle – mâle, notamment via la compétition spermatique, à l'origine d'une grande variété de processus/facteurs influençant le succès reproducteur par la voie mâle tels qu'une variation dans le taille des spermatozoïdes ou dans le volume spermatique transmis à la femelle (Stockley 1997) ou encore le développement de différents types de spermes (Birkhead & Møller 1998, Lamunyon 2000, Oppliger *et al.* 2003).

Les patrons de fécondation reflètent la présence d'un conflit entre sexes et le contrôle des deux sexes dans les processus mis en jeu lors de la reproduction (Stockley 1997). Le choix cryptique femelle et la compétition spermatique sont des processus intimement liés et difficiles à distinguer. Mâles et femelles influencent les patrons de fécondation et l'investissement ultérieur dans la descendance et sont à l'origine de biais post-copulatoires de paternité. **Ces processus de biais de paternité post-copulatoires sont d'autant plus importants chez les animaux qui stockent le sperme sur une longue durée.**

I-B-3. CAS PARTICULIER DE LA POLYANDRIE CHEZ LES ESPECES BENTHO-PELAGIQUES

Dans le cas des espèces benthopélagiques, la polyandrie peut avoir des conséquences écologiques et évolutives particulières du fait de l'absence ou de la faible mobilité des adultes. On rencontre ainsi différentes stratégies permettant d'augmenter les probabilités de rencontre entre partenaires sexuels. On distingue notamment les organismes à fécondation externe qui relâchent leurs gamètes dans la colonne d'eau où ils se retrouvent en mélange avec ceux de nombreux autres individus et chez qui la compatibilité entre les génomes mâle et femelle joue un rôle important dans le succès de fécondation (Evans *et al.* 2007). Chez les espèces ayant une phase adulte sessile et à fécondation interne, la polyandrie peut conférer un avantage en permettant que chaque rencontre entre un mâle et une femelle soit « efficace » en termes de succès de reproduction. Par ailleurs, la polyandrie peut, comme chez toutes les autres espèces, permettre d'augmenter la diversité des descendants.

Par ailleurs, les comportements ou les caractéristiques biologiques permettant de faciliter la proximité entre les individus, comme les comportements d'agrégation par exemple, vont certes accroître les probabilités de rencontre entre partenaires et de fécondation mais limitent en parallèle la diversité de ces partenaires. Ces limitations peuvent être compensées par différents traits biologiques mâles ou femelles. Par exemple, chez le mollusque *Crepidula fornicata*, les femelles sont capables de stocker du sperme sur de longues périodes (Hoagland 1978). Chez les balanes, qui vivent fixés sur le substrat rocheux, les individus hermaphrodites présentent un pénis dont la taille relative à la longueur de l'animal est la plus grande du monde animal (jusqu'à 8 fois leur taille). Ceci leur permet ainsi de maximiser les possibilités de copulation avec des partenaires différents d'autant plus que la morphologie de cet organe s'adapte en fonction du régime hydrodynamique dans lequel évoluent les individus (Neufeld & Palmer 2008). L'hermaphrodisme séquentiel (HS ; cf I.3), c'est à dire la capacité d'un individu à changer de sexe au cours de sa vie, est une autre stratégie qui peut permettre de maximiser les possibilités de rencontre entre partenaires sexuels : chez les organismes sessiles grégaires, la possibilité d'ajustement du sexe en fonction de celui des congénères environnants peut en effet permettre d'optimiser le nombre de copulations. La polyandrie et le déterminisme du changement de sexe ont, indépendamment fait l'objet de nombreuses études (e.g. voir pour revue sur la polyandrie, Simmons 2005 et pour revue sur l'HS, Munday *et al.* 2006). Or bien qu'un grand nombre d'HS soient également polyandres, les liens entre ces

deux caractéristiques commencent seulement à être étudiées (Munoz & Warner 2003, Munoz & Warner 2004).

I-C. HERMAPHRODISME SEQUENTIEL : PERSPECTIVES

THEORIQUES ET CONSTAT EMPIRIQUE

Sur l'ensemble du monde vivant, l'**hermaphrodisme séquentiel** (mode de reproduction où les individus produisent des gamètes des deux sexes successivement au cours de leur vie) est relativement rare en comparaison de l'hermaphrodisme simultané (caractérisé par des individus produisant des gamètes mâles et femelles simultanément) ou de la gonochorie (individus à sexes séparés). Dans une revue de l'occurrence de l'hermaphrodisme (simultané et séquentiel) au sein des mollusques, Heller (1993) observe que 40 % des 5600 genres que l'on compte dans cet embranchement contiennent des espèces hermaphrodites mais que l'HS y est très rare. Par exemple, chez les Prosobranches où il représente 23% des cas d'hermaphrodisme dénombrés, ce mode de reproduction est présent dans moins de 1% des 2100 genres connus. En revanche, il est phylogénétiquement très largement distribué : on répertorie des espèces hermaphrodites séquentielles chez les vertébrés (poissons), les invertébrés (mollusques et arthropodes) ou encore des plantes supérieures (Ghiselin 1969, Policansky 1982, Heller 1993). Parmi ceux-ci, on trouve deux modalités principales : la protandrie (i.e. les individus sont d'abord mâles puis femelles au cours de leur vie) et la protogynie (d'abord femelle puis mâle). Ces transformations sexuelles peuvent être irréversibles, avec des changements de sexe une seule fois au cours de la vie de l'individu (ex. le gastéropode protandre *Coralliophila violacea*, Chen & Soong 2002) ou réversibles (ex. le gobie HS bi-directionnel *Gobiodon histrio*, Munday *et al.* 1998).

I-C-1. LA THEORIE DE L'ALLOCATION AU SEXE ET L'HYPOTHESE DE

L'AVANTAGE A LA TAILLE

Une question majeure abordée par la théorie de l'allocation au sexe est de déterminer les facteurs favorisant l'évolution vers l'hermaphrodisme séquentiel par rapport à la gonochorie (Charnov 1982). Cette théorie, basée sur l'optimisation du potentiel reproducteur sur l'ensemble de la vie de l'individu, permet de déterminer dans quel **ordre** se fait le changement de sexe (mâle vers femelle ou inversement) et le **moment du changement de sexe**. Elle prédit ainsi que l'hermaphrodisme séquentiel est sélectionné quand le succès reproducteur augmente plus vite avec la taille chez un sexe que chez l'autre : c'est le **modèle**

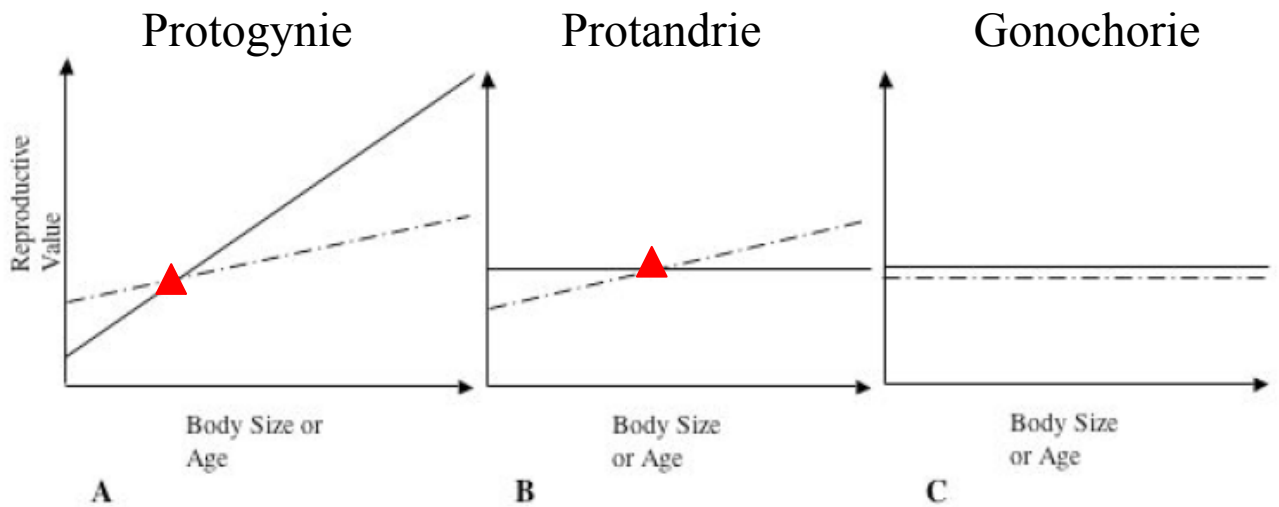


Figure I-2: Le modèle d'avantage de taille pour le changement de sexe : Les lignes pleines représentent la fertilité mâle et les lignes pointillées, la fertilité femelle. A : changement de sexe protogyne (femelle vers mâle) ; B : changement de sexe protandre (mâle vers femelle) ; C : gonochorisme (sexes séparés). Les triangles rouges (▲) indiquent la taille ou l'âge optimal au changement de sexe. Figure adaptée de Warner (1984) et issue de Allsop (2003).

dit d'avantage de taille (« size advantage model » ; Ghiselin 1969, Warner *et al.* 1975, Leigh *et al.* 1976, Charnov 1982). Le premier sexe, celui apparaissant avec la maturité sexuelle, est celui dont la valeur reproductive augmente le moins vite avec (ou est indépendant de) la taille. Le changement de sexe intervient quand les succès reproducteurs des deux sexes sont identiques (Figure I-2). Ainsi, on peut dire que l'hermaphrodisme séquentiel (HS) est une stratégie évolutivement stable dont les paramètres déterminants sont le sex-ratio et les valeurs reproductives sur les fonctions mâles et femelles.

Une extension de cette théorie prédit par ailleurs que **le sex-ratio dans des populations d'hermaphrodites séquentiels devrait être biaisé vers le premier sexe** (Charnov & Bull 1989), donc en faveur des mâles dans une population d'hermaphrodites protandres. Charnov & Bull (1989) démontent que le sex-ratio des adultes se déduit de l'équation suivante :

$$(1) \quad \frac{r}{(1-r)} = \frac{\bar{F}/f(\hat{\tau})}{\bar{M}/m(\hat{\tau})}$$

avec r , la proportion de mâles (par rapport au nombre total d'individus adultes dans la population); $\bar{F}$ et $\bar{M}$ la fertilité moyenne respectivement chez les femelles et les mâles, $f(\hat{\tau})$ et $m(\hat{\tau})$ les fertilités femelle et mâle au moment (âge) du changement de sexe. Ainsi, le sex-ratio (proportion relative mâle/femelle) est biaisé vers le sexe qui a la fertilité la plus faible au moment du changement de sexe. Rappelons que d'après la théorie d'allocation au sexe, la protandrie est évolutivement stable si la fertilité femelle augmente avec l'âge plus vite que ne le fait la fertilité mâle (donc si le ratio $\frac{f(t)}{m(t)}$ augmente de façon monotone avec l'âge).

Si la fertilité augmente pour les deux sexes avec l'âge,

$$(2) \quad \bar{M}/m(\hat{\tau}) < 1 < \bar{F}/f(\hat{\tau})$$

conduisant d'après l'équation (1) précédente à conclure que la proportion de mâles devrait être supérieure à la proportion de femelles. Cet attendu théorique est en accord avec de nombreuses données empiriques. En particulier, une étude comparative à partir de données disponibles sur les hermaphrodites séquentiels marins montre qu'une majorité d'espèces protogynes ont un sex-ratio biaisé vers les femelles tandis qu'il est biaisé vers les mâles pour les espèces protandres (Allsop & West 2004 ; voir également le tableau 1 dans Charnov & Bull 1989). Mais de nombreux contre-exemples sont également répertoriés. Notamment au sein de la famille des Calyptraeidae, regroupant des mollusques protandres (ex. *Crepidula fornicata* ; Collin 2006). Un point important à souligner est que la protandrie devrait être

Encadré I-1 : Invariance des traits d'histoire de vie et changement de sexe

L'approche de l'invariance des traits d'histoire de vie a suscité beaucoup d'intérêt dans l'étude de l'évolution des cycles de vie. Elle s'appuie sur la recherche de ratios sans dimension entre différents traits d'histoire de vie, invariants entre populations et taxa (Charnov 1993). L'existence d'invariance est intéressante car elle suggère qu'il peut y avoir une explication générale à l'évolution des traits invariants.

En particulier, 91 à 97% de la variation de taille au changement de sexe des HS s'expliquerait simplement : les individus ont atteint **72% de leur taille maximale** quand ils changent de sexe (Allsop & West 2003a, Gardner et al. 2005). Cette constance est vérifiée empiriquement à l'échelle interspécifique chez les poissons, les crustacés, les mollusques, les échinodermes et les polychètes (Allsop & West 2003a, 2003b), mais également à l'échelle intraspécifique dans quelques cas. Par exemple, Charnov & Skuladottir (2000) ont vérifié cette invariance de taille au changement de sexe dans 21 populations de la crevette protandre *Pandalus borealis*.

Ces résultats obtenus à partir d'analyses de régression ont ensuite été remis en question (Buston *et al* 2004, Ciprianni & Collin 2005, Nee *et al* 2005) car le fait que la gamme de variation de la variable dépendante soit limitée par la variable indépendante (par exemple la taille au changement de sexe ne peut excéder la taille maximale) entraîne que les patrons prédits par l'hypothèse nulle sont les mêmes que ceux prédits par l'hypothèse d'invariance (Figure a). L'hypothèse de l'invariance de la taille relative au changement de sexe suggère implicitement qu'il existe une unique taille au changement de

sexe par espèce. Pourtant, bien que cela puisse être vérifié dans certaines populations, il est peu vraisemblable que cela soit vérifié dans le cas d'HS dit à déterminisme environnemental, c'est-à-dire influencé par la composition du groupe de reproducteurs local. La taille optimale au changement de sexe devrait varier entre ces groupes en fonction de la structure de taille et des conditions sociales propres à chaque groupe. La « règle » du changement de sexe dans de tels cas devrait plus probablement être estimée en comparant les groupes plutôt que les populations ou les espèces (Munday *et al* 2006)

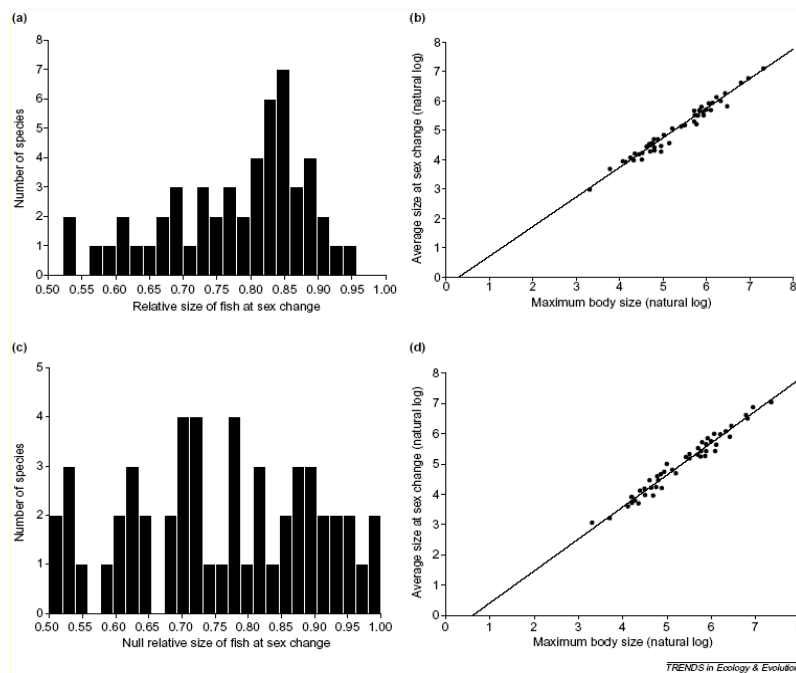


Figure a : Variation de la taille relative au changement de sexe (i.e. taille au changement de sexe divisée par la taille maximale): (a) Taille relative au changement de sexe au sexe parmi 52 espèces de poissons (données Allsop & West 2003b), (b) ces données semblent invariantes (pente 1 et R^2 élevé) quand la taille moyenne au changement de sexe est distribuée en fonction de la taille maximale. Mais les données de l'hypothèse nulle, lorsque la taille relative au changement de sexe est aléatoirement distribuée (c) produisent également une apparente relation invariante quand elles sont distribuées sur une échelle log-log. (schéma issu de Munday *et al* 2006)

trouvée dans les espèces chez lesquelles un seul male ne monopolise pas la plupart des croisements.

I-C-2. INVARIANCE DE LA TAILLE RELATIVE AU CHANGEMENT DE SEXE ?

Une approche basée sur l'invariance de paramètres descripteurs des traits d'histoire de vie a été appliquée à l'étude des changements de sexe (Charnov 1993, Charnov & Skuladottir 2000, Allsop & West 2003a, Allsop & West 2003b). Dans le cadre de l'étude de l'hermaphrodisme séquentiel, cette méthode est basée sur l'analyse de ratios sans dimension (c'est-à-dire basés sur des rapports de variables de temps, de taille etc. exprimées dans la même unité) et recherche des relations linéaires constantes entre certaines variables telles que la taille au changement de sexe, la taille maximale atteinte par le second sexe, l'âge à la maturité ou encore l'âge au changement de sexe (Allsop & West 2003a, Allsop & West 2003b, Gardner *et al.* 2005).

Un des invariants le plus souvent considéré chez les hermaphrodites séquentiels est la constance du rapport entre la taille au changement de sexe par rapport à la taille maximale atteinte dans la population (Charnov & Skuladottir 2000). Allsop & West (2003a) ont notamment suggéré par une revue des résultats obtenus sur 77 espèces, parmi lesquelles on trouve des poissons, des échinodermes, des mollusques et des crustacés, qu'en accord avec la théorie, ce ratio était égal à 0.72. Ce résultat suggère que quel que soit le taxon, l'HS se traduit par un changement de sexe à environ 72% de la taille maximale. Ces résultats et la validité de cette approche sont cependant largement discutés car l'invariance de ces paramètres a également été détectée en utilisant des modèles nuls, c'est-à-dire, dans le cas de notre exemple, dans des cas où la taille au changement de sexe était distribuée aléatoirement en fonction de la taille maximale ou de l'âge à la maturité (Buston *et al.* 2004, Cipriani & Collin 2005, Nee *et al.* 2005 pour plus de détail voir l'encadré I-1).

De plus, de nombreuses études ont mis en évidence **un chevauchement considérable entre les tailles de mâles et de femelles** (voir par exemple Hoagland 1978, Wright 1988, Soong & Chen 1991, Sewell 1994, Dupont 2004), incompatible avec une invariance stricte au niveau individuel et qui suggère fortement que le modèle d'avantage de taille (« size-advantage ») n'explique pas totalement le déterminisme du changement de sexe chez les hermaphrodites séquentiels.

I-C-3. LES FACTEURS MODULANT LA TAILLE AU CHANGEMENT DE SEXE

Le modèle d'avantage de taille, utilisé dans des études générales sur les hermaphrodites séquentiels (Policansky 1982, Heller 1993), permet de prédire l'allocation optimale qu'un individu doit apporter à la fonction mâle et la fonction femelle en réponse à certains paramètres considérés comme constants à l'échelle de l'espèce (e.g. fertilité, mortalité ou croissance dépendants de la taille, Warner *et al.* 1975). Or à l'échelle d'une population, la valeur reproductive en tant que mâle ou femelle peut être influencée par celle des autres individus du groupe de reproducteurs. Ainsi, **la variabilité de la taille au changement de sexe, observée au sein des populations chez la plupart des hermaphrodites séquentiels étudiés, traduit souvent des variations dans la structure de taille et la composition de ces groupes** (Munday *et al.* 2006). Dans sa revue, Munday *et al.* (2006) souligne la grande diversité des stratégies de reproduction chez les hermaphrodites séquentiels et montre que les études du déterminisme du changement de sexe ont permis de distinguer différents facteurs de modulation, la plupart du temps en étroite relation avec la structure locale du groupe de reproducteurs (i.e. déterminisme dit « environnemental » au sens d'environnement social, ou ESD pour « Environmental sex determination », Charnov & Bull 1977). Parmi les données présentes dans la littérature, une grande variété de facteurs influençant le moment du changement de sexe peuvent être listés, depuis la densité locale (Wright 1989), jusqu'à des signaux chimiques ou visuels (Cole & Shapiro 1995). Le Tableau I-1 illustre, au travers de quelques exemples, cette diversité et l'influence variable de l'environnement social local comme modulateur du moment du changement de sexe en fonction de la structure du groupe de reproducteurs. Trois grands types de groupe reproducteur se distinguent :

- Groupe reproducteur « ouvert »:

Chez les hermaphrodites séquentiels caractérisés par une grande mobilité (notamment liée à une vie pélagique), comme certaines crevettes hermaphrodites protandres simultanées (phase mâle puis phase où l'individu présente une morphologie femelle mais des fonctions mâles et femelles simultanément), le nombre de partenaires potentiels est élevé et par conséquent la structure sociale locale influence peu le déterminisme du changement de sexe (voir tableau I-1, colonne ESD). Par exemple, Bergström (1997) a démontré que dans une population naturelle de crevettes, *Pandulus borealis*, les variations saisonnières de la température étaient le facteur prépondérant dans le déclenchement du changement de sexe et non la composition

sexuelle des cohortes d'individus. Chez *Pandalus latirostris*, Chiba *et al.* (2000) ont montré que la croissance juvénile, essentiellement influencée par des paramètres abiotiques pouvait expliquer la variabilité de la taille au changement de sexe.

- Groupe reproducteur de taille « fermé » et hiérarchisé:

Une large majorité des poissons récifaux HS présentent une organisation de type harémique dans lequel un mâle ou une femelle de grande taille domine un petit groupe d'individus de taille inférieure et n'ayant pas encore changé de sexe. La dynamique du groupe social a alors une influence primordiale sur le déterminisme du changement de sexe (Tableau I-1): Warner *et al.* 1996 ont par exemple étudié *Thalassoma bifasciatum*, un poisson récifal protogyne harémique qui a longtemps été un modèle d'étude privilégié pour tester les prédictions des théories d'allocation au sexe. Dans cette étude, ils montrent que la disparition des mâles du groupe social entraîne presque immédiatement un changement de comportement des plus grosses femelles, qui se transforment en mâle « fonctionnel » en moins de 8 jours. Buston (2003) a également montré l'importance des structures d'organisation sociale chez le poisson clown protandre *Amphiprion percula*, chez lequel les groupes sont constitués d'une paire d'individus reproducteurs entourés généralement d'un petit nombre d'individus non reproducteurs : les individus modulent leur croissance en fonction de leur position dans la hiérarchie.

- Groupe reproducteur « fermé » sans hiérarchie comportementale:

Quand il n'y a pas d'organisation hiérarchique mais que le nombre de partenaires potentiels est limité, par exemple en conséquence d'une faible mobilité comme chez les gastéropodes marins, on observe souvent une influence du sex-ratio du groupe reproducteur local ou de paramètres modulant la composition du groupe d'individus présents localement. Notamment, l'hétérogénéité du milieu peut modifier les structures sociales et sexuelles et ainsi entraîner une variation du moment du changement de sexe. L'exemple du gastéropode *Coralliophila violacea* associé à deux types de coraux, *Porites nigrescens* et *P. lobata*, est particulièrement démonstratif (Chen *et al.* 2004). *P. nigrescens* est un corail « branchu » dans lequel les gastéropodes de l'espèce *C. violacea* vivent majoritairement de façon solitaire, alors que le second est un corail massif qui abrite de multiples groupes d'individus. Or, Chen *et al.* (2004) ont montré que les individus des coraux branchus étaient significativement plus petits et qu'il y avait plus de femelles. De plus, la taille de changement de sexe est plus petite chez les individus occupant des coraux à branches. Le gastéropode *Crepidula fornicata* est également

Tableau I-1 : Exemples d'espèces hermaphrodites séquentiels illustrant la diversité des stratégies de changement de sexe.

Les espèces sont classées dans ce tableau selon le type de groupe reproducteur (O : ouvert, HF : hiérarchique fermé, F : fermé, et « ? » pour les espèces chez qui le comportement ou la milieu de vie donnent des indication quant à la nature du groupe mais pour lesquelles les patrons de reproduction sont mal connues). Pour les espèces à groupe fermé, hiérarchique ou non, le nombre d'individus composant les groupes est indiqué. Le type de changement de sexe (PD : protandre, PG : protogyne, PDS : protandre simultané et Rev. lorsque le changement de sexe peut être réversible).

Les biais de sex-ratio (M : vers les mâles, F : vers les femelles) et la proportion de femelles (Nfemelles/Total) sont précisées ainsi que la variabilité dans le moment du changement de sexe. La colonne ESD précise si le déterminisme du changement de sexe est de type environnemental (i.e. social ; ESD). Le paramètre déterminant dans le déclenchement ou le retardement du changement de sexe est précisé. *ND* indique les données non disponibles.

Espèce		Type de changement de sexe	Groupe reproducteur		Sex-ratio : Biais (Femelle/Total)	Moment du changement sexe			Références
			Type	Nb Ind		Var	ESD	Déterminisme Paramètre influant	
<i>Pandalus borealis</i> Crustacé		PD	O		M (0.05)	OUI	NON	Saison	Bergström 1997
<i>Pandula latirostris</i> Crustacé		PD	O		<i>ND</i>	OUI	OUI	-Croissance individuelle -Composition du groupe de reproducteur*	Chiba <i>et al.</i> 2000; Chiba <i>et al.</i> 2003
<i>Hippolyte inermis</i> Crustacé		PD	O		<i>ND</i>	OUI	NON	Régime alimentaire	Zupo & Messina 2007
<i>Eleginops maclovinus</i> Vertébré		PD	O		0.5	OUI	<i>ND</i>	Taille individuelle	Licandeo <i>et al.</i> 2006
<i>Lottia gigantea</i> Gastéropode		PD	O		F 0.73	OUI	NON	Densité locale	Wright 1989
<i>Leptosynapta clarki</i> Echinoderme		PD (Rev)	O ?		M (0.10-0.29)	OUI	<i>ND</i>	Taille individuelle	Sewell 1994

Tableau 1 (suite)

Espèce		Type de changement de sexe	Groupe reproducteur		Sex-ratio : Biais (Femelle/Total)	Moment du changement sexe			Références
			Type	Nb Ind		Var	ESD	Paramètre influant	
<i>Thalassoma bisfasciatum</i> Vertébré		PG	HF	24-54	F (0.71-0.93)	OUI	OUI	Position hiérarchique dans le groupe reproducteur	Warner & Swearer 1991
<i>Trimma okinawae</i> Vertébré		PG (Rev)	HF	ND	F ND	OUI	OUI	Mouvement inter groupe	Manabe <i>et al.</i> 2007
<i>Sparisoma radians</i> Vertébré		PG	HF	ND	M 0.49	OUI	OUI	Position hiérarchique dans le groupe reproducteur r	Munoz & Warner 2004; Robertson & Warner 1978
<i>Lythrypnus dalli</i> Vertébré		PG (Rev)	HF ?	4-12	ND	OUI	OUI	Signaux visuels ou chimiques	Lorenzi <i>et al.</i> 2006
<i>Coryphopterus glaucofraenum</i> Vertébré		PG	HF ?	1-17	F 0.69	OUI	OUI	Signaux visuels ou chimiques	Cole & Shapiro 1992; Cole & Shapiro 1995
<i>Coralliophila violacea</i> Gastéropode		PD	F	1-12	M (0.26-0.40)	OUI	OUI	Taille du groupe social	Chen & Soong 2002; Chen <i>et al.</i> 2004
<i>Gnorimosphaeroma oregonense</i> Crustacé		PG	F ?	6-36	M 0.27	OUI	NON	Taille individuelle	Brook <i>et al.</i> 1994
<i>Lysmata wurdemanni</i> Crustacé		PDS	F	ND	ND	OUI	NON	-Saison -Composition du groupe reproducteur *	Baeza & Bauer 2004; Baldwin & Bauer 2003; Bauer 2002

* Ces deux espèces ont fait l'objet d'études à la fois en population naturelle (Baldwin & Bauer 2003; Bauer 2002; Chiba *et al.* 2000) et en laboratoire (Baeza & Bauer 2004; Chiba *et al.* 2003). L'influence de la composition du groupe social sur le moment du changement de sexe a été détectée durant des expériences en laboratoire mais les études de la variabilité du changement de sexe à l'échelle d'une population ont montré que le facteur prédominant en milieu naturel semblait être les variations saisonnières des conditions environnementales abiotiques (e.g. la température).

un exemple très représentatif de l'influence de l'environnement social local car ces organismes vivant en association pérenne à l'âge adulte, modulent le moment du changement de sexe en fonction du sex-ratio du groupe (Coe 1938). Cette espèce étant un des principaux organismes étudiés durant cette thèse, ses caractéristiques seront développées plus en détail par la suite (cf. I.4).

Si le modèle dit « d'avantage à la taille » et/ou la structure sociale et sexuelle locale peuvent expliquer en grande partie la variabilité de la taille au changement de sexe entre populations et/ou espèces, des stratégies plus complexes ont également été mises en évidence. En particulier, chez les poissons récifaux, très largement étudiés, des individus changeant de sexe prématurément ont été identifiés. Cette stratégie a été expliquée par la possibilité pour ces individus d'être en mesure de prendre la tête du harem plus rapidement après la disparition de l'individu dominant (Sakai 1997). Chez le poisson protogyne *Sparosima radians*, le fait que ce ne soit pas la plus grande femelle qui change de sexe en réponse à la disparition du mâle est expliquée par la valeur reproductive de la plus grande femelle (supérieure à la somme de celle des autres femelles) et/ou par l'intensité de la compétition spermatique (dans le cas de figure où des copulations « extra-harem » existent) (Munoz & Warner 2003, Munoz & Warner 2004). Partant de ces résultats, Munoz & Warner (2003, 2004) ont développé une nouvelle version de l'hypothèse « d'avantage à la taille » en y intégrant de la compétition spermatique et des biais taille-fécondité, soulignant ainsi la nécessité de préciser les modalités de reproduction des hermaphrodites séquentiels. En effet, **les patrons de reproduction (ex. paternité multiple) modifient les valeurs reproductives mâle et/ou femelle et donc apparaissent comme des paramètres critiques chez les espèces présentant des stratégies de changement de sexe.** De plus, lorsque les modalités de changement de sexe ont été étudiées à la fois au travers de suivis de populations naturelles et d'expériences en conditions contrôlées, comme c'est le cas chez deux espèces de crevettes protandres, *Pandalus latirostris* (Charnov 1982, Chiba *et al.* 2000, Chiba *et al.* 2003) et *Lyssmata wurdemanni* (Baldwin & Bauer 2003, Baeza & Bauer 2004), l'influence de l'environnement local social s'est avérée significative en laboratoire mais indétectable à l'échelle d'une population où, dans cette situation, les paramètres environnementaux abiotiques étaient prépondérants (voir Tableau I-1). Le déterminisme du changement de sexe pourrait ainsi être une combinaison subtile des modalités de reproduction locales et des paramètres biotiques (e.g. démographie) et abiotiques (e.g. température, ressources nutritives) agissant sur l'ensemble de la population.

I-D. PRESENTATION DU MODELE D'ETUDE ET DES QUESTIONS

ABORDEES AU COURS DE CETTE THESE : DISPERSION

LARVAIRE, POLYANDRIE ET PROTANDRIE CHEZ *CREPIDULA* SP.

La comparaison des modalités de reproduction entre espèces proches est particulièrement intéressante quand ces espèces présentent des traits d'histoire de vie ou des comportements différents. Dans ce contexte, la famille des Calyptraeidae, et plus particulièrement le **genre *Crepidula***, présente l'intérêt de ne contenir que des espèces protandres mais caractérisées par **une grande diversité de distribution géographique et de traits d'histoire de vie**. Le Tableau I-2 présente un échantillon d'espèces du genre *Crepidula* et quelques unes de leurs caractéristiques, illustrant la diversité de ce groupe.

Le genre *Crepidula* rassemble ainsi des espèces de gastéropodes marins présentes le long de très nombreuses zones côtières de par le monde, par exemple dans l'Atlantique Nord-Ouest où sont trouvés les espèces *Crepidula fornicata* et *Crepidula convexa* (Hoagland 1978), ou dans le Pacifique Sud Est où de nombreuses espèces de crépidules ont été dénombrées, telles que *Crepidula onyx* (Coe 1942), *Crepidula norrisarium* (Warner *et al.* 1996) ou plus récemment *Crepidula coquimbensis* (Brown & Olivares 1996). Concernant le cycle de développement, le genre *Crepidula* regroupe des espèces à cycle de vie benthopélagique (ex. *C. fornicata*, *C. incurva*) ainsi que des espèces à développement direct c'est-à-dire sans phase larvaire pélagique mais avec incubation des pontes jusqu'à l'éclosion de juvéniles benthiques (ex. *C. coquimbensis*, *C. convexa*, Collin 2003, cf Tableau I-2).

Crepidula sp. est, depuis le début du 20^{ème} siècle, un modèle privilégié pour l'étude du changement de sexe chez les mollusques, notamment concernant les déterminismes d'origine environnementale du changement de sexe. En effet, différentes études ont montré l'importance du sex-ratio local comme paramètre pouvant influencer le moment de la réversion sexuelle (Coe 1938, Hoagland 1978, Collin *et al.* 2005, Collin 2006). L'impact de ce paramètre est variable selon les espèces car fonction du comportement plus ou moins grégaire des individus. Par exemple, il existe une différence marquée du chevauchement entre les tailles mâle et femelle entre *C. cf onyx* et *C. incurva* avec une différence de 0.9mm entre la plus petite femelle et le plus grand mâle chez *C. cf onyx* et de 3.5 mm pour une taille maximale similaire de 27 et 18mm respectivement (Collin *et al.* 2005).

Tableau I-2: Présentation de certaines caractéristiques biologiques de 9 espèces protandres du genre *Crepidula*

Pour chaque espèce, sont indiqués l'aire de distribution et le cas échéant, l'aire d'introduction (Atl = Atlantique, Pac = Pacifique, Méd = Méditerranée), le mode de développement, les caractéristiques du groupe de reproducteurs : le type (O : ouvert ou F : fermé selon si une majorité d'individus vivent associés en groupe ou non), le nombre moyen et maximum d'individus par groupe, le sex-ratio exprimé par la proportion de femelles parmi les individus sexués, la variabilité de la taille au changement de sexe correspondant à la différence de taille entre le plus grand mâle et le plus petite femelle standardisée par la moyenne et enfin si des paternités multiples ont été observées. *ND* indique les données indisponibles.

Espèce	Zone de distribution	Mode de développement	Groupe de reproducteurs			Sex-ratio (Femelle/Total)	Variabilité de la taille au changement de sexe	Polyandrie	Références
			Type	Nb ind/groupe					
				Moy	Max				
<i>C. adunca</i>	Pac NO	Direct	F	1.3	3	0.36	0.42	ND	Collin 2000, 2003, 2006
<i>C. fornicata</i>	Atl NO Introduite : Atl NE Pac NO et NE Méd	Indirect	F	2.8-3.2	7-13	0.30-0.41	0.65	OUI	Blanchard 1995; Collin 2003, 2006; Dupont <i>et al.</i> 2006; Gaffney & McGee 1992; Proestou <i>et al.</i> 2008
<i>C. coquimbensis</i>	Pac SE	Direct	ND	ND	ND	ND	0	OUI	Brante <i>et al.</i> In prep; Collin 2003, 2006
<i>C. convexa</i>	Atl NO Introduite: Pac NE & NO	Direct	O	ND	ND	0.49	0.8	ND	Collin 2003, 2006; Hendler & Franz 1971; Hoagland 1978
<i>C. onyx</i>	Pac E	Indirect	O	1	2	0.35	0.32	ND	Collin 2003, 2006
<i>C. cf Onyx</i>	Pac E	Direct	O	1	1	0.79	0.04	ND	Collin 2003, 2006
<i>C. incurva</i>	Pac SO	Indirect	F	1.4	3	0.60	0.43	ND	Collin 2003, 2006
<i>C. norrisarium</i>	Pac E	Direct	F	1.4-1.5	3-4	0.47-0.53	0.73	ND	Collin 2003, 2006
<i>C. complanata</i>	Afrique S	Direct	F	1.7	10	0.51	0.41	ND	Collin 2003, 2006

Encadré I-2 : Historique de l'introduction de *C. fornicata* et distribution en Europe

Suite à son introduction réussie en Europe, *C. fornicata* est devenue une espèce emblématique pour l'étude des processus d'introductions biologiques en Europe. Originaires de la côte Nord Est des Etats-Unis, elle a été introduite en Grande-Bretagne à la fin du 19^{ième} siècle puis en France au 20^{ième} siècle. Malgré son introduction relativement récente en France, ce gastéropode occupe un vaste espace où sa présence a de multiples conséquences écologiques et économiques (Blanchard 1997; Thieltges *et al.* 2006). L'apparition simultanée de *C. fornicata* sur divers sites ostréicoles à partir de 1970 coïncide avec le début de la culture des huîtres japonaises, *Crassostrea gigas*. Compte tenu de ces données historiques, il est fort probable que la colonisation des côtes françaises par cette espèce ait été largement facilitée par les échanges entre sites ostréicoles (transport avec les naissains d'huîtres) (Blanchard 1995). Le cycle bentho-pélagique de la crépidule a également été considéré comme une caractéristique pouvant expliquer son succès d'introduction de la crépidule (Dupont *et al.* 2007b; Dupont *et al.* 2003). En particulier, deux études de la diversité génétique de plusieurs populations distribuées le long des côtes françaises et bretonnes (Dupont *et al.* 2007a; Dupont *et al.* 2003) ont montré le rôle probablement majeur de la dispersion larvaire dans l'expansion secondaire de cette espèce. Sa distribution actuelle en Europe est présentée sur la carte ci-dessous par les points rouges.



<http://www.europe-aliens.org/speciesFactsheet.do?speciesId=50159>, par Dan Minchin

I-D-1. LA POLYANDRIE AU SEIN DU GENRE *CREPIDULA*

I-D-1-a. Polyandrie et caractéristiques larvaires chez *Crepidula fornicata*

Crepidula fornicata est sans aucun doute l'espèce de la famille des Calyptraeidae qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études. Elle a été largement étudiée sur trois aspects *a priori* assez différents : (1) les modalités de la protandrie (voir pour exemple Orton 1909, Coe 1938, 1953, Hoagland 1978) et (2) les caractéristiques du développement larvaire (voir pour exemples Pechenik 1984, Pechenik & Lima 1984, Pechenik & Heyman 1987, Pechenik & Gee 1993, Pechenik *et al.* 1996, Pechenik *et al.* 2002, Collin & McHugh 2004, Pechenik & Levine 2007) et (3) plus récemment, parce qu'elle est devenue une espèce emblématique des introductions biologiques en milieu marin (Encadré I-2 ; voir par exemple Blanchard 1997, Dupont *et al.* 2003, Richard *et al.* 2006).

Cet hermaphrodite protandre présente un cycle de vie benthopélagique (Encadré I-3) : les embryons sont d'abord incubés dans des capsules ovigères disposées dans la cavité palléale de la femelle avant d'être émis sous forme de larves véligères dans la colonne d'eau où elle passent plusieurs semaines (2 à 4 semaines ; Chipperfield 1951, Rigal *et al.* In prep) avant de se métamorphoser. Les juvéniles benthiques acquièrent leur maturité sexuelle en passant obligatoirement par une phase mâle suivie plus tard dans la vie de l'individu par une transformation (non obligatoire) sous forme femelle. La durée de vie d'une crépidule est de 8-10 ans (Blanchard 1995). Certains traits larvaires tels que la nutrition, le taux de croissance et la métamorphose de la larve ont été intensivement étudiés dans l'aire de distribution naturelle de cette espèce, la côte Nord Est des Etats-Unis (Pechenik & Gee 1993, Pechenik *et al.* 1996, Pechenik *et al.* 2001, Pechenik *et al.* 2002) et plus récemment dans l'aire d'introduction française de cette espèce dans le cadre de la thèse de François Rigal (2009).

Les traits larvaires, par exemple le taux de croissance qui peut moduler la durée de vie pélagique de cette espèce, ont une influence majeure sur le succès de recrutement des individus et par voie de conséquence sur la dynamique des populations. Or plusieurs études ont souligné la grande variabilité des caractéristiques larvaires de cette espèce y compris au sein d'une même descendance. C'est ainsi qu'Hilbish *et al.* (1999) et Pechenik & Levine (2007) ont pu distinguer des larves à croissances rapide et d'autres à croissance lente. Une estimation de l'héritabilité du caractère « taux de croissance larvaire », déterminé à partir de comparaison entre et au sein de descendance larvaires, a montré que 35% de la variance phénotypique observée pouvait être expliquée par une composante génétique (Hilbish *et al.*

Encadré I-3: Cycle de vie de *Crepidula fornicata* (Linné 1758):

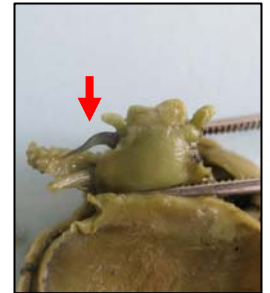
(1) chaîne de crépidules au sein de laquelle la majorité des accouplements ont lieu; (2) femelle incubant une ponte (vue de dessous); (3) larve véligère libre dans la colonne d'eau; (4) post-larve ou juvénile après la sédentarisation; (5) mâle; (6) femelle. Les individus de cette espèce peuvent vivre jusqu'à une dizaine d'années.

(3) Larve: Émise dans la colonne d'eau à une taille d'environ 400µm, elle atteint la compétence à la métamorphose au bout de 2 à 4 semaines à une taille de 800-1000µm.



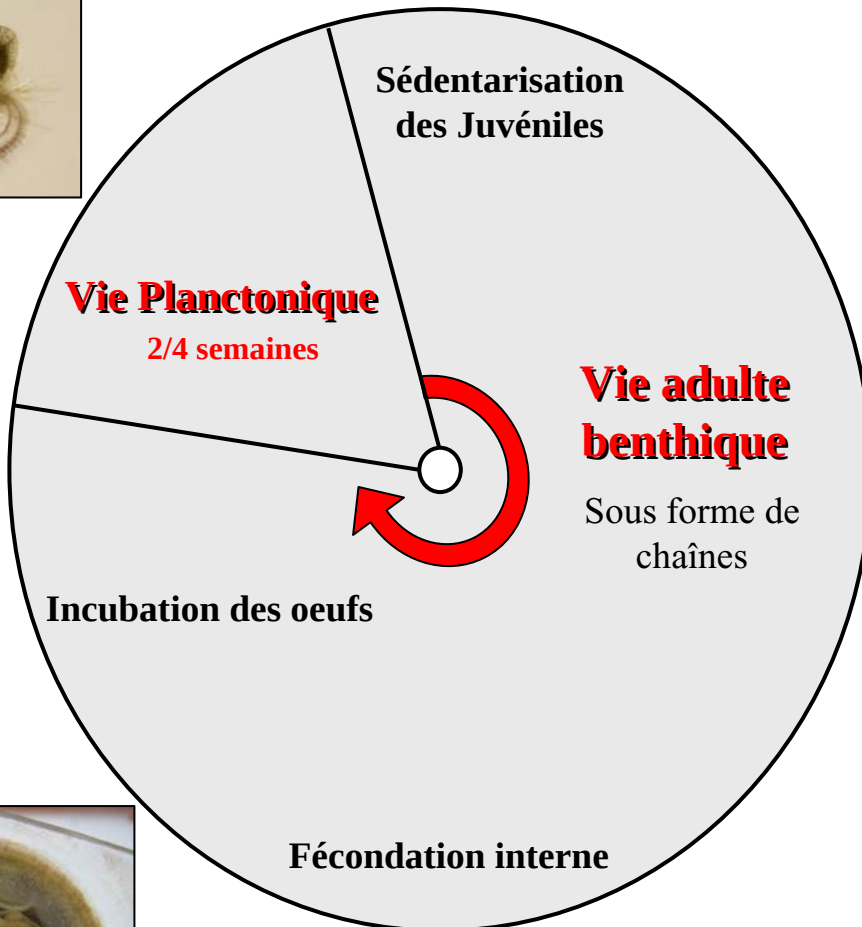
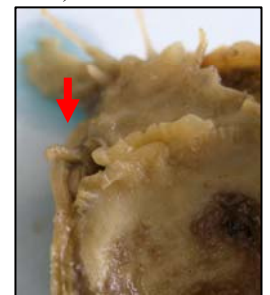
(4) Juvénile La sédentarisation a lieu à une taille d'environ 900-1000µm en réponse à différents inducteurs tels que la présence d'individus adultes conspécifiques.

(5) Mâle Première étape sexuée dans le cycle de vie des adultes (la flèche rouge indique le pénis)



Changement de sexe (facultatif)

(6) Femelle: les mâles peuvent changer de sexe et devenir femelles définitivement (la flèche indique la papille génitale).



(2) Femelle incubant une ponte Les pontes sont constituées de capsules refermant chacune des embryons. Au total une ponte peut contenir 20-60 capsules et en moyenne 7500 oeufs



(1) Chaîne: Agrégation de plusieurs individus au sein duquel a lieu une copulation (le pénis du mâle situé au dessus de la femelle est visible en noir)

1999). Compte-tenu de l'importance de la polyandrie chez *C. fornicata* et du nombre croissant d'études soulignant le rôle d'effets paternels sur les caractéristiques des embryons, larves ou juvéniles chez des espèces marines (voir par exemple le cas de *Melanogrammus aeglefinus* sur les traits d'histoires de vie embryonnaires et larvaires tels que le succès à l'éclosion ou la taille des larves, Rideout *et al.* 2004), nous avons voulu étudier la relation potentielle entre la polyandrie et le patron de variabilité de taux de croissance intra ponte observé.

Problématique 1 - J'ai cherché à déterminer si les patrons de paternité observés chez *C. fornicata* pouvaient expliquer la variance de taux de croissance larvaire observée au sein des descendance. Ces travaux ont été réalisés en mesurant le taux individuel de croissance de larves issues de 6 pontes pour lesquelles les profils de paternités ont été déterminés à l'aide marqueurs microsatellites déjà développés chez cette espèce (Dupont *et al.* 2003, 2006).

I-D-1-b. Importance de la polyandrie chez différentes espèces du genre *Crepidula*

Comme nous l'avons déjà mentionné (cf. paragraphe I-2-3), la grégarité est un trait d'histoire de vie permettant de faciliter la rencontre et la reproduction chez des individus benthiques peu mobiles. **La grégarité est également un comportement fondamental dans le déterminisme du changement de sexe notamment au travers de son influence sur les valeurs reproductives des individus des deux sexes.**

Si de nombreuses expériences en laboratoire ont été réalisées chez différentes espèces de crépidules en vue d'analyser les facteurs jouant sur le changement de sexe, les modalités de la reproduction *in situ* sont en revanche encore mal connues, en particulier concernant l'importance de la polyandrie dans le milieu naturel. Deux espèces seulement ont été étudiées : *C. fornicata* (Dupont *et al.* 2006, Proestou *et al.* 2008) et *C. coquimbensis* (Brante 2007, Brante *et al.* In prep). Des analyses de paternité conduites chez deux taxons ont révélé que les femelles étaient dans la grande majorité des cas (respectivement 80 % et 100 % chez ces deux espèces) fécondées par de multiples pères. Ces deux espèces sont caractérisées par un comportement grégaire favorisant la proximité des mâles et des femelles qui pourrait expliquer ces taux importants de paternités multiples. Sachant les liens étroits entre protandrie

et succès reproducteur des individus, une hypothèse alternative est que la polyandrie est une caractéristique du genre *Crepidula*.

Problématique 2 - J'ai conduit une analyse de paternité chez une nouvelle espèce, *Crepidula convexa*, afin de tester l'hypothèse de limitation de la polyandrie, qui pourrait être due au comportement aggrégatif nettement moins prononcé chez cette espèce par rapport à *C. fornicata* et *C. coquimbensis*.

I-D-2. LA PROTANDRIE EN MILIEU NATUREL : ETUDE D'UNE POPULATION

INTRODUITE DE *CREPIDULA FORNICATA*

I-D-2-a. Relations entre la dynamique de changement de sexe et la dynamique démographique dans une population naturelle en Baie de Morlaix.

La plupart des études sur les stratégies de changement de sexe ont été réalisées grâce à des analyses comparées de plusieurs espèces ou groupes (Allsop & West 2003a, Allsop & West 2003b, Collin 2006, Molloy *et al.* 2007) ou par l'étude de certains paramètres modulant la structure sociale locale (voir par exemple Warner & Swearer 1991, Baeza & Bauer 2004, Munoz & Warner 2004). Quelques rares études ont néanmoins été réalisées sur l'évolution temporelle du changement de sexe démontrant l'influence marquée de la saisonnalité de la dynamique de la population sur la dynamique de changement de sexe (Bergström 1997, Baldwin & Bauer 2003). Cependant ces études portaient sur des espèces qui n'ont pas de structures sociales locales ou ne forment pas de groupes reproducteurs clairs (Tableau I-1).

Crepidula fornicata représente un excellent modèle pour étudier l'influence du sex-ratio local sur le déterminisme du changement de sexe et son évolution au cours du temps. En effet, cette espèce est longévive (jusqu'à 10 ans Chipperfield 1951) et les individus adultes ont la particularité de s'associer pour former des groupe pérennes pouvant atteindre une quinzaine d'individus. Du fait du caractère protandre de cette espèce associé à la longévité des adultes et la pérennité de l'assemblage, les groupes (appelés « chaînes ») présentent de façon schématique des individus grands et âgés, **en général femelles, à la base de la chaîne et des**

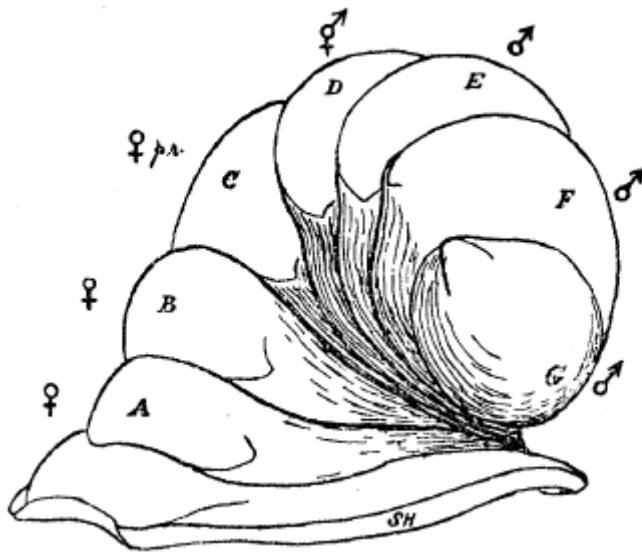


Figure I-3: Dessin schématique d'une chaîne de *C. fornicata* issue de Orton (1909)

Chaque individu est indiqué par une lettre (de A à G) et le sexe des individus par un sigle: ♂ (mâle), ♀pr. (individu en transition sexuelle), ♀pr. (femelle présentant un pénis en régression) et ♀ (femelle)

individus plus jeunes (mâles) au sommet (chaîne, Figure I-3). Les analyses de paternité réalisées précédemment sur cette espèce (Dupont *et al.* 2006) ont permis de montrer que les pères sont localisés à plus de 90% dans la chaîne de la mère, suggérant que ces chaînes d'individus sont également des groupes reproducteurs indépendants. Par ailleurs, des études en laboratoire ont montré que le déterminisme du changement de sexe de *C. fornicata* est largement sous la dépendance du sex-ratio au sein de ces chaînes (Coe 1938, Hoagland 1978). Enfin, des études du sex-ratio dans des populations naturelles établies en Bretagne (études menées dans le cadre des thèses de Lise Dupont (2004) en baie de Morlaix et de Joelle Richard (2005) en rade de Brest) ont montré un chevauchement important de la taille des individus mâles et femelles, qui suggère que le modèle d'allocation au sexe n'explique que partiellement les modalités de changement de sexe chez cette espèce. Un suivi de la population de Morlaix a été poursuivi pour étudier la dynamique démographique et sexuelle de la crépidule en population naturelle.

Problématique 3 - Je me suis intéressée à préciser si et comment la dynamique démographique d'une population (recrutement, mortalité) de crépidules pouvait se répercuter sur la dynamique de la protandrie à l'échelle de la population ou au sein des groupes reproducteurs (i.e. chaînes d'individus). Pour cela, j'ai obtenu et analysé des données issues d'un suivi temporel mené sur 40 mois. Une analyse de la structure démographique de la population a été tout d'abord réalisée avant de la mettre en perspective des caractéristiques sexuelles (taille des deux sexes, sex-ratio etc...) de la population.

I-D-2-b. Effet d'un épibionte sur la fertilité femelle et implication potentielle sur la dynamique de changement de sexe dans une population de *Crepidula fornicata*

D'après la théorie d'allocation au sexe, chez les hermaphrodites séquentiels, tout paramètre pouvant jouer sur la valeur reproductive d'un individu est susceptible d'influencer le moment de son changement de sexe. Par exemple, Schärer & Vizoso (2003) ont montré que chez le poisson protogyne *Thalassoma bifasciatum*, le parasite *Kudoa ovivora* se développant



Figure I-4: Coquilles de crépidules avec et sans marques de *Cliona* sp.

(A) coquille infestée par l'éponge perforante *Cliona* sp. qui y creuse des réseaux de cavités visibles de l'extérieur (tâches noires) et pouvant s'étendre jusqu'à la lamelle interne en comparaison d'une coquille vierge de toute infestation (B)

dans les œufs réduisait le succès reproducteur femelle. Un suivi en milieu naturel de femelles infectées et non-infectées leur a ensuite permis de mettre en évidence un changement de sexe des femelles parasitées à une taille plus petite que la taille des femelles non-parasitées.

Les crépidules localisées en baie de Morlaix présentent souvent des coquilles fortement altérées sous l'effet d'une **éponge perforante *Cliona sp.*** (Figure I-4) qui se développe sur un grand nombre de mollusques ainsi que sous forme libre dans le milieu naturel. Lors d'observations préliminaires que j'ai réalisées lors des mesures obtenues dans le cadre du suivi temporel (Chapitre B-1&2), j'ai constaté que cette éponge semblait affecter grandement l'intégrité de la coquille et de l'organisme. Les crépidules développent notamment **des processus de « résistance/réparation »** en produisant du matériel calcaire supplémentaire pour réparer les coquilles et limiter l'invasion de l'éponge sur la face interne de la coquille. Outre des effets de mortalité accrue, cette allocation d'énergie supplémentaire à la croissance pourrait se traduire par une diminution d'allocation à la reproduction, avec des conséquences possibles sur la dynamique de changement de sexe.

Problématique 4 : Compte-tenu de l'impact potentiel de l'éponge *Cliona sp.*, j'ai cherché à mieux quantifier la prévalence de cette éponge dans la population naturelle étudiée en baie de Morlaix et essayer de déterminer si elle pouvait avoir une influence sur la dynamique des populations ainsi que sur le déterminisme du changement de sexe *in situ* (Cf Chapitre B-2).

Ce manuscrit est structuré en deux parties principales :

- *Partie II correspondant aux problématiques 1 et 2 présentées dans le paragraphe I-D-1*
- *Partie III correspondant aux problématiques 3 et 4 présentées dans la paragraphe I-D-2.*

Dans chacune de ces parties, pour chaque étude faisant l'objet d'un article (publiés ou en préparation), une courte introduction de contexte général, permettant d'apporter des informations et illustrations complémentaires à l'article, ainsi qu'un résumé détaillé seront présentés en français en préambule de l'article rédigé en anglais.

PARTIE II :

LA POLYANDRIE AU SEIN DU GENRE *CREPIDULA*

**Caractérisation des patrons de paternités en
population naturelle par des assignations génétiques**

L'étude des avantages découlant de la polyandrie est encore assez limitée chez les invertébrés marins mais a suscité ces dernières années un intérêt croissant (Evans & Marshall 2005, Evans *et al.* 2007, Marshall & Uller 2007, Marshall & Evans 2007). Ces différents auteurs ont notamment démontré, en comparant les succès à la fécondation et des caractères embryonnaires ou larvaires en fonction des patrons de reproduction, une potentielle augmentation de la valeur reproductive moyenne des femelles sous l'effet de la polyandrie. Les processus de reproduction et les avantages liés à la polyandrie dépendent intimement du mode de vie, caractère très diversifié chez les invertébrés marins. Par exemple, chez une espèce sessile à fécondation externe, *Galeolaria caespitosa*, la polyandrie confère un avantage dans la mesure où elle diminue les risques de fécondation des ovules par un sperme génétiquement incompatible (Marshall & Evans 2005). Chez le gastéropode *Littorina saxatilis* caractérisé par une fécondation interne, l'évolution de la polyandrie chez cette espèce serait en revanche liée à un avantage de « bet-hedging » génétique, permettant d'éviter la consanguinité dans une situation où la reconnaissance d'individus apparentés est impossible (Makinen *et al.* 2007).

A de rares exceptions près, les analyses expérimentales visant à étudier les effets de la polyandrie ont été obtenues pour des espèces à fécondation externe chez qui il est possible de réaliser des croisements expérimentaux en conditions contrôlées limitant ainsi l'effet de facteurs confondants. A titre d'exception, Sprenger *et al.* (2008a) ont récemment étudié un gastéropode hermaphrodite simultané à fécondation interne, *Chelidonura sandrana* chez qui ils ont comparé différents paramètres dans la descendance de « femelles » accouplées 4 fois soit avec le même partenaire soit avec 4 partenaires différents. Ces auteurs ont ainsi démontré que la reproduction avec des partenaires différents résulte en une taille relative plus importante des caspules ovigères et des individus véligères (Figure II-1). Néanmoins, d'une manière générale le maintien d'élevage d'espèces à fécondation interne en laboratoire (par exemple pour obtenir de génération F1 ou F2) ou la réalisation de schémas expérimentaux de croisements restent difficiles à mettre en place et surtout ne permettent pas de contrôler certains facteurs importants tel que la fécondation effective lors d'une copulation.

Le développement des techniques moléculaires d'assignation de parenté peut permettre d'étudier les modalités de la reproduction chez des espèces à fécondation interne, à condition que les descendances soient facilement accessibles (échantillonnables ou cultivables). Ces approches ont tout d'abord permis de caractériser les mécanismes de reproduction des espèces en population naturelle. Les études génétiques portant sur les

modalités de reproduction *in situ* sont encore peu nombreuses chez les invertébrés marins en comparaison des données empiriques disponibles dans le reste du monde animal, en particulier chez les vertébrés et les insectes (Birkhead 1998, Arnqvist & Nilsson 2000). Les résultats disponibles soulignent néanmoins que la polyandrie est communément observée (e.g. Shaw & Sauer 2004, Toonen 2004, Gosselin *et al.* 2005, Johnson & Yund 2007 pour revue voir Baur 1998). En particulier, les espèces à fécondation interne, chez qui les femelles ont la possibilité de choisir des partenaires ou d'exercer un biais reproductif post copulatoire, présentent des patrons de paternités multiples intra-ponte impliquant un grand nombre de pères (3.5 pères par ponte en moyenne chez le gastéropode *Busycon carica*, Walker *et al.* 2007; 3 à 8 pères par ponte chez *Littorina saxatilis* Makinen *et al.* 2007 et 4 à 6 chez *Littorina obtusata*, Paterson *et al.* 2001).

Les techniques d'assignation de paternité offrent également l'opportunité d'étudier les conséquences des patrons de polyandrie sur les traits d'histoires de vie de la descendance chez les espèces marines à fécondation interne. Certes, cette méthode comporte l'inconvénient de ne pas contrôler certains paramètres pouvant induire des biais reproductifs entre les mâles, comme par exemple le volume éjaculé, mais elle présente l'avantage de pouvoir estimer des caractéristiques de la descendance en réponse à des patrons de reproduction réalisés en conditions naturelles. Sur ce point, Simmons *et al.* (2007) ont par exemple montré chez le criquet *Requena verticalis*, espèce modèle dans l'étude des avantages de la polyandrie chez les insectes, que la monopolisation totale de la paternité par le premier mâle observée en laboratoire ne se retrouvait pas en population naturelle.

Dans ce contexte, j'ai choisi au cours de cette thèse d'étudier les modalités de la polyandrie chez deux espèces hermaphrodites protandres afin, d'une part de vérifier un potentiel avantage de la polyandrie sur la variabilité d'un trait larvaire important, le taux de croissance, chez *Crepidula fornicata*. Cette partie sera présentée en chapitre II-A. D'autre part, nous avons étudié pour la première fois les modalités de la reproduction *in situ* de l'espèce *Crepidula convexa*. Ces résultats s'inscrivent dans un cadre plus large visant à étudier les liens entre les comportements de polyandrie, de grégarité, et le mode de dispersion, grâce à une interprétation de mes résultats en regard des données disponibles chez deux autres espèces proches, *C. fornicata* et *C. coquimbensis*. Cette étude sera présentée en chapitre II-B. Dans chacun de ces deux chapitres, les schémas de paternité ont été obtenus par des méthodes d'assignations de parenté dont le principe est rappelé dans l'encadré II-1.

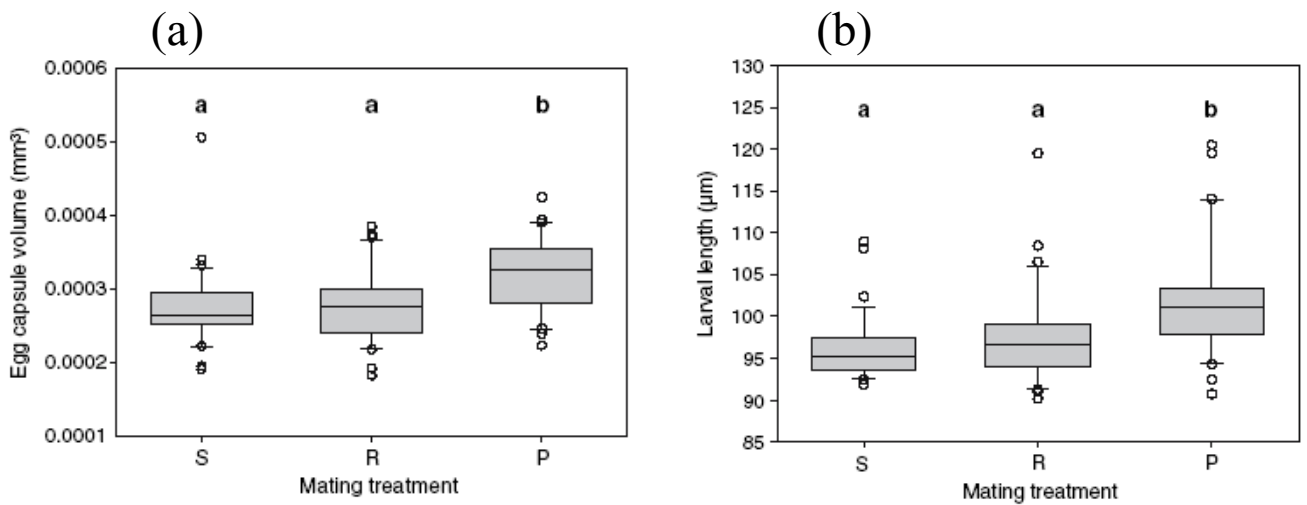


Figure II-1: Effet significatif des conditions expérimentales de reproduction chez l’hermaphrodite *Chelidonura sandrana*. (S: une copulation; R : 4 copulations avec le même partenaire; P: copulations avec 4 partenaires) sur (a) le volume de la capsule ovigère et (b) la taille larvaire. Figure issue de Sprenger et al (2008)

ENCADRE II-1 ; PRINCIPE DES ASSIGNATIONS DE PATERNITE

L'assignation de parenté est une méthode qui consiste à reconstituer des schémas de parenté mère-descendant-père à partir des génotypes de la mère, des descendants et potentiellement des pères candidats. Un des préalables à des assignations de paternité est donc l'obtention des profils génétiques des individus à des locus neutres codominants et à ségrégation mendélienne.

Afin de définir le pouvoir résolutif des assignations, la probabilité d'exclusion est calculée pour chaque locus à partir des fréquences alléliques selon le procédé suivant (Weir 1996):

Lorsque le génotype maternel à un locus est A_xA_x avec une probabilité de p_x^2 , la probabilité du génotype A_xA_x du descendant sachant la mère est p_x . Ainsi la probabilité de ce couple mère-descendant est de $p_x^2 \cdot p_x$ et cette combinaison exclue tout mâle ne présentant pas l'allèle A_x et dont la fréquence est de $(1 - p_x)^2$. La probabilité de ce trio mère-descendant-père exclu est donc de $p_x^3(1 - p_x)^2$. La probabilité d'exclusion d'un locus (Q_i) est calculée par la somme des probabilités des trios correspondant à toutes les combinaisons mère-descendant possibles et la probabilité d'exclusion de l'ensemble des locus utilisés est égale à $Q = 1 - \prod_i (1 - Q_i)$.

Le pouvoir résolutif des assignations augmente d'une part avec le polymorphisme des loci et d'autre part avec le nombre de locus utilisés.

Une des méthodes utilisées pour les assignations de paternité est basée sur une analyse de vraisemblance qui consiste à prendre des données comme point de départ et d'évaluer des hypothèses en fonction de ces données. Dans le contexte des analyses de paternités, les données sont les génotypes des descendants, de la mère et des pères candidats échantillonnés ou reconstruits sur la base du modèle de ségrégation d'allèles mendélien. Pour chaque père candidat, les hypothèses alternatives sont : (i) le père testé est le vrai père, (ii) le père testé n'est pas le vrai père.

Pour chaque père candidat, un rapport de vraisemblance est déterminé par le calcul du logarithme de vraisemblance (ou « LOD score » pour « logarithm of the odds ratio ») correspondant à la vraisemblance (probabilité conditionnelle) d'un individu d'être le parent d'un descendant donné, divisée par la vraisemblance qu'un mâle pris au hasard dans la population soit le père. L'assignation des descendants se fait par sur la base des « LOD scores » les plus élevés.

Avec plusieurs locus et plusieurs pères potentiels, les calculs sont rapidement difficiles à réaliser manuellement. De plus ils sont complexifiés en fonction de sources de doutes (ex. échantillonnage de tous les pères potentiels ou d'une fraction seulement) ou d'erreurs (ex. erreurs de génotypages). Des modèles mathématiques de plus en plus complexes ont ainsi été développés et des logiciels y sont associés.

Au cours de cette thèse, les assignations de paternité ont été menées grâce aux logiciels :
Gerud 1.0 ({Jones, 2001 #399} ; <http://www.bio.tamu.edu/USERS/ajones/JonesLab.htm>)
Cervus 2.0 ({Marshall, 1998 #54} ; <http://www.fieldgenetics.com>)
COLONY 2.0 ({Wang, 2004 #473} ; www.zoo.cam.ac.uk/ioz/software.htm)

Chacun ayant des spécificités particulières. Par exemple, GERUD permet de reconstituer les familles de demi-frères même en absence de pères. Cervus propose des tests statistiques permettant de donner une valeur de LODscore minimale à considérer. COLONY permet de reconstituer l'ensemble des génotypes parentaux en intégrant des sources techniques d'erreur.

L'ensemble de ces paramètres offre des indications précieuses sur les stratégies de reproduction au sein des espèces, en terme d'accessibilité des partenaires, de promiscuité des femelles, de biais à la reproduction entre les mâles et des caractéristiques individuels pouvant l'expliquer.

CHAPITRE II-A : RELATION ENTRE POLYANDRIE ET VARIABILITE DU TAUX DE CROISSANCE LARVAIRE CHEZ *C.*

FORNICATA

II-A-1. CONTEXTE DE L'ETUDE

A l'échelle d'un ensemble de populations, la dispersion est un processus complexe qui détermine la dynamique et l'évolution de la structure spatiale (Ronce 2007) et constitue une étape du cycle de vie particulièrement sensible pour les organismes sessiles tels que les invertébrés marins à cycle benthopélagique (Levin & Bridges 1995). Compte tenu de l'importante variabilité de l'environnement pélagique où évoluent les larves, la sélection de traits larvaires diversifiés peut permettre d'augmenter la survie moyenne à l'échelle d'une descendance et de favoriser différentes échelles de dispersion. Par exemple, Toonen & Pawlik (2001) ont étudié les larves d'un polychète *Hydroides dianthus*, qui présentent au sein d'une même descendance, un polymorphisme comportemental avec d'un côté, la plupart des larves qui se sédentarisent en réponse à des signaux émis par les populations adultes (« larves agrégatives ») et d'un autre côté, une petite partie d'entre elles qui se sédentarisent sur des substrats vierges d'adultes même après qu'il leur ait été donné l'opportunité de rejoindre un groupe d'adultes (« larves fondatrices »). Ils démontrent que la proportion intra-ponte de larves fondatrices est un caractère héritable et ce patron pourrait induire, à l'échelle d'une population, qu'une petite proportion de larves colonise de nouveaux habitats permettant l'attraction, dans un deuxième temps, de nouveaux individus. Par ailleurs, Une variabilité accrue de certains traits larvaires comme la croissance ou l'acquisition de la compétence à la métamorphose est également à l'origine de différences temporelles dans le moment de la sédentarisation, de telle manière qu'en cas de conditions défavorables, toutes les larves ne subiront pas un échec consécutif à leur sédentarisation conjointe. Une des bases d'une telle variabilité pourrait reposer sur la diversité génétique induite par les modalités de reproduction des adultes et notamment la polyandrie.

Dans cette partie de ma thèse, je me suis attachée à étudier le rôle de la paternité multiple dans la variabilité du taux de croissance larvaire observée au sein d'une ponte chez *Crepidula fornicata*. Les larves de crépidules sont émises à une taille d'environ 410µm et, en conditions contrôlées, grandissent de façon relativement constante jusqu'à atteindre la

compétence à la métamorphose. Ce processus a lieu à dans un intervalle de taille restreint (800-1000 μ m Pechenik & Heyman 1987). Ainsi il existe une relation linéaire inverse entre le taux de croissance et la durée de vie larvaire chez la crépidule (Figure II-A-1, Pechenik 1984, Pechenik & Lima 1984, Lima & Pechenik 1985). Ce paramètre, utilisé ici comme indicateur du potentiel de dispersion (Pechenik 1999), est extrêmement variable à l'échelle de l'espèce mais également à l'échelle d'une descendance. En effet, comme présenté sur la Figure II-A-2a, les taux de croissance larvaires mesurés pour des larves collectées dans le milieu s'échelonnent approximativement entre 50 et 150 μ m par jour. Sur la Figure II-A-2b, on constate que la gamme de variation des taux de croissance des individus issus d'une même ponte peut également être substantielle, par exemple dans la descendance II, on observe une différence d'un facteur 3 entre les taux de croissance extrêmes (14 à 48 μ m.j⁻¹). Enfin, Hilbish *et al.* (1999) ont estimé l'héritabilité de la croissance larvaire à 0.35 signifiant qu'une partie non négligeable de la variance phénotypique pouvait être expliquée par des composantes génétiques

La plupart des études mettant en évidence l'augmentation de la valeur reproductive moyenne des femelles sous l'effet de la polyandrie témoigne de l'accroissement de la valeur moyenne d'un trait avantageux au sein de la descendance (Marshall & Evans 2005, Sprenger *et al.* 2008a, Sprenger *et al.* 2008b). Pourtant, bien qu'un accroissement de la diversité dans la descendance soit une conséquence découlant intuitivement de la polyandrie, la sélection d'un tel mécanisme en réponse à des conditions environnementales variables a été peu étudiée.

Mettre en parallèle les performances larvaires et le profil de paternités observé au sein des descendance nous permettra de préciser dans quelle mesure la variabilité des taux de croissance intra-ponte peut être expliquée par les patrons de reproduction des femelles. Cette étude a fait l'objet d'une publication rédigée en anglais dont les principaux résultats sont résumés ci-dessous.

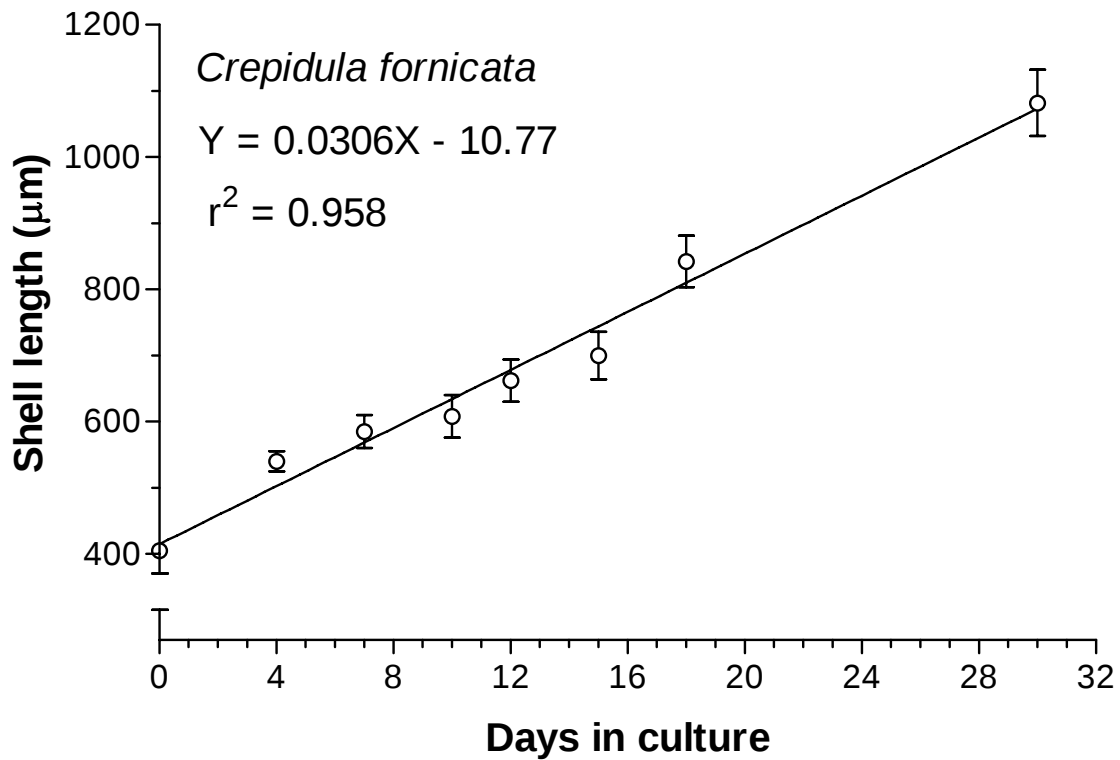


Figure II-A-1. Relation entre taille de la coquille et l'âge de la larve (jour) à 20°C; chaque point représente la moyenne et l'écart-type de 15 à 22 mesures (données de Pechenik 1978); graphique issu de Pechanik & Levine (2007).

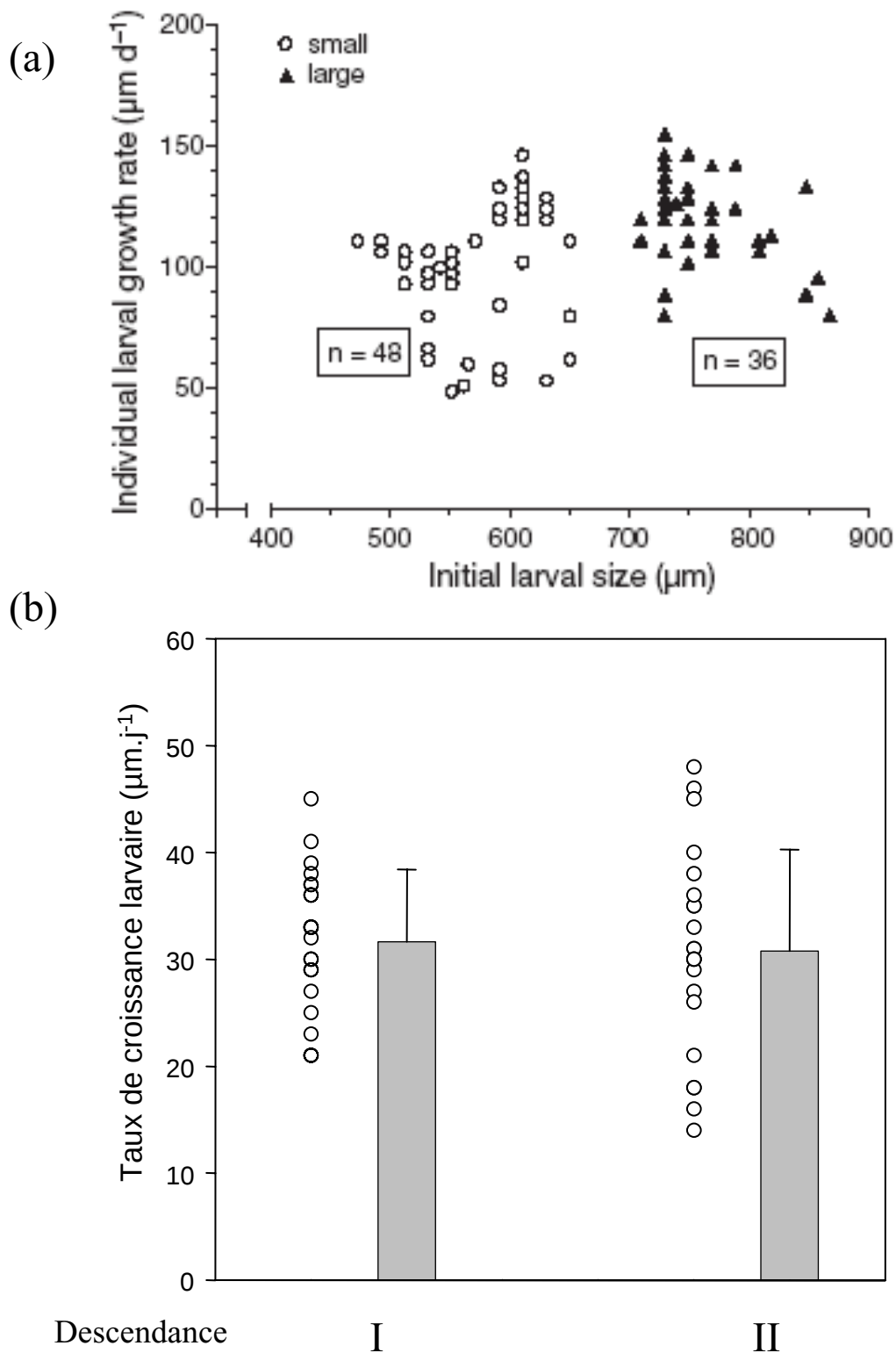


Figure II-A-2: Taux de croissance larvaire chez *Crepidula fornicata* (a) Distribution des taux de croissance individuels en fonction de la taille initiale à partir d'un échantillon issu d'un prélèvement de plancton en Juillet 1994 dans la baie de Narragansett (USA). Figure issue de Pechenik et Levine (2007). (b) Taux de croissance individuels mesurés au sein de 2 descendance (N=24 par ponte, ronds blancs) et la moyenne et écartype de cette distribution (histogramme), données issues de la thèse de François Rigal (2009)

II-A-2. SYNOPSIS DE L'ARTICLE 1: FAST VS .SLOW LARVAL GROWTH IN AN

INVASIVE MARINE MOLLUSC: DOES PATERNITY MATTER?

**Mathilde Cagnon a contribué à ce travail dans le cadre d'un stage Master 2 ENS Lyon réalisé de Septembre 2007 à Janvier 2008.*

L'objectif de cette expérience était d'évaluer le rôle de la polyandrie dans la variance intra-ponte des taux de croissance larvaire chez *Crepidula fornicata*, en vérifiant si les croissances larvaires lentes vs. rapides observées au sein d'une descendance pouvaient être liées à l'identité paternelle et/ou si la gamme de variation des taux de croissance était corrélée au nombre de pères participants.

Nous avons échantillonné des chaînes de crépidules dans une population naturelle de la baie de Morlaix (Bretagne Nord, France) et pour six d'entre elles, la descendance d'une femelle a été isolée en laboratoire durant une semaine environ afin de ségréger les larves en deux groupes : 41 à croissance rapide et 41 à croissance lente pour chaque descendance. Les génotypes des larves (437 au total), de leur mère (6) et des individus associés (93 mâles, femelles et individus en transition sexuelle) au sein des chaînes maternelles ont été obtenus avec 4 loci microsatellites. Le fort polymorphisme des marqueurs utilisés nous a permis de réaliser des assignations de paternité avec une probabilité d'exclusion supérieure à 0.99. Nous avons ainsi pu déterminer le nombre de pères participant à la descendance, leurs contributions relatives à la progéniture dans son ensemble ainsi qu'aux deux catégories de larves (i.e. croissance lente ou rapide).

Nos résultats ont montré que la polyandrie est présente chez toutes les descendances analysées mais que son intensité est variable avec un nombre de pères variant de 2 à 5 pères et en moyenne 3.3 pères par descendance. Ces pères appartiennent pour la plupart (17 sur 20) à la même chaîne que la mère. Les pères assignés étaient au moment de l'échantillonnage des mâles, des individus en transition ou des femelles, une caractéristique s'expliquant par la réversion sexuelle de cette espèce protandre et la capacité de stockage spermatique des mères (cf Figure II-A-3). La capacité de changer de sexe associée à un comportement hautement agrégatif (formation de chaîne) est parmi les traits d'histoire de vie contribuant à maximiser le degré de paternité multiple chez *C. fornicata* comme l'ont montré différentes études antérieures. Par ailleurs, notre étude montre que la contribution relative des différents pères est inégale au sein d'une ponte avec un ou deux individus fécondant une majorité de

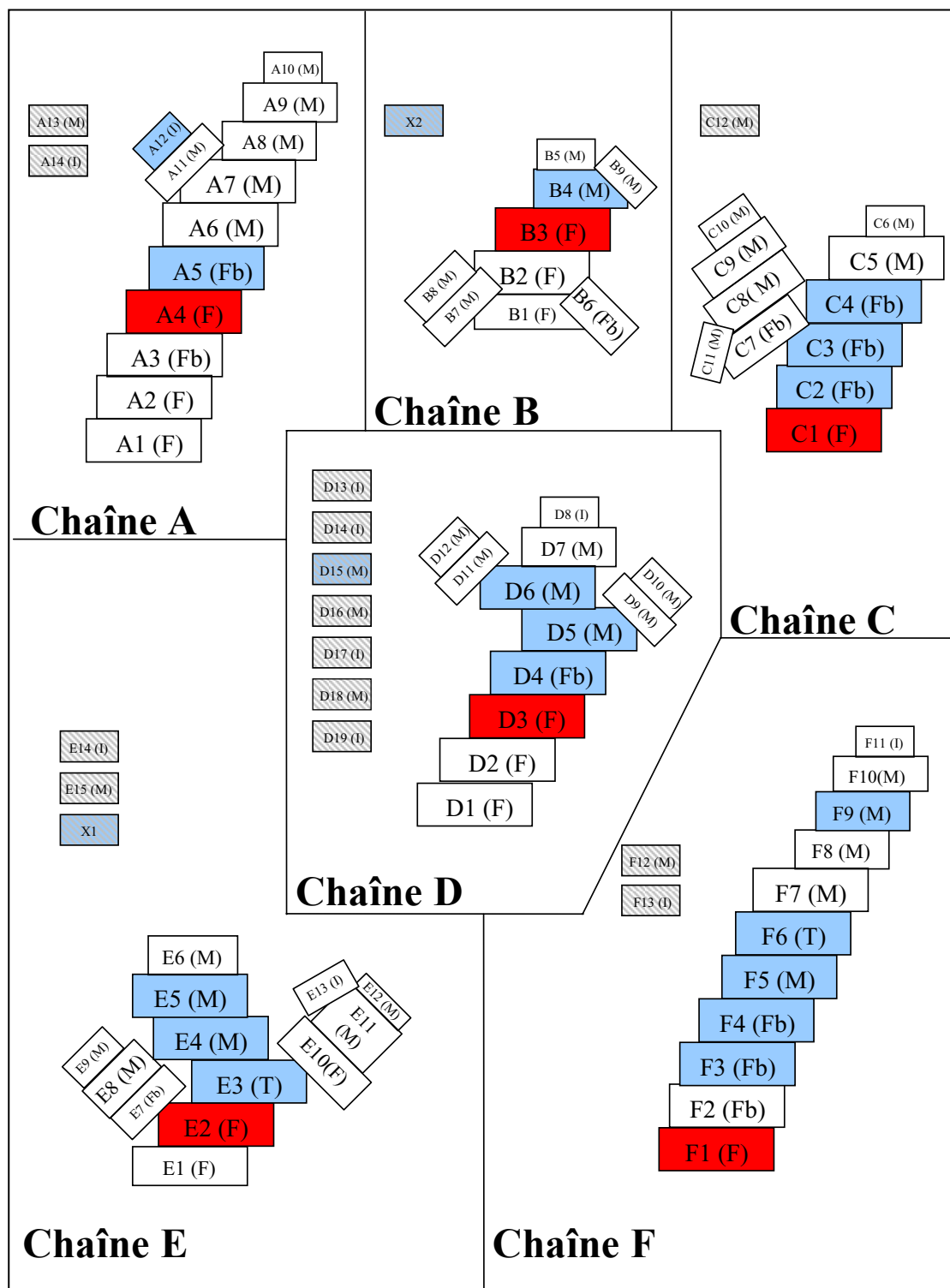


Figure II-A-3: Représentation schématique de la composition des chaînes utilisées pour l'analyse de paternité dans l'article 2. Chaque rectangle représente un individu pour lequel est précisé l'identité (Numéro de chaîne + numéro d'individu, Ex: C1) et le sexe (F, M, T ou I). La taille des rectangles est proportionnelle à la taille réelle des individus. Les individus rouges correspondent aux femelles dont les descendance ont été analysées et les rectangles bleus, les père identifiés. Les rectangles hachurés en marge des chaînes indiquent les individus dont la position n'est pas disponible, soit parce qu'ils ont bougé de la chaîne durant leur maintien en laboratoire, soit ils sont fictifs et correspondent aux père identifiés sur la base des analyses de paternité mais non échantillonnés. Dans ce dernier cas, ils sont notifiés x1 par exemple.

descendants dans 5 des 6 progénitures analysées. Les patrons de polyandrie chez la crépidule sont de niveaux variables en termes de nombre de mâles et il existe un biais du succès reproducteur entre les pères d'une même ponte ; ces résultats corroborent également les données présentes dans la littérature.

Par la mesure individuelle des taux de croissance des larves assignées, nous avons pu mettre en évidence que sur ce caractère, l'identité paternelle n'est pas un paramètre déterminant. Seuls 3 pères parmi les 20 identifiés au total ont engendré des larves issues uniquement d'une des 2 catégories et ils contribuaient de façon minime à la descendance. Par ailleurs, le seul nombre de pères participant à la ponte n'explique pas entièrement la gamme de variation de taux de croissance au sein d'une descendance. En revanche, en considérant des indices intégrant à la fois le nombre de pères et leurs contributions relatives, comme l'apparement intra-ponte ou la diversité des paternités (indice de diversité de Shannon et Weaver sur les contributions paternelles), nous avons démontré que plus un grand nombre de pères contribuant de manière substantielle était détecté, plus la gamme de variation des croissances larvaires était importante.

Compte tenu de la variabilité de l'environnement dans lequel évoluent les larves pélagiques, une augmentation de la variabilité de traits larvaires contribuant au succès de la sédentarisation, tels que la croissance, pourrait contribuer à accroître le succès reproducteur des femelles. Dans ce contexte, les résultats obtenus constituent un des rares constats montrant que l'augmentation de la diversité dans la descendance *via* la polyandrie pourrait conférer un avantage reproductif pour les femelles. Pour conforter cette hypothèse, il serait néanmoins intéressant de pouvoir manipuler le nombre de pères expérimentalement, un travail néanmoins très difficile à mener à bien chez une espèce à fécondation interne telle que *C. fornicata*.

II-A-3. « FAST VS. SLOW LARVAL GROWTH IN AN INVASIVE MARINE MOLLUSC:

DOES PATERNITY MATTER? »

Auteurs: Sabrina Le Cam, Jan A. Pechenik, Mathilde Cagnon & Frédérique Viard
Article sous presse dans “*Journal of Heredity*”

Fast versus Slow Larval Growth in an Invasive Marine Mollusc: Does Paternity Matter?

SABRINA LE CAM, JAN A. PECHENIK, MATHILDE CAGNON, AND FRÉDÉRIQUE VIARD

From the UPMC Université Paris 06, UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique, Roscoff 29682, France (Le Cam, Cagnon, and Viard); the CNRS, UMR 7144, Team Div & Co, Station Biologique, Roscoff 29682, France (Le Cam, Cagnon, and Viard); and the Department of Biology, Tufts University, Medford, MA 02155 (Pechenik).

Address correspondence to Sabrina Le Cam at the address above, or e-mail: lecam@sb-roscoff.fr.

Abstract

Reproductive strategies and parental effects play a major role in shaping early life-history traits. Although polyandry is a common reproductive strategy, its role is still poorly documented in relation to paternal effects. Here, we used as a case study the invasive sessile marine gastropod *Crepidula fornicata*, a mollusc with polyandry and extreme larval growth variation among sibling larvae. Based on paternity analyses, the relationships between paternal identity and the variations in a major early life-history trait in marine organisms, that is, larval growth, were investigated. Using microsatellite markers, paternities of 437 fast- and slow-growing larvae from 6 broods were reliably assigned to a set of 20 fathers. No particular fathers were found responsible for the specific growth performances of their offspring. However, the range of larval growth rates within a brood was significantly correlated to 1) an index of sire diversity and 2) the degree of larvae relatedness within broods. Multiple paternity could thus play an important role in determining the extent of pelagic larval duration and consequently the range of dispersal distances achieved during larval life. This study also highlighted the usefulness of using indices based on fathers' relative contribution to the progeny in paternity studies.

Key words: larval dispersal, life-history traits, marine invader, paternity analysis, protandry

Early life-history traits, including those determined by conditions experienced early in development, can profoundly influence recruitment success and overall population dynamics (Benton et al. 2006). This has been notably demonstrated in marine species (Roughgarden et al. 1988; Pechenik 2006) for which, in addition, parental effects on early life-history traits have been documented with a special emphasis on maternal effects (i.e., nongenetic effects of the maternal environment and phenotype; reviewed in Marshall et al. 2008). Paternal genetic effects (additive or nonadditive) or paternal environmental effects (Yasui 1998; Jennions and Petrie 2000; Garcia-Gonzalez and Simmons 2007) have been much less studied because they were first believed to have less influence than maternal contributions (e.g., through egg provisioning). Moreover, experimental crosses are difficult to carry out in most marine species, particularly for those with internal fertilization. Despite such theoretical expectations and practical limitations, the paternal influence on early life-history traits has been documented for some taxa, mainly fishes (e.g., Bang et al. 2006; see also Trippel et al. 2005 and references therein) but also in some

invertebrates, for example, in tunicates (e.g., Marshall and Evans 2007).

Considering early life-history traits, polyandry (i.e., females mate with more than 1 male) could play a significant role in conferring fitness benefits due to the intrinsic genetic quality of males, beneficial interactions between maternal and paternal genotypes, or through paternal environmental effects (Yasui 1998; Simmons 2005). For instance, polyandry was shown to contribute to an increase of hatchling size (e.g., Sprenger, Faber, et al. 2008), embryonic viability (e.g., Garcia-Gonzalez and Simmons 2005), and offspring size (e.g., Sprenger, Anthes, and Michiels 2008; Sprenger, Faber, et al. 2008). These effects all conferred a potential increase of female mean fitness through a greater average value for the trait under consideration within a set of siblings. Yet, for some characteristics, the range of variation might be more important than the average value: considering larval phase in benthopelagic life cycles, which characterizes 55–85% of marine invertebrates (Thorson 1950), larvae that spend more time in the plankton may be particularly good dispersers as compared with larvae that are able to

metamorphose sooner and recruit in the vicinity of the parental populations (Marshall and Keough 2003). In unpredictable environments like the seawater column, multiple mating can provide genetic benefits to females as a more genetically diverse clutch decreases both the risk of reproductive failure and the sibling competition (Yasui 1998; Zeh AJ and Zeh DW 2003; Neff and Pitcher 2005; Simmons 2005). Although being an important expected outcome of polyandry, increased trait variability within brood due to multiple paternity is still poorly documented. Without using quantitative genetic methods, paternal effects can still be examined based on correlation analyses between the sire identity and/or diversity and larval phenotypes. Using this approach, we investigated the extent to which polyandry could influence variation in larval growth rate of sibling larvae, one early life-history trait that has received considerable attention as it determines the duration of the larval dispersal period (Pechenik 1999).

We used the sessile marine gastropod *Crepidula fornicata* as a case study. This mollusc is native to the east coast of North America but has successfully invaded many bays and estuaries along the western and northern coasts of Europe. Dispersal ability is a critical aspect of marine biological invasions, and studying the factors that may influence larval development and recruitment is of central importance in understanding sessile marine invaders (Dunstan and Bax 2007; Dupont, Ellien, and Viard 2007). This marine gastropod has a number of traits that make it well suited to study the role of paternity in larval characteristics. An inverse relationship between larval growth rate and duration of larval life has been previously demonstrated for this species as individual growth rates are linear until competence to metamorphose, which is occurring at sizes between 900 and 1100 μm (Pechenik 1984). Also, the larvae of *C. fornicata* can be reared in the laboratory with negligible mortality (Pechenik and Lima 1984) so that loss in genetic diversity due to genetic drift effect is extremely limited. They grow substantially during development, and larval growth rates show remarkably wide variation in laboratory culture, ranging from about 20 $\mu\text{m}/\text{day}$ to more than 100 $\mu\text{m}/\text{day}$, even among siblings reared in the same containers, so that slow-growing and fast-growing larvae can be readily discriminated (Hilbish et al. 1999; Pechenik and Levine 2007). Although narrow-sense heritability studies using experimental crosses and quantitative genetic approaches have not previously been carried out in this species, broad-sense heritability for larval growth rate, based on analyses within and among full-sib families, has been estimated as 0.35 (Hilbish et al. 1999), showing that a proportion of the total phenotypic variance is explained by genetic components. *Crepidula fornicata* exhibits an interesting feature as this sequential hermaphrodite (i.e., sex-changing species) has the specificity of forming long-lived associations (stacks) that typically contain a number of males, females, juveniles, and individuals in transition, on the way from being male to becoming female (Conklin 1898; Coe 1938). Fertilization is internal with male transmitting sperm during mating. Mothers release veliger larvae that swim and feed in the

plankton for at least several more weeks before becoming competent to metamorphose (Pechenik 1999). Previous paternity studies in native (Gaffney and McGee 1992; Proestou et al. 2008) as well as in introduced populations (Dupont et al. 2006) showed that the eggs of a given female are commonly fertilized by multiple males mostly found in the mother's "stack." Thus, when collecting a stack of animals from the field, most potential fathers for any brood produced by females from that stack are simultaneously collected (Dupont et al. 2006; Proestou et al. 2008).

In this study, by analyzing offspring from fertilizations that took place in the wild, we could measure natural rates of polyandry and analyze with accuracy reproductive patterns occurring within a natural population to examine the relationships between the sire identity or/and diversity and larval growth rates. Based on a paternity analysis of 437 fast- and slow-growing larvae from 6 broods, we hypothesized 1) that the slow versus fast growth observed among sibling larvae might be determined by specific fathers and 2) that the amount of within-brood variation for growth rate could be influenced by the number of participating fathers.

Materials and Methods

Collection of Stacks and Sampling of Slow- and Fast-Growing Larvae

Crepidula fornicata individuals ($N = 93$) in 7 stacks were dredged from the Bay of Morlaix (Brittany, France) during the peak of the breeding season in June 2007 and maintained in aquaria for about 4 days, until 1 of the females in each stack released larvae. The sex, position, and shell length of each adult in each stack was then recorded, and the presence of eggs beneath other females was noted; for details, see Dupont et al. (2006). The animals' heads were preserved in 96% ethanol for subsequent genetic analyses. The larvae from 6 of the broods were cultured in 6 separate glass containers at room temperature in 800 ml of 0.45 μm filtered seawater. Seawater was changed and phytoplankton provided (2×10^5 cells per milliliters of *Isochrysis aff. galbana*, clone T-ISO) daily.

Crepidula fornicata is characterized by an average fecundity of 7500 ovocytes per female (Richard et al. 2006). All larvae were collected within about a week and were sorted according to size. For each brood, 41 among the largest larvae were isolated as "fast-growing larvae" and 41 among the smallest larvae were isolated as "slow-growing larvae" for subsequent genetic analyses. During the precompetent period, larvae grow at constant rates in terms of both shell length and biomass (Pechenik and Levine 2007), so that a given difference in shell length means the same amount of growth regardless of the starting size. Individual larval growth rates (in microns per day) were calculated as the size difference between 410 μm , the average hatchling size in *C. fornicata* (Pechenik J, personal observation), and the size at sampling date divided by the number of days in culture. The mean growth rate and standard deviation for fast- and

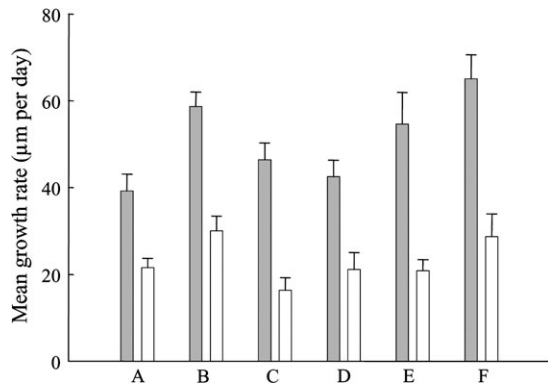


Figure 1. Mean growth rates of slow-growing (white) and fast-growing (gray) larvae for each brood. Standard deviations are indicated above bars.

slow-growing larvae of each brood are shown in Figure 1. Tests for the difference of growth rates 1) between broods and 2) between the 2 groups of larvae referred as “slow growing” and “fast growing” for each brood were carried out. Using a nested 2-way analysis of variance for ranked data (Sokal and Rohlf 1995) on the distribution of individual growth rates, we found significant differences among broods ($P < 0.001$) and between slow- and fast-growing larvae of a given brood. The brood effect explained 13.3% of the variance, and the slow or fast character of the larvae explained 82.8% of the variance. The mean growth rate of slow- and fast-growing larvae was not statistically different between broods ($P = 0.416$, Kruskal–Wallis test). Based on these results, the 6 broods were used for subsequent genetic analyses.

DNA Extraction and Microsatellite Genotyping

DNA extraction of the 93 sampled adults was performed using a NucleospinRMulti-96 Tissue Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer’s protocol and then checked on a 1% agarose gel. DNA extraction of the larvae of the 6 study broods was performed following the protocol of Higuchi (1989): in brief, each larva was washed in phosphate-buffered saline 1×, pH 7.4, to remove residual ethanol and incubated for 6 h at 56 °C in 100 µl of Higuchi buffer and 5 µl of proteinase K (10 mg/ml), followed by 15 min at 95 °C.

Adults and larvae were genotyped at 4 microsatellite loci previously characterized for *C. formicata* and previously shown to be polymorphic and accurate for paternity analyses: CfCA2 and CfCA4 (Dupont and Viard 2003), CfH7 (Dupont et al. 2006), and Cf8 (Proestou 2006). Amplifications and genotyping on a Li-Cor 4200 automatic sequencer were carried out following protocols given in Dupont and Viard (2003) and Dupont et al. (2006).

Paternity Assignment

For each brood, paternity assignment was based on the mother and larvae multilocus genotypes with reference to

the allelic composition of the adult population (93 individuals from the 7 sampled stacks).

The minimum method (Clapham and Palsboll 1997) was first used as a preliminary assessment of the minimum number of fathers for each brood considering the genotypes of the larvae and mother. For brood A, 10 larvae presented a genotype inconsistent with the other larvae and the mother’s genotype for all 4 loci but could be associated with another female of the same stack (female A2). This indicates that 2 females released larvae simultaneously, and these 10 larvae were therefore excluded from subsequent analyses. A paternity analysis was then performed using maximum likelihood computations as implemented in the software CERVUS version 3.0 (Marshall et al. 1998).

Fatherhood of Slow- and Fast-Growing Larvae and Clutch Relatedness Coefficient

For each brood, a Fisher’s Exact test was made to determine whether all assigned fathers contributed equally to the offspring. Additionally, the number of fast-growing and slow-growing larvae that could be attributed to each father was determined, and a binomial test was then used for each fatherhood to test for a contribution bias between larvae of the 2 growth rate categories.

Larval growth rate variability was compared between broods by calculating the difference in mean growth rates between fast- and slow-growing larvae. The relationship between this growth rate variability and the male reproductive success was investigated for each brood, through correlation analyses using 3 indices: 1) the number of fathers contributing to the offspring of each brood, 2) the sire diversity index calculated as a Shannon index of diversity on fathers’ contributions in each brood (Schmoll et al. 2007):

$$I = - \sum_i \frac{n_i}{N} \ln \left(\frac{n_i}{N} \right),$$

where $i = 1$ to total number of father in the brood, n_i = number of larvae assigned to the father i , and N = total number of assigned larvae in the brood; the higher this index the higher is the number of father and the evenness of the sire’s contribution.

3) a clutch relatedness (CR) coefficient giving the average relatedness coefficient between 2 individuals sampled randomly from a brood and obtained from the following formula:

$$CR = \frac{1}{2} \sum_i \frac{n_i}{N} \frac{n_i - 1}{N - 1} + \frac{1}{4} \sum_i \sum_{j \neq i} \frac{n_i}{N} \frac{n_j}{N - 1},$$

as full sibs have a relatedness of $\frac{1}{2}$, whereas half sibs have relatedness of $\frac{1}{4}$. As compared with single paternity, the average relatedness among offspring (i.e., the CR value) is decreased if multiple fathers make a genetic contribution to a clutch because the offspring will be related as half sibs. The CR value is an important parameter to further interpret genetic data.

Results

Paternity Analysis

Three of the loci were highly polymorphic, with 15–37 alleles observed over the 93 adults analyzed, whereas the fourth locus (CfCA2) had only 3 alleles. The exclusion probability of the combined set of loci (i.e., power to exclude a randomly selected unrelated candidate parent of an arbitrary offspring, given the genotype of the offspring and of the mother) was remarkably high (>0.99). Each adult was characterized by 1 unique multilocus genotype. Altogether, 437 larvae (221 slow-growing larvae and 216 fast-growing larvae, i.e., 91% of the 492 larvae genotyped) could be convincingly assigned to known fathers (Table 1). All the analyzed broods exhibited multiple paternity, and 20 fathers were identified. Most of the assignments (89.5% or 491 larvae) were made to adults found on the maternal stacks: in 4 broods (A, C, D, and F), all the larvae were assigned to a father in the maternal stacks and in broods B and E 43 out of 82 (52%) and 3 out of 74 (4%) larvae, respectively, could not be assigned to an individual from the maternal stack but showed a genotype compatible with a single father. This father was identified from the comparison between the larval genotype and the maternal alleles. For each locus, 2 paternal alleles could be determined leading to a genotype heterozygous over all loci and characterized by a mendelian segregation of the alleles in the progeny. These genotypes were added to the list of candidate parents to run the analysis again. Note that in agreement with the high exclusion power of the microsatellites used, these genotypes were not observed in the adult population.

The number of fathers for each brood varied from 2 to 5 (3.3 on average, Table 1). In brood B, the paternity was balanced between 2 fathers (Fisher's test, $P < 0.001$), namely, b4 and x2 assigned to 48% and 52% of the larvae, respectively (Figure 2). In all the other broods, fathers did not contribute equally to the paternity of the larvae (Fisher's test, $P < 0.001$ in broods A, D, E, and F, $P = 0.03$ in brood C). A single father contributed to the majority of the larvae in these broods except in brood C with 2 dominant fathers observed, namely, c2 and c4 assigned to 39% and 47.5% of the larvae, respectively (Figure 2).

All 17 fathers, whose position in the stack was known, were indeed found to be located above the mother with most of them being situated directly attached to (5; i.e., 29% of the 17 fathers), 1 individual away (4; 24%), or 2 individuals away (4; 24%) from the mother (Table 1). Four fathers were located further from the mother in the maternal stack (a12 of brood A and f5, f6, and f9 from brood F). Only 3 out of 20 assigned fathers (15%) had an unknown location: 1 moved away from the stack when transferred back to the laboratory (a15 of brood A) and 2 were unsampled (x1 and x2 of broods E and B). At the time of sampling, the fathers were either males (8; i.e., 40% of the sampled fathers), in sexual transition (i.e., an individual which was changing sex at the time of sampling; 2; 20%) females with eggs (7; 35%), or even in one case an individual that had been incorrectly thought to be immature at the time of sampling (1; 5%).

Growth of the Larvae and Fatherhood

Only 3 fathers out of 20 (15%) contributed exclusively to either fast-growing larvae or slow-growing larvae, and each was responsible for fathering only a small proportion of those larvae (see Table 1). The remaining fathers (17 fathers) were assigned both to fast- and slow-growing larvae with only 30% (6 fathers) preferably assigned to 1 category or the other (Figure 2, Table 1). Overall, the dominant fathers generally produced about equal numbers of slow- and fast-growing larvae.

Brood mean growth rates were not correlated to the number of sires identified ($r^2 = 0.10$, $P = 0.525$). In the same way, the difference of mean growth rate between fast- and slow-growing larvae was not correlated to the number of fathers represented in the brood ($r^2 = 0.03$, $P = 0.337$; Figure 3a). For example, with the same number of fathers observed, brood A presented a much smaller growth rate variation than brood B. However, growth rate variability increased significantly with the sire diversity index ($r^2 = 0.80$, $P = 0.010$; Figure 3b). Similarly, the difference in the growth rate of slow- and fast-growing larvae was significantly and inversely correlated with the degree of relatedness ($r^2 = 0.74$, $P = 0.017$; Figure 3c): the more closely related within a clutch the lower the variation in growth rate.

Discussion

With multiple paternity observed in every brood and a mean number of 3.3 fathers per brood, our data provide a confirmation of the ubiquity of polyandry in the slipper limpet *C. fornicata*. Previous paternity studies carried out on the same species have similar output both from the native range, with 1 population showing 66% of the broods with multiple paternity and on average 1.8 fathers per brood (Proestou et al. 2008) and 3 populations from the introduced area with 78% of multiple paternity and 3.1 fathers per brood (Dupont et al. 2006). A lower value was observed in the native population of Saunderstown, RI (Proestou et al. 2008), possibly due to differences in the number of reproductive individuals (excluding the mother) per stack. Only 2–5 individuals per stack (3.7 per stack on average) were reported in the study by Proestou et al. (2008), instead of 3–11 (6.1 on average over 18 stacks from 3 populations) in Dupont et al. (2006) and 9–13 (11.3 on average) in our study. The introduced populations appeared as more gregarious, possibly based on evolutionary and ecological changes in the new habitat as documented in other taxa (Whitney and Gabler 2008). Because gregarious behavior may favor rapid population growth and efficient reproduction (Dupont et al. 2006), perhaps an increased number of individuals per stack has been selected for in the French introduced populations. Raw data from a previous study (Dupont and Viard 2003) give some support to this hypothesis: the mean stack size over 12 French populations is 5.4 compared with 4.6 in Saunderstown, RI (Proestou

Table 1. Stack description and paternity assignments

Stack	Nb _{adults}	Mother	Larval growth rate (µm per day)			Number of larvae assigned			Father					
			Mean	Min	Max	Fast growing	Slow growing	% Assigned	Name	% Larvae			Position	Sex
										Fast growing	Slow growing	Total		
A	12	4	29.84	17.27	47.27	30	37	82	a5	42	58	93	5	Fb
									a12	80	20	7	Secondary stack	M
B	9	3	44.35	18.33	65	41	41	100	b4	64	36	48	4	M
C	11	1	31.6	9.17	52.5	30	29	72	x2	37	63	52	Unknown	Unknown
									c2	48	52	39	2	Fb
									c3	87	13	14	3	Fb
									c4	43	17	47	4	Fb
D	13	3	32	6	42	38	37	91	d4	33	67	4	4	Fb
									d5	42	58	78	5	M
									d6	100	0	15	6	M
									d15	50	50	3	Unknown	M
									e3	29	71	55	3	T
E	13	2	36.42	15	65	35	39	90	e4	95	5	30	4	M
									e5	25	75	11	5	M
									x1	0	100	4	Unknown	Unknown
F	10	1	46.86	18.75	81.25	41	40	99	f3	55	45	69	3	Fb
									f4	40	60	6	4	Fb
									f5	54	46	16	5	M
									f6	0	100	1	6	T
									f9	17	83	8	9	M

For each stack (brood), the position in the stack of the mother analyzed (see below for the numbering) and the number of other reproductive adults (Nb_{adults}), are indicated. For each mother, the mean, maximum, and minimum larval growth rates observed in the samples. The number of fast- and slow-growing larvae as well as the total percentage of larvae assigned is given for each brood. Then, the percentage of larvae assigned to each identified father is indicated together with the proportion of fast- and slow-growing larvae, father's name, position, and sex at the time of the sampling. Adult individuals within the stacks were numbered according to their position in the stacks: from the bottom (number 1) to the top of the main stack (e.g., I5, individual number 5 in the main stack) or in secondary stack (e.g., I12, individual number 12 in a secondary stack). The position of a father identified but either not attached to the stack or unsampled is indicated with "unknown." Fathers' sex is specified as follows: M, male, T, sexual transition, Fb, brooding female.

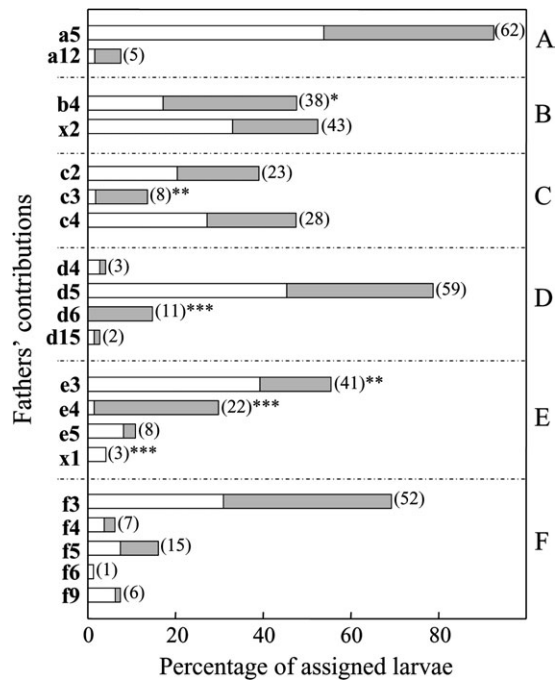


Figure 2. Relative contributions of fathers to the fast- and slow-growing larvae. For each brood, the percentage and number of larvae assigned to each father are indicated by the bar and a number in brackets, respectively. For each father, the relative proportion of slow-growing larvae (white) and fast-growing larvae (gray) are then indicated. The proportion of slow-growing larvae and fast-growing larvae assigned to a given father were compared with a binomial test (statistical confidence $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$).

et al. 2008), and 2.5 in Fairhaven, MA (Dupont and Viard 2003). Other environmental drivers (e.g., chemical cues inducing larval settlement) could also explain the variation in the number of individuals per stack. Precise comparison of stack structure between populations within and among the native and introduced range deserves to be carried out to validate this observation and investigate what can explain this apparent shift in the stack composition.

The specific behavior of the slipper limpet of aggregating in perennial stacks presents a great advantage: the individuals within a stack behave as an almost closed mating group (89.5% of the larvae analyzed had a father within the maternal stack). Patterns of polyandry form copulations that had taken place in the wild can thus be observed with an accuracy similar to controlled crossing. Together with such stacking behavior, protandry (sex-changing trait) is a primary characteristic that may favor polyandry in the slipper limpet. A nonnegligible proportion of the sires were identified as brooding females at sampling time (35%). The brooding female A5 in stack A was assigned as a father to 92.5% of the larvae of brood A (Figure 2), showing that a brooding female can even be the “dominant” father of a brood. It is noteworthy that bisexual individuals have never been documented in the literature

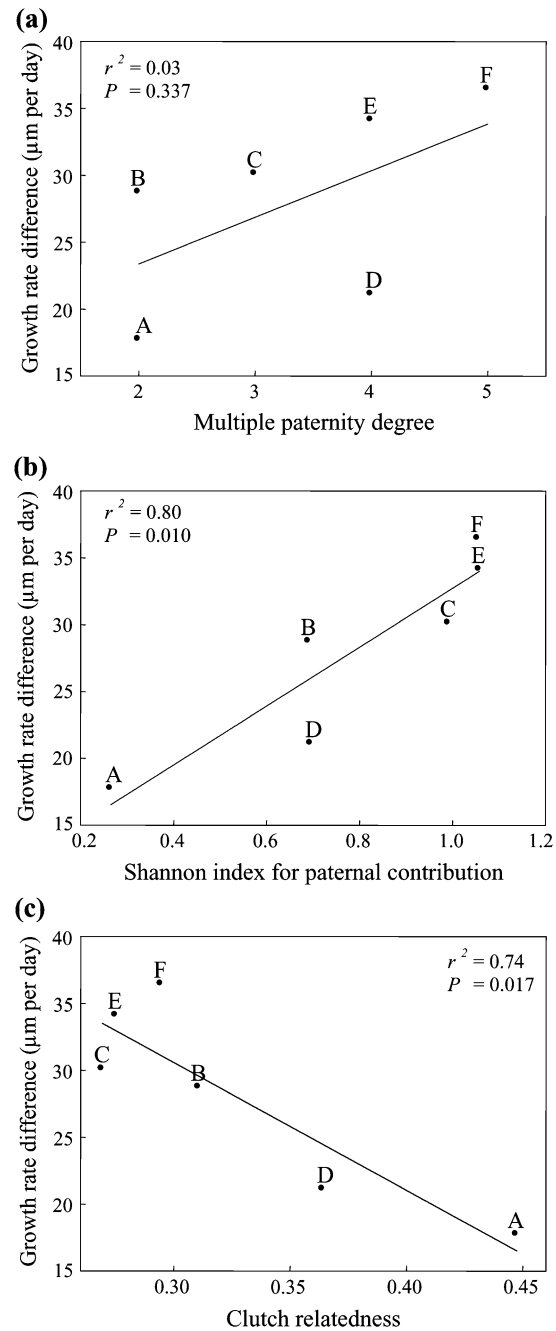


Figure 3. Relationships between polyandry patterns and range of variation of larval growth rate. For each brood (featured by its name along the x axis), the difference of mean growth rate between fast- and slow-growing larvae is regressed against (a) the number of father per brood, (b) the mean relative fertilization success of the fathers per brood, and (c) the CR coefficient.

based on histology, genetics, or morphological studies (see Le Gall 1974; Martin 1985 and references therein). Individuals in transition or even brooding females can be fathers (this study; Dupont et al. 2006; Gaffney and McGee

1992; Proestou et al. 2008). Together with the results by Hoagland (1978) who showed that isolated females were able to store sperm for 1 year, these findings evidence a capacity for sperm storage either between reproductive seasons or possibly during the same season. Sperm storage is often linked to multiple paternity because females can receive sperm from consecutive males (Adams et al. 2005).

The number of successful fathers in our study ranged from 2 to 5 per brood. As compared with the number of potential fathers in each stack (9–13; see Table 1) and given the rather large amount of larvae studied, the number of fathers was low. This result could first be due to the sampling design as we assigned fathers to 2 extreme categories of larvae (i.e., the largest and smallest ones after 1 week of culture): perhaps additional fathers would be identified with the analysis of intermediate size larvae. It is nevertheless noteworthy that 17 out of 20 fathers contributed to both fast- and slow-growing categories. Paternal identity thus appears to behave neutrally regarding the larval growth (see below) with consequently little bias on overall paternity assignment. In a previous paternity analysis (Dupont et al. 2006), based on 11–16 larvae randomly sorted, the number of fathers identified was similar. Together with a limited number of fathers, the second main outcome of the present paternity analysis is the observation of a skewed reproductive pattern: more than 50% of the larvae were fathered by 1 or 2 individuals in 5 out of the 6 broods analyzed. Such variation in the degree of paternity among sires has been observed in wild populations of numerous polyandrous species (e.g., Neff et al. 2008) and has been attributed to various causes like sexual selection (Birkhead and Møller 1998) or sperm amount (Stockley 1997) and embryo viability (Simmons 2005). In the slipper limpet, this variation could be explained by the position of the study mothers within the stacks: all fathers with a known position were found close to and above the mother. Among the 17 fathers belonging to the maternal stack, 13 (76.5%) were at most 2 individuals away from the mother. There is, however, no significant correlation between the fatherhood and the number of individuals separating the mother and assigned father. Differences in sperm amount due to repeated matings by the same male may also account for these effects. Precise data about the reproductive behavior of the slipper limpet, like the frequency of repeated mating with the same male, are needed to test this hypothesis.

In this study, we have shown that the paternity diversity, rather than the paternal identity, is linked to the range of variation in growth rate. We indeed found that the range of growth rates within a brood is not caused by any particular father, as most of the fathers (75%) were reliably assigned both to the fastest and slowest growing larvae within a brood and only 25% had a fatherhood biased toward larvae in only 1 of those 2 categories. It was also not correlated with the number of fathers although this number varied across broods, ranging from 2 to 5. Interestingly, the range of larval growth rates was significantly related to the relative contribution of the fathers: the magnitude in the difference of mean growth rates, between fast- and slow-

growing larvae, increased significantly with the sire diversity index and decreased with the degree of CR (Figure 3). Thus, a brood can exhibit a large number of fathers without showing a high degree of variability among offspring if most of those fathers fertilize only a small number of eggs. For example, in brood D, 3 out of 4 fathers sired less than 15% of the larvae and growth rate variation was relatively low. On the other hand, brood B exhibited only 2 sires, but because they fathered a similar proportion of larvae, CR is lower than that of brood D; consequently, the range of growth rate variability was higher in brood B than in brood D. Therefore, it is not only the number of fathers involved but also the degree to which each of those fathers contribute to offspring, which enhances growth rate variability in the offspring. Our results indicate that paternity analyses should consider the number of fathers involved as well as sire diversity (Schmoll et al. 2007) or the CR (this study).

Polyandry, a common feature of marine invertebrates (e.g., Toonen 2004; Marshall and Evans 2007; Sprenger, Anthes, and Michiels 2008; Sprenger, Faber, et al. 2008; for a review, see also Baur 1998), is expected to indirectly increase the female fitness either through paternal genetic effects (additive or nonadditive) or through paternal environmental effects (Yasui 1998; Jennions and Petrie 2000; Garcia-Gonzalez and Simmons 2007). Our results show that the number of fathers and their relative contribution to the brood influences the magnitude of variation in larval growth rates. This finding has ecological and evolutionary implications. On the one hand, the fact that growth rate variability within a brood decreased with higher CR gives some support to the “genetic diversity hypothesis” where there is no single best sire for any given female but diversity is per se advantageous (Yasui 1998; Zeh AJ and Zeh DW 2003; Marshall and Uller 2007). As most marine invertebrates, adults of *C. fornicata* typically have limited or no ability to move so that the persistence of the metapopulation relies on recruitment of free-living, independent larval phase. Fast-growing larvae will reach competence more rapidly and thus may metamorphose and settle earlier than slow-growing ones. As most of the fathers identified within a brood contribute to both fast- and slow-growing larvae, the 2 sets of sibling larvae that may ultimately recruit at different time will be genetically similar and diversified. This result is congruent with the large genetic diversity in juveniles coupled with a genetic stability between juveniles and adults in 2 French introduced populations (Dupont, Bernas, and Viard 2007). Slow-growing larvae might appear to be disadvantaged as they are more susceptible to planktonic predation. However, Pechenik et al. (1996) showed that larval growth rate is a poor predictor of juvenile performance; in particular, slow-growing larvae can metamorphose into unusually fast-growing juveniles. Slow-growing larvae may also have an advantage under different circumstances, for example, if the early settlers (i.e., resulting from metamorphosis of fast-growing larvae) failed to survive because of unfavorable environmental conditions. Altogether, as environmental conditions encountered by the larvae are highly unpredictable,

decreasing CR through multiple matings reduces the risk of reproductive failure of the mother and full-sibling competition (Yasui 1998). On the other hand, selection may favor female preference for males through multiple mating but not necessarily based on differences in the trait that we here studied, namely, growth rate (good genes or compatible genes hypothesis; Neff and Pitcher 2005). Skewed reproductive pattern observed among fathers might be an outcome of male–male competition or cryptic mechanism of female choice. Finally, larval growth rate could not only be due to the paternity diversity but also be affected by the maternal phenotype. For instance, Simmons (2001) and Sprenger, Anthes, and Michiels (2008) observed females modifying their reproductive output in response to mating possibilities that they encounter. In our case study, part of the differences in growth rate could result from differences in egg size so that differential allocation by mothers, and not male identity, would be the source of variations in growth rates. A logical next step would be to determine more precisely the underlying mechanisms of variability in larval growth, in particular disentangling the phenotypic plasticity and genetic bases responsible for this variability. Deciphering between those alternative hypotheses would mostly require controlled laboratory crosses, which are unfortunately technically difficult to carry out in a long-lived species with internal fertilization like *C. fornicata*.

We here showed that a reproductive behavior, that is, polyandry and more specifically the sire diversity, was significantly correlated to variations in growth rate of a benthopelagic species. Such variations in the growth rate may have implications for dispersal and recruitment success, important facets of the invasion success of the slipper limpet. Previous results based on larval modeling approaches and population genetics studies suggested that larval dispersal was an important contributor to the invasion success of *C. fornicata* in Europe (Viard et al. 2006; Dupont, Ellien, and Viard 2007). Similar to the variability in settlement behavior observed in other marine invertebrates (Marshall and Keough 2003; Toonen and Tyre 2007), variable growth rates might be associated with variable dispersal potential. Slow-growing larvae, by exhibiting a longer pelagic larval duration, could be particularly good dispersers and provide selective advantages for sessile or sedentary organisms by reducing competition between siblings and reducing mating between close relatives (review in Ronce 2007). Nevertheless, if dispersal distance scales directly with the time larvae spend in the plankton for many animals (Shanks et al. 2003; Siegel et al. 2003), many additional factors contribute to the effective dispersal range (for a review, see Cowen and Sponaugle 2008). Pineda et al. (2007) suggested that if pelagic larval duration is a good proxy of larval transport, it could be a poor predictor of the dispersal distance. Numerous environmental drivers (e.g., temperature) or specific traits (e.g., cues inducing metamorphosis; Pechenik 1990; Hadfield 1998) are likely to play a significant role in determining the length of the pelagic larval duration in *C. fornicata*. Further studies are needed to establish if in an invasive species like *C. fornicata*, larvae with

long larval duration effectively contribute to range expansion. Insights about larval dispersal variation might also come from indirect approaches like genetic assignment of larvae and juveniles sampled in the wild to determine the relative proportion of local versus immigrant larvae contributing to the local populations.

Funding

European Network of Excellence “Marine Genomics Europe”; Agence Nationale de la Recherche (MIRAGE project, N° ANR-05-BLAN-0001-01); Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche grant to S.L.C.

Acknowledgments

The authors are grateful to François Rigal and Thierry Comtet for providing space and helping to rear larvae and to the crew of the Mysis from the Service Mer & Observation (FR2424 Station Biologique of Roscoff) for collecting samples. The authors thank Thierry Comtet, Denis Roze, Sylvain Billiard, and Myriam Valero for discussion and comments on previous version of this paper as well as the associated editor Brian Bowen and the 3 anonymous reviewers for their valuable comments on the manuscript.

References

- Adams E, Jones A, Arnold S. 2005. Multiple paternity in a natural population of a salamander with long-term sperm storage. *Mol Ecol*. 14:1803–1810.
- Bang A, Grønkjær P, Clemmesen C, Hoie H. 2006. Parental effects on early life history traits of Atlantic herring (*Clupea harengus* L.) larvae. *J Exp Mar Biol Ecol*. 334:51–63.
- Baur B. 1998. Sperm competition in molluscs. In: Birkhead TR, Møller AP, editors. *Sperm competition and sexual selection*. London: Academic Press. p. 255–305.
- Benton TG, Plaistow SJ, Coulson TN. 2006. Complex population dynamics and complex causation: devils, details and demography. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 273:1173–1181.
- Birkhead TR, Møller AP. 1998. *Sperm competition and sexual selection*. London: Academic Press.
- Clapham PJ, Palsboll PJ. 1997. Molecular analysis of paternity shows promiscuous mating in female humpback whales (*Megaptera novaengliae*, Borowski). *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 264:95–98.
- Coe WR. 1938. Conditions influencing change of sex in mollusks of the genus *Crepidula*. *J Exp Zool*. 77:401–424.
- Conklin EG. 1898. Environmental and sexual dimorphism in *Crepidula*. *Proc Acad Nat Sci Philadelphia*. 50:435–444.
- Cowen RK, Sponaugle S. 2008. Larval dispersal and marine population connectivity. *Annu Rev Mar Sci*. 1:443–466.
- Dunstan PK, Bax N. 2007. How far can marine species go? Influence of population biology and larval movement on future range limits. *Mar Ecol Prog Ser*. 344:15–28.
- Dupont L, Bernas D, Viard F. 2007. Sex and genetic structure across age groups in populations of the European marine invasive mollusc, *Crepidula fornicata* L. (Gastropoda). *Biol J Linn Soc*. 90:365–374.

- Dupont L, Ellien C, Viard F. 2007. Limits to gene flow in the slipper limpet *Crepidula fornicata* as revealed by microsatellite data and a larval dispersal model. *Mar Ecol Prog Ser.* 349:125–128.
- Dupont L, Richard J, Paulet YM, 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.
- Dupont L, Viard F. 2003. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite markers from the marine invasive species *Crepidula fornicata* (Gastropoda: Calyptraeidae). *Mol Ecol Res.* 3:498–500.
- Gaffney PM, McGee B. 1992. Multiple paternity in *Crepidula fornicata* (Linnaeus). *Veliger.* 35:12–15.
- Garcia-Gonzalez F, Simmons LW. 2005. The evolution of polyandry: intrinsic sire effects contribute to embryo viability. *J Evol Biol.* 18: 1097–1103.
- Garcia-Gonzalez F, Simmons LW. 2007. Paternal indirect genetic effects on offspring viability and the benefits of polyandry. *Curr Biol.* 17:32–36.
- Hadfield MG. 1998. Research on settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae: past, present, future. *Biofouling.* 12:9–29.
- Higuchi R. 1989. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Ehrlich HA, editor. *PCR technology, principles and applications for DNA amplification.* New York: Stockton Press. p. 31–38.
- Hilbish TJ, Sasada K, Eyster LS, Pechenik JA. 1999. Relationship between rates of swimming and growth in veliger larvae: genetic variance and covariance. *J Exp Mar Biol Ecol.* 239:183–193.
- Hoagland KE. 1978. Protandry and the evolution of environmentally-mediated sex change: a study of the mollusca. *Malacologia.* 17:365–391.
- Jennions MD, Petrie M. 2000. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biol Rev.* 75:21–64.
- Le Gall F. 1974. Déterminisme de la morphogénèse et du cycle du tractus génital mâle externe chez *Crepidula fornicata* Phil [PhD thesis]. [Caen (France)]: Faculté des sciences de Caen. p. 107.
- Marshall D, Uller T. 2007. When is a maternal effect adaptive? *Oikos.* 116:1957–1963.
- Marshall DJ, Allen RM, Crean AJ. 2008. The ecological and evolutionary importance of maternal effects in the sea. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev.* 46:203–250.
- Marshall DJ, Evans JP. 2007. Context-dependent genetic benefits of polyandry in a marine hermaphrodite. *Biol Lett.* 3:685–688.
- Marshall DJ, Keough MJ. 2003. Variation in the dispersal potential of non-feeding invertebrate larvae: the desperate larva hypothesis and larval size. *Mar Ecol Prog Ser.* 255:145–153.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol.* 7:639–655.
- Martin MC. 1985. Etude expérimentale de l'inversion sexuelle et de la morphogénèse génitale femelle chez un mollusque hermaphrodite protandre *Crepidula fornicata* L. (Mésogastéropode) [PhD thesis]. [Caen (France)]: Faculté des sciences de Caen. p. 147.
- Neff BD, Pitcher TE. 2005. Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Mol Ecol.* 14:19–38.
- Neff BD, Pitcher TE, Ramnarine IW. 2008. Inter-population variation in multiple paternity and reproductive skew in the guppy. *Mol Ecol.* 17:2975–2984.
- Pechenik JA. 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 JA. 1990. Delayed metamorphosis by larvae of benthic marine invertebrates: does it occur: is there a price to pay? *Ophelia.* 32:1–2.
- Pechenik JA. 1999. On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles. *Mar Ecol Prog Ser.* 177: 269–297.
- Pechenik JA. 2006. Larval experience and latent effects—metamorphosis is not a new beginning. *Integr Comp Biol.* 46:323–333.
- Pechenik JA, Hilbish TJ, Eyster LS, Marshall D. 1996. Relationship between larval and juvenile growth rates in two marine gastropods, *Crepidula plana* and *C. fornicata*. *Mar Biol.* 125:119–127.
- Pechenik JA, Levine SH. 2007. Estimates of planktonic larval mortality using the marine gastropods *Crepidula fornicata* and *C. plana*. *Mar Ecol Prog Ser.* 344:107–118.
- Pechenik JA, Lima GM. 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.
- Pineda J, Hare JA, Sponaugle S. 2007. Larval transport and dispersal in the coastal ocean and consequences for population connectivity. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev.* 20:22–39.
- Proestou DA. 2006. Isolation and characterization of microsatellite markers in the Atlantic slipper shell *Crepidula fornicata* for use in paternity analysis. *Mol Ecol Res.* 6:437–439.
- Proestou DA, Goldsmith MR, 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.
- Richard J, Huet M, Thouzeau G, Paulet YM. 2006. Reproduction of the invasive slipper limpet, *Crepidula fornicata*, in the bay of Brest, France. *Mar Biol.* 149:789–801.
- Ronce O. 2007. How does it feel to be like a rolling stone? Ten questions about dispersal evolution. *Annu Rev Ecol Syst.* 38:231–253.
- Roughgarden J, Gaines S, Possingham H. 1988. Recruitment dynamics in complex life cycles. *Science.* 241:1460–1466.
- Schmoll T, Schurr FM, Winkel W, Epplen JT, Lubjuhn T. 2007. Polyandry in coal tits *Parus ater*: fitness consequences of putting eggs into multiple genetic baskets. *J Evol Biol.* 20:1115–1125.
- Shanks AL, Grantham BA, Carr MH. 2003. Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. *Ecol Appl.* 13:159–169.
- Siegel DA, Kinlan BP, Gaylord B, Gaines SD. 2003. Lagrangian descriptions of marine larval dispersion. *Mar Ecol Prog Ser.* 260: 83–96.
- Simmons LW. 2001. The evolution of polyandry: an examination of the genetic incompatibility and good-sperm hypotheses. *J Evol Biol.* 14: 585–594.
- Simmons LW. 2005. The evolution of polyandry: sperm competition, sperm selection, and offspring viability. *Annu Rev Ecol Syst.* 36:125–146.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1995. *Biometry.* New York: W.H. Freeman and Company.
- Sprenger D, Anthes N, Michiels NK. 2008. Multiple mating affects offspring size in the opisthobranch *Chelidonura sandrana*. *Mar Biol.* 153:891–897.
- Sprenger D, Faber J, Michiels NK, Anthes N. 2008. Natural female mating rate maximizes hatchling size in a marine invertebrate. *J Anim Ecol.* 77: 696–701.
- Stockley P. 1997. Sexual conflict resulting from adaptations to sperm competition. *Trends Ecol Evol.* 12:154–159.
- Thorson G. 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biol Rev.* 25:1–45.
- Toonen RJ. 2004. Genetic evidence of multiple paternity of broods in the intertidal crab *Petrolisthes cinctipes*. *Mar Ecol Prog Ser.* 270:259–263.
- Toonen RJ, Tyre AJ. 2007. If larvae were smart: a simple model for optimal settlement behavior of competent larvae. *Mar Ecol Prog Ser.* 349: 43–61.

- Trippel EA, Kraus G, Kaster FW. 2005. Maternal and paternal influences on early life history traits and processes of Baltic cod *Gadus morhua*. Mar Ecol Prog Ser. 303:259–267.
- Viard F, Ellien C, Dupont L. 2006. Dispersal ability and invasion success of *Crepidula fornicata* in a single gulf: insights from genetic markers and larval-dispersal model. Helgol Mar Res. 60:144–152.
- Whitney KD, Gabler CA. 2008. Rapid evolution in introduced species, ‘invasive traits’ and recipient communities: challenges for predicting potential. Divers Distrib. 14:569–580.
- Yasui Y. 1998. The ‘genetic benefits’ of female multiple mating reconsidered. Trends Ecol Evol. 13:246–250.
- Zeh AJ, Zeh DW. 2003. Toward a new sexual selection paradigm: polyandry, conflict and incompatibility (invited article). Ethology. 109:929–950.

**Received November 13, 2008; Revised February 16, 2009;
Accepted February 20, 2009**

Corresponding Editor: Brian W. Bowen

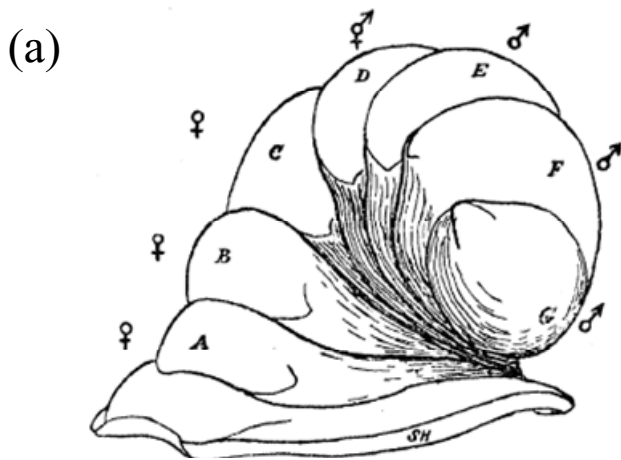
CHAPITRE II-B : LIENS ENTRE MODE DE DISPERSION, GREGARITE ET POLYANDRIE AU SEIN DU GENRE CREPIDULA

II-B-1. CONTEXTE DE L'ETUDE

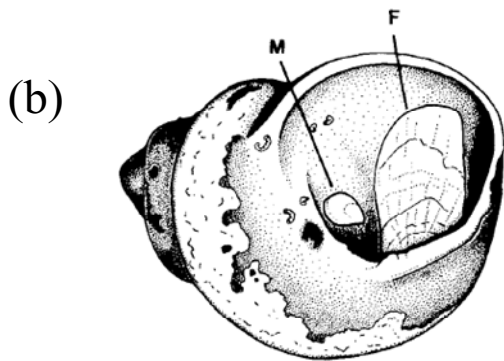
La sélection sexuelle intimement dépendante de l'ensemble des traits d'histoire de vie d'une espèce peut conduire à l'évolution d'une large diversité de stratégies reproductives. En particulier, le nombre de partenaires sexuels disponibles est un facteur influençant grandement les mécanismes de reproduction (Kokko & Rankin 2006). La famille des Calyptraeidae, et plus particulièrement le genre *Crepidula*, regroupent des espèces aux traits d'histoires de vie communs comme la protandrie, la fécondation interne et l'incubation des œufs mais affichant par ailleurs d'importantes différences comportementales et développementales. Au sein du genre *Crepidula*, l'intensité du comportement agrégatif et le mode de développement (direct ou indirect) sont des caractéristiques variables au sein de ce groupe qui pourraient moduler les possibilités et modalités de rencontres entre partenaires pour la reproduction.

Outre *C. fornicata*, des études des modalités de la reproduction au sein du genre *Crepidula* ne sont disponibles que chez une autre espèce, *C. coquimbensis* (Figure II-B-1 et Tableau II-B-1). Ces deux espèces présentent des différences mais également des similitudes quant à leurs propriétés biologiques :

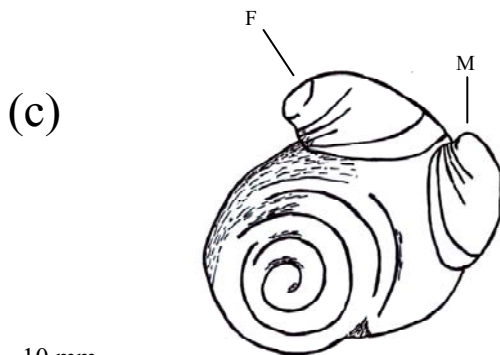
- *C. fornicata*, qui présente un **cycle benthopélagique**, est une espèce particulièrement grégaire : les individus benthiques perdent leur capacité de mobilité très tôt et l'association en chaîne des adultes se fait de façon pérenne. Comme il a été rappelé antérieurement, **un comportement de polyandrie** a été mis en évidence chez cette espèce : d'abord à travers l'observation de copulations multiples (Hoagland 1978), puis de paternités multiples au sein d'une ponte, observations reposant sur des analyses de paternité avec des allozymes dans un premier temps (Gaffney & McGee 1992) puis plus précisément au moyen de marqueurs microsatellites (3 pères en moyennes chez Dupont *et al.* 2006, Proestou *et al.* 2008). L'étude présentée dans la partie précédente (Cf II-A-2) a largement confirmé ces résultats avec en moyenne 3.3 pères dans les 6 descendance analysées. De plus sur l'ensemble de ces études, plus de 80% des pères identifiés étaient des individus appartenant à la même chaîne que la



Crepidula fornicata, Linnaeus 1758



Crepidula coquimbensis, Brown & Olivares 1996

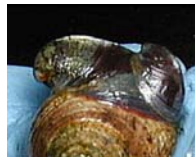


10 mm

Crepidula convexa, Say 1922

Figure II-B-1: Comportement d'agrégation de trois espèces du genre *Crepidula* : (a) *C. fornicata* dont les individus sont associés en chaînes (dessin issu de Orton 1909), (b) *C. coquimbensis* dont les individus vivent à l'intérieur de coquilles vides, ici coquille de *Tegula euryomphala* (dessin issu de Brown & Olivares 1996) et (c) *C. convexa* dont les individus vivent fixés à la surface de coquilles vides ou habitées par des *Pagurus* sp. (dessin issu d'une collaboration à quatre mains entre Sabrina Le Cam et François Rigal)

Tableau II-B-1. Caractéristiques de *Crepidula convexa*, *C. coquimbensis* et *C. fornicata* en termes de reproduction, cycle de vie et comportement.



	<i>C. convexa</i>	<i>C. coquimbensis</i>	<i>C. fornicata</i>
Protandrie	oui	oui	oui
Fécondation interne & incubation des embryons	oui	oui	oui
Cycle de vie	Développement direct	Développement direct	Cycle benthopélagique
Grégarité	+	++	+++
	Individus isolés ou peu nombreux sur un même substrat	Une femelle et 2-6 mâles dans le même micro-habitat (une coquille vide)	1-4 femelles et 1-10 mâles formant une chaîne pérenne
	Adultes mobiles	Mâles Mobiles	Peu ou pas de mobilité des adultes
Paternité	? (but de cette étude)	Multiple Brante <i>et al.</i> , in prep.	Multiple Dupont <i>et al.</i> 2006

mère, suggérant ainsi que ces structures correspondaient à des groupes de reproducteurs quasi « clos ». **La formation de chaînes pérennes apparaît comme une composante clé du succès de la polyandrie** en favorisant la proximité entre les individus sans qu'il y ait de monopolisation des accouplements par un seul mâle. Par ailleurs, les femelles sont dotées de capacité de **stockage spermatique**. Cette propriété a été mise en évidence par l'assignation de pères potentiels se révélant être des femelles au moment de l'échantillonnage : entre le moment de la copulation et le moment de l'échantillonnage, ces individus, évidemment mâles au moment de la copulation, se sont transformés en femelles et l'individu mère a stocké leur sperme depuis la copulation jusqu'à l'émission de la ponte durant l'intervalle minimum permettant la transition sexuelle de l'individu « père ». Cette espèce, notamment par son comportement grégaire et sa capacité à changer de sexe maximise ainsi le nombre de mâles qui participent à la reproduction et, par conséquent, la diversité de sa descendance, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent.

- Contrairement à *C. fornicata*, *C. coquimbensis* ne présente pas de phase larvaire (**développement direct**) et ne forme pas de chaînes pérennes. Elle a néanmoins un **comportement fortement grégaire** puisque femelles et mâles (généralement une femelle accompagnée de 2 à 6 mâles) partagent **un même micro habitat**, une coquille vide d'autres gastéropodes marins (Brown & Olivares 1996). Comme chez *C. fornicata*, **un fort degré de paternité multiple** (3 pères par ponte en moyenne) a été mis en évidence au sein d'une ponte ainsi qu'au sein des capsules (enveloppe protectrice permettant la conservation des embryons fertilisés) composant les pontes (Brante *et al.* In prep). Les femelles peuvent également **stocker du sperme** au moins six mois.

La proximité des mâles et des femelles est donc associée dans les deux cas à d'important taux de polyandrie. Est-ce une caractéristique du genre *Crepidula* ou est-ce une caractéristique spécifique aux mollusques grégaires de ce genre ?

Pour aborder cette question, nous avons choisi d'étudier *C. convexa*, espèce vivant en sympatrie avec *C. fornicata* sur les côtes Nord Est Atlantique et qui présente un comportement agrégatif beaucoup moins prononcé que chez les 2 autres espèces. *C. convexa* est une espèce à développement direct qui vit sur différents types de substrats tels que des petits cailloux ou des coquilles de mollusques vides ou parfois habitées par des pagures (crustacés décapodes plus connus sous le nom de bernard-l'ermite), ce qui peut leur conférer une certaine mobilité (Hendler & Franz 1971, Li & Pechenik 2004). Au contraire de *C.*

fornicata ou de *C. coquimbensis*, les individus sont solitaires (souvent une seule femelle) ou ne forment que de très petits groupes (rarement plus de 3 individus).

Nous avons au cours de cette étude réalisé des analyses de paternité à partir d'embryons isolés par Jan Pechenik (Univ. Tufts, Boston) provenant de six femelles échantillonnées dans une population de la côte Nord Est des Etats-Unis. De plus, l'échantillonnage additionnel de près de 90 adultes dans cette même population m'a permis de préciser les relations taille-sexe des individus et d'estimer ainsi la variabilité de la taille au changement de sexe dans cette population. Au préalable, nous avons dû développer des marqueurs génétiques afin de réaliser ces assignations de paternité : des marqueurs microsatellites ont été isolés et optimisés au laboratoire en collaboration avec Claire Daguin-Thiébaud.

II-B-2. SYNOPSIS DE L'ARTICLE 2: ISOLATION OF 11 MICROSATELLITE MARKERS IN *CREPIDULA CONVEXA* (GASTROPODA, CALYPTRAEIDAE) FOR PARENTAGE ANALYSES

A partir d'une banque d'ADN enrichie en microsatellites, 768 clones ont été obtenus. Quatre-cent quatre-vingt d'entre eux, positifs (i.e. contenant une séquence microsatellite) et contenant un insert de grande taille, ont été séquencés. L'analyse de séquences obtenues a permis de définir 108 paires d'amorces pour des tests initiaux d'amplification. Soixante et une d'entre elles ont ensuite été utilisées pour des tests de polymorphisme. Au total, 11 marqueurs microsatellites ont été sélectionnés pour leur polymorphisme et la qualité des amplicons obtenus sur un gel de séquence. L'analyse de la diversité génétique de ces 11 locus à partir d'un échantillon de 24 individus provenant de la population de Nahants (MA, USA) a montré une richesse allélique moyenne de 17 allèles (11 à 25 allèles par locus). En outre, la probabilité d'exclusion (la probabilité d'exclure comme père un male choisi aléatoirement et non apparenté dans la population, connaissant le génotype de la mère et du descendant) est très élevée : sa valeur combinée sur l'ensemble des locus est de 0.999 (entre 0.725 et 0.91 selon les locus), un résultat prometteur quant à la possibilité de réaliser des assignations de paternité avec ces locus chez cette espèce.

Note : Le principe du protocole d'isolement, de caractérisation et de mise au point des locus microsatellites élaborés sont indiqués en annexe II-B-1, les protocoles d'amplication, en Annexe II-B-2 et les fréquences alléliques observées dans la population de Nahants sont indiquées en annexe II-B-3.

II-B-3. « ISOLATION OF 11 MICROSATELLITE MARKERS IN *CREPIDULA CONVEXA*

(GASTROPODA, CALYPTRAEIDAE) FOR PARENTAGE ANALYSES »

Auteurs: Claire Daguin Thiebaut, Sabrina Le Cam & Frédérique Viard
Article sous presse dans “*Molecular Ecology Resources*”

PERMANENT GENETIC RESOURCES

Isolation of 11 microsatellite markers in *Crepidula convexa* (Gastropoda, Calyptraeidae) for parentage analyses

CLAIRE DAGUIN-THIÉBAUT*†, SABRINA LE CAM*† and FRÉDÉRIQUE VIARD*†

*UPMC Univ Paris 06, UMR 7144, Adaptation & Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff, France,

†CNRS, UMR 7144, Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff, France

Abstract

Crepidula convexa, a calyptraeid gastropod with direct embryonic development, changes sex from male to female in the course of its lifetime (protandry). Under sex-allocation theory, male reproductive success should be independent from age and size (a proxy used for age). However, this may be counterbalanced by female cryptic choice or gregarious behaviour. Eleven polymorphic microsatellite loci were thus developed to examine paternity of embryos and larvae. This set of loci appears suitable to carry out paternity analyses due to the high exclusion probability of unrelated males given the maternal genotype.

Keywords: enriched library, marine invertebrate, microsatellite, paternity, protandry

Received 4 September 2008; revision accepted 13 October 2008

Crepidula convexa Say 1822 is a marine gastropod that occurs along the east coast of North America from New England to Georgia (Hoagland 1977). As other members of the genus *Crepidula*, this species is protandrous, characterized by irreversible sex change during its lifetime in which males become females (Hoagland 1978). According to sex-allocation theory, protandrous species have differential reproductive output between the sexes based on age. Such a reproductive system may be selected when the reproductive output of females increases with age, whereas those of males is stable over time (Ghiselin 1969; Warner *et al.* 1975). Male investment should thus be independent of their age. As previously shown in other *Crepidula* species (e.g. *Crepidula fornicata*, Dupont *et al.* 2006), paternity analyses of embryos and larvae can be a powerful method to investigate this hypothesis. These analyses nevertheless need the development of highly polymorphic markers like microsatellites (Jarne & Lagoda 1996).

A genomic library was constructed of isolated DNA from one *C. convexa* individual from Beaufort, Chesapeake Bay, Virginia (34°42.993N, 76°40.291W), using Nucleospin Tissue columns (Macherey-Nagel), following the same methods as presented in Daguin *et al.* (2007). Sixteen micrograms DNA were digested by *RsaI*, purified with Nucleospin extract II columns (Macherey-Nagel) and ligated to *RsaI*

adaptors. Three enriched libraries for AC, CT and TGTA repeats were constructed; DNA fragments were hybridized to 5'-biotinylated (AC)₁₀, (CT)₁₀ and (TGTA)₅ probes separately, and captured with streptavidin-coated Magne-sphere paramagnetic beads (Promega). The three fractions of purified and enriched DNA were then ligated into pGEM-T Easy plasmid (Promega) and transformed into *Escherichia coli* JM109 competent cells.

Seven hundred and sixty-eight recombinant clones were screened for microsatellites by standard polymerase chain reaction (PCR) using a mixture of (AC)₁₀, (CT)₁₀ or (TGTA)₅ primers and the universal T7 and SP6easy (Daguin *et al.* 2007) primers consecutively. Four hundred and eighty positive clones were then sequenced with T7 primer on an ABI 3100 sequencer (Applied Biosystems). A total of 108 primer pairs were designed using the software Primer Premier 5.0 (PREMIER Biosoft International) and used in preliminary tests. Sixty-one pairs were screened for polymorphism on a LI-COR NEN Global IR2 DNA Analyser with forward primers labelled with infrared fluorescent dye IRD700 or IRD800.

Using the Nucleospin 96 Tissue kit (Macherey-Nagel), genomic DNA was extracted from a panel of eight individuals sampled in Nahant, Massachusetts, and in Wickford, Rhode Island. All loci were amplified as follows: touch-down PCR procedure using a PTC-200 thermocycler (MJ Research): 15 µL final volume, 2 µL of DNA template diluted to 1:10, 1× buffer (Euroclone), 0.25 mM of each

Correspondance: Claire Daguin-Thiébaud, Fax: +332 98292336;
E-mail: daguin@sb-roscoff.fr

2 PERMANENT GENETIC RESOURCES

Table 1 Microsatellite loci in *Crepidula convexa* (GenBank Accession nos. EU573967–EU573977): locus name, repeat array, primer sequences, initial temperature (Ti) in touchdown PCR program, allele size range, allele number (Nall), unbiased expected (H_E) and observed (H_O) heterozygosity, Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) P value. The probability of excluding a randomly chosen unrelated candidate parent from parentage given the genotype of the offspring and of the mother (P excl.) is indicated for each locus and over all loci. BLAST search within GenBank did not reveal any similarity between these markers and those previously developed for *C. fornicata* (Dupont & Viard 2003) or *C. coquimbensis* (Daguin *et al.* 2007)

Locus	Repeat array	Primer sequences 5'–3'	Nahant, Massachusetts, USA $N = 24$						
			Ti (°C)	Allele size range	Nall	H_E	H_O	HWE P value	P excl.
CconvAC2B2	(AGAT) ₄ N ₁₁ (TAGA) ₃ (GA) ₃₃	F: GTAGGGTCGATTTGTTGATATGTC R: TCATTAAACAAGCCGTGTCTAGTTC	60	191–231	13	0.902	0.958	0.352	0.770
CconvAC2G8	(TG) ₆ C(GT) ₁₁ (GC) ₂ (GT) ₆ (GC) ₄ (GT) ₅ N ₁₈ (GT) ₂ A(TG) ₃	F: AACAGCAGTTAGGATTATATCAGAG R: CTAACCTACCTTTGCTCGGGAC	62	265–305	15	0.909	0.833	0.316	0.781
CconvAC2H3	(GT) ₃ CA(GT) ₂ N ₇ (TG) ₄ N ₇ (TG) ₂ GT(TG) ₁₁	F: GTGGGGTGGTGGAGATTTGC R: AACACCTGTAGCTCCCAGTCATC	63	147–158	11	0.880	0.792	0.190	0.725
CconvCT2C3	(TG) ₂ TA(TG) ₃₈ TT(TG) ₂ AGT (GA) ₄	F: ACCAGTTGATCGCTTACCATTGTC R: CCTGTCTTGTGCTTCGACTTATG	62	216–284	14	0.909	0.917	0.457	0.779
CconvCT3B10	(GA) ₃ A(AG) ₃ (AC) ₂ (AG) ₅ AA(AG) ₂₀ N ₆ (AG) ₇ N ₂₁ (AG) ₄	F: TTGCCCTTCATAATCATCATAAGC R: AATGCGATCAAAACAGCGG	62	250–282	11	0.754	0.750	0.118	0.551
CconvCT3D8	(GA) ₅ GT(GA) ₃₂	F: GCGGAGGGTTGTGCTCATCG R: TAAGCAGCGCATTGACTTTAAGGC	55†	163–215	22	0.957	1.000	0.632	0.874
CconvCT3F5	(AG) ₆ (GA) ₅ A(AG) ₄₁ GGAA(AG) ₂₆	F: CTGTCAAGATTTCAGGAAAACCGTAG R: TCATACCTCCCGACCCCTCAC	65	269–311	16	0.937	1.000	0.983	0.833
CconvCT4B3	(AG) ₆ C(GA) ₃₁ AA(GA) ₃ TA(GA) ₃ CA (GA) ₃ AA(GA) ₃ A(AGAC) ₂ (AG) ₇ G ₁₁	F: GTTGTGGGGACGTGACGG R: TCTTTTAGGCACACAGCAATATAC	62	147–189	25	0.945	0.958	0.048	0.853
CconvCT5H8	(GA) ₅ TA(GA) ₄₃	F: AAGACTATGTAGACCATATAAGCC R: CATGAAAGCGAGTGCGTATG	62	427–495	14	0.906	0.833	0.645	0.773
CconvCT6E1	(CT) ₁₆ TT(CT) ₃	F: CCATAGTGGACGGCGAGGC R: TTTGCAGGTAATTGGAAAGCAGAAC	53†	206–284	28	0.976	0.917	0.940	0.910
CconvCT6F1	(AG) ₃₆	F: TCGAGTGAGACATTTCTAAAGC R: CACTTCCAGGGGTGAGATG	60	177–284	18	0.951	1.000	0.935	0.860
Mean over loci					17	0.908	0.897		
Standard deviation					5.66	0.058	0.084		

†For these two loci, the touchdown step in the PCR program was replaced by 10 cycles at the temperature indicated.

dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 2 µM of bovine serum albumin, 0.32 U of EuroTaq polymerase (Euroclone), 0.10 µM of fluorescent-labelled forward primer, 0.27 µM of unlabelled forward primer and 0.33 µM of unlabelled reverse primer. The touchdown PCR program included 4 min at 95 °C, followed by 10 cycles with 45 s at 95 °C, 45 s at the initial temperature (Ti, Table 1) and then decreasing by 1 °C per cycle to the final temperature, 45 s at 72 °C, and then 25 cycles at 95 °C for 45 s, Ti–10 °C for 45 s, 72 °C for 45 s, and 7 min at 72 °C. Of the 61 primer pairs, 49 were discarded because of unclear banding patterns or monomorphism.

Twenty-four individuals sampled in Nahant were genotyped with the remaining 11 loci in order to assess the level of polymorphism within *C. convexa*. Allele sizes were determined from a known sequence. The program GenePop'007 (Rousset 2008) was used to estimate the expected and observed heterozygosities (Table 1) and to test for deviation from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE). Genotypic disequilibrium was tested with the

program Genetix version 4.05 (Belkhir *et al.* 1996–2004). The total number of alleles ranged from 11 to 28, and the levels of heterozygosity were high and comparable across loci. No deviation from HWE was observed over all loci ($P = 0.358$). Significant deviations from HWE were observed only for the locus CT4B3. However, the test was no longer significant after correcting for multiple comparisons. Nevertheless, this pattern might be indicative of null alleles. Parentage analyses with known mother and father will be helpful to ascertain this hypothesis. No linkage disequilibria were detected between loci, after correction for multiple comparisons. The exclusion probability (the probability to exclude a randomly selected unrelated candidate parent of an arbitrary offspring, given the genotype of the offspring and of the mother), was computed with the software GERUD 2.0 (Jones 2005). The exclusion power of this set of loci was very high (Table 1). Using all of the loci, the exclusion probability was 0.999. Preliminary tests also showed that these loci can be successfully used to

analyse embryos (data not shown). These microsatellite loci thus provide sufficient variation and are likely to be used efficiently for parentage analyses and for studies of reproductive behaviour of *C. convexa* adults.

Acknowledgements

The authors are grateful to Bill Kirby-Smith, Wei Li and J. Pechenik for collecting specimens. This work benefited from a grant allocated by the Agence Nationale pour la Recherche (project MIRAGE, ANR-05-BLAN-0001-01). Molecular work was also supported by 'Third research program: Reproductive ecology and Reproductive output' of LIA DIAMS. S. Le Cam acknowledges a doctoral fellowship from the French Ministry of Higher Education and Research. The authors are also grateful to M. Perennou and the Genomer platform at SBR for assistance in sequencing, and to Stacy Krueger for the English proofreading.

References

- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chiki L, Raufaste N, Bonhomme F (1996-2004) Genetix 4.05 logiciel sous Windows pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome, Populations, Interactions*. CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Daguin C, Brante A, Fernandez M, Viard F (2007) Isolation of 10 microsatellite markers in the gastropod *Crepidula coquimbensis* (Gastropod, Calyptraeidae) for parentage analyses. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 1091–1093.
- Dupont L, Richard J, Paulet YM, Thouzeau G, Viard F (2006) Gregariousness and protandry promote reproductive insurance in the invasive gastropod *Crepidula fornicata*: evidence from assignment of larval paternity. *Molecular Ecology*, **15**, 3009–3021.
- Dupont L, Viard F (2003) Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite markers from the marine invasive species *Crepidula fornicata* (Gastropoda: Calyptraeidae). *Molecular Ecology Notes*, **3**, 498–500.
- Ghiselin MT (1969) The evolution of hermaphroditism among animals. *The Quarterly Review of Biology*, **44**, 189–208.
- Hoagland KE (1977) Systematic review of fossil and recent *Crepidula* and discussion of evolution of the Calyptraeidae. *Malacologia*, **16**, 353–420.
- Hoagland KE (1978) Protandry and the evolution of environmentally-mediated sex change: a study of the Mollusca. *Malacologia*, **17**, 365–391.
- Jarne P, Lagoda J-L (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, **11**, 424–429.
- Jones AG (2005) GERUD 2.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Molecular Ecology Notes*, **5**, 708–711.
- Rousset F (2008) GenePop'007: a complete re-implementation of the GenePop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103–106.
- Warner RR, Robertson DR, Leigh EG Jr (1975) Sex change and sexual selection. *Science*, **196**, 633–638.

**II-B-4. SYNOPSIS DE L'ARTICLE 3: « PATERNITY AND SEX CHANGE IN THE
SESSILE MARINE GASTROPOD *CREPIDULA CONVEXA*: COMPARISON WITH OTHER
PROTANDROUS *CREPIDULA* SPECIES »**

**Florentine Riquet a contribué à ce travail dans le cadre d'un stage de césure (de Avril à Septembre 2008, AgroParisTech).*

L'objectif de cette étude était de déterminer si la polyandrie est possible chez *Crepidula convexa*, un gastéropode à développement direct, à fécondation interne et au comportement peu grégaire. Ces résultats ont été analysés en regard des connaissances disponibles dans la littérature sur deux espèces proches mais aux traits d'histoire de vie contrastés, *C. fornicata* et *C. coquimbensis*.

Des individus adultes ont été échantillonnés dans une population de la côte nord est des Etats-Unis à Barnstable (N=97) : (i) 79 individus ont été échantillonnés aléatoirement et (ii) les 18 restants ont été échantillonnés sur 6 supports (coquilles, cailloux) répartis dans une zone de 25 mètres environ; la distribution de ces 18 adultes sur chacun des supports a été notée. Les embryons de 10 femelles (25 embryons par femelle) ont été isolés pour réaliser des analyses de paternités. L'ensemble des adultes échantillonnés (97) a été mesuré et sexé. Les génotypes de ces adultes et embryons ont été obtenus à l'aide de 6 marqueurs microsatellites.

Bien que différant par ses caractéristiques développementales et comportementales de *C. fornicata* et *C. coquimbensis*, nous avons observé comme chez ces deux espèces, une forte diversité génétique chez *C. convexa* (ex. estimateur de la diversité génétique, $H_e = 0.92$).

Les assignations de paternité réalisées sur les 10 descendances montrent que la polyandrie existe chez *C. convexa*. Il s'agit donc d'un trait commun aux trois espèces de crépidules pour lesquelles ce type d'étude a été réalisé. Cependant chez *C. convexa*, le degré de paternité multiple est plus faible avec en moyenne 1.8 pères par ponte contre 3 chez *C. fornicata* et 4 chez *C. coquimbensis*. Cette plus faible diversité moyenne des contributions paternelles à une descendance est due à une grande variabilité de ces contributions selon les descendances : en effet sur les 10 descendances analysées, la moitié ne présente qu'un seul père. Or ces femelles apparemment monoandres sont toutes des femelles isolées ou associées uniquement à un mâle sur leur substrat. Ces résultats sont synthétisés dans la Figure A-II-2 schématisant les profils de paternité, la distribution des mères et des individus associés sur les substrats. En ne considérant que les descendances de mères associées à d'autres individus sur les substrats

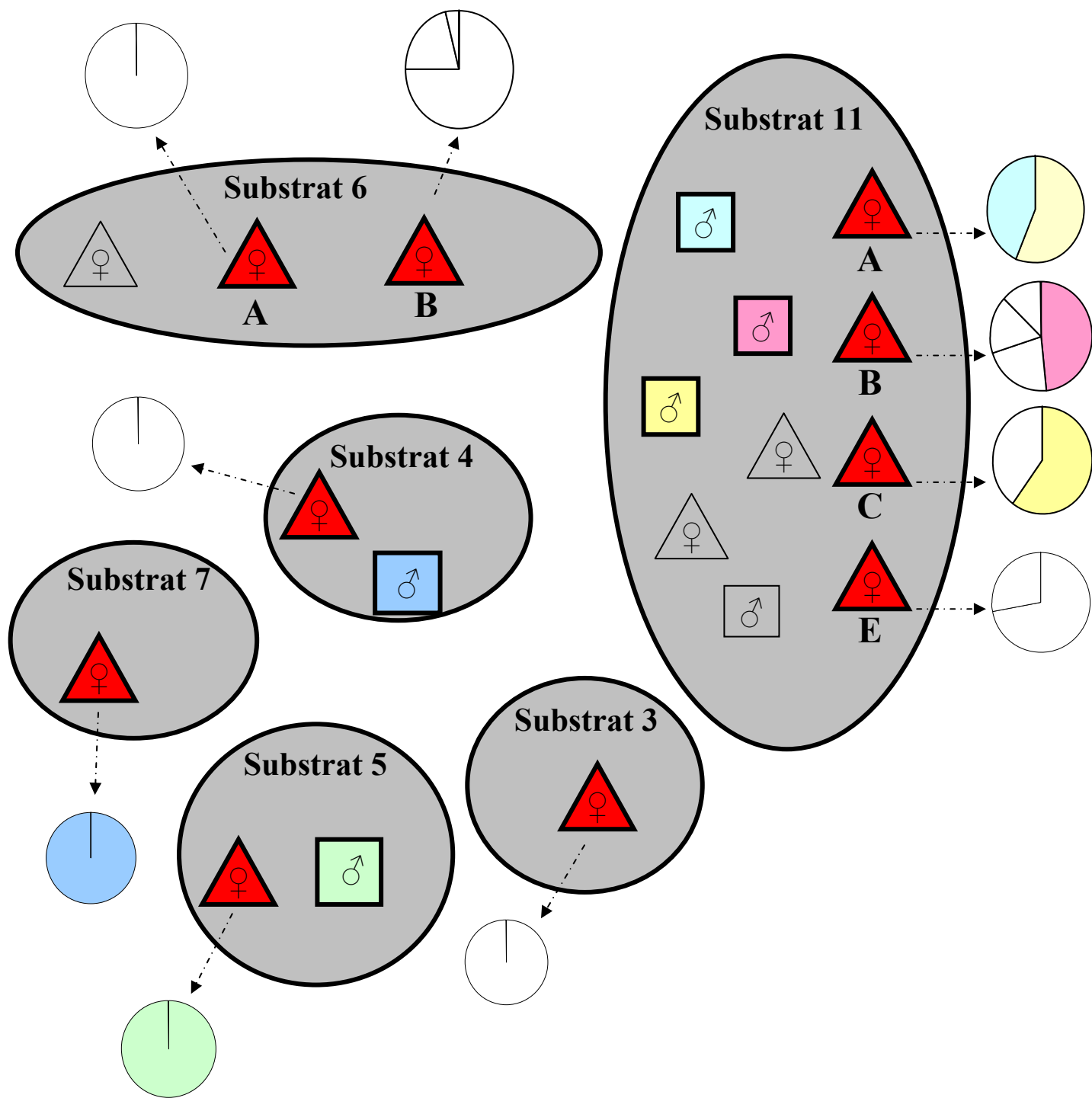


Figure II-B-2: Représentation schématique des individus analysés pour l'assignation de paternité chez *C. convexa* et leur distribution sur les substrats étudiés.

Chaque substrat est représenté par un ovale grisé. Les mâles sont symbolisés par des carrés et les femelles par des triangles. Les triangles rouges indiquent les femelles dont la descendance a été analysée et les assignations en résultant sont indiquées par un graphique en camembert. Chaque tranche représente la contribution relative d'un père spécifique. Lorsque ces tranches sont laissées blanches, elle indiquent que les pères associés n'ont pas été échantillonnés (chacun de ces pères est différent des autres), quand elle sont colorées elles indiquent un individus figuré de la même couleur sur les substrats.

échantillonnés, le degré de paternité passe de 1.8 à 2.6 pères en moyenne, une valeur plus proche de celles rencontrées chez *C. fornicata* ou *C. coquimbensis*. Un autre point remarquable et différenciant des résultats d'analyses de paternité chez les deux autres espèces est que 70% des pères n'ont pas été retrouvés à proximité des mères. Par ailleurs, un père assigné à une des descendance est un mâle échantillonné sur un substrat différent de celui de la mère étudiée.

Ces résultats pourraient être expliqués par une capacité de déplacement importante des mâles chez *C. convexa*, associée à des mécanismes d'attraction conspécifique, favorisant le passage plus important de mâles sur les substrats où cohabitent plusieurs femelles, et ainsi augmentant la probabilité de fécondations multiples.

Une similitude est cependant trouvée entre les trois espèces : la notion de père majoritaire dans une descendance donnée. Chez *C. fornicata*, ces pères ont des caractéristiques particulières : ils se trouvent systématiquement dans la chaîne maternelle et sont généralement de grands individus se situant juste au dessus de la femelle. Chez *C. coquimbensis*, les caractéristiques du père majoritaire sont moins documentées, cependant, il a été montré que ni le dernier mâle copulant avec la femelle, ni le plus grand mâle n'était le père majoritaire. Pour *C. convexa*, notre étude ne permet pas d'obtenir de données quant à l'ordre de fécondation par les mâles, et même si les pères identifiés et échantillonnés appartiennent aux plus grandes classes de la distribution de tailles des mâles, les tailles relatives de tous les autres pères sont indisponibles. Les relations entre caractéristiques des pères et succès de reproduction sont ainsi encore à étudier chez *C. convexa*.

En conclusion, la reproduction de *C. convexa* se rapproche de celle des deux autres espèces de crépidules étudiées lorsque la mère se trouve en présence d'autres individus, lui permettant ainsi de maximiser sa reproduction. Par ailleurs, notre étude suggère que si la formation de chaînes chez *C. fornicata* assure la proximité de partenaires potentiels, en revanche, la mobilité des mâles chez *C. convexa* et *C. coquimbensis* pourrait permettre d'augmenter le nombre de partenaires différents au cours d'une saison de reproduction. Cette mobilité importante des mâles pourrait compenser l'absence de phase larvaire libre chez ces deux espèces et limiter des reproductions entre individus apparentés dans la population.

Note : Pour réaliser cette étude, 6 des 11 microsatellites décrits dans l'article 2 ont été utilisés. Les caractéristiques et les conditions d'amplification des marqueurs utilisés au cours de cette étude sont détaillées en annexe II-B-2 et les fréquences alléliques observées dans la population de Barnstable sont indiquées en annexe II-B-3.

II-B-5. « PATERNITY AND SEX CHANGE IN THE SESSILE MARINE GASTROPOD

CREPIDULA CONVEXA*: COMPARISON WITH OTHER PROTANDROUS *CREPIDULA

SPECIE »

Auteurs: Sabrina Le Cam, Florentine Riquet, Jan A. Pechenik & Frédérique Viard
Article en préparation

Paternity and sex change in the sessile marine gastropod *Crepidula convexa*: comparison with other protandrous *Crepidula* species.

Sabrina Le Cam, Florentine Riquet, Jan A. Pechenik and Frédérique Viard

Authors list

Sabrina Le Cam, Frédérique Viard

UPMC Univ Paris 06, CNRS, UMR 7144, Adaptation & Diversité en Milieu Marin, Station Biologique, Roscoff, 29682 France

Correspondence: Sabrina Le Cam, UPMC Univ Paris 06, CNRS UMR 7144, Adaptation & Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, 29682 France ; Tel : +33298 292320, Fax : +33298 292336 ; E-mail : lecam@sb-roscoff.fr

ABSTRACT

Patterns of polyandry are likely to influence sex changing strategies in sequential hermaphrodites as they interact directly with individual reproductive values. In sex changers with internal fertilization, gregarious behaviour is a trait that may contribute to increase mating opportunities and thus the level of multiple paternity. *Crepidula convexa* is a direct developing protandrous gastropod characterized by a weak gregarious behaviour, the females being frequently found isolated. Using 6 microsatellite markers, we analyzed paternity profiles in 10 progenies (25 embryos per mother). The number of assigned fathers was highly variable among them ranging from 1 to 4 fathers. Interestingly, polyandry was not detected in solitary females but in females grouped with conspecific individuals. On average 1.8 fathers per brood were observed but this value increased to 2.6 fathers per brood when considering only non-isolated females. Over all the broods, 18 sires were unambiguously identified but only 5 were sampled suggesting an important male mobility. Male mobility may have been selected to balance the absence of larval dispersal in this benthic species. By comparing our results with previous paternity analyses carried out in two other *Crepidula* species, namely *C. fornicata* and *C. coquimbensis*, polyandry appears as a common trait of these sex changing gastropods despite their different grouping behaviour and life cycles. As expected, the level of polyandry was nevertheless lower in the weakly gregarious *C. convexa*. Additional model species have to be examined to get a comprehensive view of the complex relationship between larval dispersal, adults' mobility and reproduction patterns in such sex changers.

Key words: *Crepidula*, multiple paternity, gregarity, direct developpement

INTRODUCTION

Life cycle and reproductive systems are likely to co-evolve to maximize lifetime reproductive success of individuals under the influence of biotic (e.g. competition) and abiotic (e.g. environmental stochasticity) drivers (Levin & Bridges 1995). Marine invertebrates, which are considered as the largest group in terms of phyla and classes (Giese & Pearse 1974), display a wide range of reproductive and development traits thus providing numerous case studies for examining the interplay and co-evolution between different life history traits.

Polyandry (i.e. multiple paternity) is one of these traits that has been largely described in animals and more specifically in many marine invertebrates. (reviewed in Baur 1998). Despite associated costs like copulation costs for the females, it is recognized as a main driver of female fitness and average offspring quality (Jennions & Petrie 2000; Neff & Pitcher 2005; Simmons 2005; Yasui 1998). Benefits are gained with polyandry through different mechanisms such as material benefits to the females (e.g. chemical defense against predation, González *et al.* 1999), the intrinsic genetic quality of males, the beneficial interactions between maternal and paternal genotypes or paternal environmental effects (Simmons 2005; Yasui 1998). Indirect genetic benefits largely rely on the potential variability among sperms from different males which will contribute to increase offspring traits diversity (“bet-hedging hypothesis” Jennions & Petrie 2000; Yasui 1998). Polyandry can be particularly advantageous in terms of individuals’ reproductive value in species living in fluctuating environments (Yasui 1998) like marine habitats, typically characterized by highly variable environmental conditions (e.g. thermal variation, hydrodynamism, Ferdinando 1994).

Most of the marine invertebrates (55-85% according to Thorson 1950) present a benthopelagic life cycle where dispersal and next generation survival mainly rely on a free larval phase. The remaining part of these marine sessile invertebrates lacks of this dispersive phase and rear embryos that will be released as juveniles directly in the benthic population. The limited or even absence of mobile behaviour of benthic species, especially when associated to internal fertilization (i.e. males directly transmit their sperm to females), is likely to prevent polyandry due to a limited amount of sexual partners available in the vicinity. However, several molecular studies based on paternity analyses in marine invertebrates demonstrated the ubiquity of within brood multiple paternity and, surprisingly an important number of sires have been identified in many species with internal fertilization and limited mobility (Makinen *et al.* 2007; Paterson *et al.* 2001; Sprenger *et al.* 2008; Walker *et al.* 2007).

Several processes can help in getting together sexual partners in sedentary marine invertebrates such as the release of attractive cues in between sexes (e.g. in the shrimp *Rhynchocinetes typus*, Diaz & Thiel 2004) or gregarious behaviour (e.g. the marine tube worm *Phragmatopoma lapidosa californica*, Pawlik et al. 1991). Sequential hermaphroditism with environmental sex determination (ESD, Charnov & Bull 1977) is an additional mechanism that may favour the grouping of compatible sexual partners. Sex changing species are known in a large number of phyla (e.g. terrestrial plants, fishes and marine invertebrates, Policansky 1982). Sex and resource allocation theories have been successful in predicting the conditions favouring sex change, the type (i.e. from male to female or from female to male) and timing (age) of sex reversal (Charnov 1982). In particular, Ghiselin (1969)'s size advantage model predicts that sex change occurs when the reproductive value of one sex increases more quickly with size or age compared to the other sex. As pointed out by Munday et al. (2006), sex change strategies are nevertheless greatly diversified in the wild. In particular, the timing of sex change is highly influenced by the local social environment (i.e. group of individuals interacting for reproduction). The adaptive significance of this sexual strategy relies on an increase of mating opportunities by the optimization of the relative proportion of males and females at a local scale; this may favour polyandry when associated to gregarious behaviour. Thus patterns of polyandry or traits affecting individuals' reproductive success stand as a link between sex change patterns and reproductive group structure, and despite that, are still poorly studied (Munoz & Warner 2003; Munoz & Warner 2004)

A tight relationship can be expected between gregarity, sex change and polyandry. In particular, we can hypothesize a lower amount of multiple paternity in sessile species lacking proximal mechanisms to adjust their sex-ratio and/or gregarious behaviours. We here examined this hypothesis by carrying out and comparing the outcome of a paternity analysis in the species *Crepidula convexa*. The genus *Crepidula* is particularly well-suited to examine the interplay between gregarity, sex change and polyandry: it is composed of protandrous (i.e. changing sex from male to female) species with internal fertilization. However, gregarious behaviours are of variable intensity within this genus (Collin 2006; Hoagland 1978). In some species, like *Crepidula fornicata*, large perennial clumps of individuals (also called "stacks") are found in the wild whereas in other species like *C. convexa*, the individuals are found more or less isolated. Several life cycles are also documented in the genus *Crepidula* from benthopelagic life cycle with long larval stage (e.g. *C. fornicata*) to direct developers (e.g. *C. convexa*). The most largely studied species of this family is *C. fornicata*. This benthopelagic

gastropod has been for a long time a model species for sex change studies (see for example, Coe 1938). More recently, this mollusc native from the coasts of the North-Western Atlantic has been largely investigated because of its invasive status in Europe (Blanchard 1995, 1997; Coum 1979; Deslous-Paoli 1985; Dupont et al. 2007a; Dupont et al. 2007b; Richard et al. 2006). In this highly gregarious species in which sex change has been shown to be determined by local sex ratio (Coe 1938; Hoagland 1978), paternity assignment studies have demonstrated that multiple paternity is the rule (Dupont *et al.* 2006; Gaffney & McGee 1992; Le Cam *et al.* 2009; Proestou *et al.* 2008). *Crepidula coquimbensis* is the only other species in which paternity analysis has been carried out (Brante 2007; Brante *et al.* in prep). Conversely to *C. fornicata*, this species originating from the South East Pacific is a direct developer. However like *C. fornicata*, it displays a gregarious behaviour with females and males sharing the same microhabitats, i.e. empty shells of other gastropods (Brown & Olivares 1996). Moreover, this species also showed large amount of multiple paternity (100% of the progeny arrays analyzed by Brante *et al.* in prep). In this study, we chose to document the paternity profile of a third *Crepidula* species, namely *C. convexa*, showing a much lower gregarious behaviour as compared to *C. fornicata* and *C. coquimbensis*. *C. convexa* is a protandrous species inhabiting the same habitats than *C. fornicata* along the east coast of North America from New England to Georgia (Collin 2001). As *C. coquimbensis*, it is a direct developer. *C. convexa* is often found in small groups of individuals and females are commonly found isolated on rocks, sea grass or empty shells or living animals. For instance, the association between *C. convexa* and shells inhabited by hermit crabs (*Pagurus longicarpus* Hendler & Franz 1971) suggested an enhanced mobility potential of the gastropod (Li & Pechenik 2004).

We hypothesized that the limited gregarious behaviour of females of the species *C. convexa* should decrease their ability to mate as compared to *C. fornicata* and *C. coquimbensis*, and that as a consequence the amount of multiple paternity should be reduced. To test for this hypothesis, based on microsatellite markers recently developed for this species (Daguin et al. 2009), we carried out a paternity analysis on 10 progenies of *C. convexa* females sampled in the wild. Besides, the size distribution of males and females was carried out to have more insights on the reproductive patterns in this species. These results are discussed in the light of previous data obtained in the two other species of the genus *Crepidula* for which paternity analyses were made, *Crepidula fornicata* and *Crepidula coquimbensis*.

Table 1. Males and females distribution on the sampled substrates

Individuals' label is composed of the substrate number and the individual sexual status (M: male; F: Female, Fb: brooding female)

Brooding females for which progenies were analyzed are indicated in bold.

Susbstrate label	Number of individuals on the substrate	Individuals' sexual status and label
3	1	3-Fb
4	2	4-Fb , 4-M
5	2	5-Fb , 5-M
6	3	6A-Fb , 6B-Fb
7	1	5-Fb
11	10	11A-Fb , 11B-Fb , 11C-Fb , 11E-Fb , 11-Fb, 11-F, 11-M1, 11-M2, 11-M3, 11-bM

MATERIALS AND METHODS

Sampling and size structure analysis

Ninety-seven adults were sampled during low tide, at the breeding season, in July 2007, in Barnstable Harbour (Massachusetts, USA). Adults were sampled on empty shells or stones. In addition, embryos of ten brooding females (which will be referred as ‘mother’ in the following text), sampled on 6 distinct substrates, were isolated. A total of 275 embryos from 10 broods distributed on 6 substrates were isolated: 2 progenies from females (N° 3 and 7) found alone on a substrate, 2 progenies (N° 4 and 5) from females sharing their substrate with a male, 2 progenies from 2 females sharing the same substrate (N° 6) and 4 progenies from females sharing the same substrate together with other conspecifics (N° 11) as presented in Table 1. For all except progeny N°11-A, 5 embryos in each of 5 different capsules ($N = 25$) were preserved and for the progeny 11-A, 50 embryos (8-9 from 6 capsules) were sampled. The exact position of each mother (in comparison of the 9 other females) and surrounding males is described in Table 1.

To analyze the population age structure and the relationship between age and sex in the study population, all the study individuals were sexed according to Hoagland (1978) and their shell length was measured with a caliper to the nearest 0.1mm. A size-frequency histogram was plotted using 2 mm size-class intervals. The size-class interval fits three criteria: (1) size classes have at least 5 individuals; (2) the number of adjacent empty classes is minimized and (3) the interval is larger than the error on measurements (Jollivet et al. 2000). The size distribution was compared to a normal distribution using a Shapiro–Wilk 1-sample test with the *shapiro.test* function of the statistical package R (R Development Core Team 2007; <http://www.R-project.org>). Size-frequency histograms were smoothed using a weighted moving average at the 3rd order (Frontier & Pichod-Viale 1991). Assuming that the sizes follow a Gaussian distribution within each cohort (age group), modal decomposition of size-frequency distribution was performed using MIXDIST, a package from the statistical software R (<http://www.r-project.org>). According to the precision of the measures and the true growth model, a Gaussian curve can in fact be representative of several closed cohorts, in particular for older (largest) individuals. Nevertheless, this method has been proved to be efficient to identify major discontinuities in age structure (Thiébaud *et al.* 2002). The relative size at sex change ($L_{50}/L_{\max}$), a classical parameter used to describe sex changing species (Charnov & Skuladottir 2000) was calculated: this parameter is the ratio of the size at which 50% of the individuals are females (L_{50}) divided by the size of the largest individual in the

sample ($L_{\max}$). L_{50} was estimated by using a logistic regression (standard method described by Sokal & Rohlf 1995) on the size data of males and females. Finally the size overlap between males and females was calculated as the percentage of the size range of females where males were observed.

Adults and embryos were preserved in ethanol (96%) for posterior genetic analyses.

DNA extraction and microsatellite genotyping

DNA extraction of the 97 sampled adults was performed using NucleospinRMulti-96 Tissue Kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer's protocol, and then checked on a 1% agarose gel. DNA extraction of the 275 sampled embryos was performed following the protocol of Higuchi (1989): briefly each larva was washed in PBS 1X pH 7.4 to remove residual ethanol, and incubated for six hours at 56°C in 100 μ L of Higuchi buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5mM MgCl₂, 0,45% NP40 (Igepal 630), 0,45% Tween 20, 0,1mg/ml gelatine) with 5 μ L of proteinase K (10 mg/mL), followed by 15 min. at 95°C.

Adults and larvae were genotyped at 6 microsatellite loci previously characterized for *C. convexa* (Daguin-Thiébaud et al. 2009): AC2G8, CT2C3, CT3F5, CT6F1, CT3B10, and CT5H8. Amplifications and genotyping on a Li-Cor 4200 sequencer were carried out following protocols given in (Daguin-Thiébaud et al. 2009).

Statistical analysis of molecular data

The null hypothesis of independence between loci was tested from statistical genotypic disequilibrium analysis with the software GENEPOP V 3.4 (Raymond & Rousset 2003). Using the same software, allele frequencies, total number of alleles and average number of alleles, observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities were estimated at the population level. For sake of comparison with other data set with smaller sampling size, we also calculated allelic richness with a rarefaction size of 24 individuals (Ar ; El Mousadik & Petit 1996) using FSTAT, version 2.9.3 (Goudet 1999). Population heterozygote deficiencies were quantified within each population by calculating $\hat{f}$ (Weir & Cockerham 1984), an estimator of the fixation index F_{is} using GENEPOP, version 3.4.

For each brood, paternity assignment was based on the mother and larvae multi-locus genotypes with reference to the allelic composition of the adult population (i.e. 97 individuals from Barnstable population). The exclusion probability (the probability to exclude a randomly-selected unrelated candidate parent of an arbitrary offspring, given the genotype of

the offspring and of the mother), was computed with the software GERUD 1.0 (Jones 2005) . For paternity inference, we used the likelihood-based method implemented in the software COLONY (Wang 2004) that provides the best paternity configuration either by identifying a potential father from a candidate fathers' list or by reconstructing fathers' genotype when fathers were not sampled. All the 97 adult individuals from the population were considered as candidate fathers to determine if assigned fathers were identified some adults sampled. From paternity assignments' results, the relative contribution of each father to the progeny was calculated and for each brood, a Fisher's exact test was made to determine whether all assigned fathers contributed equally to the offspring.

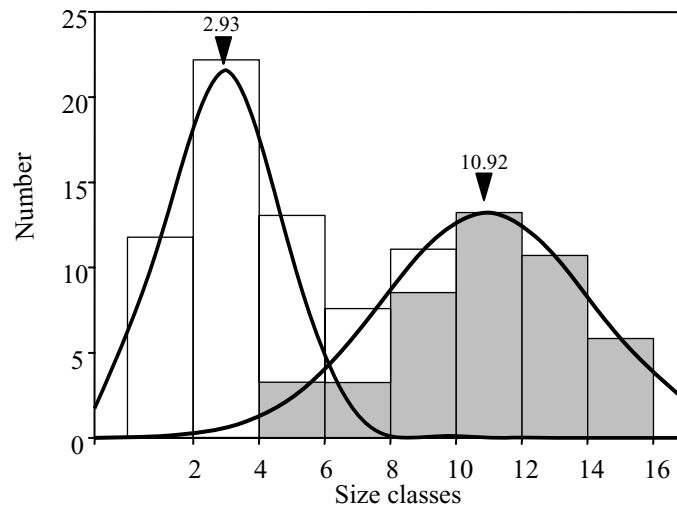


Fig 1. Size-class frequency histogram (bars) and outcome of the modal decomposition (curve) for adults of *C. convexa* sampled in Barnstable Harbour (N=97)

Mean value of each modal component is indicated with a black arrow. Sex distribution is indicated for each size class (males in white and females in grey).

Table 2. Population size structure

Size-distribution analysis at population level with characteristics of the two modal components identified following the modal decomposition.

	Modal component N°1	Modal component N°2
Proportion	0.47	0.57
Mean size (mm)	2.93	10.92
Standard deviation	1.64	3.14

Table 3. Genetic diversity, heterozygote deficiency and exclusion probability in the study population (Barnstable, N=97 adults)

For each locus and over all loci, the total number of adults examined is indicated together with the number of alleles (Nall), allelic richness (Ar; based on a rarefaction size of 24 individuals), expected heterozygosities (H_e) and exclusion probability. The estimator of the fixation index F_{is} is indicated with probability of the exact test for deviations from Hardy–Weinberg expectations: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Locus	N	Ar (Nall)	H_e	Fis	Exclusion Probability
AC2G8	97	17 (23)	0.93	0.014**	0.85
CT2C3	97	17 (31)	0.92	0.088***	0.84
CT3F5	96	20 (35)	0.93	0.023	0.87
CT6F1	97	16 (23)	0.92	0.010*	0.84
CT3B10	72	8 (11)	0.81	0.012*	0.63
CT5H8	88	19 (27)	0.93	0.227***	0.87
Total	97	16.1 (25)	0.92	0.075**	0.99

RESULTS

Sex change and size structure in Barnstable

The overall sex ratio (ratio of males over all adults) in the study population (N=97 adults) was 0.54%. The mean size of females (11.6 mm) was significantly different from the mean size of males (3.3 mm) (Kruskal-Wallis test: $H = 68.82$, $df=1$, $P<0.001$). The relative size at sex change (L_{50}/L_{max}) was estimated 49% and males were observed up to 43% of the female size range (minimum female size: 5.9mm and maximum male size: 10mm)..

The size-frequency distribution significantly differed from a normal distribution (Shapiro-Wilk test, $W=0.8615$, $P<0.001$). The fact that the overall size distribution can be split in several Gaussian curves highlighted the occurrence of several age groups and thus an irregular recruitment through time in these populations. The modal decomposition of the size-frequency histogram showed two modes ($ddl = 5$, $\chi^2_2 = 2.0871$, $P = 0.837$). Size-frequency histogram is presented in Figure 1 and the characteristics of each component of the modal decomposition of histogram are detailed in Table 2. The first Gaussian curve grouped together small individuals (mean = 2.93, Standard deviation = 1.64) that were almost exclusively males (98% of the individuals in the size classes ranging from 0 to 6mm). The largest individuals, included in the second Gaussian curve (mean = 10.92, Standard deviation = 3.14) consisted mainly of females (86% of the individuals in size classes from 6 to 16mm). Only three size classes displayed both males and females with a large amount of males for two size-classes (4-6 mm and 6-8 mm) and an excess of females in the size-class 8-10mm : the smallest female and the largest male displayed a size of 5.9 mm and 10 mm respectively.

Genetic diversity in the study population

Genetic diversity indexes are indicated for each locus and over all loci in Table 3. Genetic diversity was high across all the microsatellite loci examined. Over the 97 individuals analysed, the number of alleles per locus varied from 11 for the locus CT3B10 to 35 for the locus CT3F5. Allelic richness of Barnstable was 16.1 showing that even with less sampling effort (here the rarefaction size used was 24), the genetic diversity is still important in the study population. A low but significant heterozygote deficiency was observed at the population level ($\hat{f} = 0.075$, $P<0.001$). Mean expected heterozygosity was also high with a value of 0.92 which is congruent with the high exclusion power of this set of loci ranging from 0.63 for CT3B10 to 0.87 for CT3F5 and CT5H8 (Table 3). The exclusion probability of the combined set of loci was consequently remarkably high (> 0.99) and each study adult was

characterized by a unique multi-locus genotype. These microsatellite loci thus provide sufficient variation for parentage analyses in the study population.

Paternity analyses

Figure 2 and Table 4 present the fatherhood profile of each progeny together with the fathers' identity and their relative contribution. Altogether 262 embryos could be unambiguously assigned to 18 paternal genotypes. Among them, five adults that were collected during the sampling were assigned as fathers of 45% of the embryos analyzed. Four of these five fathers were collected on the substrate of the mother of the embryos that they were assigned to. Only one male (individual 4-M sampled on substrate 4) was assigned as a father of a brood from a female sampled on a different substrate (i.e. the female of the substrate 7). Also, except the male 11-bM which sired embryos of both females 11A-Fp and 11C-Fp, all the identified sires contributed to only one given progeny.

On average, 1.8 fathers per brood were observed with a variable amount of the number of fathers per brood ranging from 1 to 4. All the progenies from females found alone on a substrate or sharing their substrate with a single male exhibited a unique sire (substrates N° 3, 4, 5 and 7). Cases of multiple paternity (5 over the 10 progenies analyzed) were observed only for females sharing a substrate with at least two other individuals (i.e. substrates 6 and 11). Within these five progenies, a mean of 2.6 fathers per brood were identified. For three of them, we noted an unequal relative contribution among sires (Fisher exact test; progeny 6B, $P = 0.003$; progeny 11B, $P = 0.005$ and progeny 11E, $P = 0.002$) with one father contributing to a large proportion of the study embryos, (75% for X_{6B-1} , 48% for 11-M2 and 72% for X_{11E-1} ; see Table 2). Broods of females 11A-Fp and 11C-Fp presented a similar contributions of the 2 sires (Fisher exact test, $P = 0.47$ and 0.20 respectively).

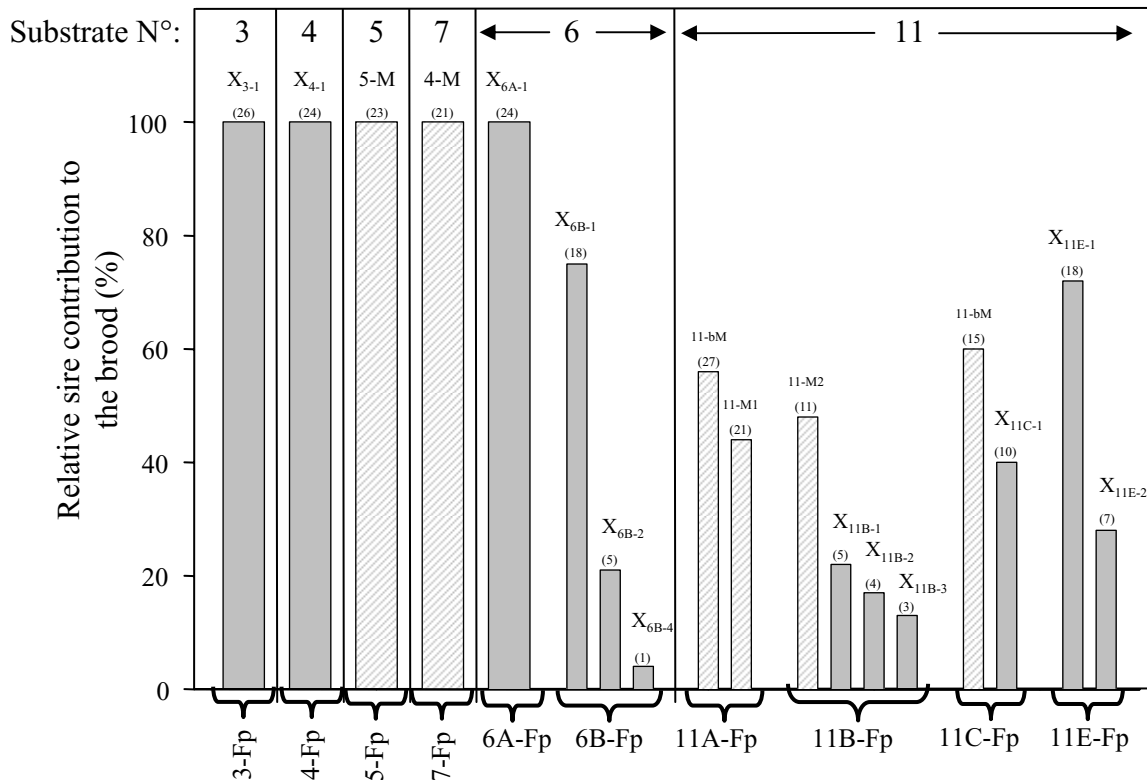


Fig 2. Relative sire contribution in each brood

Substrate land mothers' labels are indicated together with fathers's label and the number of embryos they sired (in between brackets). Stripped vertical bars correspond to know (i.e. sampled) fathers.

Table 4. Paternity assignment and father's characteristics

For each substrate analyzed, the name of the mothers, their size (mm) and the number of embryos (N_{Emb}) assigned are indicated together with the number of sires (N_{sires}) assigned per progeny.

For each progeny, the percentage of embryos assigned to each identified father is presented with fathers' characteristics (label and size) when known (i.e. sampled individual). Unknown (i.e. not sampled) assigned father are named with a X and a number referring to the progeny (ex. X_{6B-2} : second unknown individual assigned to the progeny of the mother 6B)

Substrate	Mothers' characteristics			Nb_{sires}	Fathers' characteristics		
	Label	Size (mm)	Nb_{Emb}		Relative contribution (%)	Label	Size (mm)
3	3-Fp	10.7	26	1	100	Unknown (X_{3-1})	
4	4-Fp	Unknown	24	1	100	Unknown (X_{4-1})	
5	5-Fp	10.4	23	1	100	5-M	6.2
7	7-Fp	15.2	21	1	100	4-M	6.1
6	6A-Fp	9.3	24	1	100	Unknown (X_{6A-1})	
	6B-Fp	12.2	24	4	75	Unknown (X_{6B-1})	
					21	Unknown (X_{6B-2})	
					4	Unknown (X_{6B-3})	
11	11A-Fp	8.9	48	2	56	11-M1	5.5
					44	11-bM	9
	11B-Fp	12.8	23	3	48	11-M2	7.8
					22	Unknown (X_{11B-1})	
					17	Unknown (X_{11B-2})	
					13	Unknown (X_{11B-3})	
	11C-Fp	14.3	25	2	60	11-bM	9
					40	Unknown (X_{11C-1})	
	11E-Fp	15.4	25	2	72	Unknown (X_{11E-1})	
					28	Unknown (X_{11E-2})	

DISCUSSION

Genetic investigations of reproductive patterns are not that numerous in marine invertebrates, yet the data available show that intra-brood multiple paternity is commonly observed (e.g. Gosselin *et al.* 2005; Johnson & Yund 2007; Marshall & Evans 2007; Shaw & Sauer 2004; Toonen 2004). In particular, species with internal fertilisation, in which females might exercise mate choice, a high level of polyandry is usually observed (e.g. 3.5 fathers per brood on average in the gastropod *Busycon carica* (Walker *et al.* 2007); 3 to 8 father in the gastropod *Littorina saxatilis* (Makinen *et al.* 2007); 4 to 6 fathers per broods in *Littorina obtusata*, (Paterson *et al.* 2001)). In our study, we observed a much lower degree of multiple paternity with polyandry observed in 5 out of the 10 studied progenies of *Crepidula convexa* and an average of 1.8 fathers per brood. This value is lower than those measured in *C. coquimbensis* (3.4 fathers per brood in one population, Brante *et al.* in prep) or in *C. fornicata* in populations introduced along the French coast of the English Channel (3.3 fathers per brood in the Bay of Morlaix (Le Cam *et al.* 2009) and 2.5 fathers per brood in three populations from the Bay of Brest (Dupont *et al.* 2006)). The occurrence of polyandry in this species together with the outcome of the previous studies in *C. fornicata* (Dupont *et al.* 2006; Gaffney & McGee 1992; Proestou *et al.* 2008) and *C. coquimbensis* (Brante *et al.* in prep) nevertheless supports the hypothesis of ubiquity of polyandrous behaviour in the genus *Crepidula* despite different life history traits and life cycle among species of this genus.

The lower average value found in *C. convexa* is not due to a lower amount of fathers in each progeny but rather to the occurrence of single paternity in half of the 10 progenies analyzed in Barnstable. When considering only the progenies in which multiple paternities were observed, the average number of fathers increased to 2.6 fathers per brood, with a maximum of 4 fathers for the progeny 11C. Conversely to *C. fornicata* which lives in perennial groups of several individuals (stacks) and *C. coquimbensis* which formed groups composed of one female and 2 to 6 males (Brante *et al.* in prep; Brown & Olivares 1996), *C. convexa* does not exhibit a strong gregarious behaviour. Comparative studies among species for polyandry patterns are rare but according to Uller & Olsson (2008), which reviewed paternity patterns and processes in reptiles, one of the most significant parameter in determining the level of polyandry is the mate-encounter-frequency, combined to conflict between large male benefits and relatively small female costs. This might also hold in the marine realm and in particular in the study species. In our study, four of the substrates collected in Barnstable consisted either of a lonely female or of a female associated with a

conspecific male and all of the broods analyzed from these substrates were sired by a single male. This suggests that encountering mates might be potentially limiting in *C. convexa*. A low amount of multiple paternity was also observed in one population of *C. fornicata* studied in its American native range, with 42% of the broods characterized by single paternity and on average 1.8 fathers per brood (Proestou et al. 2008). Interestingly, in this study, the mean number of individuals per stack was much lower than in the study by Le Cam *et al.* (2009) or Dupont *et al.* (2006), suggesting a correlation between the number of potential fathers surrounding the mother and the number of assigned (thus effective) fathers. Indeed, when plotting the number of fathers per brood against the number of individuals sampled in association with the mother, from the data available in papers cited above (this study, Brante *et al.* in prep; Dupont *et al.* 2006; Le Cam *et al.* 2009; Proestou *et al.* 2008), we observed a significant increase in the level of polyandry together with the number of potential fathers (Linear regression, $y = 0.126 + 1.730x$, $R^2 = 0.137$, $P < 0.001$; Figure 3). These data suggest a link between the amount of sires and the proximity (number) among (of) sexual partners at a very local scale within and among *Crepidula* species.

In *C. fornicata* and *C. coquimbensis*, polyandry was found to be associated with sperm storage ability by the females, a characteristic commonly associated to a high level of polyandry in marine invertebrates (e.g. Makinen *et al.* 2007; Shaw & Sauer 2004; Walker *et al.* 2007). Females of *C. coquimbensis* isolated during 6 months still produced broods (Brante *et al.* in prep) and in *C. fornicata*, females or even brooding females have been identified as fathers of other progenies, indicating that sperm can be stored by females of this species at least during the time necessary for its mate (male) to undergo sex reversal into female sex and even produce eggs. In our study only few individuals, all males, were sampled and assigned fatherhood so it is difficult to assess sperm storage capacity in *C. convexa*. Laboratory experiments would be necessary to examine this hypothesis. Yet, the occurrence of multiple paternity demonstrates that sperm from several males can be stored simultaneously, providing potentiality for sperm competition or post-copulatory selection processes (Jennions & Petrie 2000). The observation of reproductive skew in three progenies (progenies 6B, 11B and 11E, Fisher exact test) also supported this hypothesis. In addition, our results suggested a rapid use of the sperm: all the fathers identified were males and four out of the five sampled males were assigned fatherhood to the progeny of the females that were found on the same substrate. Moreover, except for the male 11b-M which sired embryos from progenies 11A and 11C, all fathers identified in multiply sired brood contributed to a single progeny even if several females were in a close proximity on the substrate.

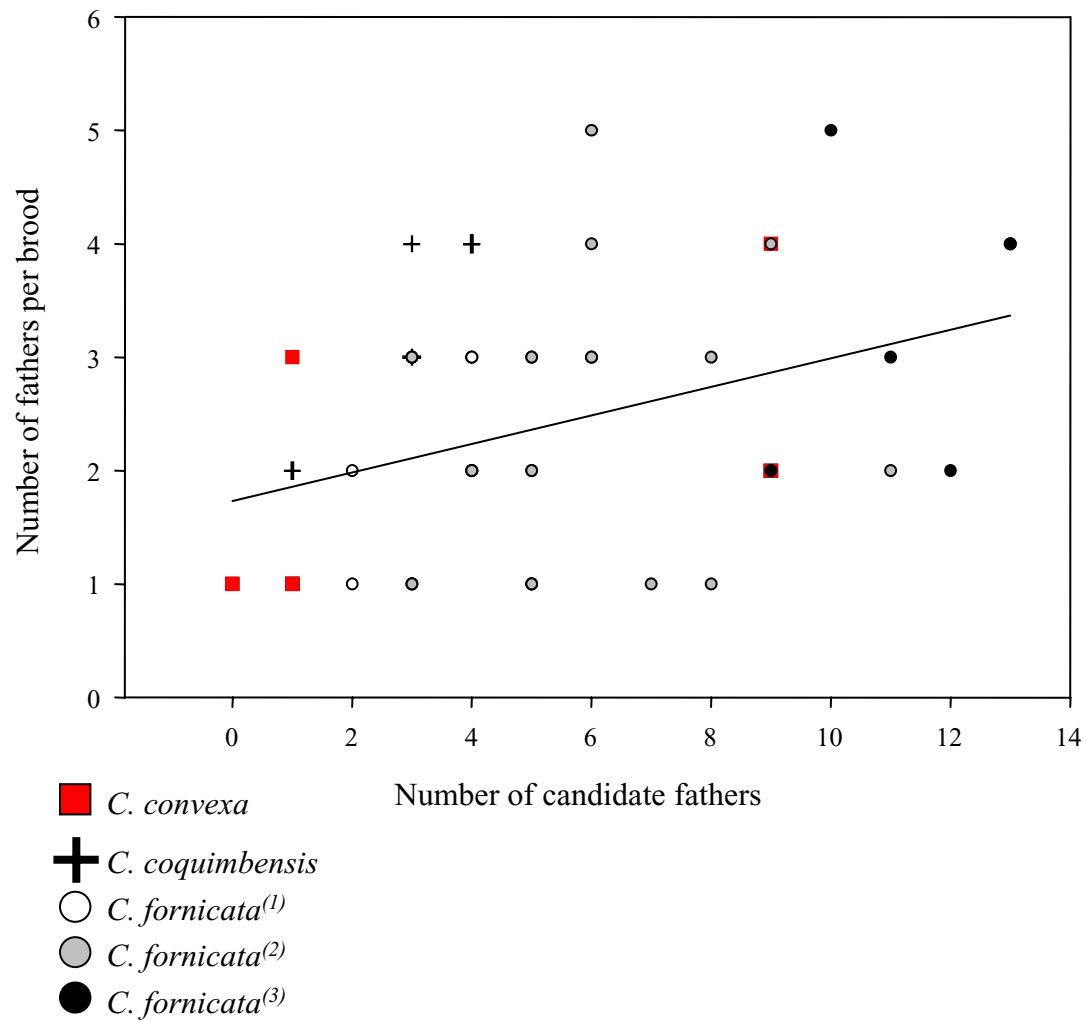


Figure 3. Relationship between the number of sires per brood and the number of candidate fathers in three species of the genus *Crepidula*: *C. convexa* (N=10, this study), *C. coquimbensis* (N=5, Brante *et al.* in prep), *C. fornicata* ((1) N=12, Proestou *et al.* 2008; (2) N= 18, Dupont *et al.* 2006; N= 6, Le Cam *et al.* 2009)

On the whole, variation in the patterns of polyandry within and among species of the genus *Crepidula* might be due to mate availability and sperm competition which depend in turn on life cycle and gregarious behaviour in these marine species. For instance, the pelagic larval stage and the attraction of larvae by conspecific adult individuals in *C. fornicata* (Hoagland 1978) allow adults to form perennial stacks of unrelated individuals and the position of males with respect to females is usually permanent over the whole life-time of the individuals. This proximity increases the probability of finding different mates (Dupont et al. 2006). Conversely, *C. convexa* and *C. coquimbensis* lack a larval stage and juveniles hatch directly on the mothers's substrate but males are mobile (Hoagland 1978, Brow & Olivares 1996, A. Brante pers. comm.). In particular, based on laboratory experiments, Hoagland (1978) reported that males of *C. convexa* paired only with female individuals with a pairing lasting less than three weeks. This observation is congruent with our results where only 5 males among the 17 fathers identified were sampled in close vicinity of the mothers and a male (from substrate N°4) sired offspring from a female on a different substrate (n° 7). In direct developing species, male motility may balance the lack of planktonic dispersal and contribute to increase gene flow and genetic diversity within populations.

Our results also provide insights about the unexpected results by Li & Pechenik (2007) who showed that overall inbreeding depression was much more severe in *C. convexa* than in *C. fornicata*. As a direct developer, *C. convexa* was expected to exhibit the lowest inbreeding depression because of a higher probability of mating with relatives and of subsequent purging of deleterious alleles. On the contrary, Li & Pechenik (2007) showed that inbred crosses had a negative effect on female fecundity, juvenile growth rate and survival in the direct developing species and. One explanation for this apparent paradox could be that individuals of *C. convexa* are much more mobile than previously thought. The output of our paternity analysis together with the high genetic diversity ($H_e = 0.92$) observed in the study population of *C. convexa* gave some support to this hypothesis. Similar values of genetic diversity were observed with the same markers in another population (Nahants, $H_e = 0.89$; data from Daguin et al. (2009)) and a low, although significant, genetic structure ($F_{st} = 0.02$, $P < 0.001$) was measured between Nahants and Barnstable suggesting higher gene flow than expected in this species. Hoagland (1978) indicated that individuals of *C. convexa* could float in the water surface film during tidal movements. In addition, individuals of *C. convexa* are commonly associated to *Pagurus*-inhabited shells (Hendler & Franz 1971; Li & Pechenik 2004) and Collin (2001) mentioned that they are often found living on blades of seagrasses. Rafting either on *Pagurus*-inhabited shells or seagrasses might enhance potential dispersal ability of

this species as it has been shown in other sedentary marine invertebrate species (Worcester 1994). Adult dispersal in *C. convexa* could compensate the lack of a pelagic larval phase and decrease the probability of mating between related individuals.

Finally, our dataset also allow getting complementary data about sex change parameters in *C. convexa*. As already noted by Hendler & Franz (1971) and Hoagland (1978), the size distribution of males and females overlapped only moderately (here, 43% of the female size range, Figure 1). This was also observed in *C. coquimbensis* (Brown & Olivares 1996). This is a very distinct feature as compared to *C. fornicata* where large overlap was previously noted (e.g. 100% of the female size range, Dupont et al. 2006, 94.6% Le Cam & Viard in prep.). Size overlap between males and females in the genus *Crepidula* is correlated to the social structure as measured by the proportion of stacked individuals and mean stack size (Collin 2006). Considering, the low plasticity in size at sex change together with the male-biased sex ratio, the size-advantage hypothesis (Ghiselin 1969; Leigh et al. 1976; Warner et al. 1975) might thus be a relevant scenario to explain sex change determinism in *C. convexa* as compared to *C. fornicata*, in which environmental sex determinism (ESD) was found to be more likely (Collin 2006; Munday et al. 2006). Nevertheless, under the size-advantage model (Charnov 1982) and based on empirical observations across many taxa (Allsop & West 2003), 72% appeared to be a constant value of the relative size at sex change (L_{50}/L_{max} ; Allsop & West 2003; Charnov & Skuladottir 2000) in sequential hermaphrodites. We found large deviation from this expected value in the study population of *C. convexa* with individuals changing sex at 49% of the maximum size. Additionally, it is noteworthy that all the assigned fathers that were sampled had a rather large size (ranging from 5.5 to 9 mm) as compared to the mean size of males (i.e. 3.34mm). The size-advantage model is insufficient to explain these observations. Sperm competition which is directly related to the level of polyandry might be an additional factor to consider here as it has important implication for the evolution of sex-changing species and the diversity of reproductive strategies in sex changers (reviewed in Munday et al. 2006; Murnoz & Warner 2003). In *C. convexa*, which is a short-lived species (Hendler & Franz 1971), mating opportunities over a breeding season might play an important role, any delay in finding a breeding partner decreasing the overall individual reproductive value. Sex reversal may be delayed as a consequence of a lower reproductive success of males due to social conditions where sperm competition is increased. Additional paternity studies in experimental populations or populations characterized by various local densities or aggregation mode (e.g. *Pagurus*-inhabited shells vs. artificial substrates exhibit different percentage of females with attached males; Hendler & Franz 1991)

are needed to test for the hypothesis sex change variation according to the degree of successful mating opportunities.

Conclusions

By comparing closely related protandrous species displaying contrasted dispersal ability and gregarious behaviour, we could hypothesize complex relationships between life cycle, gregariousness and reproduction patterns with two main strategies: (i) a bentho pelagic life cycle associated to extreme gregarious behaviours enhancing individuals' promiscuity (e.g. *C. fornicata*) and (ii) direct developing species characterized by a lack of larval dispersal balanced by male mobility and absence of gregarious behaviour. Both strategies can promote polyandry and increase mating between unrelated individuals. Paternity data are needed in other species with a pelagic larval phase, no adult mobility and a low adult gregarious behaviour (e.g. *C. plana*). In such species, a low amount of polyandry would be expected.

Acknowledgments: The authors are grateful to Claire Daguin Thiebaut for her availability and for providing technical support and advice to carry out the molecular work. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the University Pierre & Marie Curie. S. L C benefited from a PhD grant by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

REFERENCES

- Allsop DJ, West SA, 2003. Changing sex at the same relative body size. *Nature*. 425:783-784.
- Baur B, 1998. Sperm competition in molluscs. In: Birkhead TR, Møller AP, editors. *Sperm competition and sexual selection*. London: Academic Press; p. 255-305.
- Blanchard M, 1995. Origin and present state of the slipper limpet (*Crepidula fornicata*) population, (*Gastropoda Prosobranchia*) on French coasts. *Halictis*. 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.
- Brante A, 2007. Intracapsular limitations in two gastropod species with contrasting developmental modes: *Crepidula fornicata* and *C. coquimbensis* [PhD]. Santiago: Pontificia Universidad Católica de Chile & Université Pierre & Marie Curie. 141p.
- Brante A, Fernández M, Viard F, in prep. Microsatellite evidence for sperm storage and extreme multiple paternity in the adelphophagous protandrous gastropod *Crepidula coquimbensis*.
- Brown DI, Olivares CA, 1996. A new species of *Crepidula* (Mollusca: Mesogastropoda: Calyptraeidae) from Chile: additional characters for the identification of eastern Pacific planar *Crepidula* group. *J. Nat. History*. 30:1443-1458.
- Charnov EL, 1982. The theory of sex allocation. Vol. 18: Princeton.
- Charnov EL, Bull J, 1977. When is sex environmentally determined? *Nature*. 266:828-830.
- Charnov EL, Skuladottir U, 2000. Dimensionless invariants for the optimal size (age) of sex change. *Evol. Ecol. Res*. 2:1067-1071.
- Coe WR, 1938. Conditions influencing change of sex in mollusks of the genus *Crepidula*. *J Exp Zool*. 77:401-424.
- Collin R, 2001. The effects of mode of development on phylogeography and population structure of North Atlantic *Crepidula* (Gastropoda: Calyptraeidae). *Mol Ecol*. 10:2249-2262.
- Collin R, 2006. Sex ratio, life-history invariants, and patterns of sex change in a family of protandrous gastropods. *Evolution*. 60:735-745.
- Coum A, 1979. La population de crépidules, *Crepidula fornicata* (L.1758) en rade de Brest: écologie et dynamique [PhD thesis]. Brest: Université de Bretagne occidentale. 133p.
- Daguin-Thiébaud C, Le Cam S, Viard F, 2009. Isolation of 11 microsatellite markers in *Crepidula convexa* (Gastropoda, Calyptraeidae) for parentage analyses. *Mol. Ecol. Res.* available on line.
- Deslous-Paoli J-M, 1985. *Crepidula fornicata* L. (gastéropode) dans le bassin de Marennes-Oléron : structure, dynamique et production d'une population. *Oceanol. Acta*. 8:453-460.
- Diaz ER, Thiel M, 2004. Chemical and visual communication during mate searching in rock shrimp. *Biol Bull*. 206:134-143.
- Dupont L, Bernas D, Viard F, 2007a. Sex and genetic structure across age groups in populations of the European marine invasive mollusc, *Crepidula fornicata* L. (Gastropoda). *Biol J Linn Soc*. 90:365-374.
- Dupont L, Ellien C, Viard F, 2007b. Limits to gene flow in the slipper limpet *Crepidula fornicata* as revealed by microsatellite data and a larval dispersal model. *Mar Ecol Prog Ser*. 349:125-128.
- Dupont L, Richard J, Paulet YM, 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.
- El Mousadik A, Petit RJ, 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.*. 92:832-839.
- Ferdinando B, 1994. Fluctuations and variations in coastal marine environments. *Mar. Ecol.*. 15:3-25.
- Frontier S, Pichod-Viale D, 1991. Ecosystèmes : structure, fonctionnement, évolution. Paris: Masson.
- Gaffney PM, McGee B, 1992. Multiple paternity in *Crepidula fornicata* (Linnaeus). *Veliger*. 35:12-15.
- Ghiselin MT, 1969. The evolution of hermaphroditism among animals. *Quat. Rev. Biol.*. 44.
- Giese AC, Pearse JS, 1974. Introduction: general principles. In: Giese AC, Pearse JS, editors. *Reproduction of marine invertebrates*. New York: Academic Press; p. 1-49.

- González A, Rossini C, Eisner M, Eisner T, 1999. Sexually transmitted chemical defence in a moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proc. Natl Acad. Sci., USA*. 96:5570-5574.
- Gosselin T, Sainte-Marie B, Bernatchez L, 2005. Geographic variation of multiple paternity in the American lobster, *Homarus americanus*. *Mol Ecol*. 14:1517-1525.
- Goudet J, 1999. FSTAT vers. 2.8, updated from Goudet (1995). Fstat: a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86: 485-486. available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Hendler G, Franz DR, 1971. Population dynamics and life history of *Crepidula convexa* say (Gastropoda: Posobranchia) in Delaware Bay. *Biol. Bull.* 141:514-526.
- Higuchi R, 1989. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Ehrlich HA, editors. PCR technology, principles and applications for DNA amplification. New York: Stockton Press; p. 31-38.
- Hoagland KE, 1978. Protandry and the evolution of environmentally-mediated sex change: a study of the Mollusca. *Malacologia*. 17:365-391.
- Jennions MD, Petrie M, 2000. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biol Rev.* 75: 21-64.
- Johnson SL, Yund PO, 2007. Variation in multiple paternity in natural populations of a free-spawning marine invertebrate. *Mol. Ecol.* 16:3253-3262.
- Jones AG, 2005. gerud 2.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Mol. Ecol. Notes* 5:708-711.
- Le Cam S, Pechenik JA, Cagnon M, Viard F, 2009. Fast vs. slow larval growth in an invasive marine mollusc: does paternity matter? *J Hered.* available on-line
- Leigh EG, Charnov EL, Warner RR, 1976. Sex ratio, sex change and natural selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73:3656-3660.
- Levin LA, Bridges TS, 1995. Pattern and diversity in reproduction and development. In: McEdward L, editors. Ecology of marine invertebrate larvae. Boca Raton: CRC Press; p. 1-48.
- Li W, Pechenik JA, 2004. A forced association between the slipper snail *Crepidula convexa* and the hermit crab *Pagurus longicarpus*? Possible influence of a third party. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 311:339-354.
- Li W, Pechenik JA, 2007. Effect of inbreeding on reproduction and juvenile performance in two marine gastropods with contrasting reproductive patterns. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 346:219-234.
- Makinen T, Panova M, Andre C, 2007. High levels of multiple paternity in *Littorina saxatilis*: hedging the bets? *J Hered.* 98:705-711.
- Marshall DJ, Evans JP, 2007. Context-dependent genetic benefits of polyandry in a marine hermaphrodite. *Biol Lett.* 3:685-688.
- Munday PL, Buston PM, Warner RR, 2006. Diversity and flexibility of sex-change strategies in animals. *Trends Ecol Evol.* 21:89-95.
- Munoz RC, Warner RR, 2003. A new version of the size-advantage hypothesis for sex change: Incorporating sperm competition and size-fecundity skew. *Am Nat.* 161:749-761.
- Munoz RC, Warner RR, 2004. Testing a new version of the size-advantage hypothesis for sex change: sperm competition and size-skew effects in the bucktooth parrotfish, *Sparisoma radians*. *Behav Ecol.* 15:129-136.
- Neff BD, Pitcher TE, 2005. Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Mol Ecol.* 14:19-38.
- Paterson IG, Partridge V, Buckland-Nicks J, 2001. Multiple paternity in *Littorina obtusata* (Gastropoda, Littorinidea) revealed by microsatellite analyses. *Biol Bull.* 200:261-267.
- Pawlik JR, Butman CA, Starczak VR, 1991. Hydrodynamic facilitation of gregarious settlement of a reef-building tube worm. *Science*. 251:421-424.
- Policansky D, 1982. Sex change in plants and animals. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13:471-495.
- Proestou DA, Goldsmith MR, 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.
- Raymond M, Rousset F, 2003. GENEPOP 3.4., an updated version of GENEPOP V.1.2 (1995): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered.* 86:248-249.

- Richard J, Huet M, Thouzeau G, Paulet YM, 2006. Reproduction of the invasive slipper limpet, *Crepidula fornicata*, in the bay of Brest, France. *Mar Biol.* 149:789-801.
- Shaw PW, Sauer WHH, 2004. Multiple paternity and complex fertilisation dynamics in the squid *Loligo vulgaris reynaudii*. *Mar Ecol Prog Ser.* 270:173-179.
- Simmons LW, 2005. The evolution of polyandry : sperm competition, sperm selection, and offspring viability. *Annu Rev Ecol Syst.* 36:125-146.
- Sokal RR, Rohlf FJ, 1995. Biometry. New York: W.H. Freeman and Company.
- Sprenger D, Anthes N, Michiels NK, 2008. Multiple mating affects offspring size in the opisthobranch *Chelidonura sandrana*. *Mar Biol.* 153:891-897.
- Thiébaud E, Huth X, Shillito B, Jollivet D, Gaill F, 2002. Spatial and temporal variations of recruitment in the tube worm *Riftia pachyptila* on the East Pacific Rise (9°50'N and 13° N). *Mar Ecol Prog Ser.* 234:147-157.
- Thorson G, 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biol Rev.* 25:1-45.
- Toonen RJ, 2004. Genetic evidence of multiple paternity of broods in the intertidal crab *Petrolisthes cinctipes*. *Mar Ecol Prog Ser.* 270:259-263.
- Uller T, Olsson M, 2008. Multiple paternity in reptiles: patterns and processes. *Mol Ecol.* 17:2566-2580.
- Walker D, Power A, Sweeney-Reeves M, Avise J, 2007. Multiple paternity and female sperm usage along egg-case strings of the knobbed whelk, *Busycon carica* (Mollusca; Melongenidae). *Mar Biol.* 151:53-61.
- Wang J, 2004. Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics.* 166:1963-1979.
- Warner RR, Robertson DR, Leigh EG, 1975. Sex change and sexual selection. *Science.* 190:633-638.
- Weir BS, Cockerham CC, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 38:1358-1370
- Worcester SE, 1994. Adult rafting versus larval swimming: dispersal and recruitment of a botryllid ascidian on eelgrass. *Mar Biol.* 121:309-317.
- Yasui Y, 1998. The 'genetic benefits' of female multiple mating reconsidered. *Trends Ecol Evol.* 13:246-250.

Dans cette partie II, je me suis attachée à préciser les patrons de reproduction par des analyses de paternité chez deux espèces de crépidules. Deux constats émergent :

- 1- Chez ces espèces protandres, ces patrons de paternité sont directement liés à la composition sexuelle des populations et/ou des groupes reproducteurs donc dépendent de la dynamique de changement de sexe.*
- 2- Des liens existent entre la diversité des contributions paternelles et des traits de vie ou comportementaux, en particulier ici j'ai montré de tels liens avec la variabilité d'un trait larvaire et les comportements de grégarité.*

*Les modalités de la protandrie et de la polyandrie agissent donc à différentes étapes du cycle de vie et s'inscrivent dans une dynamique globale des populations de l'espèce. Aussi, pour mieux appréhender les interactions entre les processus de changement de sexe et la dynamique des populations, j'ai suivi l'évolution démographique et sexuelle d'une population de *C. fornicata*, ces résultats font l'objet de la Partie III.*

...

PARTIE III :

LA PROTANDRIE EN MILIEU NATUREL

**Etude d'une population introduite de *Crepidula*
*fornicata***

La plupart des études du déterminisme du changement de sexe chez les espèces protandres, et particulièrement chez les crépidules, ont été effectuées à l'échelle « individu » dans des conditions contrôlées en laboratoire (e.g. chez la crépidule, Coe 1938, 1953; Collin 1995; Hoagland 1975, 1978). Il existe néanmoins quelques études en populations naturelles notamment concernant la quantification des sex-ratios. Ainsi, chez *Crepidula fornicata*, des analyses de sexe- ratio ont été effectuées dans des populations françaises par exemple dans le cadre des thèses de Lise Dupont (2004), en baie de Morlaix, et de Joëlle Richard (2005), en rade de Brest. Ces travaux ont notamment permis de montrer un chevauchement important de la taille des individus mâles et femelles, corroborant des résultats obtenus en laboratoire ainsi que dans quelques populations de l'aire d'origine de l'espèce (Collin 2006). En étudiant deux populations localisées dans le golfe Normand-Breton, Dupont *et al.* (2006) ont néanmoins également mis en évidence une répartition des mâles et des femelles différentes dans différentes classes d'âge ce qui pourrait favoriser la reproduction entre générations successives et expliquerait, en partie, l'homogénéité génétique observée entre les juvéniles et les adultes reproducteurs.

Avec un mode de reproduction aussi original que la protandrie, il devient ainsi intéressant de préciser comment la dynamique démographique de la population se répercute au cours du temps sur la dynamique de la protandrie. J'ai étudié au cours de cette thèse une population de *C. fornicata* située en baie de Morlaix. La crépidule y a été pour la première fois observée dans les années 60 (Marteil 1963) et, contrairement à de nombreux autres baies et estuaires colonisés par cette espèce, la présence de *C. fornicata* y est longtemps restée « anecdotique ». D'importantes populations de cette espèce n'ont été observées dans cette baie qu'à partir du début des années 1990 et sans jamais atteindre les niveaux de densité rencontrés dans d'autres baies françaises (Dupont 2004). La population « du château du Taureau » (Figure III-1) étudiée au cours de mon travail de thèse est caractérisée par une répartition très hétérogène des individus, résultant en une faible densité moyenne (d'environ 20 individus.m⁻²) et des pics locaux de quelques centaines d'individus.m⁻² (Dupont 2004). Ce patron pourrait être expliqué par l'installation récente de la crépidule en baie de Morlaix mais également par des caractéristiques propres à cette baie limitant le recrutement local et/ou l'apport extérieur en larves (Rigal 2009).

Le choix de ce site d'étude est lié aux connaissances déjà acquises et aux échantillonnages disponibles sur cette population, étudiée depuis 2002 par l'équipe où j'ai réalisé ma thèse. Nous avons pu en particulier poursuivre un suivi temporel de cette

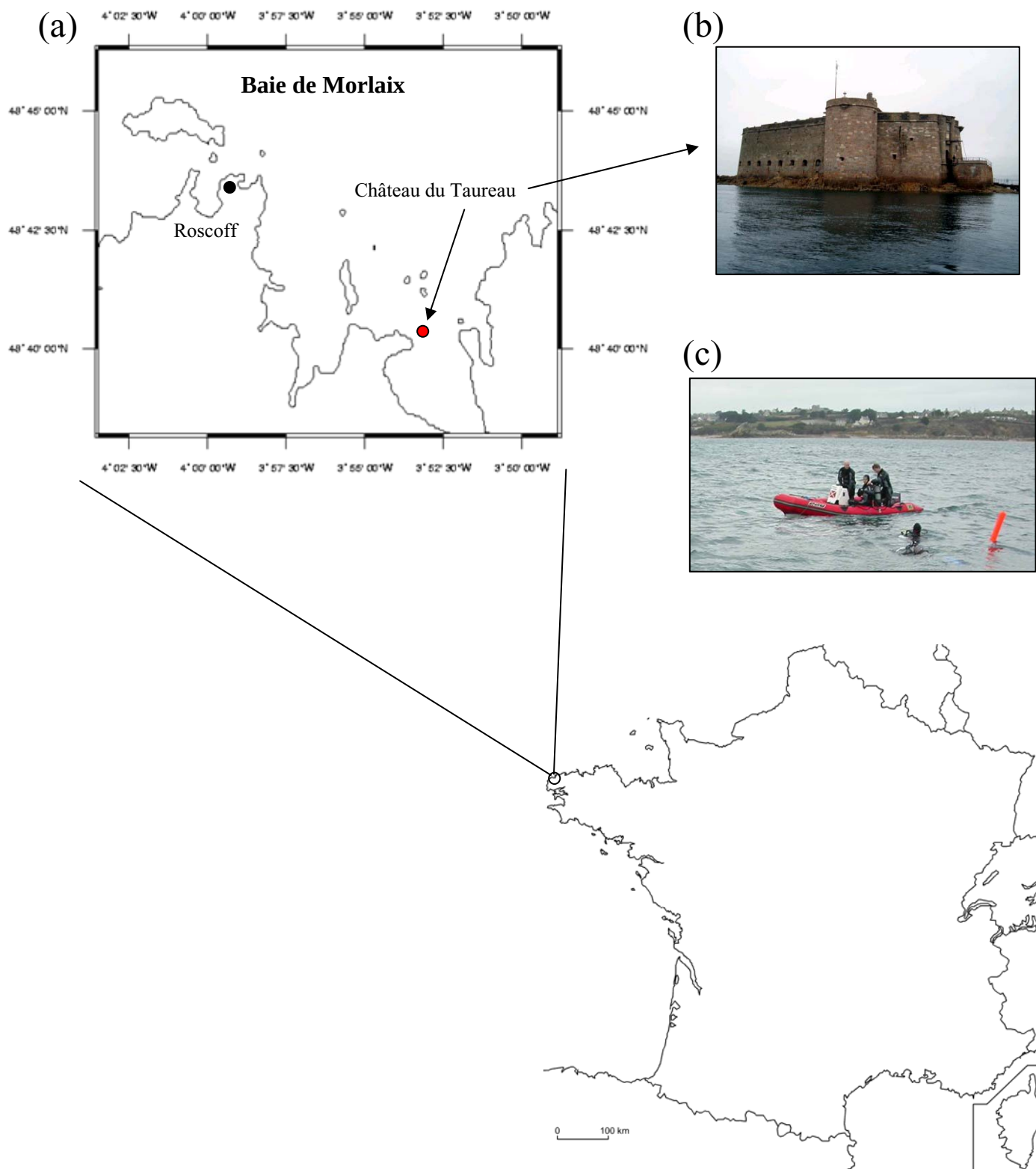


Figure III-1: Site d'étude: carte de la baie de Morlaix (a) et de la localisation du point d'étude, situé à proximité du château du Taureau (b) et échantillonné en plongée (c)

population initié dans le cadre de la thèse de Lise Dupont (2004) et du Master de Julien Lorion (2005), bénéficiant ainsi de points de repères « à plus long terme » concernant la composition sexuelle et la structure de taille de la population. Des prélèvements mensuels ont été effectués, entre septembre 2004 et décembre 2007, au moyen d'un échantillonnage non mécanisé, par les plongeurs du Service « Mer & Observation » de la Station Biologique de Roscoff. Cette méthode a été préférée à l'utilisation de dragues ou de bennes, habituellement utilisées pour échantillonner cette espèce, afin de préserver l'intégrité des chaînes.

Dans le cadre de cette thèse, je me suis intéressée aux patrons de changement de sexe chez la crépidule d'un point de vue populationnelle afin d'étudier certains des facteurs qui pourraient influencer la dynamique de la protandrie à grande échelle. Pour cela, deux approches ont été menées :

(i) L'analyse de la dynamique de la protandrie dans une population naturelle en regard de la dynamique démographique de cette population (ici, restreinte aux patrons de sédentarisation des individus juvéniles) : la taille au changement de sexe est-elle modulée par les épisodes de recrutement et d'arrivée des jeunes mâles dans la population ? (Chapitre III-B)

(ii) L'étude de l'infestation des crépidules par une éponge perforante : quelle est la prévalence de cette éponge endolithique, son évolution temporelle et l'impact de cette infestation sur le cycle de reproduction, plus particulièrement la fertilité femelle ? Une modification du succès reproducteur d'un sexe pourrait en effet se répercuter sur la dynamique de changement de sexe (Chapitre III-C)

Note:

Au contraire des autres chapitres présentés dans cette thèse, qui font l'objet d'articles publiés ou en préparation pour une soumission prochaine, le chapitre III-A n'est pas rédigé sous forme d'article en anglais. En effet, ce chapitre n'a pas vocation à faire l'objet d'un article en tant que tel mais à être intégré avec d'autres résultats issus de la thèse François Rigal (2009). Ce dernier a étudié la dynamique spatio-temporelle du nuage larvaire de la même population de crépidules que celle étudiée au cours de ma thèse. Nous souhaitons mettre en commun nos deux approches afin d'écrire un article discutant des asynchronies observées, au cours de nos trois années respectives de suivi in situ, entre les dynamiques larvaires et benthiques dans cette population de crépidules. Bien que sortant un peu du cadre initial de ma problématique de thèse, les résultats présentés dans le chapitre III-A me semblent importants en préambule des questions et résultats exposés au chapitres III-B.

CHAPITRE III-A : ETUDE DU LIEN ENTRE REPRODUCTION ET RECRUTEMENT DANS UNE POPULATION DE *CREPIDULA* *FORNICATA* DE LA BAIE DE MORLAIX

III-A-1. INTRODUCTION

Chez les espèces à cycle benthopélagique, (Figure I-1 de l'introduction), les dynamiques temporelle et spatiale des phases adulte et larvaire sont naturellement étroitement liées. L'efficacité de la reproduction des adultes, conduisant à l'émission de larves dans la colonne d'eau, conditionne par exemple l'importance du nuage larvaire local (Lewin 1986). Réciproquement, les conditions de la métamorphose larvaire, notamment quand elle est liée à des déterminismes fonction de la densité des adultes, vont largement influencer l'intensité du recrutement dans la population benthique. L'arrivée des post-larves dans la population benthique est ainsi l'un des principaux processus régulant la densité locale et la dynamique des populations (Roughgarden et al. 1988). Par exemple, une étude de la dynamique de deux populations de l'oursin, *Paracentrotus lividus*, aux caractéristiques contrastées, a montré que la densité et la structure de taille des populations d'adultes étaient corrélées à l'intensité de l'arrivée de post-larves (Tomas et al. 2004). Or l'intensité du recrutement, c'est-à-dire le nombre d'individus qui, ayant survécu à la mortalité post sédentarisation, vont participer à la dynamique de la population benthique (Keough & Downes 1982, Pineda 2000), est très variable spatialement et temporellement.

La réussite du recrutement est multi-factorielle car dépendante de processus intervenant pendant les étapes de pré-sédentarisation (i.e. larves pélagiques) et de post-sédentarisation. La disponibilité en larves a ainsi depuis longtemps été mise en avant comme facteur majeur de la réussite du recrutement, ce qui a été notamment formalisé au travers de la théorie dite de « supply side » (Gaines & Roughgarden 1985 ; références citées dans Levin (2006)). Or, cet apport larvaire est fonction de nombreux paramètres parmi lesquels l'intensité de la reproduction, le succès de la fécondation, les patrons de dispersion (i.e. apport de larves issues de populations voisines) et l'importance de la mortalité larvaire (Dunstan & Bax 2007). Ces paramètres sont eux-mêmes modulés par des interactions complexes entre des processus biologiques (par exemple : taux de croissance larvaire, sélection de l'habitat, prédation), des processus physiques comme l'hydrodynamisme et des facteurs abiotiques (par exemple, la

température, la salinité). Le succès de la sédentarisation est ensuite fonction de la disponibilité en habitats favorables, du comportement larvaire ainsi que des modalités d'acquisition de la compétence à la métamorphose. Jenkins (2005) a par exemple montré que la distribution différentielle de deux espèces de balanes, dans des milieux rocheux exposés ou non, était expliquée non pas par un apport différentiel en larves sur les deux zones mais par une sélection de l'habitat par les larves. Enfin, les facteurs modulant la post-sédentarisation sont pour l'essentiel constitués de l'ensemble des paramètres biotiques et abiotiques influençant la mortalité juvénile, particulièrement élevée chez les invertébrés marins benthiques (Gosselin & Qian 1997). Le moment et les modalités du recrutement peuvent être à cet égard des processus critiques dans le cycle de vie (Underwood & Fairweather 1989). En particulier, une reproduction adulte et un développement larvaire synchrones peuvent conduire à des périodes de fortes sédentarisation : dans cette situation, ce sont les facteurs post-sédentarisation qui joueront un rôle majeur sur la dynamique de la population benthique. Ainsi, tous les processus régulant l'arrivée de jeunes individus dans la population benthique semblent interagir selon un schéma complexe et opérer à différentes échelles de temps et d'espace (Figure III-A-1), résultant en patrons « à première vue » stochastiques. Ce déterminisme multi-factoriel de l'abondance des stades précoces de développement suggère que les patrons de reproduction pourraient être découplés de l'apport de jeunes individus dans la population (Caley et al. 1996, voir aussi Cowen et al. 2000; Jones et al. 2005; Swearer et al. 2002; Warner et al. 2000).

Il existe néanmoins des facteurs favorisant le couplage entre les phases pélagiques et benthiques. Les cycles de vie des organismes marins présentent en effet pour la plupart des patrons saisonniers pour des paramètres tels que la croissance, la reproduction et l'abondance (Coma et al. 2000). Certains facteurs environnementaux, variant de manière saisonnière, comme la température (Giese & Pearse 1974), la photopériode (Pearse et al. 1986) et la disponibilité en nourriture (Pearse & Cameron 1991), jouent un rôle important dans la régulation de la reproduction chez les invertébrés marins. En particulier, dans les écosystèmes côtiers tempérés, un patron annuel a été mis en évidence chez les organismes filtreurs benthiques, caractérisé par une productivité accrue durant le printemps et l'été, diminuant en automne pour atteindre un minimum en hiver (Coma et al. 2000). L'étude de la saisonnalité et de la variabilité des patrons de recrutement chez les espèces à cycle benthopélagique permet de mieux comprendre l'importance relative de ces différents processus et d'évaluer les mécanismes à l'origine de la persistance des populations. Appréhender ce type de variation est particulièrement important dans le cadre des espèces invasives car les interactions entre la

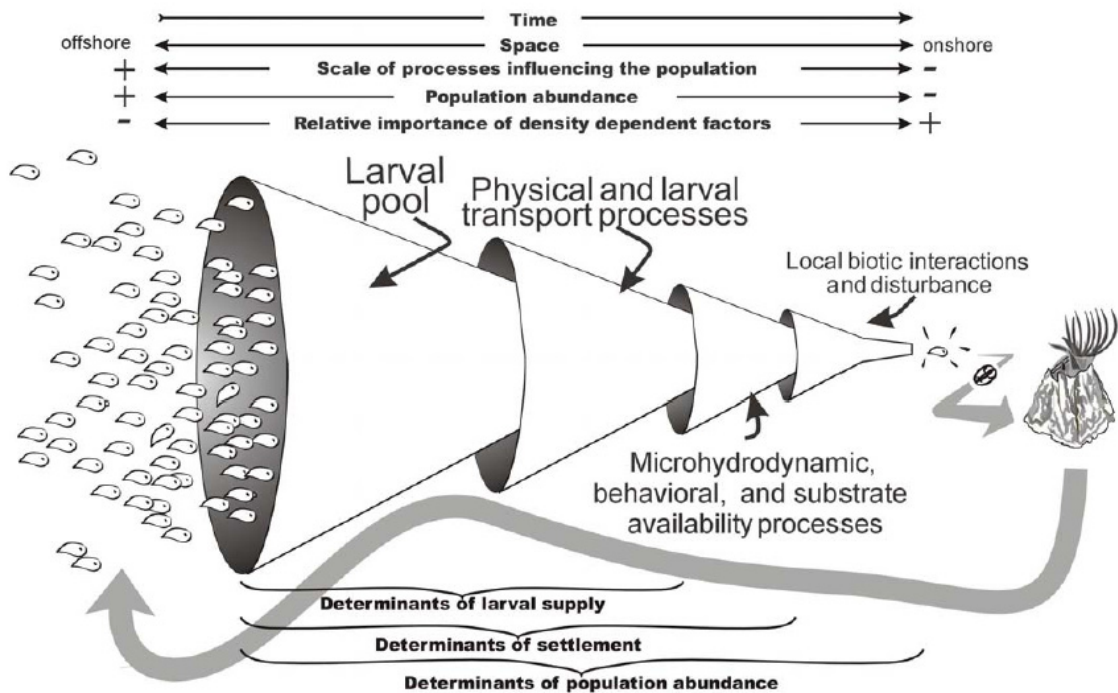


Figure III-A-1. Représentation des processus proximaux influençant le taux de sédentarisation larvaire et la densité des populations benthiques. Bien que les larves lors de leur émission soient infiniment plus nombreuses que les adultes, leur nombre est fortement réduit à chaque étape de leur développement. Ainsi de faibles changements du taux de larves à chaque étape peuvent entraîner de profonds changements à l'échelle de la population benthique. L'exemple illustré ici est celui d'espèces de balanes et le schéma issu de Pineda 2000

biologie de l'espèce, en particulier la dynamique de reproduction, et les conditions environnementales déterminent pour une large part, leur potentiel d'installation et d'invasion (Dunstan & Bax 2007).

Dans le cadre de cette partie de mon travail de thèse (partie III de ce manuscrit), mon objectif majeur était l'étude de la dynamique de changement de sexe dans une population de l'espèce invasive en Europe, *Crepidula fornicata* (Encadré I-2 ; §I-4). Compte tenu des interactions entre les différentes étapes du cycle de vie, telle que présentées ci-dessus, une étape préliminaire de ce travail impliquait de caractériser plus finement la dynamique de la population adulte étudiée, en termes de reproduction et recrutement. Je me suis ainsi intéressée à une population établie en baie de Morlaix (Figure III-1), qui avait déjà fait l'objet de deux études, dans le cadre de la thèse de Lise Dupont (2004) et du Master de Julien Lorion (2005). Ces études menées à partir d'échantillons obtenus tous les trimestres entre octobre 2002 et septembre 2004. Cette fréquence trimestrielle ne permettait pas d'établir avec précision les périodes de sédentarisation des nouveaux individus. Aussi, afin de mieux caractériser les patrons de recrutement dans cette population et son couplage avec la reproduction des individus adultes en place, j'ai souhaité étudier la dynamique démographique de la crépidule par des prélèvements mensuels durant 3 cycles annuels. Ces données ont par ailleurs été analysées en regard des résultats de thèse obtenus par François Rigal (2009) à la suite d'un suivi larvaire effectué dans ce même site, ceci afin d'affiner notre compréhension du couplage entre phase benthique et pélagique.

III-A-2. MATERIELS ET METHODES

Echantillonnage et mesures :

La population benthique étudiée, localisée à proximité du Château du Taureau (Figure III-1), est située à environ 10-15 mètres de profondeur sur un fond recouvert en majeure partie de sédiments biogènes (Cabioch 1968). Les échantillons ont été prélevés mensuellement pendant 40 mois, entre Septembre 2004 et Décembre 2007, par les plongeurs de la station biologique de Roscoff afin de prévenir l'endommagement des chaînes et la perte éventuelle de petits individus. Les chaînes ont été collectées à partir d'un point fixe (coordonnées GPS : 48°40,18 N / 3°53,167 W) le long d'un transect d'environ 20-30 m dans la direction Ouest. Les chaînes, entourées d'une compresse de gaze pour préserver leur structure, ont été stockées dans de l'alcool à 96°C, en vue de comptages et d'analyses morphologiques et génétiques.

Pour chacun des 40 échantillons, un minimum de 25 chaînes a été analysé (pour pouvoir analyser un minimum de 300 individus par prélèvement) et les paramètres suivant ont été notés pour chaque individu :

- Le type sexuel: individu immature, mâle, en transition sexuelle ou femelle ; les critères utilisés sont présentés en Figure III-A-2.
- Pour les femelles, la présence de capsules ovigères incubées dans la cavité palléale.
- La longueur droite (L_d), mesurée au moyen d'un pied à coulisse (précision 0.1mm) le long du plus grand axe entre l'apex et l'avant de la coquille. Classiquement, la longueur curviligne (L_c), qui mesure l'axe d'enroulement de la coquille, a été utilisée pour caractériser la taille des crépidules (Deslous-Paoli 1985; Dupont et al. 2006; Hoagland 1978; Le Gall 1980), en particulier en corrélation avec des stries de croissance visibles sur la surface extérieure de la coquille (Deslous-Paoli 1985; Dupont 2004; Lubet & Le Gall 1972; Richard 2005). Néanmoins la mesure simultanée de la longueur droite et de la longueur curviligne pour les échantillons récoltés entre septembre 2004 et décembre 2005, montre une corrélation significative entre les deux mesures ($N = 5164$ individus, régression linéaire : $L_c = 2.10 \times L_d - 6.43$, $R^2 = 0.90$, $P < 0.0001$). Nous avons donc choisi d'utiliser la longueur droite comme indicateur de la taille, mesure substantiellement moins contraignante lorsque le nombre d'individus à analyser est très important.

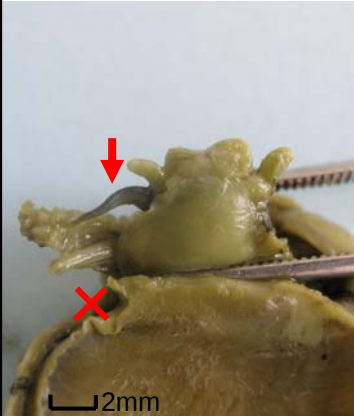
Juvénile	Mâle	Transition	Femelle
 Taille réelle 3mm environ	 2mm		 4mm
Absence ou Bourgeonnement de pénis	Présence de pénis	Pénis en cours de régression ou absent Absence de papille génitale	Absence de pénis Présence d'une papille génitale

Figure III-A-2: Détermination du type sexuel des individus chez *C. fornicata*

Les critères utilisés (texte sous les photos) sont indiqués par des croix et flèches rouges sur les photographies. Ces observations sont réalisées à l'œil nu ou à la loupe binoculaire pour les petits individus (inférieurs à 5mm)

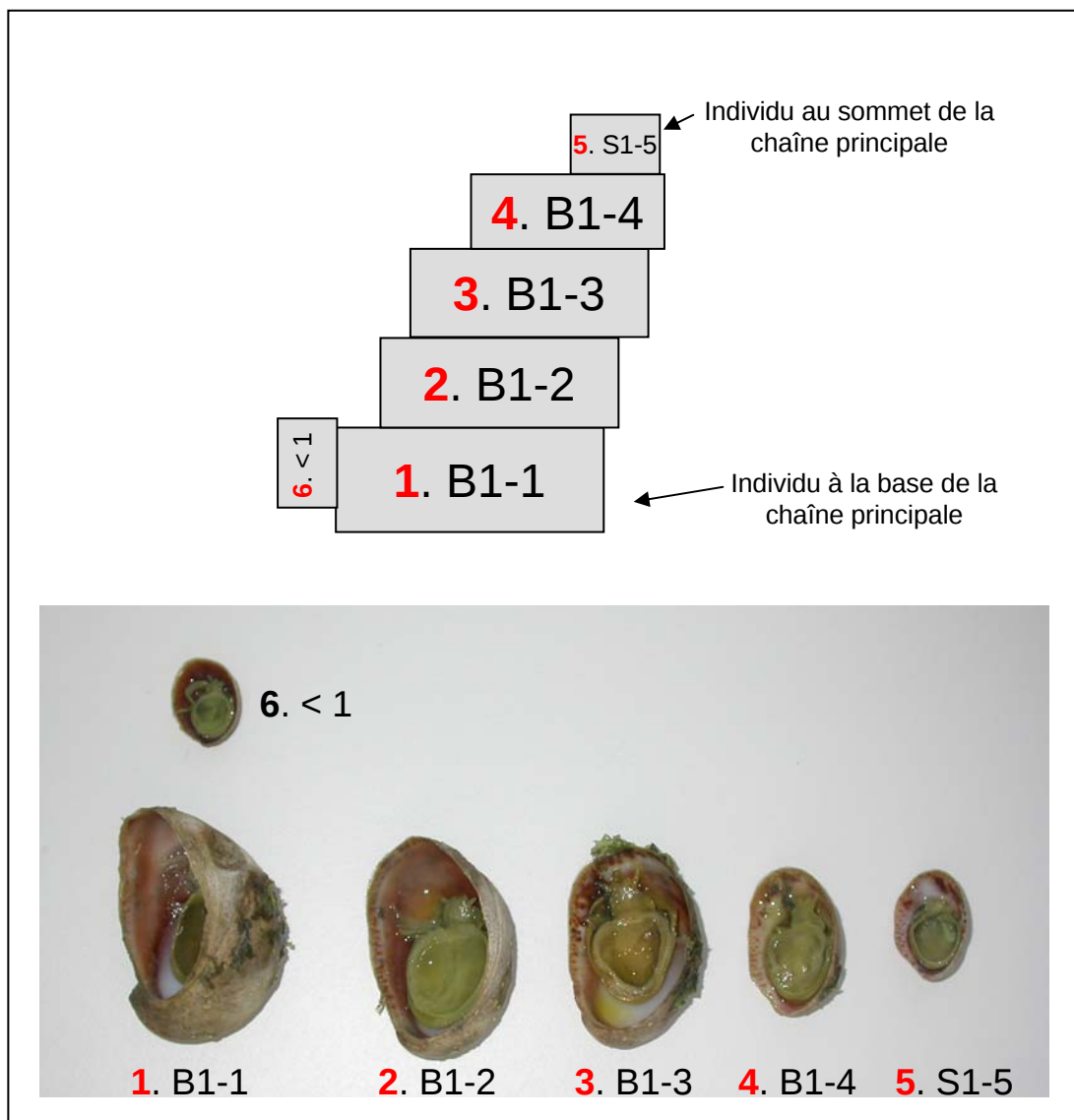


Figure III-A-3. Schéma explicatif de la numérotation des individus selon leur position dans la chaîne.

Une chaîne d'individus (chacun représenté par un rectangle) est schématisée en haut de la figure et une photographie des individus correspondant est présentée en bas. En rouge et gras est indiqué le numéro de l'individu, suivi du code de chaîne-position dans la chaîne.

Les individus de la chaîne principale sont notés *B1-X* (pour « individu de la base de la chaîne principale (1) ») avec l'ordre d'empilement indiqué par X; le dernier individu (situé au sommet de la chaîne) est codé par *S1-X*, X étant son ordre dans l'empilement (S pour sommet).

Dans certains cas, des chaînes secondaires sont fixées sur la chaîne principale. Les individus la composant sont notés de la même manière mais avec le code de chaîne B2 (ex B2-1, B2-2, ..., S2-4).

Lorsque qu'un individu est seul et fixé sur un autre individu d'une chaîne, il est indiqué par le symbole « < » (sur) suivi du numéro de l'individu sur lequel il se trouve.

- La position des individus dans la chaîne a été notée selon la numérotation présentée en Figure III-A-3.

Les coquilles exemptes de chair sont conservées et numérotées. Les têtes de chaque individu ainsi que les pontes, sont stockées dans de l'alcool 90° en vue d'analyses génétiques.

Méthode d'analyses des données :

Décomposition modale des distributions de tailles

L'analyse de la structure d'âge, déterminée grâce à une décomposition modale des distributions des fréquences de taille, est une méthode communément utilisée pour caractériser la structure démographique d'une population (Frontier & Pichod-Viale 1991). Sous l'hypothèse d'un recrutement discontinu et d'une corrélation positive entre la taille et l'âge, les modes observés sur les histogrammes de fréquences de taille représentent alors des groupes d'individus d'une même cohorte (i.e. groupe d'individus recrutés au même moment dans la population). A noter que toutes les déviations par rapport aux hypothèses mentionnées ci-dessus, font que ces groupes d'âge, en particulier ceux correspondant aux individus les plus âgés, regroupent généralement plusieurs cohortes au sens strict. Ces dernières ne sont identifiables que si leur apparition dans le biotope se fait à intervalles de temps suffisamment distincts, que la croissance est suffisamment rapide, et surtout que la dispersion statistique des tailles individuelles au sein d'une même cohorte est inférieure à la variation de taille moyenne entre une cohorte et la suivante (Frontier & Pichod-Viale 1991). Le cas de la crépidule ne remplit certainement pas ces conditions notamment parce que cette espèce longévive présente une grande variabilité de croissance. Néanmoins ce type d'approche a l'avantage de permettre des analyses sur un grand nombre d'échantillons et est adéquate quand il s'agit en priorité d'identifier les périodes d'arrivées de nouveaux individus dans la population, ce qui était l'objectif principal ici. L'évolution mensuelle de la structure démographique durant trois ans, nous a permis d'analyser le rythme d'apparition de nouvelles cohortes (c'est-à-dire l'arrivée de juvéniles) et la croissance, déterminée par le déplacement des modes vers des valeurs supérieures.

Pour construire les histogrammes de classe de taille, nous avons utilisé un intervalle de classe de 4mm selon une méthode empirique cherchant à (i) éviter les effets d'erreur de mesure, (ii) limiter le nombre de classes vides consécutives, (iii) analyser un maximum de classe avec des effectifs supérieurs à 5 (Jollivet et al. 2000). Les histogrammes sont ensuite

lissés à l'aide d'une moyenne mobile d'ordre 3 (Frontier & Pichod-Viale 1991), afin de tenir compte du biais de mesures aux bornes des classes, selon la formule suivante :

$$N_i = \frac{N_{i-1} + 2 \times N_i + N_{i+1}}{4} \text{ avec } N_i \text{ l'effectif de la classe } i.$$

La normalité de chacune des distributions a été soumise à un test de Kolmogorov-Smirnov avec le logiciel Minitab 13.2, le rejet de l'hypothèse nulle justifiant la réalisation d'une décomposition modale. La détermination statistique des groupes d'âge consiste à analyser la distribution des fréquences de classes de taille, à partir de l'hypothèse selon laquelle les tailles des individus appartenant à un même groupe d'âge (« cohorte » au sens strict si les hypothèses sont vérifiées) suivent une distribution gaussienne autour de la moyenne (ou mode). Ainsi, sur l'ensemble de la population, l'ajustement de la distribution des différentes classes de tailles est réalisé par une courbe polymodale, résultant du mélange des distributions normales identifiées. Cet ajustement a été réalisé grâce au package MIXDIST utilisé sous le logiciel de statistiques R (<http://www.r-project.org>). Cette procédure, basée sur une estimation par maximum de vraisemblance, ajuste à la distribution observée à une somme de composantes gaussiennes en nombre fini. Pour chacune de ces composantes, sont calculés sa moyenne, son écart-type et sa proportion relative.

Ces analyses ont été réalisées pour chacun des échantillons mensuels étudiés au cours du suivi de septembre 2004 à décembre 2007 ainsi que pour les mois d'octobre 2002, février juin et septembre 2003, et janvier et juin 2004 (données brutes issues de la thèse de Lise Dupont (2004)) afin de suivre l'évolution de la structure démographique sur un plus long terme.

Distribution des fréquences de taille des individus de moins de 10mm

Cherchant à déterminer avec le plus de précision les périodes d'arrivées de nouveaux individus dans la population, nous avons réalisé une seconde analyse de structure de taille, cette fois sur les individus de taille inférieure à 10 mm. Selon les résultats préliminaires obtenus au cours de la thèse de Lise Dupont (2004), c'est une taille critique correspondant à l'apparition des premiers mâles, donc déjà établis depuis plusieurs semaines dans la population. Les individus de moins de 10 mm ont été distribués en classes de tailles de 1mm et une moyenne pondérée de la distribution a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Moyenne Pondérée } (x) = \frac{\sum_{i=1}^n (a_i \times x_i)}{\sum_{i=1}^n a_i}$$

où n est le nombre de classe, x_i est la valeur de la borne supérieure de la classe de taille i et a_i est l'effectif dans la classe de taille i .

III-A-3. RESULTATS

Caractérisation de la structure démographique de la population du Taureau

Sur l'ensemble de la période étudiée, un total de 13 913 individus a été mesuré, avec en moyenne 328 ± 68 individus par mois.

Pour tous les échantillons, l'hypothèse nulle de normalité de distribution des classes de taille a été rejetée avec un seuil de risque inférieur à 1%. Les décompositions modales ont donc été réalisées pour chacun de ces échantillons. Les graphiques résultant de ces décompositions sont présentés en Figure III-A-4 et les caractéristiques (proportion relative, moyenne et écart type) de chaque composante modale sont données dans le Tableau III-A-1. Les gaussiennes sont numérotées de 1 à 4. La composante gaussienne caractérisée par le plus grand mode a été systématiquement numérotée 4 dans le Tableau III-A-1. A l'exception d'un seul échantillon (mois d'octobre 2002), la structure de taille de la population résulte de 3 ou 4 composantes modales (« CM » dans la suite du texte).

Ces gaussiennes répartissent les individus en :

(i) un groupe de grands individus (CM N°4) rassemblant probablement plusieurs cohortes d'individus âgés ; la moyenne et l'écart type de CM N°4 varient peu entre échantillons (41.17 à 47.95 mm et 4.33 à 7.31 mm, respectivement),

(ii) La deuxième gaussienne (CM N°3) est celle caractérisée par les valeurs d'écart type les plus élevées ; CM N°3 est également la composante caractérisée par la plus grande variabilité pour le mode et l'écart-type entre échantillons variant de 16.52 à 37.07 mm pour la moyenne et de 4.65 à 10.64 mm pour l'écart-type. Ce groupe d'individus regroupe ainsi une partie variable de la population selon les proportions relatives des autres groupes. En 2005, ce groupe varie peu : il comporte les individus en moyenne de taille intermédiaires. En 2006 et 2007, les écart types de cette composante sont en revanche très importants (maximum de 10.64mm en mai 2006), signifiant que ce groupe d'individus est moins bien défini ; cette

Sur les pages suivantes

Figure III-A-4 : Evolution de la structure de taille de la population de crépidule du château du Taureau

Les graphiques ci-dessous indiquent la distribution des fréquences de tailles basée sur la longueur droite (histogramme bleu) et les résultats des décompositions modales associées. Les courbes rouges représentent chacune des composantes gaussiennes et la courbe verte est la résultante de l'ensemble des gaussiennes. Les classes de tailles (intervalle de 4mm) sont indiquées en abscisse et les fréquences relatives en ordonnées.

Tableau III-A-1 : Caractéristiques des composantes modales décrivant la structure des histogrammes de fréquences de tailles dans la population de crépidule du Château du Taureau, pour chacun des échantillons mensuels disponibles d'octobre 2002 à Décembre 2007.

N est la taille de l'échantillon, χ^2 , ddl et P sont les valeurs, degré de liberté et probabilité associée au test de χ^2 d'ajustement de la distribution théorique à la distribution observée.

Quatre composantes gaussiennes ont été identifiées au maximum et les valeurs de la proportion, de la moyenne et de l'écart type de chaque composante sont précisées.

Figure III-A-4

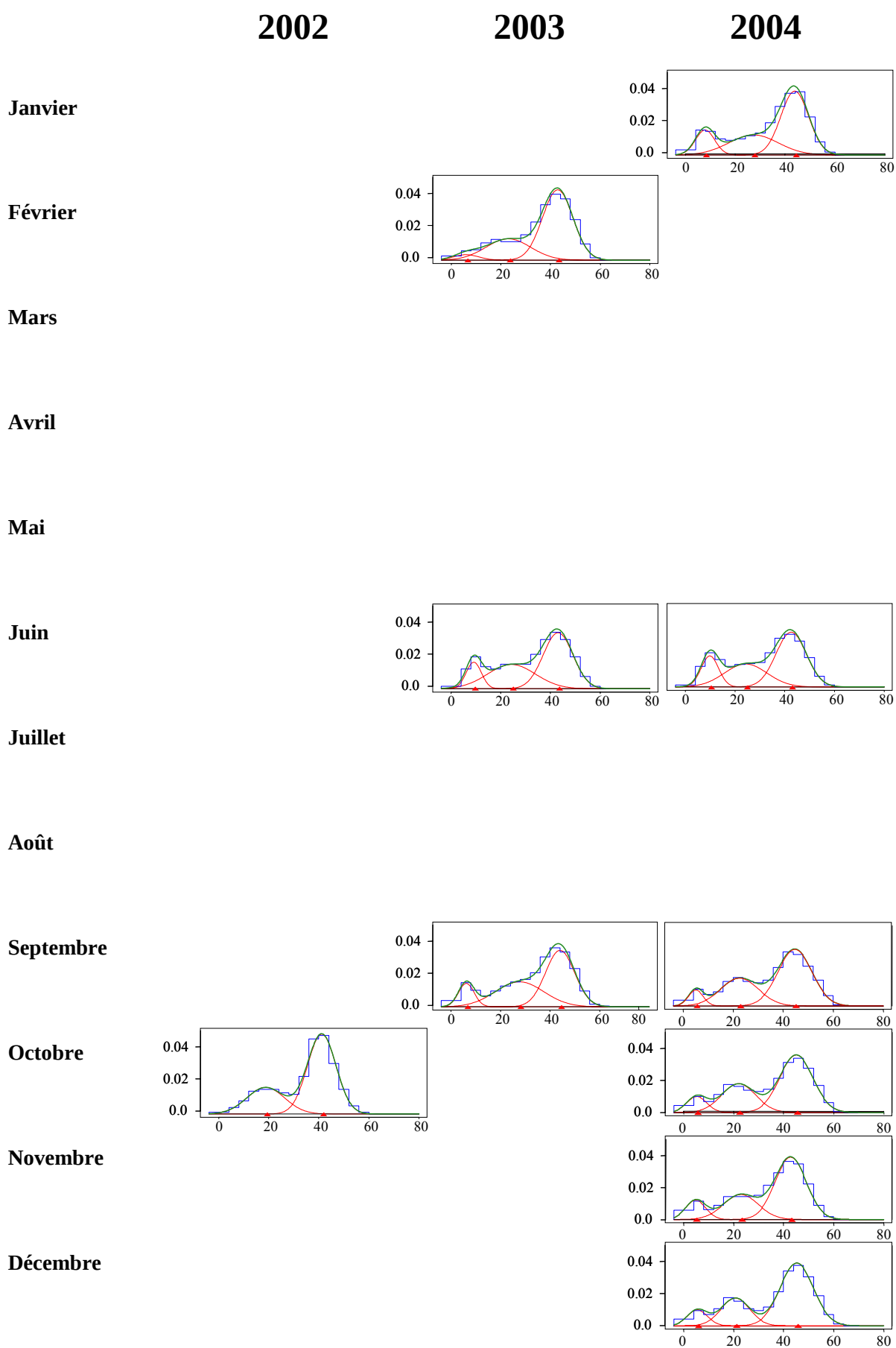


Tableau III-A-1

Date	N		Composantes Modales				Test
			1	2	3	4	
oct-02	200	Proportion			0.31	0.69	ddl = 11
		Moyenne (mm)			18.76	41.17	$\chi^2 = 1.4689$
		Ecart-type (mm)			7.54	5.71	P = 0.9997
févr-03	323	Proportion		0.04	0.27	0.68	ddl = 9
		Moyenne (mm)		8.96	23.38	41.57	$\chi^2 = 1.9248$
		Ecart-type (mm)		5.54	9.04	6.47	P = 0.9926
juin-03	353	Proportion		0.12	0.36	0.52	ddl = 9
		Moyenne (mm)		9.15	24.34	43.08	$\chi^2 = 0.6983$
		Ecart-type (mm)		3.07	9.63	5.98	P = 0.9999
sept-03	413	Proportion		0.11	0.38	0.51	ddl = 9
		Moyenne (mm)		6.20	27.69	44.03	$\chi^2 = 1.5691$
		Ecart-type (mm)		3.16	9.76	5.87	P = 0.9966
janv-04	223	Proportion		0.15	0.30	0.55	ddl = 9
		Moyenne (mm)		7.84	27.31	43.83	$\chi^2 = 1.3596$
		Ecart-type (mm)		3.85	9.93	5.58	P = 0.998
juin-04	408	Proportion		0.17	0.31	0.52	ddl = 9
		Moyenne (mm)		9.87	24.31	42.59	$\chi^2 = 1.9196$
		Ecart-type (mm)		3.51	8.56	6.09	P = 0.9927
30 sept-04	314	Proportion		0.07	0.33	0.60	ddl = 10
		Moyenne (mm)		5.02	22.50	44.71	$\chi^2 = 2.3659$
		Ecart-type (mm)		2.93	7.54	6.78	P = 0.9927
21 oct-04	400	Proportion		0.08	0.33	0.59	ddl = 12
		Moyenne (mm)		4.47	21.72	45.21	$\chi^2 = 4.1775$
		Ecart-type (mm)		3.00	7.48	6.54	P = 0.98
19 nov-04	287	Proportion		0.12	0.27	0.61	ddl = 11
		Moyenne (mm)		4.76	22.88	42.81	$\chi^2 = 3.3177$
		Ecart-type (mm)		4.00	6.95	6.24	P = 0.9858
20 déc-04	213	Proportion		0.10	0.25	0.65	ddl = 12
		Moyenne (mm)		5.46	20.66	45.23	$\chi^2 = 2.3677$
		Ecart-type (mm)		4.00	5.73	6.67	P = 0.9986

Figure III-A-4 (suite) :

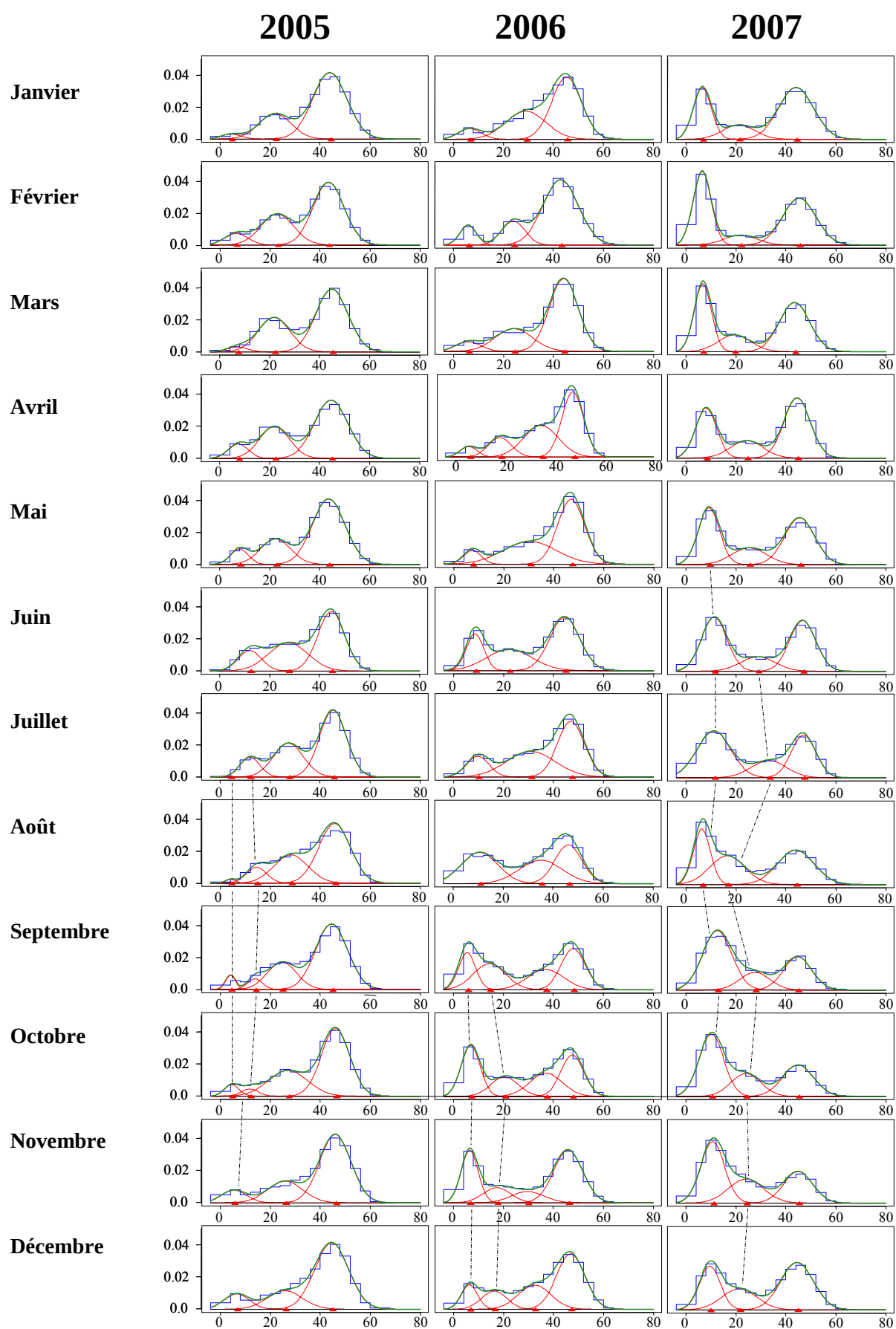


Tableau III-A-1 (suite) :

Date	N		Composantes Modales				Test
			1	2	3	4	
20 janv-05	316	Proportion		0.03	0.26	0.71	ddl = 12
		Moyenne (mm)		4.39	21.96	43.91	$\chi^2 = 3.2589$
		Ecart-type (mm)		4.00	6.49	6.89	P = 0.9934
22 févr-05	255	Proportion		0.09	0.32	0.61	ddl = 11
		Moyenne (mm)		6.46	22.85	43.43	$\chi^2 = -5.4911$
		Ecart-type (mm)		4.67	6.56	6.23	P = 1
22 mars-05	395	Proportion		0.03	0.34	0.63	ddl = 13
		Moyenne (mm)		7.00	21.72	44.93	$\chi^2 = 5.8273$
		Ecart-type (mm)		4.00	6.36	6.42	P = 0.9522
20 avr-05	411	Proportion		0.09	0.30	0.61	ddl = 14
		Moyenne (mm)		7.42	21.91	44.62	$\chi^2 = 5.3126$
		Ecart-type (mm)		4.00	6.00	6.71	P = 0.981
19 mai-05	322	Proportion		0.09	0.24	0.67	ddl = 10
		Moyenne (mm)		7.86	22.36	43.64	$\chi^2 = 0.7475$
		Ecart-type (mm)		3.55	6.06	6.58	P = 1
21 juin-05	385	Proportion		0.15	0.35	0.50	ddl = 10
		Moyenne (mm)		12.02	27.42	44.66	$\chi^2 = 2.093$
		Ecart-type (mm)		4.71	7.91	5.38	P = 0.9956
22 juil-05	382	Proportion	>0.01	0.12	0.32	0.56	ddl = 10
		Moyenne (mm)	4.00	11.89	27.33	45.20	$\chi^2 = 2.0117$
		Ecart-type (mm)	2.00	4.00	6.00	5.36	P = 0.9962
17 août-05	305	Proportion	0.01	0.10	0.30	0.59	ddl = 12
		Moyenne (mm)	4.00	14.46	28.23	45.73	$\chi^2 = 3.9759$
		Ecart-type (mm)	2.00	4.00	6.83	6.34	P = 0.9839
21 sept-05	314	Proportion	0.04	0.05	0.25	0.65	ddl = 12
		Moyenne (mm)	4.00	13.84	24.64	44.56	$\chi^2 = 2.8415$
		Ecart-type (mm)	2.00	3.00	5.87	6.41	P = 0.9966
19 oct-05	303	Proportion	0.05	0.04	0.31	0.60	ddl = 6
		Moyenne (mm)	4.52	11.80	27.08	46.10	$\chi^2 = 0.5371$
		Ecart-type (mm)	2.96	3.43	7.82	5.66	P = 0.9974
16 nov-05	307	Proportion		0.10	0.24	0.66	ddl = 12
		Moyenne (mm)		5.38	25.87	46.03	$\chi^2 = 5.1579$
		Ecart-type (mm)		5.00	7.00	6.24	P = 0.9525
20 déc-05	312	Proportion		0.12	0.20	0.70	ddl = 14
		Moyenne (mm)		6.49	25.80	44.58	$\chi^2 = -5.8964$
		Ecart-type (mm)		5.00	7.00	6.76	P = 1
20 janv-06	308	Proportion		0.08	0.35	0.57	ddl = 13
		Moyenne (mm)		6.50	29.00	45.31	$\chi^2 = 5.2208$
		Ecart-type (mm)		4.50	8.00	5.94	P = 0.97
22 févr-06	239	Proportion		0.10	0.17	0.72	ddl = 10
		Moyenne (mm)		5.85	23.91	42.94	$\chi^2 = 1.2921$
		Ecart-type (mm)		3.24	4.65	7.10	P = 0.9995
22 mars-06	300	Proportion		0.07	0.27	0.66	ddl = 12
		Moyenne (mm)		5.80	24.08	44.07	$\chi^2 = 3.925$
		Ecart-type (mm)		5.00	7.50	5.80	P = 0.9848
18 avr-06	300	Proportion	0.06	0.14	0.35	0.45	ddl = 5
		Moyenne (mm)	5.33	17.97	34.58	47.41	$\chi^2 = 0.6786$
		Ecart-type (mm)	3.44	4.67	7.02	4.33	P = 0.9841

Tableau III-A-1 (suite) :

Date	N		Composantes Modales				Test
			1	2	3	4	
18 mai-06	277	Proportion		0.07	0.38	0.55	ddl = 10
		Moyenne (mm)		7.36	30.40	46.96	$\chi^2 = 2.0414$
		Ecart-type (mm)		3.48	10.64	5.39	P = 0.996
20 juin-06	309	Proportion		0.20	0.30	0.50	ddl = 9
		Moyenne (mm)		8.52	22.28	44.49	$\chi^2 = 0.7376$
		Ecart-type (mm)		3.47	9.17	6.01	P = 0.9998
19 juil-06	304	Proportion		0.14	0.39	0.47	ddl = 9
		Moyenne (mm)		9.62	30.89	46.96	$\chi^2 = 1.1684$
		Ecart-type (mm)		4.52	9.70	5.35	P = 0.999
17 août-06	322	Proportion		0.36	0.31	0.33	ddl = 9
		Moyenne (mm)		10.55	35.10	46.14	$\chi^2 = 1.4674$
		Ecart-type (mm)		7.36	8.59	5.40	P = 0.9974
19 sept-06	336	Proportion	0.20	0.26	0.23	0.31	ddl = 6
		Moyenne (mm)	5.49	14.43	36.91	47.95	$\chi^2 = 0.342$
		Ecart-type (mm)	3.37	6.45	7.28	4.84	P = 0.9993
18 oct-06	305	Proportion	0.30	0.17	0.24	0.29	ddl = 7
		Moyenne (mm)	6.85	20.49	37.07	47.58	$\chi^2 = 0.9358$
		Ecart-type (mm)	3.76	5.50	6.50	4.55	P = 0.9958
17 nov-06	308	Proportion	0.28	0.13	0.11	0.48	ddl = 8
		Moyenne (mm)	6.46	17.34	29.67	45.94	$\chi^2 = 0.3183$
		Ecart-type (mm)	3.38	5.50	6.50	5.80	P = 1
20 déc-06	299	Proportion	0.12	0.14	0.24	0.49	ddl = 8
		Moyenne (mm)	6.31	16.21	32.39	46.86	$\chi^2 = 0.7363$
		Ecart-type (mm)	3.22	5.00	6.50	5.67	P = 0.9994
17 janv-07	302	Proportion		0.29	0.14	0.56	ddl = 11
		Moyenne (mm)		6.51	21.14	44.10	$\chi^2 = 1.4616$
		Ecart-type (mm)		3.60	6.50	7.01	P = 0.9997
21 févr-07	306	Proportion		0.41	0.10	0.49	ddl = 11
		Moyenne (mm)		6.45	21.82	45.35	$\chi^2 = 1.2928$
		Ecart-type (mm)		3.58	6.50	6.69	P = 0.9998
14 mars-07	300	Proportion		0.37	0.17	0.47	ddl = 10
		Moyenne (mm)		6.69	19.39	43.46	$\chi^2 = 2.5709$
		Ecart-type (mm)		3.42	6.50	6.08	P = 0.9898
19 avr-07	302	Proportion		0.33	0.18	0.50	ddl = 9
		Moyenne (mm)		8.02	24.33	44.50	$\chi^2 = 2.2917$
		Ecart-type (mm)		4.19	6.50	5.28	P = 0.986
15 mai-07	301	Proportion		0.38	0.18	0.44	ddl = 10
		Moyenne (mm)		9.15	25.26	45.50	$\chi^2 = 4.1012$
		Ecart-type (mm)		4.25	7.00	6.02	P = 0.9427
19 juin-07	308	Proportion		0.43	0.16	0.41	ddl = 10
		Moyenne (mm)		11.25	28.78	46.72	$\chi^2 = 3.1164$
		Ecart-type (mm)		5.10	7.00	5.26	P = 0.9785
18 juil-07	438	Proportion		0.49	0.19	0.32	ddl = 9
		Moyenne (mm)		11.12	33.18	47.09	$\chi^2 = 2.4058$
		Ecart-type (mm)		6.73	7.00	4.88	P = 0.9833
22 août-07	320	Proportion		0.29	0.31	0.39	ddl = 11
		Moyenne (mm)		6.34	16.52	43.98	$\chi^2 = 3.2583$
		Ecart-type (mm)		3.38	7.00	7.31	P = 0.9869

Tableau III-A-1 (suite) :

Date	N		Composantes Modales				Test
			1	2	3	4	
20 sept-07	426	Proportion		0.54	0.17	0.29	ddl = 10
		Moyenne (mm)		12.47	27.57	44.69	$\chi^2 = 2.8024$
		Ecart-type (mm)		5.84	6.00	5.64	P = 0.9857
17 oct-07	529	Proportion		0.48	0.22	0.31	ddl = 10
		Moyenne (mm)		10.13	23.98	44.87	$\chi^2 = 2.8664$
		Ecart-type (mm)		4.91	6.00	6.23	P = 0.9844
20 nov-07	530	Proportion		0.45	0.26	0.29	ddl = 11
		Moyenne (mm)		10.65	24.00	44.92	$\chi^2 = 4.1362$
		Ecart-type (mm)		4.74	7.00	5.81	P = 0.9658
20 déc-07	303	Proportion		0.28	0.23	0.48	ddl = 11
		Moyenne (mm)		9.53	21.36	44.49	$\chi^2 = 1.3394$
		Ecart-type (mm)		4.17	7.00	6.57	P = 0.9998

composante montre de plus un important chevauchement avec les deux composantes qui lui sont adjacentes.

(iii) La ou les plus petites composantes modales (CM N°1&2) traduit (traduisent) l'arrivée et la croissance des plus jeunes individus. Si CM N°2 est présente dans tous les échantillons, CM N°1 n'est présente que de juillet à octobre 2005 puis en avril 2006 puis de septembre à décembre 2006. En revanche, en 2007, ce groupe n'est pas identifié mais on note de très importantes variations de la CM N°2 tant au niveau de la valeur du mode (de 6.34 en août 2007 à 12.47 en septembre 2007) que des proportions relatives de cette composante (de 28 à 54% des individus des échantillons).

Evolution des modes et proportions caractérisant les composantes modales au cours du suivi

L'évolution comparée des proportions relatives des plus petits individus (CM N° 1 et 2) par rapport aux classes regroupant les individus les plus grands (CM N° 4), entre Septembre 2004 et Décembre 2007, est présentée en Figure III-A-5.

En 2004, 2005 et jusqu'en mars 2006, la population est dominée (50% en juin 2005 et 72% en février 2006) par la composante gaussienne N°4 constituée des plus grands individus (supposés les plus âgés et caractérisés par une taille minimale d'environ 35mm). Jusqu'en avril 2006, les individus regroupés dans cette composante modale représentent 63% des individus échantillonnés mais leur proportion diminue ensuite se traduisant après avril 2006 par une représentation moyenne de 42%. En parallèle la proportion de jeunes individus augmente significativement pour passer de 10% en moyenne avant avril 2006 à 35% par la suite. Ils deviennent même majoritaires en septembre 2007 représentant alors 54% des individus échantillonnés dans la population.

Les changements observés sur la proportion des petits individus au cours du suivi s'accompagnent d'une évolution importante de la moyenne de taille des composantes modales N°1 et 2 au cours du temps (voir le diagramme à bulles dans la figure Figure III-A-6 (c)). Les moyennes de CM N° 1 et CM N°2 sont caractérisées par une faible variation pendant les mois d'hiver (novembre à janvier 2005, janvier à mars 2006) suivie d'une augmentation (de janvier à août en 2005 ; de mars à octobre en 2006 et de mars à juillet en 2007) puis d'une nette diminution (entre septembre et novembre 2005, novembre et janvier 2007 et une brusque chute en août 2007). Comme souligné plus haut, l'année 2007 se distingue par l'absence de

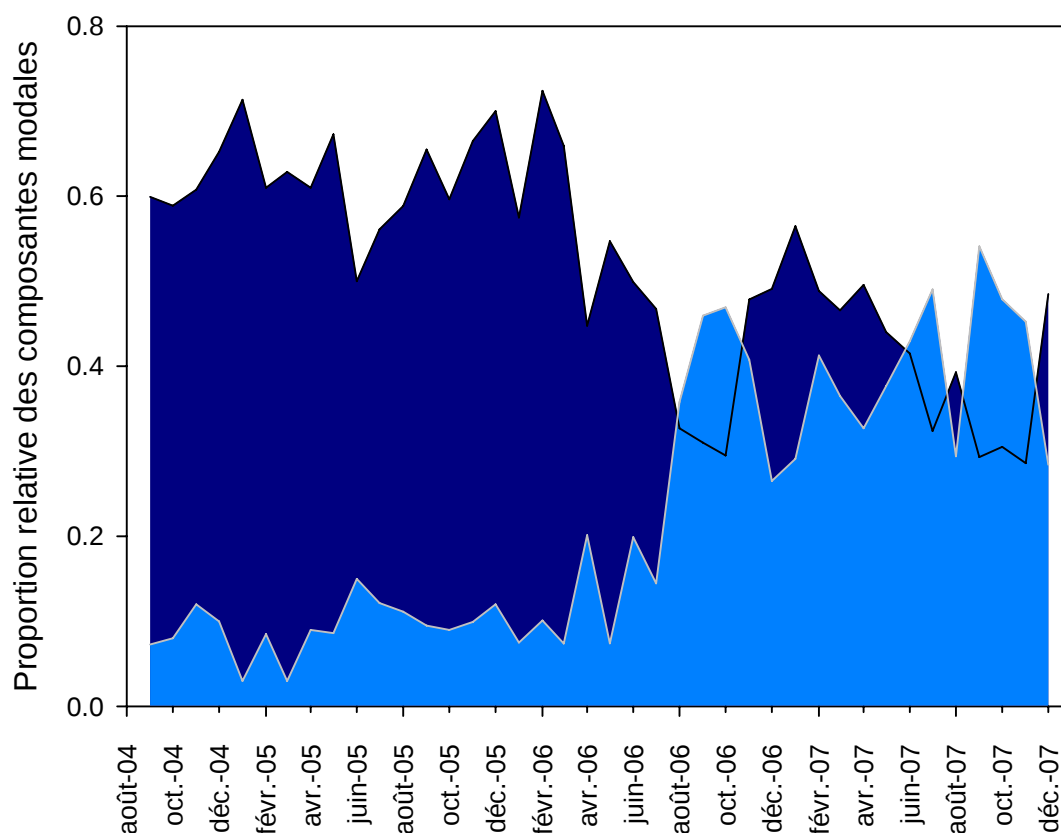


Figure III-A-5: Evolution mensuelle de la proportion des individus les plus petits (courbe bleu clair) prélevés au cours des 40 mois de suivi de la population de crépidules du château du Taureau.

L'évolution des proportions relatives cumulées des composantes modales 1 et 2 (bleu clair) est représentée avec l'évolution des proportions relatives de la 4^e composante modale, représentant les individus les plus grands de la population (bleu foncé).

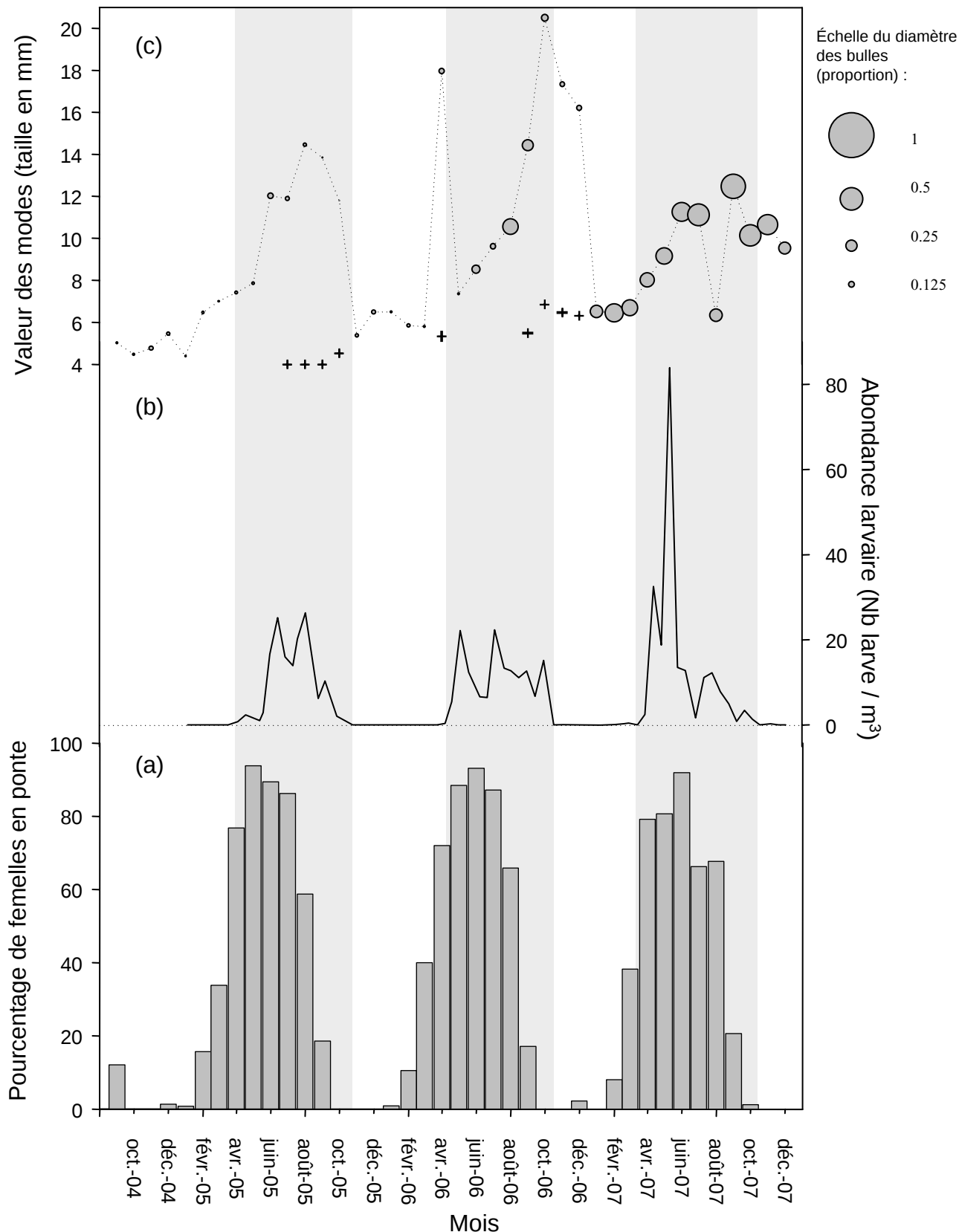


Figure III-A-6 : Évolution comparée (a) du pourcentage de femelle en ponte, (b) de l'abondance larvaire (nombre de larves par m³) et (c) des modes (en mm) de la première (croix) et de la deuxième (bulles) composante modale identifiées lors des décompositions modales des histogrammes de fréquence de taille (cf. **figure III-A-4** et **Tableau III-A-1**); la taille des bulles représente la proportion relative de la deuxième composante modale

gaussienne englobant les individus sédentarisés de l'année (CM N°1), combinée à une forte proportion relative de jeunes individus et une faible variation de la moyenne.

Composition des classes de taille regroupant les individus de moins de 10 mm

La présence d'une ou deux composantes modales pour caractériser les petits (jeunes) individus dans la population ne permet pas de distinguer à elles seules précisément les événements de sédentarisation car la variation des modes de ces deux composantes englobe à la fois les phénomènes de post-sédentarisation et de croissance des individus juvéniles. Grâce à l'analyse détaillée des distributions de fréquences de taille dans l'intervalle 1-10mm ainsi que de la proportion d'individus non matures, nous avons néanmoins pu distinguer les périodes d'arrivée de nouveaux individus dans la population (Figure III-A-7). La période d'arrivée des post-larves sédentarisées (« jeunes de l'année » ou « recrues »; classe 1mm) démarre à partir de juillet en 2005 mais un mois plus tôt, en juin, pour les années 2006 et 2007. La présence de jeunes individus s'intensifie à partir de juin 2006 : on note une proportion relative maximale de la plus petite composante modale de 5% en octobre 2005 puis de 29% dès Janvier 2007.

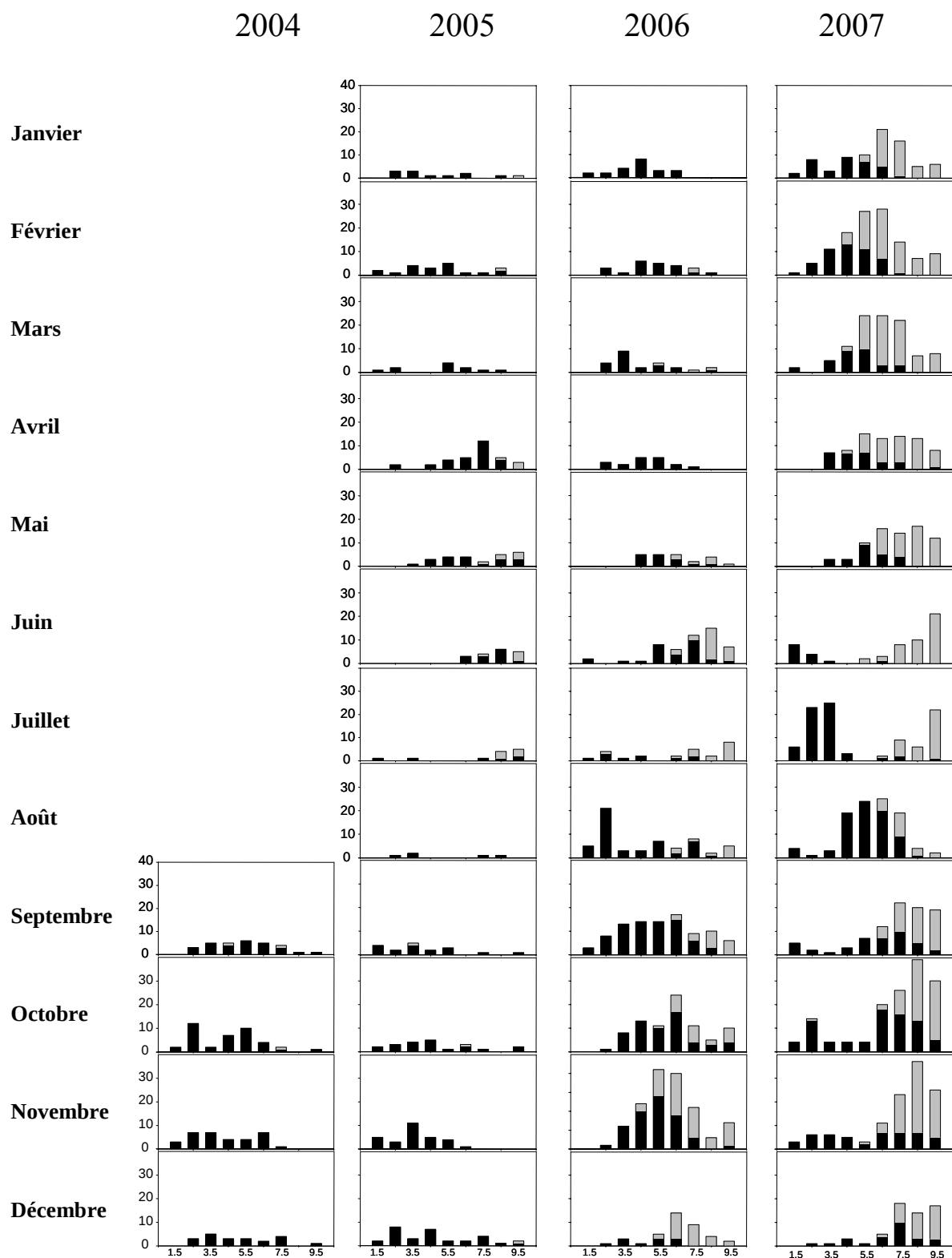
L'évolution de la moyenne pondérée de la distribution de fréquence de taille des individus de moins de 10 mm (Figure III-A-8 (a)) révèle une période de croissance des jeunes individus, probablement sédentarisés en fin d'automne-début d'hiver de l'année précédente, d'avril à juin en 2005 et 2006 et de mars à mai en 2007. La diminution marquée de la moyenne pondérée de la distribution des tailles, avec un minimum en septembre 2005, août 2006 et juillet 2007, traduit en revanche une période d'arrivée significative de nouveaux individus dans la population (« recrues ») et, de façon concomitante, la croissance et l'acquisition de la maturité sexuelle des recrues de l'année précédente.

Evolution temporelle du pourcentage de femelle incubant des oeufs

L'analyse de l'évolution du pourcentage de femelles en ponte montre que les patrons de reproduction sont très réguliers d'une année à l'autre (Figure III-A-6 (a)). La période de présence de femelles portant des pontes est longue, de décembre à septembre en 2005, de janvier à septembre en 2006 et de février à octobre en 2007. A noter que deux pontes ont été également observées en décembre 2006. Trois mois au cours de chaque année étudiée sont

Figure III-A-7 : Distribution des fréquences de tailles des individus de moins de 10 mm prélevés dans la population du château su Taureau entre septembre 2004 et décembre 2007

En abscisse sont représentées les valeurs médianes des classes de tailles (intervalle de 1mm) et en ordonnée, les effectifs. Les histogrammes correspondent aux effectifs cumulés des juvéniles (noir) et des mâles (gris).



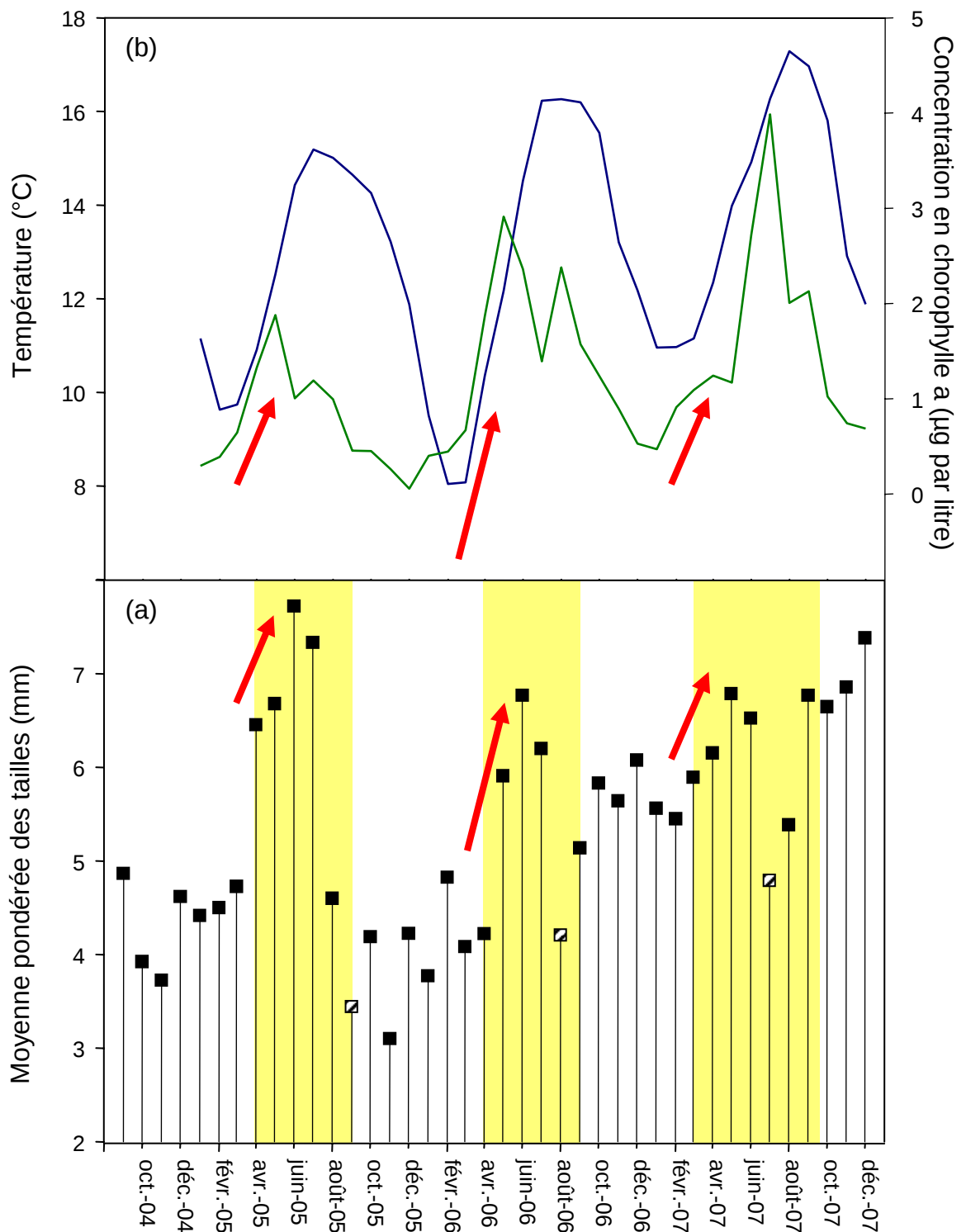


Figure III-A-8: Évolution comparée (a) de la moyenne pondérée de la distribution des tailles des individus de moins de 10mm (les points rayés correspondent à la première diminution importante de taille annuelle), des périodes de présence de larves (zone jaune), (b) des mesures de températures (°C, en bleu) et de concentration en chlorophylle a ($\mu\text{g.l}^{-1}$, en vert) dans la colonne d'eau. NB: les flèches rouges indiquent les augmentations simultanées des différentes variables.

caractérisés par la présence de plus de 80% de femelles portant des pontes (mai, juin, juillet en 2005 et 2006 ; avril mai juin en 2007).

III-A-4. DISCUSSION

Des patrons de reproduction saisonniers et stables entre années

Au cours des trois années du suivi démographique de la population de crépidules localisée au Château du Taureau, un résultat particulièrement clair est la régularité des patrons de reproduction tels qu'estimés par la proportion de femelles portant des pontes (Figure III-A-6 (a)).

Parmi les caractères les plus marquants, nous avons noté la présence de femelles portant des pontes sur une longue période, s'étalant sur plus de 8 mois (d'environ décembre/janvier à septembre/octobre). De plus, une large majorité des femelles participe à la reproduction avec, chaque année, trois mois où plus de 80% des femelles échantillonnées incubent des pontes (mai, juin, juillet en 2005 et 2006 puis avril, mai, juin en 2007). Le temps d'incubation des pontes étant de l'ordre d'un mois (Chipperfield 1951), ceci suggère que les femelles se reproduisent plusieurs fois au cours d'une même saison, une constatation qui rejoint des observations faites en laboratoire avec des femelles produisant des pontes successives à quelques semaines d'intervalle (F. Viard et R. Lasbleiz, observations personnelles). Ce patron régulier se rapproche également des données disponibles dans la littérature qui montrent une similitude de la production de pontes par les femelles en différents points du littoral français et sur plusieurs années (Tableau III-A-2). En particulier, à partir d'un suivi mené durant 4 années sur une population de la rade de Brest, Richard et al. (2006) montrent comme dans notre étude (i) la présence de femelles portant des pontes sur une longue période (de mi-février à septembre) et (ii) avec un maximum en mai-juin (80% de femelles avec pontes). L'étude de Richard et al. (2006) a en outre suivi les stades de développement embryonnaire des pontes, ce qui leur a permis d'estimer que les femelles émettaient des pontes entre 2.4 et 3.7 fois par saison de reproduction. Des observations similaires ont été réalisées par Lubet & Le Gall (1972) qui notent qu'à Luc-sur-Mer (Manche Orientale), au cours de 3 années d'un suivi, les premières pontes apparaissent en général en février, leur nombre augmentant jusqu'à un maximum en mai et juin (avec 80 à 90% des femelles présentant des pontes) avant de décroître jusqu'en octobre. Cette régularité n'est pas

Tableau III-A-2: Période de reproduction chez *C. fornicata* dans différentes régions géographiques d'après les données de la littérature

	Aire Native		Aire d'introduction	
	Nord Est des Etats Unis	France	Sud de l'Angleterre	Nord de la mer de Wadden
Période de reproduction	Mai– Septembre <i>Conklin, 1897;</i> <i>Hoagland, 1978</i>	Février /Mars-Novembre <i>Lubet & LeGall, 1972</i> <i>Deslous-Paoli, 1985</i> <i>Quiniou & Blanchard, 1987</i> <i>Richard et al 2006</i>	Avril– Septembre <i>Orton, 1950</i> <i>Chipperfield, 1951</i> <i>Walne, 1956</i>	Avril– Septembre <i>Werner, 1948;</i> <i>Thieltges et al 2004</i>

restreinte aux populations des côtes bretonnes et de la Manche : Deslous-Paoli (1985) a également observé ce même patron dans le bassin de Marennes-Oléron.

Les déterminismes fins du déclenchement de la production de pontes sont cependant mal connus. Des observations et expériences en laboratoire mené par le Service Mer & Observation de la Station Biologique (Lasbleiz et al., données non publiées) semblent toutefois indiquer que comme chez beaucoup d'invertébrés la température serait un facteur important (Olive 1995). L'évolution de la température, présentée en Figure III-A-8 (b), a été obtenue en 2005 grâce aux données du réseau national d'observation SOMLIT, situé à la sortie de la baie de Morlaix, et, en 2006 et 2007 à l'aide une sonde CTD (SBE19+) sur le site d'échantillonnage (données obtenues dans le cadre de la thèse de François Rigal 2009). Durant les 3 années de suivi, la température a varié de 7.9 °C (mars 2006) à 18.0°C (août 2007). Les températures minimales sont variables entre années et ont été enregistrées en février 2005 (9.1°C), mars 2006 (7.9°C) et mars 2007 (10.8°C). Pourtant, les patrons de reproduction décrits ne semblent pas suivre ces variations et décalages de température. Par exemple, en mars 2006 et 2007, la période la plus froide de ces deux années, on trouve la même proportion de femelles portant des pontes (40%). Selon Werner (1955), la température minimale en deçà de laquelle on ne trouve plus de pontes chez le crépidule est de 6-7°C. Les périodes de pontes enregistrées au Nord Est de l'Angleterre dans un estuaire de l'Essex (Chipperfield 1951) et dans le Nord de la mer de Wadden, Allemagne (Thieltges et al. 2004), où les températures hivernales de la colonne d'eau descendent jusqu'à 0°C et en deçà, sont plus courtes (par rapport à nos observations) : entre avril et septembre (Tableau III-A-2). Une explication de ce décalage est que les variations de températures sont plus abruptes dans ces régions, avec une augmentation plus tardive mais significative de la température au printemps. En baie de Morlaix la température descend rarement sous les 6°C pendant l'hiver. Compte tenu de la stabilité interannuelle des patrons de présence de pontes, on peut émettre l'hypothèse que dans cette population naturelle de la baie de Morlaix, d'autres facteurs influencent les rythmes biologiques, dont la reproduction, de la crépidule. Par exemple, Fromont & Bergquist (1994) ont démontré une rythmicité dans le cycle reproducteur d'éponges en lien avec la photopériode.

Le couplage entre phase benthique et pélagique est-il efficace ?

Un second résultat intéressant est de constater que la régularité interannuelle de ces périodes de reproduction est concordante avec les périodes de présence de larves dans le

milieu (Figure III-A-6 (b)). En effet, les données obtenues à la suite d'un suivi larvaire bi-mensuel, conduit de janvier 2005 à décembre 2007 par François Rigal (2009) dans le cadre de sa thèse, ont révélé que la période de présence de larves de *C. fornicata* dans la colonne d'eau est longue et varie peu d'une année sur l'autre (avril à octobre en 2005 et 2006) avec néanmoins un mois d'avance en 2007 (mars à octobre). Ainsi les dates d'apparition (i.e. premières observations) de larves dans le milieu suivent l'apparition des premières pontes avec un délai de deux voire trois mois. Même en prenant en compte un décalage entre la production initiale des embryons et la libération des larves véligères dans le milieu, ainsi qu'une semaine ou deux de développement des larves dans le milieu, ce décalage reste important. Il est vraisemblable que cette différence soit liée à des effets d'échantillonnage des larves. Les concentrations larvaires mesurées pendant la période de présence de larves sont en effet très faibles ($12.2 \text{ larves.m}^{-3}$) en comparaison de données enregistrées par exemple en certains points de la baie du Mont Saint Michel avec $2000 \text{ larves.m}^{-3}$ (Lasbleiz 2003), et ceci particulièrement en début de saison. Hormis ce décalage initial, on note une bonne synchronie entre la présence des femelles incubantes et la présence de larves dans le milieu. L'augmentation de l'abondance larvaire jusqu'à un niveau maximal est abrupte puis fluctue durant 7 mois pour chuter tout aussi brutalement (Figure III-A-6 (b)). L'émission de larves est ainsi continue au cours de la période de reproduction et atteint un maximum correspondant au « plateau » de la distribution de la proportion de femelles en ponte au cours du temps, avec des pics d'émission durant les mois de forte activité reproductive.

L'observation de larves d'une espèce dans le milieu peut trouver deux origines : (i) la reproduction des adultes présents localement ou (ii) le transport de larves depuis des populations environnantes (Lewin 1986). La très forte synchronie entre les périodes de reproduction des femelles et de présence des larves pourrait nous amener à privilégier la première proposition dans le cas de la population du Château du Taureau. Néanmoins, comme nous l'avons souligné auparavant, les périodes de reproduction des femelles dans d'autres sites bretons sont sensiblement identiques à celles observées dans la baie de Morlaix. Associé au fait que notre pas de temps d'échantillonnage est de un mois, une période largement suffisante pour permettre le transport de larves depuis des baies environnantes dans des conditions météorologiques favorables (Edwards *et al.* 2007), il ne nous est ainsi pas possible de rejeter la seconde proposition d'apports larvaires extérieurs. Il faudrait pouvoir compléter notre étude par des analyses d'origine des larves, par exemple par des méthodes d'assignation génétique (Hellberg *et al.* 2002) ou par des techniques de traceurs isotopiques (Herzka 2005).

Selon Pechenik & Heyman (1987) les larves de crépidules peuvent se sédentariser à des tailles allant de 800 à 1100µm. Nos observations sur la phase benthique nous ont permis de préciser la période de début de la sédentarisation annuelle, avec l'apparition d'individus de moins de 4mm, en juillet 2005 et en juin 2006 et 2007 (Figure III-A-7). L'analyse détaillée des distributions de fréquences de taille des individus de moins de 10mm a permis de caractériser les événements moyens de sédentarisation des post-larves, en utilisant la valeur minimum annuelle de la moyenne pondérée des tailles des individus de moins de 10mm comme un indicateur de la période où la sédentarisation des post-larves est maximale. Ce minimum, caractérisé par la présence d'un grand nombre de petits individus (1-2mm), se décale d'un mois à chacune des 3 années du suivi : il est atteint en septembre 2005, août 2006 et juillet 2007 (Figure III-A-8). Dans un premier temps, cette évolution temporelle de la distribution des individus juvéniles peut être analysée en regard des fluctuations saisonnières de deux paramètres environnementaux, la température et la concentration en chlorophylle a, qui ont une influence majeure sur la dynamique du pool larvaire de crépidules dans la zone étudiée (thèse de François Rigal 2009). L'augmentation simultanée de la température et de la concentration en chlorophylle a coïncide avec les périodes de croissance des juvéniles, certainement recrutés en fin d'année précédente (Figure III-A-8). On note aussi que la période de présence de larves dans la colonne d'eau et les pics de reproduction débutent également avec l'augmentation de ces variables environnementales. En revanche, la diminution de la moyenne pondérée, traduisant l'arrivée significative des jeunes de l'année, a lieu au moment des maxima de température. Il n'est pas surprenant que les processus de reproduction et croissance suivent les variations de paramètres environnementaux tels que la température et la concentration en chlorophylle a car les juvéniles de crépidule, comme les adultes, sont filtreurs et les larves planctotrophes.

Que ce soit sous l'effet de variables environnementales ou intrinsèques à l'espèce, les dynamiques de reproduction, larvaires et de sédentarisation sont relativement bien synchronisées entre les compartiments benthiques et pélagiques et stables d'une année sur l'autre. Le couplage entre les phases benthiques et pélagiques semble donc à première vue relativement réussi en baie de Morlaix. Néanmoins, il est intéressant de remarquer que la période où se concentrent les effectifs des nouveaux individus sédentarisés (septembre 2005, août 2006 et juillet 2007) est très largement décalée du moment où plus de 50% des femelles présentent des pontes (vers mars-avril de chaque année, soit 3 à 5 mois plus tôt) ou du

moment où les larves sont largement présentes dans le milieu (avril-juin). Elle est également « resserrée » dans le temps par rapport aux périodes de reproduction et présence de larves. Même en prenant en compte des croissances larvaires ralenties sous de faibles températures, ces résultats suggèrent qu'une large part de la production d'embryons par les femelles ne se traduit pas par une sédentarisation locale. L'utilisation de modèles simples de transports larvaires par la marée ainsi que de suivis spatiaux des abondances larvaires ont permis à Rigal *et al.* (In prep.) de suggérer des exports massifs de larves en dehors de la baie du fait de son hydrodynamisme particulier, notamment au printemps compte-tenu des conditions météorologiques. Ces exports massifs à certaines saisons pourraient expliquer les décalages entre les périodes de reproduction et de sédentarisation observées dans notre étude. Une autre hypothèse pouvant expliquer nos résultats est une mortalité importante des post-larves au printemps et en début d'été. Dans tous les cas, cela signifierait une perte importante de l'investissement à la reproduction des individus. Les taux de mortalité des post-larves chez les organismes benthiques sont très largement méconnus, y compris chez *C. fornicata*. Il conviendrait de réaliser des expériences *in situ* pour pouvoir mieux caractériser les causes de ce découplage apparent entre phase pélagique et benthique.

Une évolution importante de la structure démographique au cours du temps malgré des patrons réguliers de reproduction

Au cours de ce suivi, nous avons réalisé une autre observation soulignant la complexité des processus affectant la dynamique de recrutement chez notre modèle biologique. Nous avons en effet mis en évidence un changement majeur dans la composition de la population benthique au cours des trois années de ce suivi avec l'arrivée massive de jeunes individus dans la population en 2007.

Quatre cohortes au maximum ont été mises en évidence durant les 40 mois de suivi. Ces résultats sont en accord avec les précédents résultats obtenus sur cette même population durant la thèse de Lise Dupont (2004), et dans une population du bassin de Marennes d'Oléron (Deslous-Paoli 1985). A la différence de notre étude, ces travaux utilisaient la longueur curviligne comme proxy de la taille des individus. Néanmoins, les composantes modales ajustées conduisent au même type de structure démographique, signifiant que la longueur droite, bien que ne prenant pas en compte la courbure de la coquille, est un paramètre utilisable pour ce type d'analyse impliquant de gros échantillonnages. Ces analyses ont révélé un changement notable de la structure démographique, depuis une population

dominée par des individus de grande taille (âgés) de 2004 à mi 2006 jusqu'à une structure caractérisée par une forte augmentation de la proportion relative de jeunes individus dans la population (Figure III-A-4).

En outre, l'analyse démographique des 6 échantillons prélevés en 2002, 2003 et début 2004 montre également que la population est dominée par une majorité d'individus âgés (58% en moyenne) ce qui suggère que la structure démographique observée jusqu'au début 2006 était stable depuis plus de 3 ans. Les modifications des proportions relatives des jeunes individus détectées à partir de 2006 et jusqu'en 2007 pourraient signifier un changement atypique dans la composition de la population.

Ainsi malgré des processus de reproduction et d'émission larvaire se distinguant par leur saisonnalité et leur stabilité interannuelle en terme d'intensité, la structure démographique de la population s'est modifiée en conséquence de deux événements de sédentarisation intenses en 2006 et en 2007. Dès lors, des facteurs pré- et/ou post-sédentarisation pourraient être à l'origine du découplage entre les processus de reproduction et l'intensité de la sédentarisation observée. Les facteurs liés à la phase de pré-sédentarisation, tels que la mortalité ou la dispersion larvaire, sont difficiles à estimer à partir de l'abondance larvaire. En effet, la mesure stationnaire de l'abondance larvaire avec un pas bi-mensuel est peu représentative de l'apport larvaire (Gaines & Bertness 1992). L'analyse détaillée des distributions de fréquences de taille des individus de moins de 10mm montre qu'au début de 2007, on observe une forte abondance de petits individus issus de 2006, qui, combinée à l'arrivée importante de recrues de l'année, empêche la discrétisation de deux composantes modales avec un pas de classe de 4 mm. Selon Underwood & Fairweather (1989), l'intensité de la sédentarisation peut renforcer l'importance des facteurs jouant sur la réussite de la phase de post-sédentarisation, par exemple la prédation sur les nouvelles recrues. Pourtant, les proportions relatives des nouveaux individus entrés dans la population en 2005, 2006 puis 2007 ne varient pas durant les mois d'hiver ; on note seulement une stabilité du mode suggérant un arrêt de la croissance. La mortalité des juvéniles semble donc limitée dans cette population, indépendamment de l'ampleur de l'évènement estival de sédentarisation, ce qui pourrait expliquer l'augmentation progressive de jeunes individus dans la population suite aux deux événements de sédentarisation importants survenus en 2006 puis 2007. Ces résultats corroborent des observations de la littérature montrant ou suggérant que *C. fornicata* est une espèce peu sensible à la compétition intra-spécifique (Pechenik *et al.* 2004). Comme déjà souligné, il semble important de pouvoir développer des études moins indirectes des

processus affectant les individus juvéniles, notamment par des mesures *in situ* ou en mésocosme de leurs taux de mortalité.

Conclusions

Durant ce suivi, j'ai étudié trois cycles de reproduction ce qui m'a permis de mettre évidence des épisodes majeurs de sédentarisation de juvéniles dans la population étudiée. La variabilité du recrutement chez les espèces benthopélagiques a été très largement étudiée dans la littérature (voir la revue de Pineda 2000). Cependant, prédire le devenir de la population à partir de suivis démographiques nécessite des suivis sur un très long terme afin d'analyser les déterminants des variations observées. Or de telles études sont relativement rares. Citons toutefois l'étude de Van Der Meer et al. (2001), sur l'évolution de la structure démographique de *Macoma baltica* : grâce à des données obtenues sur 30 ans, ces auteurs démontrent que malgré l'importance ponctuelle de la mortalité post-sédentarisation, la variabilité interannuelle de la sédentarisation est la cause majeure de variation de l'abondance des populations. Ce constat est particulièrement intéressant dans notre cas car la crépidule est une espèce invasive. La poursuite du suivi temporel de la population permettrait ainsi de déterminer si le patron de recrutement observé en 2007 correspond à un événement ponctuel ou à un changement dans le fonctionnement de la population. Il serait également nécessaire de comparer cette évolution et les caractéristiques de recrutement avec celle d'autres populations présentant des structures démographiques différentes. Par exemple, Dupont *et al.* (2007) ont étudié deux populations de la baie du Mont Saint Michel où la crépidule est très abondante mais dont l'historique diffère. La première population, depuis longtemps établie, présentait une structure similaire à celle observée en 2004 dans notre étude et caractérisée par une prédominance d'individus âgés alors que la deuxième population, absente en 1997, était constituée de 3 groupes caractérisés par des effectifs similaires.

Dans notre étude, nous observons un changement dans la structure de la population à partir de 2006. La conséquence de variations dans la structure d'âge d'une population est fortement étudiée dans le cadre d'étude de stocks de poissons exploités (voir par exemple Hsieh et al. 2006). En particulier, ces auteurs montrent que la réduction de la taille et de l'âge des individus peut contribuer à augmenter la variabilité du recrutement, en diminuant la capacité à palier à des périodes de conditions environnementales défavorables. Beaucoup de poissons se distinguent par une stratégie de « bet-hedging » (littéralement stratégie de « répartition des risques ») souvent associée à des structures d'âge biaisées envers les individus âgés, ce qui contribue à augmenter le taux de survie de larves dans des conditions

délétères et/ou variables. Une des explications est que les individus âgés peuvent produire une plus grande quantité ou une meilleure qualité dans la descendance. Une des caractéristiques des espèces protandres comme la crépidule, est une fertilité et une valeur reproductive des femelles augmentant avec la taille. Ainsi, le changement dans la structure d'âge de la population observée durant ce suivi pourrait avoir pour conséquence future, une diminution de la taille des reproducteurs et une plus faible production de larves à chaque cycle de reproduction. Enfin, une deuxième caractéristique des espèces protandres est que l'arrivée de recrue dans la population est synonyme d'entrée, avec un délai, de mâles dans la population. Par conséquent ce n'est pas seulement la structure démographique qui s'avère modifiée, mais également la structure sexuelle. Le chapitre suivant s'attachera donc à déterminer quelle a été la dynamique de changement de sexe en réponse aux changements démographiques observés lors de notre suivi de la population benthique de crépidules de la baie de Morlaix.

CHAPITRE III-B : RELATIONS ENTRE LA DYNAMIQUE DE CHANGEMENT DE SEXE ET LA DYNAMIQUE DEMOGRAPHIQUE DANS UNE POPULATION NATURELLE EN BAIE DE MORLAIX

III-B-1. SYNOPSIS DE L'ARTICLE 4: SEX CHANGE RESPONSE TO UNPREDICTABLE RECRUITMENT PROCESSES IN THE INVASIVE AND PROTANDROUS MOLLUSC *CREPIDULA FORNICATA*.

**Myriam Milbergue a contribué à ce travail dans le cadre d'un stage d'été réalisé de juillet 2006 à août 2006.*

En analysant la composition sexuelle et les fréquences d'individus juvéniles apparus au cours d'un suivi de 40 mois d'une population de l'espèce protandre *C. fornicata*, nous avons cherché à analyser l'évolution des patrons de changement de sexe et de les analyser en regard de la dynamique démographique de la population. En effet, l'arrivée de nouveaux individus dans la population se traduit avec un délai d'environ un mois par une augmentation de mâle dans la population. Le changement de sexe chez ce mollusque est sous la dépendance de facteurs locaux (i.e. la proportion des deux sexes dans l'environnement immédiat de l'individu). L'arrivée de nouveaux mâles dans la population devrait donc se traduire par une ré-équilibrage du sex-ratio dans la population par un processus de réversion sexuelle. Nous avons également cherché à déterminer comment la composition sexuelle aux niveaux locaux, c'est-à-dire au niveau d'une chaîne pérenne de crépidules, et populationnel co-évoluaient au cours du temps.

Un total d'environ 13000 individus ont été analysés au cours de cette étude avec en moyenne ca. 320 individus par mois sur 40 mois. Le sex-ratio (ici : proportion de femelles par rapport aux mâles et femelles) a été mesuré pour chaque échantillon mensuel à la fois au niveau de l'échantillon complet (« population ») et au niveau « chaîne » (i.e. assemblage pérennes d'individus des deux sexes qui forment des groupes reproducteurs locaux, cf. Partie II-A). Comme prédit par la théorie de l'avantage à la taille, le sex-ratio était biaisé envers les mâles dans une large majorité des échantillons (37 des 40 mois). Nous avons observé des variations importantes de ce paramètre au cours du temps, oscillant entre 0.18 et 0.46 sur l'ensemble du suivi ; en particulier, nous avons observé une diminution significative du sex-

ratio (i.e. ici augmentation de mâles) sur la durée du suivi. Le pourcentage de juvéniles et le sex-ratio se sont révélés corrélés positivement avec un délai de 6 mois, et l'analyse temporelle de la taille au changement de sexe montre une diminution annuelle de celle-ci, suggérant des épisodes de changement de sexe pendant les périodes de croissance de juvéniles, c'est-à-dire les épisodes d'entrée de jeunes mâles dans la population. Ainsi, sur l'ensemble du suivi, les paramètres mesurant les patrons de changement de sexe présentent une rythmicité saisonnière, répondant avec un délai, aux arrivées de nouveaux individus dans la population.

Deux périodes aux caractéristiques contrastées ont néanmoins été observées au cours de cette étude. Durant la première partie du suivi (2004, 2005), on note un rééquilibrage clair de la structure sexuelle de la population répondant à l'arrivée de nouveaux mâles dans la population. En revanche, dans la deuxième partie du suivi (en 2006 et 2007), deux événements majeurs et consécutifs de sédentarisation de juvéniles sont observés : ils concordent avec l'accroissement de la proportion de mâles dans la population (diminution du sex-ratio). Les mécanismes globaux de changement de sexe saisonniers semblent pourtant se poursuivre et même s'intensifier comme en témoigne la diminution de la taille médiane des mâles appartenant à la gamme de taille où la majorité des individus en transitions sexuelle sont observés (i.e. $> 44\text{mm}$). La composition des chaînes (nombre d'individus reproducteurs et sex-ratio) est cependant fortement modifiée avec une augmentation du nombre moyen d'individu par chaîne au cours du suivi, de façon concomitante aux arrivées massives de nouveaux individus. La taille des chaînes et leur sex-ratio apparaissent directement corrélés, la proportion de mâles augmentant avec le nombre d'individus dans la chaîne. De plus, la taille au changement de sexe est plus élevée dans les grandes chaînes, confirmant en conditions naturelles que le déterminisme du changement de sexe est fonction de l'environnement social local.

En conclusion, les modifications importantes constatées dans la structure sexuelle de la population au cours de ce suivi résultent de changements fins dans la composition des groupes reproducteurs, modifications induites par l'arrivée importante de jeunes mâles dans la population. Le déterminisme de changement de sexe de *C. fornicata* répond ainsi à de multiples signaux locaux et populationnels. Cette étude illustre ainsi le rôle majeur des processus démographiques sur la flexibilité du changement de sexe d'une espèce protandre,

III-B-2. «SEX CHANGE RESPONSE TO UNPREDICTABLE RECRUITMENT

PROCESSES IN THE INVASIVE AND PROTANDROUS MOLLUSC *CREPIDULA*

***FORNICATA*».**

Auteurs: Sabrina Le Cam & Frédérique Viard
Article en préparation

Title

Sex change response to unpredictable recruitment processes in the invasive and protandrous mollusc *Crepidula fornicata*.

Authors list

Sabrina Le Cam, Frédérique Viard

UPMC Univ Paris 06, UMR 7144, Adaptation & Diversité en Milieu Marin, Station Biologique, Roscoff, 29682 France

Correspondence: Sabrina Le Cam, UPMC Univ Paris 06, CNRS UMR 7144, Adaptation & Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, 29682 France ; Tel : +33298 292320, Fax : +33298 292336 ; E-mail : lecam@sb-roscoff.fr

ABSTRACT

Sex change strategies are considerably diverse among sequential hermaphrodites, and processes explaining this diversity have mostly been studied either among species or populations. By carrying out a 40 month survey and analyzing ca. 13 000 individuals from the exact same population of the protandrous mollusc *Crepidula fornicata*, a species characterized by well-defined local social environment, we showed an important variation over time of the sexual composition of the population. Sex change was shown to be triggered by seasonal settlement of juveniles, i.e. delayed arrivals of new males in the population. In agreement with experimental data, our data showed that the immediate social environment (i.e. perennial mating groups) is influencing timing of sex change in *C. fornicata*. In addition, when massive juveniles' settlement occurred, we observed that the sexual structure of the population was profoundly modified. Such exceptional demographic features have drawn modifications in the mating group composition reverberating on the sex change features at population level. Altogether our results suggested that a complex combination of several cues is determining sex change dynamics in natural populations of the study species and highlights the interest of taking into account global population functioning to study the flexibility in sex change strategies within a single species.

Keywords: sex change, marine gastropod, population dynamics, local social environnement

INTRODUCTION

Sex change has been documented in a variety of taxa including fishes, molluscs, crustaceans, echinoderms and annelids (Policansky 1982) and its adaptive significance has been largely investigated through the prism of the sex allocation theory (Charnov 1982). In particular, the size-advantage hypothesis (Ghiselin 1969; Leigh et al. 1976; Warner et al. 1975) predicts (i) the conditions under which sex change can be selected over dioecy (syn. gonochorism), (ii) the direction of the change –from males to females (protandry) or from females to males (protogyny)– and (iii) the age (size) at sex change. Sex change is favoured when reproductive success increases faster with age (or size) in one sex compared to the other. That way, individuals' reproductive success is maximized over the entire life.

In addition, as a part of the framework of the life-history invariant approach (Charnov 1993), dimensionless theory has been developed to predict some invariance rules and make general prediction across disparate sex changing species (Charnov & Skuladottir 2000). Although debated (Buston *et al.* 2004; Cipriani & Collin 2005; Nee *et al.* 2005), the relative age (size) at sex change was pointed out as an invariant across taxa (Allsop & West 2003a). One rationale for using invariance approaches is the difficulty to carry out experimental testing of the size-advantage theory, especially for the estimation of males' reproductive success. Empirical evidences nevertheless underlined the magnitude of variation in population sex-ratio and age (size) at sex change. Charnov & Bull (1989) showed by theoretical approach that sex-ratio should be biased towards the first sex in sex changers. And yet, Molloy et al. (2007) and Collin (2006) demonstrated substantial variation of the sex ratio across fishes and a family of gastropods (Calyptraeidae) respectively. Studies of size distributions often revealed a large overlap between males and females size in protogynous (e.g. Shapiro 1987) and protandrous species (e.g. Sewell 1994; Soong & Chen 1991; Wright 1989) with an overlapping range that can differ among closely related species (DeMartini *et al.* 2005) or between populations of a same species. For instance, Chen *et al.* (2004) have shown that the size overlap between males and females of the protandrous species *Coralliophila violacea* is variable with the type of habitat. As an explanation for this surprising flexibility of sex reversal characteristics in sequential hermaphrodites (but see Brook *et al.* 1994 for an opposite example), Munday *et al.* (2006) emphasized the role of local social and ecological drivers. Examples of sex changing species able to advance or delay sex change according to the local environment are numerous and the majority are influenced by social conditions, such

as local density (e.g. Wright 1989), relative individual's size in the mating group (e.g. Buston 2003) or sex ratio of the mating group (e.g. Collin *et al.* 2005; Warner & Swearer 1991).

Most of the empirical studies focused on characterizing life history traits variations (i) among different species (Allsop & West 2003a; Allsop & West 2003b; Molloy *et al.* 2007) or (ii) among different populations or groups of individuals in a heterogeneous environment (Chen *et al.* 2004; Collin 2006; Collin *et al.* 2005; DeMartini *et al.* 2005). Temporal analyses at the population level are comparatively scarce although sex change patterns can be greatly influenced by population dynamics (Charnov & Anderson 1989, Baldwin & Bauer 2003, Bergstrom 1997). For instance, Baldwin & Bauer (2003) have carried out one of these rare studies that examined the evolution over time of sex change at population level: using a two-years population survey, they showed the influence of abiotic environment on the timing of sex change in the protandric simultaneous hermaphroditic shrimp *Lysmata wurdemanni*. However, despite the importance of environmental sex determinism (ESD, Munday *et al.* 2006), fine-scale processes acting within local mating groups over time were not examined in those previous studies, mainly because of the lack of such social structure in the study species. Studies investigating the relationships between population wide processes, such as recruitment patterns at population level, together with local sex change response are still lacking. We chose to investigate such relationships in a sessile protandrous gastropod, *Crepidula fornicata* (slipper limpet). Sex change properties of this species and close relatives of the same genus have long been studied (e.g. Chipperfield 1951; Coe 1938; Orton 1909) and an environmental sex determination has rapidly been suggested to explain the sexual composition of the population (Coe 1938). A new interest for the study of *C. fornicata* had been observed in the last 10 years in relation to its status of invasive species in Europe where it was introduced from North East coast of America at the end of the 19th century (Blanchard 1997). That this gastropod is a sex changer is one of the properties to add to the long list of life history traits that have been proposed to explain its success in many bays and estuaries from Norway to Spain (Blanchard 1997; Dupont *et al.* 2007b).

C. fornicata exhibits a peculiar behaviour by forming long-lived associations (here after called "stacks") that typically contain a variable number of males, females, juveniles, and individuals in sexual transition, on the way from being male to becoming female. Sex change is irreversible and has been shown to be under the influence of the sex ratio within the stack (Coe 1938; Wright 1988). Fertilization is internal and eggs are brooded in the females' pallial cavity. Several paternity analyses have demonstrated that most of the matings take place within a stack (Dupont *et al.* 2006; Gaffney & McGee 1992; Le Cam *et al.* 2009;

Proestou *et al.* 2008). *C. fornicata* is a benthopelagic species releasing pelagic larvae that will settle on the shells of adults after two to four weeks in the water column (Chipperfield 1951; Rigal *et al.* In prep). Following post-larvae settlement, a rapid increase of the male frequency in the population follows as a result of the changes of juveniles into males, an obligatory stage in this protandrous species –this change is occurring within ca. 30 to 60 days in laboratory (R. Lasbleiz, pers. com.). New males' arrival is thus directly linked to the reproductive effort of the adult population, the size of the larval pool and the settlement success. All three are strongly influenced by highly fluctuating environmental abiotic and biotic factors (e.g. temperature, hydrodynamics, predation etc., Ferdinando 1994). Gregariousness and perennial associations of individuals forming mating groups together with the benthopelagic life cycle of *C. fornicata* are ideal characteristics to analyze how sex change dynamics respond to variable population dynamics at local and population level. To evaluate the link between temporal patterns of sex change and population dynamics in the protandrous mollusc *C. fornicata*, a population survey was carried out over 40 months, i.e. more than 3 complete annual reproductive cycles. This study is the first to document temporal sex change patterns at both population and local (i.e. within stacks) scales in a marine protandrous species with environmental sex determinism. If the laboratory observations about sex change determinism in *C. fornicata* (i.e. joint influence of local sex-ratio and age; Coe 1938; Hoagland 1978) are true in the wild, we hypothesized that (1) sex ratio variation respond with a short delay to settlement events so that sexual structure of the population is stabilized and (2) most of the response at the population level depends on local adjustment at the level of mating groups (i.e. stacks).

MATERIALS AND METHODS

Data collection

Samples were collected every month in a subtidal (12 m depth) population of the slipper limpet, *Crepidula fornicata*, located in the Bay of Morlaix (48°40,18 N / 3°53,167), Brittany, France, between September 2004 and December 2007. This population is well-established since the 1960s (Blanchard 1995) and have been regularly monitored for ca. ten years by the Station Biologique of Roscoff. Stacks of *C. fornicata* were sampled along a 20-30 meter long transect by means of scuba diving to preserve the structure of each stack. In the laboratory, a minimum of 24 stacks (to reach a minimum number of ca. 200 individuals) per month was preserved separately and for every individuals of each stack, the following parameters were recorded. Firstly, the sexual stage was determined by the presence or absence of penis and genital papilla following the same criteria as in previous studies of the slipper limpet (Collin 1995; Dupont *et al.* 2006; Hoagland 1978; Richard *et al.* 2006). Briefly, males are animals with a penis and non genital papilla whereas the absence of penis and the presence of the genital papilla are female characteristics. Juveniles are small individuals presented neither of these organs. Larger individuals of typical adult size lacking these same features are individuals in sexual transition. Secondly, the presence of broods found in the paleal cavity of the mother was noted. Finally, the position within the study stack and the size, defined as the longer length between the apex and the front part of the shell, was measured to the nearest 0.1mm with calipers. We chose the linear length rather than the curvilinear length (Dupont *et al.* 2006; Hoagland 1978) because (i) it is a good approximation of the curvilinear length (e.g. a significant correlation was obtained on a subset of 5164 individuals, $R^2 = 0.90$; $P < 0.0001$), (ii) more appropriate for very large samples and (iii) used in studies by Collin (1995) and Richard *et al.* (2006), further compared with our dataset.

Statistical analyses

Sexual structure at stack and population levels

For each monthly sample and each stack, the relative proportion of each “individual status” (i.e. female, male, individuals in sexual transition and juveniles) and sex-ratio, defined as the ratio between the number of females divided by the number of females and males, were calculated to characterize the sexual structure at population and stack levels.

Sex change in *Crepidula fornicata* is expected to occur within stacks in response to the evolution of the stack composition. Stack sizes (the number of reproductive individuals, i.e;

males and females) ranged between 1 and 30 individuals and the mean number of individuals was calculated each month. To identify any shift in the general architecture of the mating groups and take into account this large variation in composition of stacks, we sorted the stacks into four categories based on the overall stack size distribution over the 40 months: each category represented approximately one-fourth (25%) of the overall distribution (e.g. the upper limits of the first category correspond to the lower quartile of the distribution). The relative proportion of each category as well as the mean and range of variation of the sex ratio in each category was computed every year. Differences in stack sex ratios between categories were tested using a Kruskal-Wallis test and post-hoc pairwise comparisons implemented in the *kruskalmc* function from *pgirmess* package in R (R Development Core Team 2007; <http://www.R-project.org>).

Theoretical framework predicted that sequential hermaphrodites should have a sex ratio biased towards the first sex (Charnov & Bull 1989). This was confirmed empirically in *Crepidula fornicata* with ca. 60% of males and 40% of females in populations showing a good annual recruitment (Hoagland 1978; Wilczynski 1955). At population level, for every month, we tested for departure from these expectations (sex-ratio equals to 0.4) and from a balanced sex ratio (0.5) using a binomial test. To take into account for multiple tests, we controlled for False Discovery Rate (FDR) using the method proposed by Benjamini & Yekutieli (2001) as implemented by the *p.adjust* function of the statistical package R and reported adjusted probability values. Linear regression analysis between the population sex ratio and time (months) was carried out to detect any temporal trend (using the *lm* function from the statistical package R). Seasonal trends were subsequently tested using an autocorrelation analysis based on detrended data over three complete annual cycles (i.e. from December 2004 to December 2007). Computations were made using the *acf* function of the statistical package R to run this analysis.

Size and sex relationships at stack and population levels

For each month, the size range of males and females was determined as the difference between the largest and the smallest individuals of each sex. The overlap between size distributions of both sexes was calculated monthly as the percentage of the female size range in which males were observed. To examine the size range within which sex change is susceptible to occur, the size of individuals in sexual transition observed over the whole survey was analysed using a size frequency distribution with a size class of 4 mm. The median size of males and females larger than the mean transition size (hereafter called MMT

and FMT respectively) were calculated and temporal trend tested using linear regression analyses. The time series of MMT and FMT median sizes were analyzed using a moving average method to smooth out short-term fluctuations and highlight longer-term trends. We used EWMA (Exponential Weighted Moving Average), a method using a weighted factor decreasing exponentially which gives less weight to data that are further in time. The statistic Y_t , the transformation of the observation x at time t (x_t), is calculated according to the following formula (Roberts 1959):

$$Y_t = \alpha \times x_t + (1 - \alpha)Y_{t-1} \text{ for } t=1,2,\dots,n$$

where α is a constant determining the depth of the memory of EWMA, here:

$$\alpha = \frac{2}{N + 1}$$

with N the number of samples.

Y_0 is the reference value, usually an average value of the dataset. The average value of the variable was calculated over the first entire reproductive cycle from September 2004 to September 2005 to be able to highlight the short term trends as well as any longer term changes.

The relative size at sex change (RS) is a classical parameter used to study sex change characteristics (Allsop & West 2003a; Charnov & Skuladottir 2000). Using a logistic regression (Sokal & Rohlf 1995) to fit on the size data of males and females, the size at which 50% of the individuals are females ($L50$) was estimated each month. The relative size at sex change is defined as $L50$ divided by $Lmax$, where $Lmax$ is the maximum size in a population. In most of the studies of sex changers, $Lmax$ is the size of the largest individual in the study sample, a value found to be a good approximation since sex change is mostly compared among species or populations (Allsop & West 2003a; Allsop & West 2003b; Collin 2006; Collin *et al.* 2005). In our study, two $Lmax$ values were considered for monthly calculations. Firstly, the maximum value of all the individual sizes recorded for each month. Secondly, for comparison with other studies and because the exact same population was surveyed over time, we carried out every analyses with $Lmax$ being the maximum size measured during the whole survey. Because the two calculations led to the same conclusions, only results with monthly $Lmax$ values are provided. The logistic regression was carried out with the *glm* function of the statistical package R and $L50$ values were obtained with the *dose.LD50* function in the MASS package R. With a temporal survey, RS is more than a point estimate: changes in RS are a proxy of the sex change dynamics. In a protandrous species, a decrease of RS is evidencing an active sex changing period with young (small) individuals (males) transforming into females

whereas an increase may be due to either an increase of the female sizes and/or an increased proportion of males (non sex changing period). The time series of RS data was analyzed using EWMA method as described above. The size at sex change (L_{50}) was also calculated for individuals within each stack size category.

Settlement analyses

The settlement dynamics within the population was followed over time using two variables, the proportion of juveniles and their median size. The combination of both indicators allowed determining the onset of the arrivals of new individuals in the population. These indicators were found to be in agreement with outputs from conventional cohort analyses carried out on the same samples as part of a population dynamics survey coupled with larval monitoring (S. Le Cam, F. Rigal, T. Comtet & F. Viard, unpublished data). Temporal and seasonal trends of settlement arrivals (i.e. proportion of juveniles) were tested using a cross correlation analysis (Legendre & Legendre 1998) on data from December 2004 to December 2007. Series of Pearson correlation coefficients are calculated between the two variables, each at different temporal lag (months). This procedure helps to characterize the direction and the temporal delay of the correlation between the two variables. It was carried out using the *ccf* function in the statistical package R. To picture a link between sex change dynamics and settlement patterns, the proportion of juveniles and population sex ratio was analyzed and compared using cumulative sums (Ibañez *et al.* 1993). The correlation between the two variables was tested with a cross correlation analysis using the *ccf* function in the statistical package R.

Table 1: Sampling and sexual structure of the population over 40 months in the study population of *C. fornicata*.

The number of stacks (N_{stacks}) and individuals (N_{ind}), the relative size at sex change (L_{50}/L_{max}), the overlap between male and female size range (see Material and Methods) and the population sex ratio (SR; defined as the proportion of females over the total number of males and females) are indicated for each month. Adjusted P value (P_{Adj} ; false discovery rate procedure) are presented for two multiple binomial tests: sex ratio departure from balanced sex ratio (0.5:0.5) and from reference value in *Crepidula fornicata* (0.4:0.6; see text). Significant values are in bold

Sampling date	N_{stacks}	N_{ind}	L_{50}/L_{max}	Size overlap (%)	SR	0.5: 0.5 P_{Adj}	0.4: 0.6 P_{Adj}
30/09/2004	50	314	0.72	99	0.42	0.011	0.144
21/10/2004	50	400	0.73	86	0.38	<0.001	0.168
19/11/2004	46	287	0.73	100	0.41	0.006	0.194
mid 12/2004	38	213	0.73	100	0.43	0.054	0.144
20/01/2005	44	316	0.74	99	0.41	0.002	0.196
22/02/2005	41	255	0.71	100	0.39	<0.001	0.208
22/03/2005	51	395	0.75	85	0.34	<0.001	0.020
20/04/2005	50	411	0.74	95	0.37	<0.001	0.107
19/05/2005	48	322	0.70	100	0.44	0.024	0.099
21/06/2005	55	385	0.73	92	0.40	<0.001	0.238
22/07/2005	55	382	0.76	94	0.39	<0.001	0.216
17/08/2005	30	305	0.77	97	0.37	<0.001	0.144
21/09/2005	38	314	0.77	88	0.34	<0.001	0.026
19/10/2005	42	303	0.76	99	0.43	0.017	0.129
16/11/2005	37	307	0.75	93	0.44	0.044	0.090
20/12/2005	34	312	0.68	66	0.38	<0.001	0.159
20/01/2006	38	308	0.72	81	0.44	0.030	0.099
22/02/2006	48	239	0.69	81	0.45	0.100	0.091
22/03/2006	45	300	0.74	92	0.42	0.008	0.159
18/04/2006	37	300	0.78	97	0.42	0.010	0.144
18/05/2006	38	277	0.73	89	0.47	0.239	0.024
20/06/2006	32	309	0.75	92	0.32	<0.001	0.008
19/07/2006	31	304	0.76	96	0.35	<0.001	0.040
17/08/2006	33	322	0.76	100	0.31	<0.001	0.006
19/09/2006	27	336	0.72	100	0.31	<0.001	0.005
18/10/2006	31	305	0.78	100	0.33	<0.001	0.014
17/11/2006	34	308	0.74	100	0.34	<0.001	0.026
20/12/2006	32	299	0.74	100	0.32	<0.001	0.008
17/01/2007	34	302	0.72	95	0.36	<0.001	0.132
21/02/2007	32	306	0.70	85	0.40	0.001	0.238
14/03/2007	30	300	0.72	97	0.33	<0.001	0.023
19/04/2007	33	302	0.75	92	0.37	<0.001	0.123
15/05/2007	32	301	0.75	78	0.33	<0.001	0.009
19/06/2007	26	308	0.78	100	0.30	<0.001	0.001
18/07/2007	24	438	0.80	94	0.25	<0.001	<0.001
22/08/2007	25	320	0.72	67	0.29	<0.001	<0.001
20/09/2007	25	426	0.76	81	0.18	<0.001	<0.001
17/10/2007	25	529	0.78	92	0.18	<0.001	<0.001
20/11/2007	25	530	0.74	96	0.23	<0.001	<0.001
20/12/2007	29	303	0.70	100	0.33	<0.001	0.013

RESULTS

Sexual structure at population level

Over the 40-months survey, from September 2004 to December 2007, 13193 individuals distributed into 1475 stacks were analyzed (Table 1). On average 330 ± 66 individuals were analyzed each month with a minimum value of 213 individuals (December 2004) and a maximum of 530 (November 2007).

The percentage of males and females, for each month is shown in Appendix 1 and the corresponding sex-ratio values are provided in Table 1. Regardless of the month or the year, the individuals in sexual transition were scarcely represented (absent in 5 out of 40 samples and a maximum value of 4.2% on December 2004). Males were always dominant with females being second (except for August 2007 with a higher relative proportion of juveniles; see below). The sex ratio (i.e. number of females as compared to number of males and females) was nevertheless variable over the whole survey, ranging from 0.18 on October 2007 to 0.47 on May 2006. It decreased significantly with time (linear regression, $y = -0.004x + 0.44$, $R^2 = 0.49$, $p < 0.001$): from May-June 2006 to September 2007, an increase of the proportion of males was observed.

The dominance of males in the population explained a departure from balanced sex ratio (i.e. value of 0.5) in 37 samples out of 40 as detected by a binomial test corrected by FRD (Table 1). The only exceptions were on December 2004, February 2006 and May 2006. When testing departure from the expected sex ratio in *Crepidula fornicata* (i.e. value of 0.4), two periods could be distinguished: (i) until May 2006, only two months (March and September 2005) showed significant departures with an excess of males whereas (ii) after May 2006, the reverse was observed with all but three samples (January, February and April) showing a significantly higher proportion of males than expected (Table 1). Once the temporal trend (i.e. decrease of the proportion of females after May 2006) removed, a significant seasonal trend was observed showing a negative autocorrelation with a lag of 7 month (see Appendix 2A), and the first maximal positive value (non significant) at a lag of 11 months, suggesting an annual cycle in the sex-ratio variation at the population level. These temporal changes of sex-ratio were also pictured by cumulative sum curve (grey bars in Figure 1).

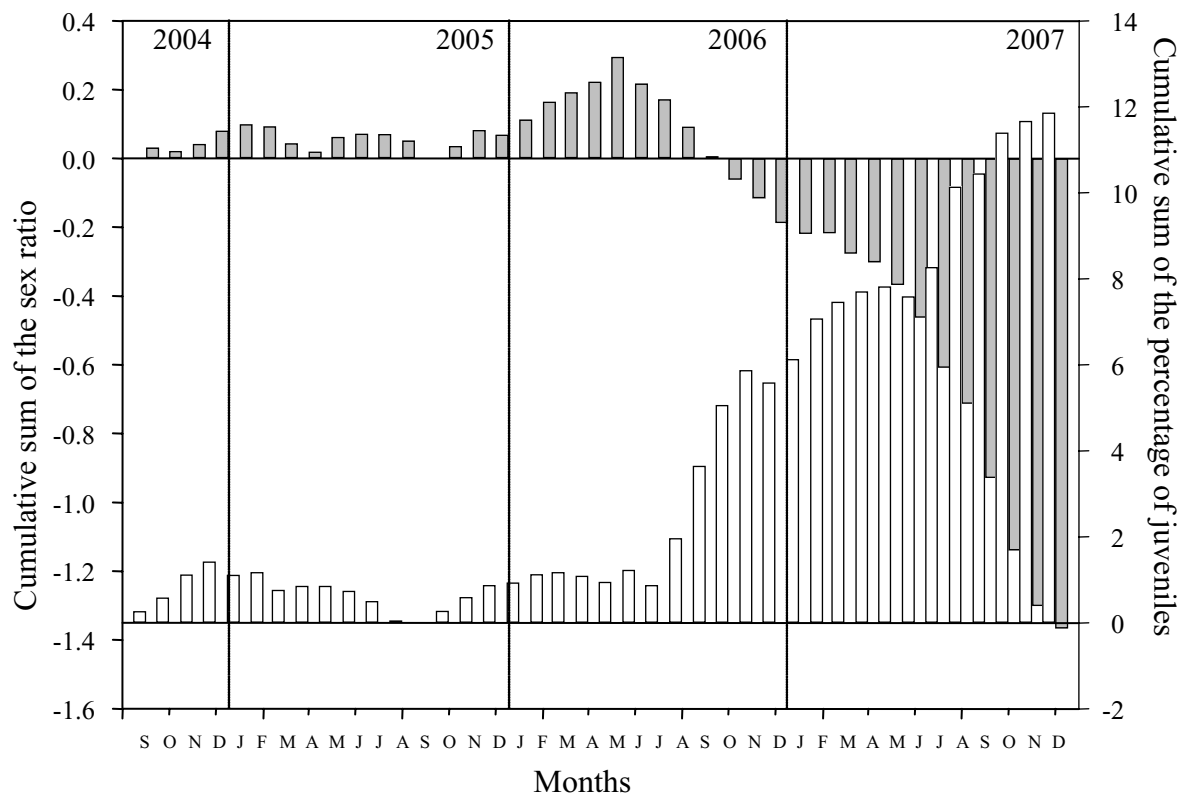


Fig 1: Compared cumulative sums calculated over 40 months for the population sex ratio (grey bars) and the percentage of juveniles (white bars)

Size overlap between sexes and relative size at sex change

The size range of the males was large (mean magnitude of 48.5 mm) as compared to the females (28.5 mm). On average, size range of the males equals 94.6% of the size range of the females and the largest individual observed in 11 samples was a male (table 1). These findings are indicative of an important flexibility of the size (age) at sex change in the study population.

The sizes of individuals in sexual transition varied over a wide range (from 15 et 57.5 mm) with an average size of 44 mm (see Appendix 3). Sixty percent of the transition individuals were larger than this average value, showing that most of the sex change might occur for males larger than 44 mm; the median size of males and females larger than this threshold value (named MMT and FMT respectively in the following text) varied during the survey ranging from 46.5 to 49.3mm and 47.5 to 49.9mm, respectively. A significant temporal decrease of the MMT size was shown with linear regression ($y = -0.02 x + 48.05$, $R^2 = 0.18$, $P = 0.005$). No seasonal trend was detected on raw data. Using data transformed with the EMWA approach, the MMT median size, pictured in Fig 2a, showed a constant overall decrease since February 2005 to August 2006 with a yearly minimum (on October 2004, July 2005 and June 2006) separated by periods of increase, suggesting an alternation between sex change and growth in MMTs. After August 2006, median size of MMT decreased almost every month, potentially due to sex changing processes overweighting growth of individuals. The median of FMTs did not present a significant temporal (linear regression $P = 0.968$) nor a seasonal trend. Data transformed by the EWMA method however revealed a constant overall increase of the median size of FMTs over the 40 month survey (Fig 2b)

The relative size at sex change (RS) varied between 0.68 on December 2005 and 0.80 on July 2007. No temporal trend was detected over the whole survey (linear regression between months and RS value, $p = 0.584$) while a seasonal trend was observed with an autocorrelation analysis showing a significant negative correlation at 5 months (Appendix 2A). Figure 3 pictures RS data transformed with an EMWA approach: each year a strong decrease of RS was observed (May-June 2005 and February-March 2006 and 2007). This analysis also showed that despite the apparent lack of temporal trend for RS, the range of variation tended to move toward larger values each year.

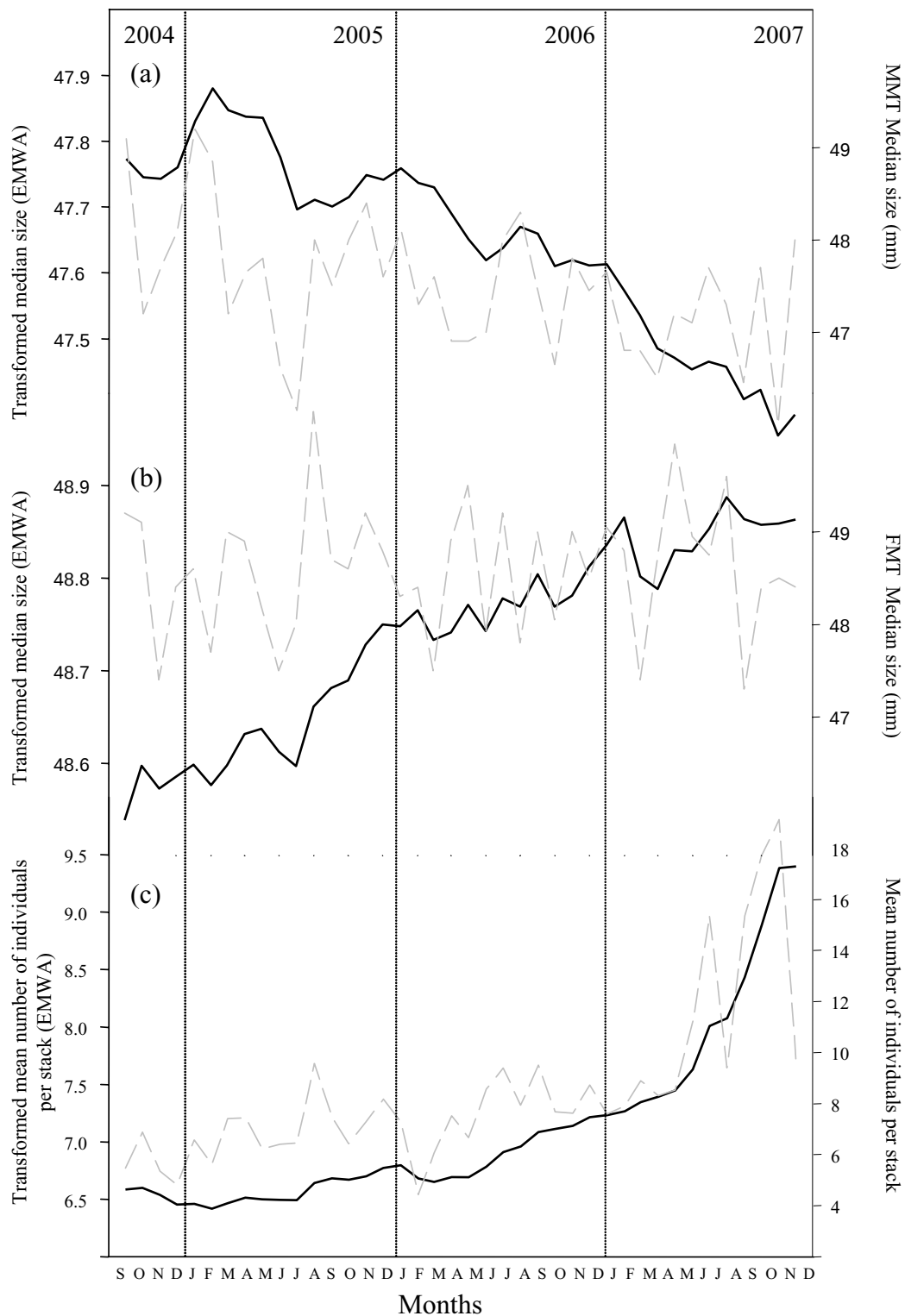


Fig 2: Evolution of median size of (a) MMT and (b) FMT, respectively males and females with a size superior to 44 mm (mean size of individuals in sexual transition) and (c) the mean number of individuals per stack using data transformed with the EMWA method (black line).

Raw values are indicated by the grey dashed line.

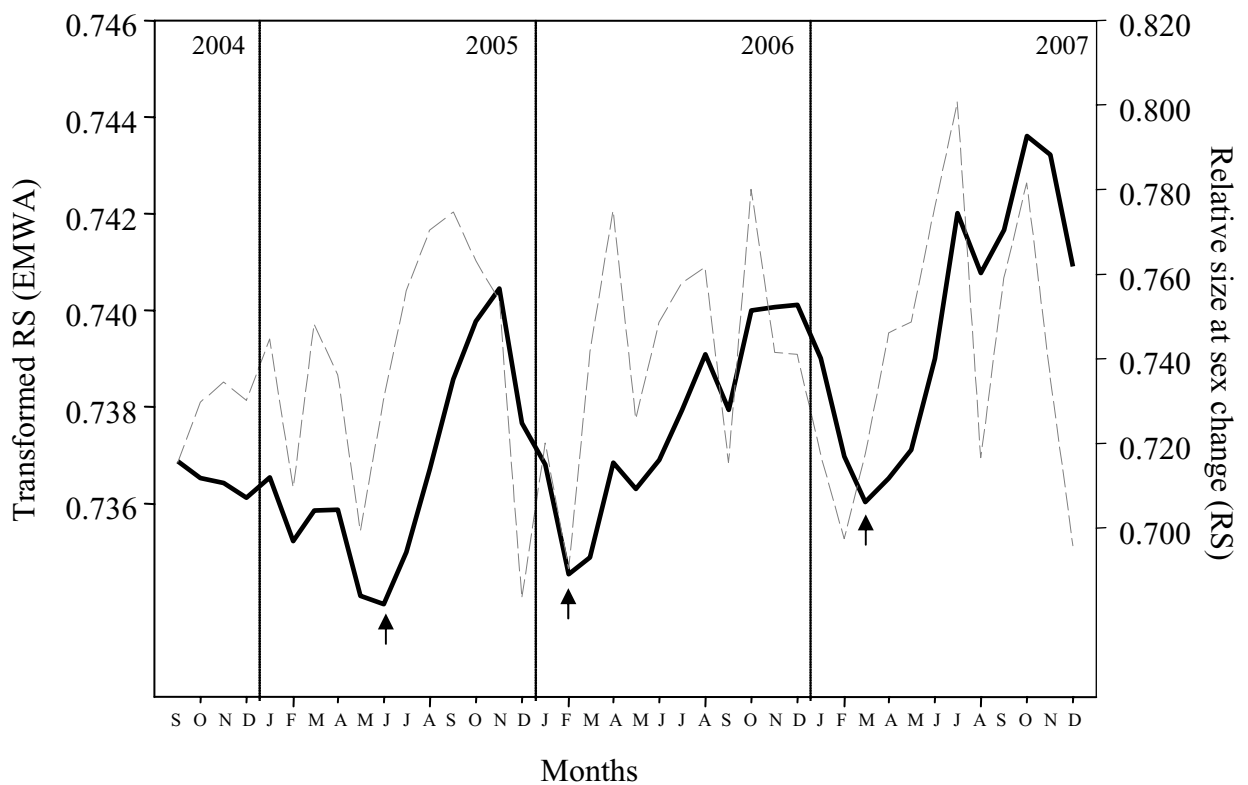


Fig 3: Evolution of relative size at sex change (L_{50}/L_{max}) using data transformed with the EMWA method.

Arrows indicate a yearly minimum which followed a sharp decrease.

Raw values are indicated by the grey dashed line.

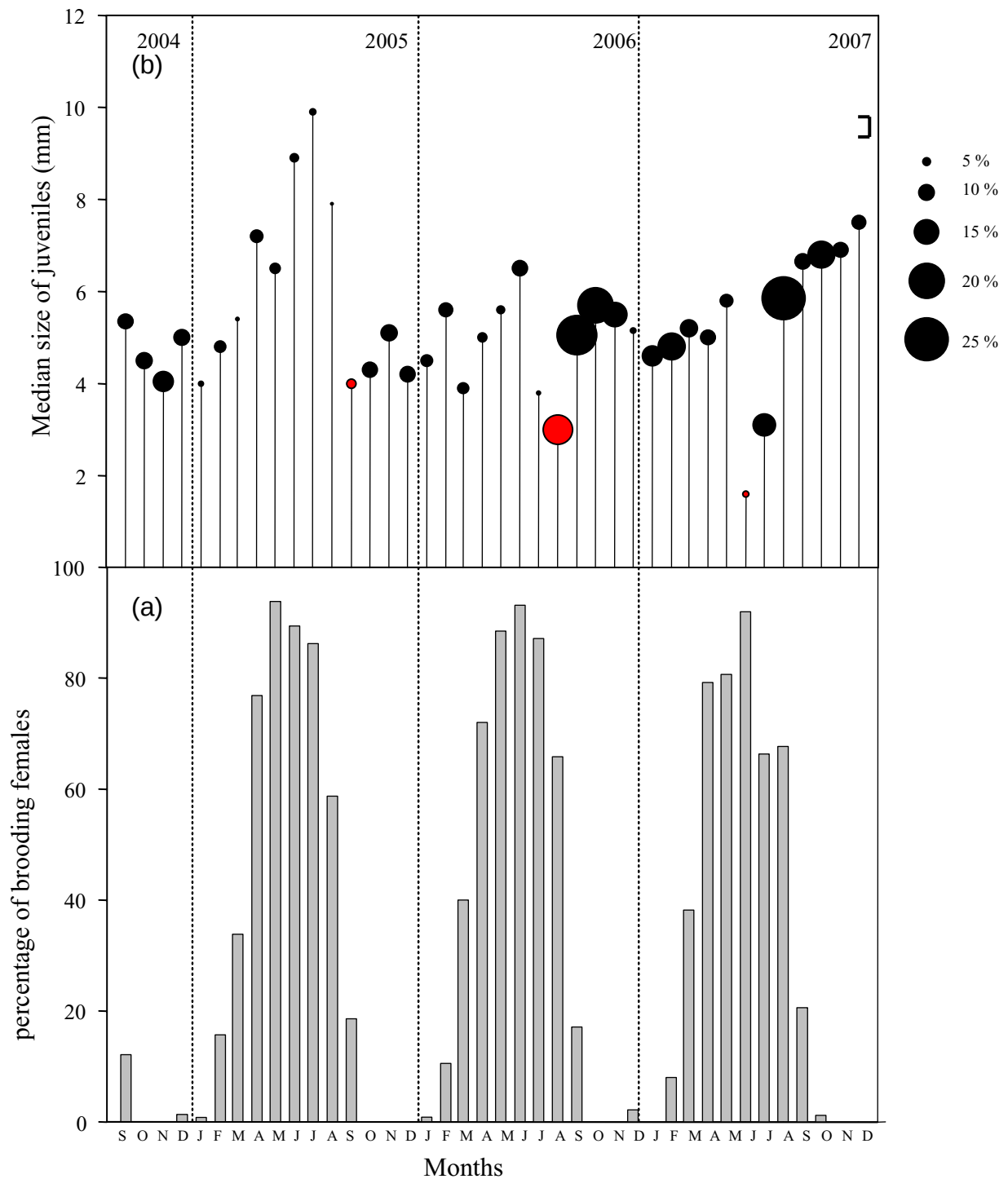


Fig 4: Reproductive and settlement patterns over time in the study population (a) percentage of brooding females and (b) median size of the juveniles together with their proportion in the population (i.e. bubble size; with annual minimum value in red) are pictured.

Reproduction and Settlement patterns

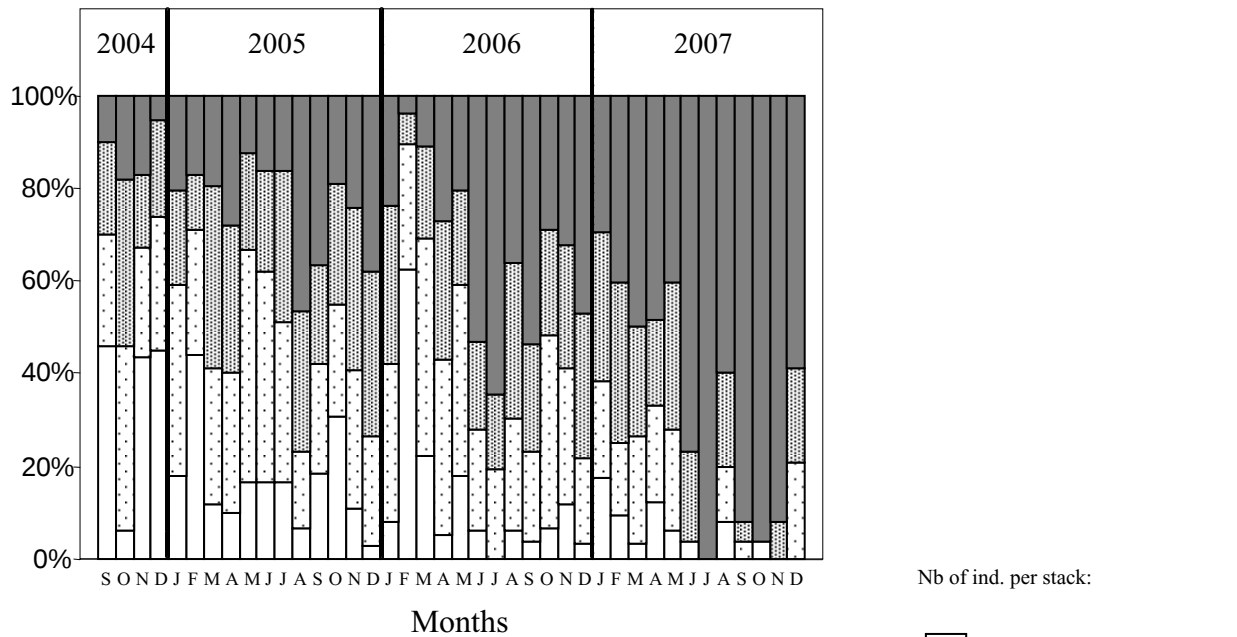
As presented in Figure 4a, the percentage of brooding females followed a regular annual trend along the survey, with females with eggs present between ca. January and September each year with a peak on May 2005 and June 2006 and 2007.

The median size and the proportion of juveniles are presented in Fig 4b. Juveniles were present in all samples but a sharp decrease of the median value observed each year pointed out a yearly settlement event in September 2005 (median size equal to 4.05 mm), one month earlier in 2006 (August 2006, 4.1 mm) and 2 months earlier in 2007 (June 2007, 1.6 mm). The juvenile proportion varied over time. In particular, very high proportions were observed on September 2006 and August 2007 (23.7% and 25.6%, respectively). Altogether, two periods can be pointed out (Figure 4b): one ranging from September 2004 to July 2006 characterized by moderate changes in the proportion of juveniles (varying from 2.3% on August 2005 to 12.2% on November 2004) and one spanning from August 2006 to December 2007 with much higher variations (from 4.5% on December 2006 to 25.6% on August 2007). A significant temporal increase of the proportion of juveniles was detected over the whole survey (Linear regression, $y = 0.18x + 6.17$, $R^2 = 0.16$, $p = 0.014$) and autocorrelation analysis showed a positive correlation with a lag of 11 months confirming the one month gap in between juvenile arrival each year (Appendix 2A).

Sex ratio within mating groups

Twenty-four to 55 stacks were considered each month with on average 37 ± 9 stacks per month. The number of individuals per stack was highly variable. For instance on February 2006, 48 stacks were composed of 239 individuals whereas on October 2007, 25 stacks were made of 529 individuals. To characterize mating groups, only reproductive adults were considered and over the survey, the mean number of individuals per stack was 7.9. The mean number of individuals per stack varied monthly ranging from 4.44 on February 2006 to 19.18 on November 2007, exhibiting a significant temporal increase (linear regression, $y = 0.19x + 4.45$, $R^2 = 0.51$, $P < 0.001$). The stack sex-ratio was found to be negatively exponentially correlated with the number of reproductive individuals in the stacks (Exponential regression $y = 0.6 \exp^{-0.06x}$, $p < 0.0001$). Four stack size categories were defined: Category 1: stack with 1 to 4 individuals (16% of the total stack number), category 2: from 5 to 6 individuals (27%), category 3: from 7 to 8 individuals (24%) and category 4: 9 to 30 individuals (33%). On average, monthly relative proportion of each stack category showed that stacks from category 1 were the least abundant (14%), stacks from category 2 and 3 representing 25 and 23 % and

(a)



(b)

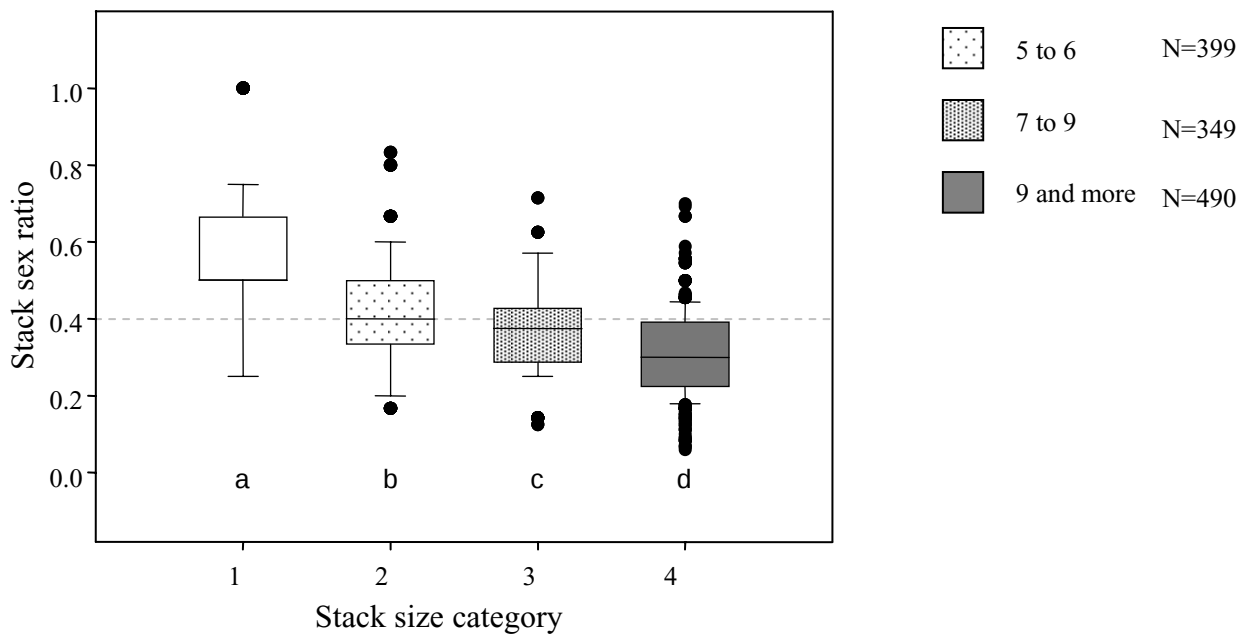


Fig 5: Stack composition (a) and sex ratio per stack (b) in the study population
Stacks were sorted in four categories (total number N) as indicated by the legend on the right side of the figures.

a- Monthly variation of the proportion of each stack categories over 40 months
b- Sex ratio according to stack categories.

Box plot indicating for each category the mean, quartile and outliers of the sex-ratio for each category. Different letters indicate significant difference after *a posteriori* statistical test.

category 4 being the most frequent (38%). These proportions nevertheless varied greatly through out the survey, in particular, category 1 which represented 22% of the stack in the population until May 2006 underwent a sharp decrease to represent on average 5% of the stacks after that date, and a concomitant increase of the proportion of stacks from category 4 was observed, evolving from 21% until May 2006 to 58% on the end of the survey (Figure 5a; Appendix 4). Interestingly, stack sex ratio distributions were significantly different among stack categories (Kruskal-Wallis test, $H= 339.05$, $df = 3$, $P < 0.001$; Figure 5b) and for each *post hoc* pairwise comparisons. Over the 40 months, we thus observed an increasing number of large stacks characterized by lower sex ratios. In addition, different values for size at sex change (L_{50}) were observed in each stack category: 39.44 mm in category 1, 42.07 mm in category 2, 43.3 2mm in category 3 and 43.54 mm in category 4.

DISCUSSION

The population survey carried out in this study showed considerable variation of sexual structure at both population and mating groups level across several reproductive cycles of the protandrous species *Crepidula fornicata*. This pattern appeared to be linked to demographic features highlighting the importance to take population dynamics into account when studying sex changing strategies in sessile species.

Reproductive and settlement patterns displayed a regular seasonal cycle, with brooding females being observed each year over a long period, i.e. more than 8 consecutive months (see Fig 4a, ca. from December/January to September/October). Every year, a large majority of females was incubating eggs during three months (May, June, July in 2005 and 2006 then April, May and June in 2007). This regular pattern is consistent with other observations of brooding periods registered along French coasts (Deslous-Paoli 1985; Lubet & Le Gall 1972; Richard *et al.* 2006). Timing in the arrival of newly settled juveniles was also regular, as shown by the yearly decrease of the juvenile median size, reaching a minimum value in September 2005 and with a month lag in the two following years (August 2006 and July 2007, Fig 4b). Seasonal patterns of reproduction and settlement are commonly observed in marine invertebrates as these processes are often triggered by environmental parameters such as temperature or food availability varying according to a seasonal cycle in temperate regions (Giese & Pearse 1974). Conversely to the regular pattern in the timing of settlement, we observed irregular patterns in terms of intensity of the arrival of juveniles: settlement events observed at the end of the summer 2006 and 2007 were particularly important (with juveniles representing up to 25% of all the sampled individuals), as compared to 2004, 2005 (Fig 4b) and previous monitoring in the same population (Dupont 2004, F. Viard, unpublished data). Both a temporal increase and a seasonal pattern with a period of 11 months were observed for the proportion of juveniles. In bento-pelagic species, recruitment is influenced by complex processes including abiotic and biotic factors both during larval phase and settlement, leading to high variations in the intensity of arrivals of juveniles from year to another (reviewed in Pineda 2000). As *Crepidula fornicata* is a protandrous species, variations in settlement patterns are tantamount to variations in the potential entry of males (with a delay) and, this may strongly modify the sexual composition of the populations. Sex change in the slipper limpet has since long been shown to be environmentally determined,

depending in particular of the stack sex ratio (Coe 1938) and we here analyzed how this process can interplay with demographic dynamics within a natural population.

Numerous studies have demonstrated the important flexibility of sex-ratio and size at sex change in sequential hermaphrodites (Munday *et al.* 2006). This has been exemplified in protandrous species of the Calyptraeidae family: by analyzing 27 populations from 19 species, Collin (2006) reported extreme variations in the number of females compared to the total number of males and females, ranging from 0.09 to 0.95. Here, we focused on a single population and observed important variations of the sex-ratio over time (Table 1). Although the sex ratio was significantly biased towards males in 37 out of 40 months of the survey, as predicted by theory (Charnov & Bull 1989), the proportion of females in the study population fluctuated with values ranging from 0.18 to 0.46. The two populations of *Crepidula fornicata* analyzed by Collin (2006) showed a sex-ratio of 0.41 and 0.30 which falls into the range of the values observed during our temporal survey. Yet, when analyzing the evolution of the sex ratio over all three reproductive seasons, two pictures could be distinguished: one from September 2004 to May 2006, where sex ratio was in agreement with values expected in *C. fornicata* (i.e. 0.4) and the second after May 2006 where population was largely biased towards males, resulting in a significant decrease of the sex ratio over the 40 months of the survey. This pattern was observed simultaneously to a major increase in the percentage of juveniles in the population with only a slight delay (1-2 months, Figure 1). Sex-ratio and percentage of juveniles both showed a temporal trend, suggesting that the extreme sex ratio values observed were mainly due to the unusual recruitment observed in 2006 and 2007.

Despite the profound changes in the composition of the population, variations in sex ratio did respond to the seasonal trends of demographic parameters. From September 2004 to July 2006, the onset of juveniles was followed several months later by an increase of the proportion of females, as exemplified by the cumulative sum curves in Figure 2. Using detrended values of these two variables, cross correlation analyses showed a positive significant correlation between them with a time lag of 6 months indicating that maximum values of population sex ratio occurred 6 months after maximum values of juvenile proportions. By analysing female reproduction of the slipper limpet in a population in the Bay of Brest (Brittany, France) over four years, Richard *et al.* (2006) also registered seasonal changes in the sexual composition of a population with a maximum female frequency occurring between July and October. In our case, a yearly increase in the proportion of females was only observed in 2005 (40.4% of females in May), followed by a sex-ratio adjustment via efficient sex change until May 2006. Environmental sex determination thus

appeared triggered by demographic features at population level. Nevertheless, after two successive annual major settlement events, the population sex ratio was in constant decay, with no apparent re-balancing.

Analyzing the relative size at sex change enabled us to follow the sex change patterns across the whole survey. The relative size of an individual in a social group has been shown to influence the timing of sex change in harem protogynous fishes (Buston 2003; Warner & Swearer 1991) but also in the genus *Crepidula* (Collin *et al.* 2005; Warner *et al.* 1996). At population level, the range of variation of the relative size at sex change (from 0.68 to 0.80) was moderate as compared to sex ratio variation. This range of variation is consistent with relative sizes at sex change observed by Richard (2005) among 13 European populations of *C. fornicata* distributed from Germany to the Atlantic coast of France (between 0.63 in Oosterschelde, Holland and 0.83 in the Bay of Brest, France) or by Dupont (2004) among seasonal samplings in two populations from the Bay of Mont-St-Michel (English Channel, France; 0.65 to 0.75) but are much less variable than the values (0.67 and 0.45) reported in the two populations studied in the native range of the species by Collin (2006). Although moderate, temporal analysis of the relative size at sex change (RS) using EMWA showed that the variations observed in the study population followed a seasonal trend with a yearly decrease in May-June 2005 and February-March in 2006 and 2007. Monthly maximum sizes ($L_{\max}$) showed neither temporal nor seasonal trends so that variations observed for the relative size at sex change were mostly due to changes in the size at sex change (L_{50}). Regular decrease of L_{50} values could account for periodic episodes of active sex change in the population. As pictured in Fig 4b, each year, juveniles' median size increased from the beginning of the year until a sharp decrease, showing that before the annual settlement peak, juveniles that had settled since the last reproductive season grew and turned into males. The decrease in the relative size at sex change is concomitant to the growth and maturation of new males in the population, even if slightly delayed in 2005, compared to 2006 and 2007, once again evidencing the influence of seasonal demographic patterns. Combined to the seasonal patterns, EWMA transformed RS showed an increase in the variation range limits. Size at sex change increased because of either a higher relative proportion of males or a greater proportion of large females.

The large flexibility of sex-change in *Crepidula fornicata* is clearly demonstrated by the large size overlap between males and females. This observation has been made repeatedly in different populations of this species (e.g. males were observed over the entire female size range in two populations of Brittany (France) studied by Dupont *et al.* (2007a)). In order to

determine the size interval corresponding to individuals with the highest probability to undergo sex reversal, we have considered the size of individuals in sexual transition. Interestingly, individuals in sexual transitions appeared to be very rare in this survey (mean $1.6 \pm 1.2\%$) suggesting that sex change is occurring very rapidly in the wild (less than one month, the lag time between two sampling dates). This duration is well below the value of 61 days reported by Coe (1938) from laboratory experiments. Richard *et al.* (2006) found higher proportions of individuals in transitions along the 4 years survey, $10 \pm 6\%$, but still highlighted the fleetingness of the process in the wild as compared to laboratory observations. As pictured in Fig 2, combined decrease of the median size of males with sizes above the mean size of transition individuals (MMT) and increase of the median size of females with size above this threshold (FMT) suggested an intensifying sex change of large individuals in response to massive settlement event that have been observed in 2006 and 2007.

Sex change determinism has been demonstrated to be influenced by the local social environment in many sex changing animals (Munday *et al.* 2006). In the slipper limpet *Crepidula fornicata*, stack sex ratio was described as the most important factor as shown by laboratory experiments (Coe 1938; Collin 2006; Hoagland 1978). Our survey pointed out that stack sex ratio is also a major factor in the wild. In particular, we observed that changes of the population sex ratio and median size of MMT were simultaneous to an increase in the mean number of individuals per stack (Fig 4) with two consecutive massive arrivals of new individuals in the population which strongly modified the composition of the stacks. Indeed, between 2004 and May 2006, the population displayed a shift between a state where stacks are composed mainly with 2 to 6 individuals (mean of 22 and 32 % for category 1 and 2 between September 2004 and May 2006) to a state where on average more than half of the stacks contained every month more than 9 individuals (57%). Stack sex ratio was significantly negatively correlated to the number of limpets in the stacks, and the range of variation of stack sex ratio was the smallest for the largest stacks (Fig 5). In addition, the size at sex change was shown to increase with the number of individuals per stack, ranging from 39.44 mm in small stack (category 1) to 43.54 mm in large stack (category 2). This results are consistent with outcomes of several experimental studies that have demonstrated that size at sex change is affected by the associations with conspecifics in *Crepidula fornicata* (Coe 1938, 1953; Collin 1995): males associated to females change sex at larger sizes than those placed with others males or isolated.

In this study, we have evidenced the importance of demographic processes in shaping the sexual structure of the population of a gregarious protandrous species and the subsequent

sex change processes. Such links between sex change and population dynamics have been previously demonstrated only in a few sex changing species (Charnov & Anderson 1989, Baldwin & Bauer 2003, Bergstrom 1997). For instance, Baldwin & Bauer (2003) showed that large males of the protandric simultaneous hermaphroditic shrimp *Lysmata wurdemanni* could delayed sex change until the next reproductive season. Yet, sex change determinism was not influenced by the sexual composition of the population, and seasonal abiotic factors as well as female breeding season were the most determinant parameters. In a species like the slipper limpet where stacks represent well defined mating groups, sex change dynamics was shown to follow the seasonal rhythms of settlement dynamics but also to be greatly influenced by intense recruitment events registered along this survey. In the absence of massive arrival of new individuals, sex reversal processes balanced the yearly entry of males. However, despite previous mechanisms still operating and an increased rate of sex change among large males, the massive arrival of new individuals lead to a modification in the composition of the mating groups echoing on the whole population dynamics.

Further observations of that population would be interesting to carry out to follow the evolution of the population from that state and observe how long (if ever) would it take for the sexual structure to revert to its initial composition. Given the wide range of variation in the sexual structure registered both at the population and the mating group level during several reproductive cycles, this study emphasizes the need of population wide surveys to explain the diversity of sex changing strategies noticed among groups of sequential hermaphrodites.

Acknowledgments: We are grateful to the past and present scuba-divers of the Service Mer et Observation (FR2424) at the Station Biologique de Roscoff, for carrying out all the sampling used in this study and for collecting slipper limpets for a long time. We thank Myriam Mylbergue for help in gathering part of this dataset and François Rigal, Thierry Comtet, for stimulating discussions about these results. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the University Pierre & Marie Curie. This work is part of the PhD of S. L. C who benefited from a grant by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

REFERENCES

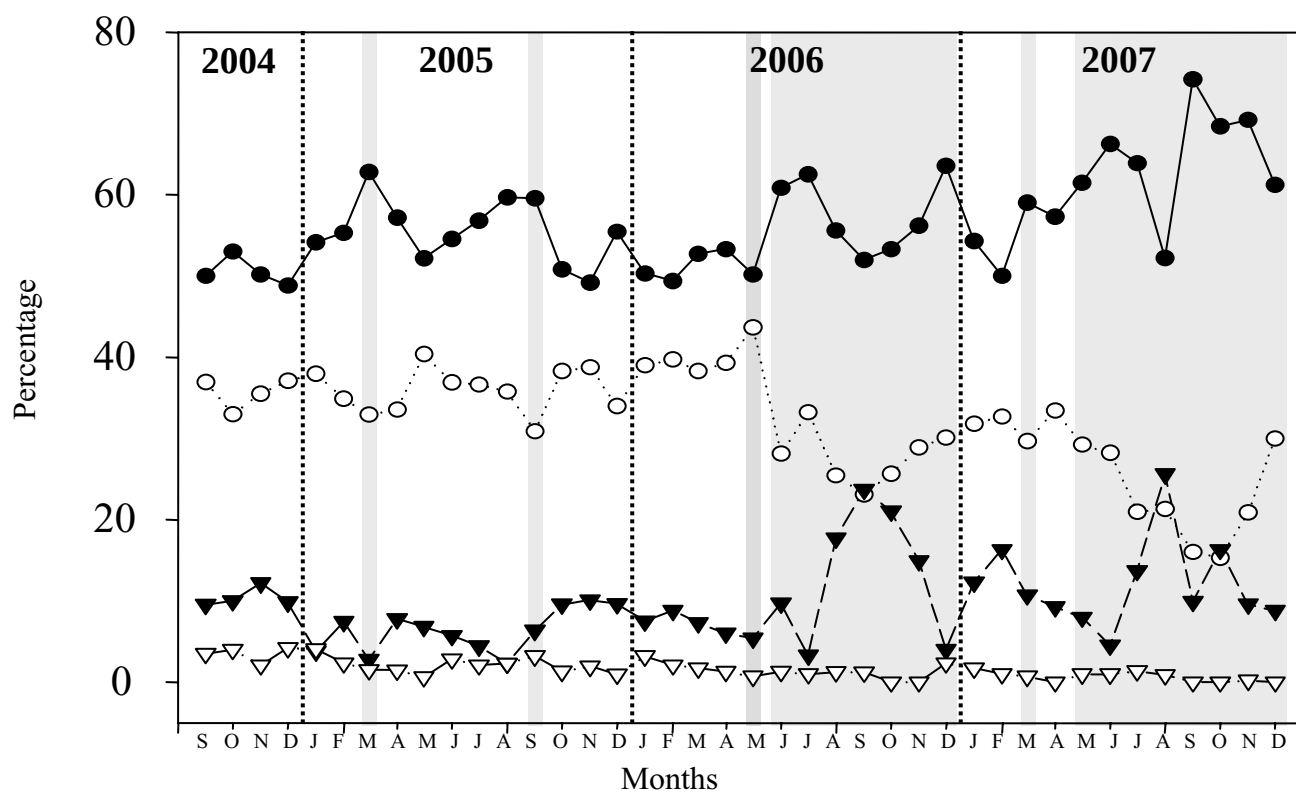
- Allsop DJ, West SA, 2003a. Changing sex at the same relative body size. *Nature*. 425:783-784.
- Allsop DJ, West SA, 2003b. Constant relative age and size at sex change for sequentially hermaphroditic fish. *J Evol Biol*. 16:921-929.
- Baldwin AP, Bauer RT, 2003. Growth, survivorship, lifespan, and sex change in the hermaphroditic shrimp *Lysemata wurdemanni* (Decapoda: Caridea: Hippolytidae). *Mar Biol*. 143:157-166.
- Benjamini Y, Yekutieli D, 2001. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann Stat* 1165–1188.
- Blanchard M, 1995. Origin and present state of the slipper limpet (*Crepidula fornicata*) population, (Gastropoda Prosobranchia) on French coasts. *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.
- Buston PM, 2003. Size and growth modification in the clownfish. *Nature*. 424:145-146.
- Buston PM, Munday PL, Warner RR, 2004. Sex change and relative body size in animals. *Nature*. 428:1.
- Charnov EL, 1982. The theory of sex allocation. Vol. 18:Princeton.
- Charnov EL, 1993. Life history invariants: some explorations of symmetry in evolutionary ecology Oxford: Oxford University Press.
- Charnov EL, Bull JJ, 1989. Non-fisherian sex-ratios with sex change and environmental sex determination. *Nature*. 338:148-150.
- Charnov EL, Skuladottir U, 2000. Dimensionless invariants for the optimal size (age) of sex change. *Evol Ecol Res*. 2:1067-1071.
- Chen MH, Soong K, Tsai ML, 2004. Host effect on size structure and timing of sex change in the coral-inhabiting snail *Coralliophila violacea*. *Mar Biol*. 144:287-593.
- Chipperfield PNJ, 1951. The breeding of *Crepidula fornicata* in the River Blackwater, Essex. *J Mar Biol Assoc UK*. 30:49-71.
- Cipriani R, Collin R, 2005. Life-history invariants with bounded variables cannot be distinguish from data generated by random processes using standard analyses. *J Evol Biol*. 18:1613-1618.
- Coe WR, 1938. Conditions influencing change of sex in mollusks of the genus *Crepidula*. *J Exp Zool*. 77:401-424.
- Coe WR, 1953. Influence of association, isolation, and nutrition on the sexuality of snails of the genus *Crepidula*. *J Exp Zool*. 122:5-19.
- 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.
- Collin R, 2006. Sex ratio, life-history invariants, and patterns of sex change in a family of protandrous gastropods. *Evolution*. 60:735-745.
- Collin R, McLellan M, Gruber K, Bailey-Jourdain C, 2005. Effects of conspecific associations on size at sex change in three species of calyptraeid gastropods. *Mar Ecol Prog Ser*. 293:89-97.
- DeMartini EE, Friedlander AM, Holzwarth RS, 2005. Size at sex change in protogynous labroids, prey body size distributions, and apex predator densities at NW Hawaiian atolls. *Mar Ecol Prog Ser*. 297:259-271.
- Deslous-Paoli J-M, 1985. *Crepidula fornicata* L. (gastéropode) dans le bassin de Marennes-Oléron : structure, dynamique et production d'une population. *Oceanol Acta*. 8:453-460.
- Dupont L, 2004. Invasion des côtes françaises par le mollusque exotique *Crepidula fornicata* : contribution de la dispersion larvaire et du système de reproduction au succès de la colonisation Paris: Université Pierre et Marie Curie. 123p.
- Dupont L, Bernas D, Viard F, 2007a. Sex and genetic structure across age groups in populations of the European marine invasive mollusc, *Crepidula fornicata* L. (Gastropoda). *Biol J Linn Soc*. 90:365-374.
- Dupont L, Ellien C, Viard F, 2007b. Limits to gene flow in the slipper limpet *Crepidula fornicata* as revealed by microsatellite data and a larval dispersal model. *Mar Ecol Prog Ser*. 349:125-128.

- Dupont L, Richard J, Paulet YM, 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.
- Ferdinando B, 1994. Fluctuations and Variations in Coastal Marine Environments. *Mar Ecol*. 15:3-25.
- Gaffney PM, McGee B, 1992. Multiple paternity in *Crepidula fornicata* (Linnaeus). *Veliger*. 35:12-15.
- Ghiselin MT, 1969. The evolution of hermaphroditism among animals. *The Q Rev Biol*. 44.
- Giese AC, Pearse JS, 1974. Reproduction of marine invertebrates. New York: Academic Press.
- Hoagland KE, 1978. Protandry and the evolution of environmentally-mediated sex change: a study of the Mollusca. *Malacologia*. 17:365-391.
- Ibañez F, Fromentin J-M, Castel J, 1993. Application de la méthode des sommes cumulées à l'analyse des séries chronologiques en océanographie. *CR Acad Sci III-Vie*. 316:745-748.
- Le Cam S, Pechenik JA, Cagnon M, Viard F, 2009. Fast vs. slow larval growth in an invasive marine mollusc: does paternity matter? *J Hered*. available on line
- Legendre P, Legendre L, 1998. Numerical ecology. Amsterdam: Elsevier Science BV.
- Leigh EG, Charnov EL, Warner RR, 1976. Sex ratio, sex change and natural selection. *P Natl Acad Sci USA*. 73:3656-3660.
- Lubet P, Le Gall P, 1972. Recherches préliminaires sur la structure des populations de *Crepidula fornicata* Philb., mollusque mésogastéropode. *B Soc Zool Fr*. 97:211-222.
- Molloy PP, Goodwin NB, Côté IM, Reynolds JD, Gage MJG, 2007. Sperm competition and sex change: a comparative analysis across fishes. *Evolution*. 61:640-652.
- Munday PL, Buston PM, Warner RR, 2006. Diversity and flexibility of sex-change strategies in animals. *Trends Ecol Evol*. 21:89-95.
- Nee S, Colegrave N, West SA, Grafen A, 2005. The Illusion of Invariant Quantities in Life Histories. *Science*. 309:1236-1239.
- Orton JH, 1909. On the occurrence of protandric hermaphroditism in the mollusc *Crepidula fornicata*. *P Roy Soc Lond B Bio*. 81:468-484.
- Pineda J, 2000. Linking larval settlement to larval transport: assumptions, potentials, and pitfalls. *Oceanogr East Pac*. 1:84-105.
- Policansky D, 1982. Sex change in plants and animals. *Annu Rev Ecol Syst*. 13:471-495.
- Proestou DA, Goldsmith MR, 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.
- Richard J, 2005. *Crepidula fornicata* : un modèle biologique pour l'étude du rôle de la variabilité des caractères phénotypique (reproduction, croissance et nutrition) sur les processus de colonisation en milieu marin Genève: Université de Bretagne Occidentale, Université de Genève. 296p.
- Richard J, Huet M, Thouzeau G, Paulet YM, 2006. Reproduction of the invasive slipper limpet, *Crepidula fornicata*, in the bay of Brest, France. *Mar Biol*. 149:789-801.
- Rigal F, Comtet T, Viard F, In prep. Invasion in a changing world: can increase in temperature promote connectivity in a marine invader?
- Roberts SW, 1959. Control chart tests based on geometric moving averages. *Technometrics*. 1:239-250.
- Sewell MA, 1994. Small size, brooding, and protandry in the Apopid sea cucumber *Leptosynapta clarki*. *Biol Bull*. 187:112-123.
- Sokal RR, Rohlf FJ, 1995. Biometry. New York: W.H. Freeman and Company.
- Soong K, Chen J-L, 1991. Population structure and sex change in the coral-inhabiting snail *Corapllliophila violacea* at Hsiao-Liuchu, Taiwan. *Mar Biol*. 111:81-86.
- Warner RR, Fitch DL, Standish JD, 1996. Social control of sex change in the shelf limpet, *Crepidula norrisiarum*: size-specific responses to local group composition. *J Exp Mar Biol Ecol*. 204:155-167.
- Warner RR, Robertson DR, Leigh EG, 1975. Sex change and sexual selection. *Science*. 190:633-638.
- Warner RR, Swearer SE, 1991. Social control of cex change in the blue wrasse, *Thalassoma bifasciatum* (Pisces: Labridae). *Biol Bull*. 181:199-204.

- Wilczynski J, 1955. On sex behaviour and sex determination in *Crepidula fornicata*. Biol Bull. 109:353-354.
- Wright WG, 1988. Sex change in the Mollusca. Trends Ecol Evol. 3:137-140.
- Wright WG, 1989. Intraspecific density mediates sex-change in the territorial patellacean limpet *Lottia gigantea*. Mar Biol. 100:353-364.

Appendix 1. Evolution over time (40 months) of the relative proportion of developmental and sexual stages in the study population of *C. fornicata*

Percentage of females (white circle), individuals in sexual transition (white triangle), males (black circle) and juveniles (black triangle) is indicated with lines and shaded areas correspond to months where the sex ratio (females as compares to males and females) departs significantly from the value of 0.4 expected for *C. fornicata* (Binomial tests, False discovery rate correction for multiple tests; details in Table 1).



Appendix 2. Outcome of the temporal correlation analyses on parameters describing settlement and sexual structure in the study population over the 40 months of the survey

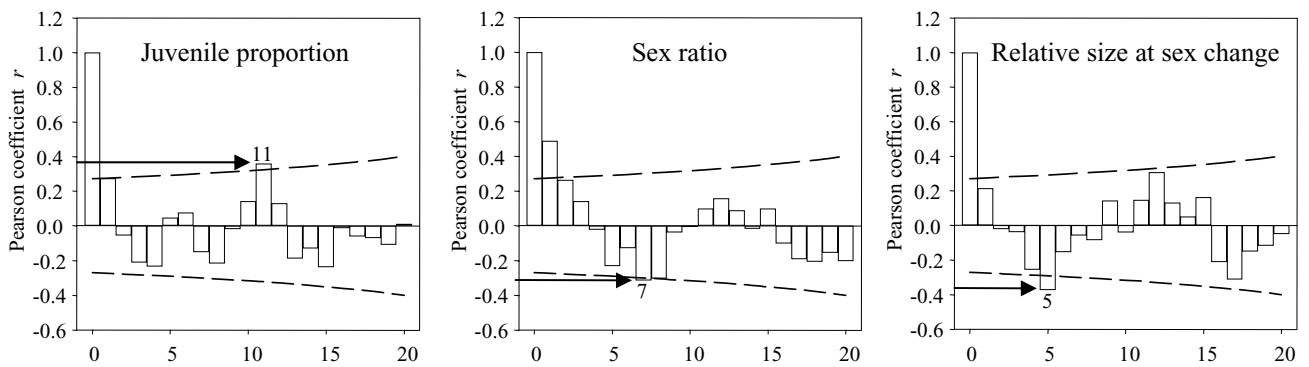
A- Autocorrelation analyses for proportion of juveniles, sex-ratio and L50/Lmax

B- Cross-correlation between juvenile proportions and sex-ratio

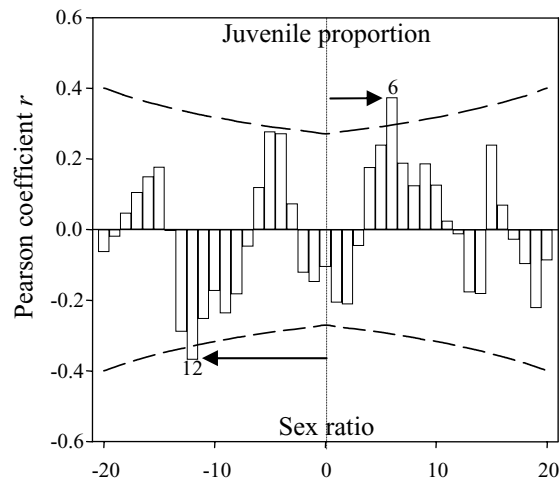
Dashed curves indicate the significance limits for the Pearson correlation coefficients obtained

Arrows indicate the first significant lag

A

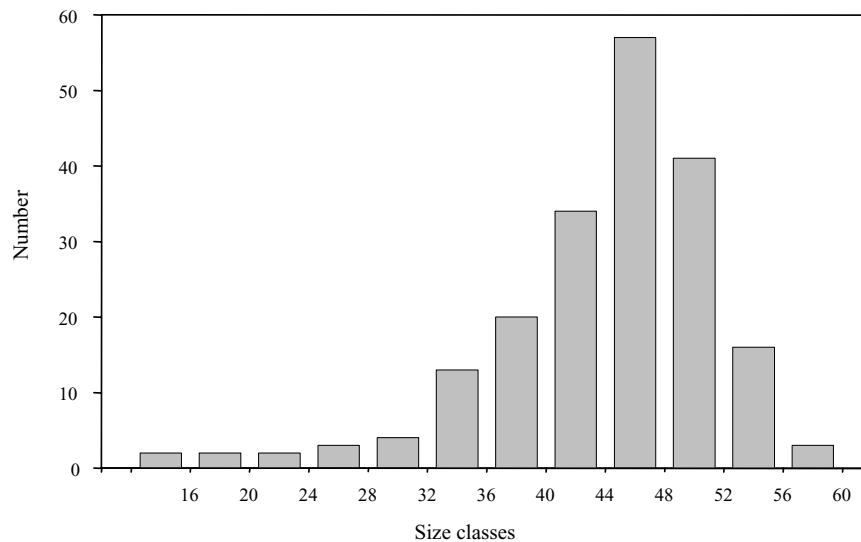


B



Appendix 3. Histogram of the size distribution of individuals in sexual transition

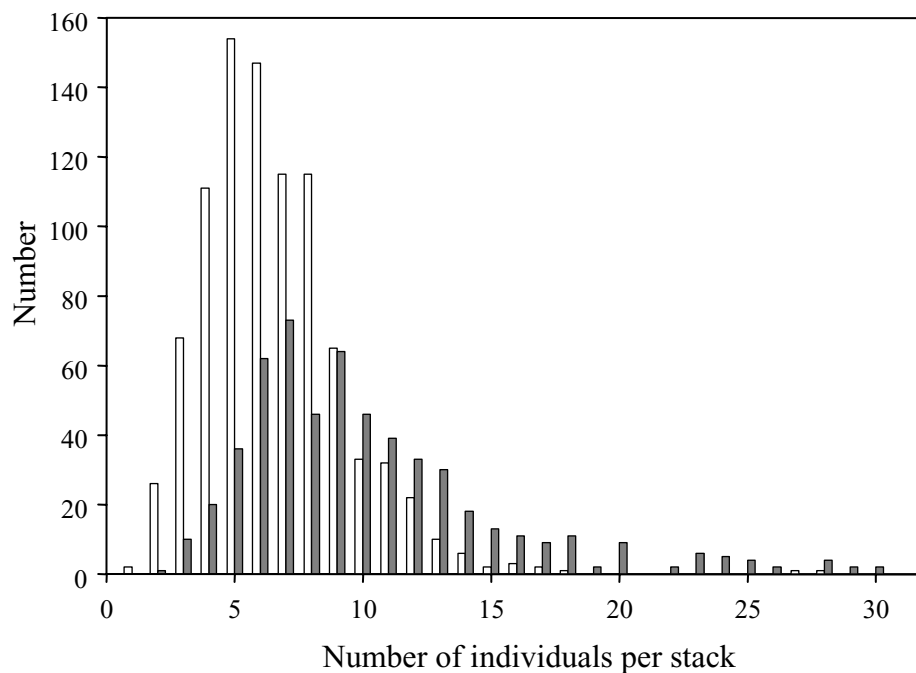
The size class (4mm) was chosen according to previous analyses of population dynamics in *Crepidula fornicata* (Dupont et al; 2007; S. Le Cam, unpublished data)



Appendix 4. Histogram of the stack size distribution

The total number of stacks analyzed is 1475. The size class interval is 1.

The histogram is computed using samples from September 2004 to May 2006 (white bars) and from June 2006 to December 2007 (grey bars).



CHAPITRE III-C : EFFET D'UN EPIBIONTE SUR LA FERTILITE FEMELLE ET IMPLICATIONS POTENTIELLES SUR LA DYNAMIQUE DE CHANGEMENT DE SEXE DANS UNE POPULATION DE *CREPIDULA FORNICATA*

III-C-1. CONTEXTE DE L'ETUDE

A cours du suivi démographique (cf Chap III-A et III-B), nous avons constaté que les individus de cette population étaient fréquemment infestés par une éponge de la famille des Clionidae. La présence de cette éponge chez la crépidule avait déjà été mentionnée par Hoeksema (1983) dans une population du Sud Ouest de la Hollande (Grevelingen lake).

Cliona celata peut être observée à la surface de la coquille de crépidules sous forme de perforations jaunes (Stefaniak *et al.* 2005 ; Figure III-C-1). Ces perforations sont en fait comblées par les papillae de l'éponge qui assurent la circulation de l'eau à travers la totalité des tissus de la l'organisme. Le reste de l'éponge se développe à l'intérieur de galeries creusées dans la coquille (le carbonate de calcium est chimiquement dissous, Cobb 1969). Selon Rützler (2002), c'est la première et la plus commune des formes de croissance des éponges perforantes, appelé également *stade alpha*. Le stade *beta* pendant lequel l'éponge grandit et recouvre la coquille et le stade *gamma* qui est la forme "libre" (l'éponge se développe seule en milieu rocheux et peut atteindre jusqu'à 1.5m de diamètre) sont plus rares. On retrouve tout de même la forme "libre" dans les zones rocheuses et profondes de la Baie de Morlaix (Hoeksema 1983). *C. celata* est une espèce depuis longtemps répertoriée dans la zone de Roscoff et de la baie de Morlaix, comme l'attestent les travaux de Topsent (1891). Le cycle de reproduction de *C. celata* n'est pas bien connu mais plusieurs modes de reproduction ont été proposés: reproduction clonale par fragmentation et par bourgeonnement avec formation de propagules résistantes durant l'hiver et reproduction sexuée (la clione est ovipare, Hartman 1958; Warburton 1958). Ces éponges sont surtout étudiées dans le cadre de l'aquaculture car elles infestent des coquillages exploités à fortes valeurs commerciales comme les huîtres (Rosell *et al.* 1999; Royer *et al.* 2006; Schleyer 1991) et les cavités qu'elles creusent fragilisent les coquilles qu'elles rendent poreuses.

On observe, pour les stades avancés d'infestation, un processus de « résistance » des crépidules. Les individus, dont l'infestation par l'éponge commence à atteindre l'intérieur de

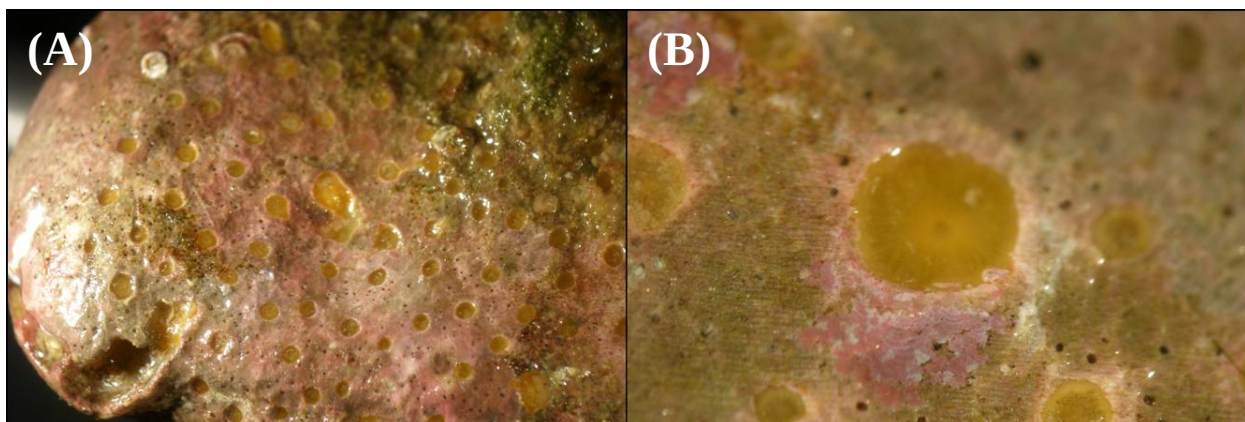


Figure III-C-1: Photos de (A) perforation dues à l'éponge *Cliona celata* chez le mollusque *Crepidula fornicata* (à gauche) et (B) d'une papillae de l'éponge (vue zoomée ; à droite)

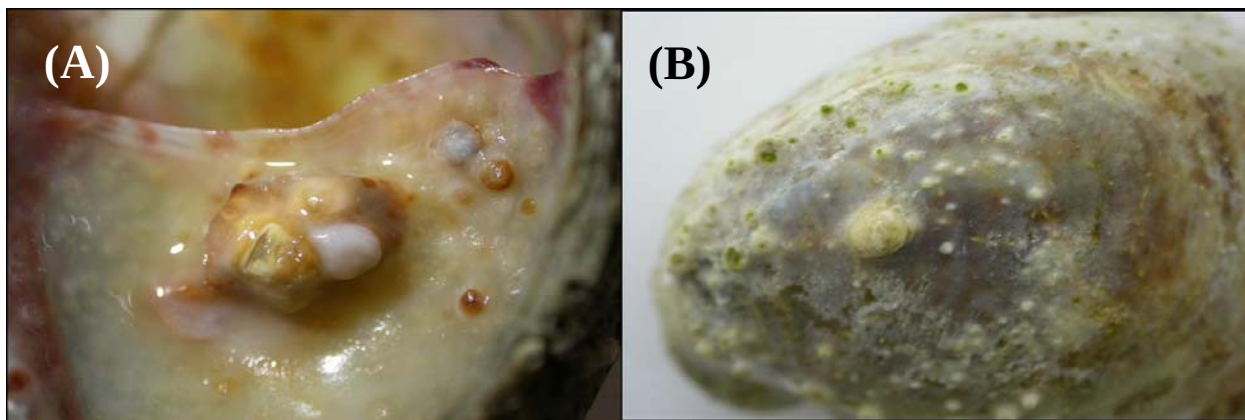


Figure III-C-2: Photo d'excroissance de calcaire : réponse du mollusque à l'infestation par *Cliona celata*, à l'intérieur de la coquille (A) ou sur la coquille de l'individu de dessous (B)

la coquille, produisent du matériel calcaire supplémentaire à l'endroit de la perforation et des excroissances calcaires finissent par apparaître (Figure III-C-2).

Il a été montré chez les mollusques que le coût de la production de coquille est important car il réduit l'énergie disponible pour la croissance somatique et la reproduction (Palmer 1981). Cette infestation pourrait ainsi altérer le succès reproducteur des individus touchés, composante importante dans le déterminisme du changement de sexe. En utilisant les échantillons prélevés pour le suivi démographique et sexuel, réalisé en baie de Morlaix, nous sommes donc attachés à déterminer plus précisément le degré d'infestation de la population par *C. celata* et son évolution au cours du temps, notamment afin de préciser les caractéristiques des individus affectés par *C. celata* (sexe, taille). Enfin, nous avons cherché à déterminer s'il existait un coût sur certaines composantes du succès reproducteur femelle (fécondité).

III-C-2. SYNOPSIS DE L'ARTICLE 5: CAN INVASIVE POPULATIONS OF *CREPIDULA FORNICATA* BE A RESERVOIR OF THE HARMFUL CRYPTOGENIC BORING SPONGE *CLIONA CELATA*?

La prévalence de l'éponge perforante *Cliona celata*, a été étudiée durant 37 mois dans le cadre d'un suivi mensuel d'une population de *Crepidula fornicata* située en baie de Morlaix. La présence de l'éponge a été évaluée sur chaque coquille de crépidule avec une classification en 4 stades de présence :

Stade 0 : aucune trace de présence de l'éponge

Stade 1 : trace d'infestation à l'apex (partie la plus ancienne de la coquille)

Stade 2 : Infestation visible sur plus des $\frac{3}{4}$ de l'extérieur de la coquille

Stade 3 : Infestation visible sur les faces extérieure et intérieure de la coquille

La prévalence de *C. celata* dans la population de crépidules s'est avérée substantielle avec en moyenne 43.1% des individus présentant des signes d'infestation. Cependant la proportion d'individus touchés varie selon les mois avec des valeurs oscillant entre 26 et 67%. Une augmentation de la proportion d'individus lourdement infestés (stade 3) est observée en outre au cours du suivi, et le pourcentage relatif de ces individus diminue tous les 10 mois ce qui pourrait suggérer des épisodes de mortalité réguliers des mollusques les plus touchés. La distribution de cette éponge est très homogène entre les chaînes de crépidules, avec seulement 4.2% de celles-ci totalement exemptes d'éponges. Par ailleurs, le comportement fortement grégaire peut expliquer cette large présence de l'éponge perforante au sein de la population, car sa propagation semble se réaliser d'un individu à l'autre par contact, depuis les plus âgés vers les plus jeunes. La taille des individus semble être le meilleur indicateur de la probabilité et du stade d'infestation. Comme le sexe et la taille sont fortement corrélés chez une espèce protandre telle que *C. fornicata*, ceci résulte en une infestation massive et plus sévère des femelles. Cependant, la présence de *C. celata* ne semble pas affecter les patrons de changement de sexe même lorsque certains individus de la chaîne sont largement infestés.

Nous avons observé qu'une forte infestation de la coquille d'un individu vivant par cette éponge perforante entraîne la production de supplémentaire de coquille afin d'enrayer la progression de l'éponge vers l'intérieur de la coquille. Bien que le coût de la production de coquille puisse être considérable, en analysant la fécondité femelle (masse sèche des pontes,

nombre de capsules par ponte et nombre d'embryons par capsules), nous n'avons pas trouvé de différence entre les fertilités des femelles lourdement infestées ou non. Certes d'autres paramètres, telles que la qualité des pontes ou la croissance somatique pourraient être affectés par l'infestation de *C. celeta*, mais ces résultats soulignent que cette éponge, présente de façon substantielle dans la population, ne semble par avoir un impact important sur la dynamique démographique, la reproduction ou le changement de sexe de *C. fornicata*.

Il a été montré que *C. celata* est un épibionte nuisible pour certains coquillages, notamment des espèces commercialement exploitées (e.g. huîtres, ormeaux). La faible sensibilité apparente de la crépidule, espèce longévive, à l'infestation par l'éponge perforante pourrait faire de cette population de mollusque un réservoir de *C. celata* et accentuer son impact sur des espèces locales natives ou introduites.

**III-C-3. « CAN INVASIVE POPULATIONS OF *CREPIDULA FORNICATA* BE A
RESERVOIR OF THE HARMFUL CRYPTOGENIC BORING SPONGE *CLIONA
CELATA?*».**

**Auteurs: Sabrina Le Cam & Frédérique Viard
Article en préparation**

Title

Can invasive populations of *Crepidula fornicata* be a reservoir of the harmful cryptogenic boring sponge *Cliona celata*?

Authors list

Sabrina Le Cam and Frédérique Viard

UPMC Univ Paris 06, CNRS UMR 7144, Adaptation & Diversité en Milieu Marin, Station Biologique, Roscoff, 29682 France, ²CNRS, UMR 7144, Station Biologique Roscoff, 29682, France

Correspondence:

Sabrina Le Cam, UPMC Univ Paris 06, CNRS UMR 7144, Adaptation & Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, 29682 France ; Tel : +33298 292320, Fax : +33298 292336 ; E-mail : lecam@sb-roscoff.fr

Frédérique Viard, UPMC Univ Paris 06, CNRS UMR 7144, Adaptation & Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, 29682 France ; Tel : +33298 292312, Fax : +33298 292336 ; E-mail : viard@sb-roscoff.fr

ABSTRACT

The prevalence over time of a widespread boring sponge *Cliona celata* and its effect on female was analyzed in a population of the invasive sex changing gastropod, *Crepidula fornicata*. This endolithic sponge has a detrimental effect on the slipper limpet's shells whose response consists of the production of extra shell material, a costly mechanism. During 37 months, size, sex, female reproductive status and infestation stage by the boring sponge were recorded for 300 individuals sampled monthly in Bay of Morlaix (Brittany). The prevalence *C. celata* was found to be relatively high over time with on average 43.1% of the individuals hosting the boring sponge. The relative proportion of infested individuals nevertheless increased over the whole survey and a regular decrease of these individuals every 10 months was observed, suggesting potential episodes of mortality of infested slipper limpets. The large prevalence of the sponge appeared to be facilitated by the gregarious behaviour of the mollusc species with propagation by contact between neighbouring individuals. Females were found to be far more infested than males, a pattern explained by a sex-size relationship in the protandrous species *C. fornicata*. We did not find any evidences for a cost of producing extra-shells on female fecundity (number of capsules, number of eggs) and the boring sponge is unlikely to exert a strong pressure on sex change patterns of *C. fornicata*. Given the limited effects of the epibiont in the study population of *C. fornicata* and the documented damages on some local species including commercially exploited shellfishes, our results suggest that the invasive mollusc, *C. fornicata*, might be a reservoir of the boring sponge for other native or introduced species.

INTRODUCTION

Molluscs are often considered as important ecosystem engineers in particular because shells shape habitat structure and provide substrata for a wide range of species. This may in turn affect population- and community-level processes (McLean 1983). For example, De Montaudouin & Sauriau (1999) showed that a local increase in biodiversity associated to the invasive mollusc species *Crepidula fornicata* could be explained by the epifauna colonizing the shells of this invader. Among epibiontic organisms, shell boring organisms are of particular interest as they may profoundly alter shell integrity which is primordial in molluscs to ensure protection from predators (e.g. Stefaniak *et al.* 2005) or mechanical stress as well as to better control their internal environment. This latter characteristic is particularly important for brooding species which incubate eggs in the pallial cavity, for instance to control oxygen provisioning to embryos (e.g. Brante *et al.* 2008 and references therein).

Excavating sponges, mostly from the family *Clionidae* are among the most important bioeroders in benthic communities. These sponges grow into galleries inside shells where the calcium carbonate substratum has been chemically excavated (Pomponi 1980) and only bright yellow perforations, corresponding to papillae which ensure the water circulation through the whole living tissues, are visible. *Cliona* sp. has been classified as a cryptogenic species (i.e. species “not demonstrably native or introduced” *sensu* Carlton 1996) by Orensanz *et al.* (2002). Although its impact has been mainly documented in coral reef ecosystems (for a review see Diaz & Rützler 2001), it can develop on various calcareous substrates such as limestone and mollusc shells and was shown to have deleterious effects on economically valuable species like *Pinctada maxima*, (Fromont *et al.* 2005); *Crassostrea virginica*, (Guida 1976), *Haliotis tuberculata*, (Huchette *et al.* 2006) and *Ostrea edulis*, (Rosell *et al.* 1999).

Infested molluscs have been observed to produce extra shell production in order to stem the sponge progression toward the inner part on the shell (Hoeksema 1983; Rosell *et al.* 1999). As a consequence, the individuals’ living space may be reduced and more importantly, because of the costs of calcification (Palmer 1992), a part of the energy allocated to somatic growth and reproduction might be circumvented. This has been documented in the gastropod *Littorina littorea* in which *Cliona* sp. increased vulnerability to predation and had potential costs in terms of growth and/or fecundity due to shell repair (Stefaniak *et al.* 2005).

With respect to marine invasion processes, boring sponges are of particular interest as they may be a driver of the local expansion process by inducing detrimental effects on the invading species. In this study, we examined the prevalence and possible costs on female

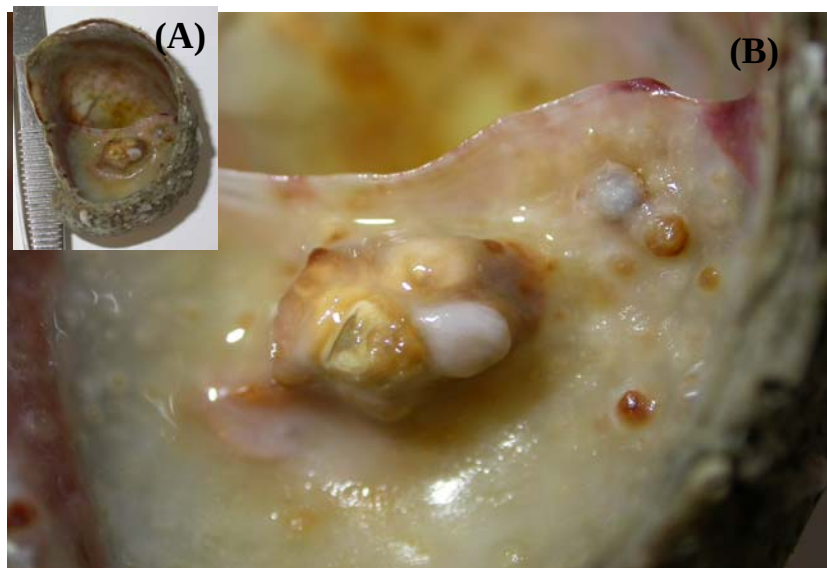


Fig 1. Effects of *Cliona celata*: extra shell formation within a *C. fornicata* shell

(A) The entire individual

(B) Focus on the extra-shell formation

fertility of a boring sponge *Cliona* sp. in a population of the invasive species *Crepidula fornicata*. We observed this boring sponge along a granite rocky shore, the Bay of Morlaix (Brittany, France) where many of the calcareous substrates are composed of mollusc shells and calcified algae (Hoeksema 1983 and pers.obs.). *C. fornicata* is an emblematic species for the study of biological invasions since its introduction in Europe from North East coast of America at the end of the 19th century. This mollusc has invaded nearly all the major bays and estuaries from Spain to Norway (Blanchard 1997) with major modifications in the indigenous species assemblages (De Montaudouin & Sauriau 1999) and several deleterious effects on economically exploited species (e.g. fishes like *Solea solea*, Le Pape et al. 2004 or native or introduced molluscs like *Mytilus edulis* (Thieltges 2005), *Pecten maximus* or *Crassostrea gigas*, Blanchard 1997). The slipper limpet and *Cliona* sp. are thus two pests for exploited shellfishes and their interaction might be particularly interesting to survey.

Considering only *C. fornicata*, this mollusc displays a number of reproductive traits that make it particularly well suited to study the impact of *Cliona* sp. Observations of blisters of extra-shell production in heavily infested individuals (Fig. 1) suggested the possibility of associated costs. In addition, *C. fornicata* is a long lived (~8-10 years) sex changing species. It is forming long-lived associations (“stacks”) that typically contain a number of males, females, juveniles, and individuals in transition, on the way from being male to becoming female (Coe 1938; Conklin 1898) and which are attached to a hard substrate (often a dead slipper limpet shell or other mollusc shells). The largest (oldest) individuals are usually females. Fertilization is internal and broods, composed of 20-60 capsules filled with several hundreds of embryos, are incubated inside the female’s pallial cavity until their release as veliger larvae (Chipperfield 1951). Because, the excavating patterns due to boring sponge tend to increase with size or age (Hoeksema 1983; Rosell *et al.* 1999), it is likely that infestation in *C. fornicata* be unbalanced in between the two sexes, i.e. more intense and more costly for females. To test for this hypothesis, after having validated the species status of the boring sponge studied, we carried out a population survey over 37 months, between December 2004 and December 2007, to analyze the prevalence of the boring sponge throughout 3 complete reproductive cycles and determine the characteristics of the slipper limper individuals that were the most heavily attacked. In addition, parameters measuring female fertility were analysed according to the infestation status to test for any evidences of reproductive costs due to the presence of the boring sponge.

MATERIALS AND METHODS

***Cliona* sp.: molecular identification of the species**

Based on tissue colour, excavation characteristics and spicules's morphology, we unambiguously identified the endolithic sponge sampled on *C. fornicata* shells as a member of the Clionidae family (Hayward & Ryland 1996; Rützler 2002) and based on previous reports, *Cliona celata* was the most likely species, here sampled at its α stage, the first and most common growth form of this boring sponge. It is noteworthy that the 'free living' γ stage of *Cliona celata* is found in deeper areas of the study site, Bay of Morlaix (divers from Station Biologique of Roscoff, pers.com., Hoeksema 1983). To validate the species identification, we used a molecular approach by sequencing D2 and D3 regions of 28S rDNA as described by Barucca *et al.* (2007). Sponges corresponding to α and β stages were sampled within a slipper limpet as well as one individual at γ stage sampled in Bay of Morlaix. Total DNA was extracted using a conventional phenol-chloroform protocol (Sambrook & Russell 2001) and checked on a 1% agarose gel. Following primers details and protocols provided in Barucca *et al.* (2007), we sequenced a ~630bp fragment of D2 and D3 regions of 28S rDNA using primers 5'-AAGGTGAAAAGTACTTTGAAAAGA-3' and 5'-TCCGTGTTTCAA GACGGGTC-3' for 28S D2 region and 5'-GACCCGTCTTGAAACACGGA-3' and 5'-TCGGAAGGAACCAGCTAC-3' for 28S D3 region. Sequences were obtained using the Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit on an ABI 3130 XL DNA sequencer following the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). Sequences were edited in BioEdit version 5.0.1 Hall 1999 and aligned with Clustal V (Jeanmougin *et al.* 1998) with published sequences of *Cliona celata* available in GenBank at the time of the analysis (GenBank No. AM293629, AM293647).

Population survey - Data collection

Samples were collected every month in a subtidal (12 m depth) population of the slipper limpet, *C. fornicata*, located in the Bay of Morlaix (48°40,18 N / 3°53,167 W), Brittany, France, between September 2004 and December 2007. This population is well-established since the 1960s (Blanchard 1995) and have been regularly monitored for ca. ten years by the Station Biologique of Roscoff. Stacks of *Crepidula fornicata* were sampled along a 20-30 meter long transect by means of scuba diving to preserve the structure of each stack. In the laboratory, a minimum of 25 stacks (to reach a minimum number of ca. 300 individuals) per month was preserved separately and for every individuals of each stack, the following parameters were recorded. Firstly, the sexual stage (i.e. males, individuals in sexual transition

or females) was determined by the presence or absence of penis and genital papilla following the same criteria as in previous studies of the slipper limpet (Collin 1995; Dupont et al. 2006; Hoagland 1978; Richard et al. 2006). Secondly, the presence of broods found in the paleal cavity of the mother was noted. Thirdly, the position within the study stack and the size, defined as the longer length between the apex and the front part of the shell, was measured to the nearest 0.1mm with callipers which provides a good estimate of the relative age of the individuals (Dupont et al. 2006; Hoagland 1978). Finally, (v) shells were examined and sorted into four categories according to the infestation level by *Cliona* sp.: level 0: no papillae in inner and outer parts of the shell, level 1: light infestation, only present in the apex area (the older part of the shell), level 2: intermediate infestation stage with the sponge covering over the half the external side of the shell and level 3: massive infestation with the sponge covering both the inner and outer parts of the shell. This method, convenient when analyzing a large number of individuals, was used in other surveys of infestation (e.g. *Striostrea margaritacea*, Schleyer 1991) including in commercially exploited species such as pearl oysters (Hart & Friedman 2004).

Population survey - Data Analysis

The proportion of individuals infested by *C. celata* and the relative proportion of each infestation level was calculated monthly over the three years of the survey. Temporal trends and seasonal trends were investigated using linear regression and autocorrelation analyses respectively. These analyses were conducted using *lm* and *acf* functions respectively implemented in the statistical package R (R Development Core Team 2007; <http://www.R-project.org>). Because the infestation level 3 is the most likely to have deleterious effects, an additional analysis was done on level 3-individuals only to monitor their evolution through time using the same regression and autocorrelation analyses.

C. fornicata is forming stacks, perennial assemblages of individuals which are functioning as mating groups (Dupont *et al.* 2006; Hoagland 1978; Le Cam *et al.* 2009). Prevalence of the sponge was analyzed at stack level by calculating the proportion of individuals colonized by the boring sponge within every stack through out the 37 months survey. Considering all the samples, the distribution of the stacks according to the percentage of the individuals infested by *Cliona* sp. within stack was pictured. The evolution of the monthly mean stack infestation proportion was tested for temporal and seasonal trends as described above. Given that the stacks are made by individuals which are older (larger) at the basis of the assemblage and younger (smaller) at the top, we investigated how much the

propagation patterns of the boring sponge within a stack may reflect this age-size structure by considering in details 3 samples (May, June and July 2006, N=889): we analyzed the proportion of infested individuals according to the presence vs. absence of boring sponge on individuals in the immediate vicinity (above or below).

Patterns of infestation were analyzed at the individual level. The relative proportion of each infestation level was calculated for juveniles, males, individuals in sexual transition and females (hereafter named “individual categories”). Nevertheless, in sex changing species, size and sex are usually highly correlated (Charnov 1982). A one-way ANOVA was conducted with Minitab V13.20 to test for this association in our samples. To determine which variable was the best predictor of *C. celata* presence vs. absence, mollusc individuals were distributed into size classes of 4mm and a logistic regression was carried out using a nested [sex $\times$ size class(sex)] model. Models were evaluated based on a Hosmer–Lemeshow goodness-of-fit test. These analyses were carried out with Minitab 13.20.

Finally, we computed the relative size at sex change (RS), a classical parameter used to study sex change characteristics (Allsop & West 2003; Charnov & Skuladottir 2000). RS is defined as $L50$ divided by $Lmax$, where $Lmax$ is the maximum size in the study population. Using a logistic regression (Sokal & Rohlf 1995) to fit on the size data of males and females, the size at which 50% of the individuals are females ($L50$) was estimated. We compared RS between individuals located within stacks where at least one level 3-individual was found and all the other individuals sampled.

Impact of Cliona sp. on the female fertility of Crepidula fornicata

Two parameters used as proxies of *C. fornicata* female fertility, brood dry mass and number of capsules and number of embryos per capsules, were analyzed on sub-samples.

Brood dry weight was measured using the sample of July 2005 to get enough brooding females (N=122). One capsule was removed from each brood that was preserved in 90° ethanol after the sampling of the mollusc. Broods could be sorted according to three categories: “young brood” (y): light yellow colour, capsules filled only poorly and round embryos without typical larval characteristics; “intermediate brood” (i): dark yellow to light brown, capsules being moderately filled and embryos with a shell and “mature” broods (m): dark brown eggs in packed capsules with large embryos showing well developed shells. Dry weight of these broods was recorded after 48h at 70°C, using precision weighting device (0.001g). Female fecundity in *C. fornicata* has been shown to increase with the size of the female individual (Collin 2006; Ghiselin 1969; Richard *et al.* 2006). A linear regression

between mother size and brood dry weight was carried out to test for this effect in our sampling using the *lm* function from the statistical package R. The effect of the infestation level of *C. celata* on brood dry weight was then tested using a nested [Infestation level × Brood developmental stage (Infestation level)] general linear model (GLM) with mother size (mm) as a co-variable. This model allowed taking into account for the lack of orthogonality in the sampling design. For each performed analyses, model assumptions were checked. All the analyses were conducted using Minitab V.13.20.

To better examine the possible effect of *Cliona* sp. on female fertility, we compared females without sponge (level 0) to heavily infested ones (level 3) using samples of May, June and July 2006 for which stack analyses were carried out (see above) and which correspond to the peak of the reproduction period (more than 80% of the females with broods each month). To minimize age (size) biases on female fertility, only females between 40 and 50 mm long were considered. The number of capsules per brood was counted for 22 females without sponge and 22 females at level 3 of infestation. In addition, for 10 females, 5 of each category, the number of embryos in each of 5 capsules (N=50 capsules) was counted. Preliminary tests using the Spearman rank order correlation factor were carried out to test for any trade off between the number of capsules and the number of embryos per capsule and for a correlation of both variables with the size of the female. Then, the effect of the infestation degree (heavily infested vs. absence of sponge) on the number of capsules per brood was analyzed by an ANOVA using the GLM model with Minitab V.13.20. To test for the impact of *Cliona* sp. on the number of embryos per capsule, a nested [Infestation degree × Mother identity (Infestation degree)] GLM was carried out. Finally, a [infestation degree] GLM with mother size as a co-variable was analyzed to decipher between effects due to female status and female size.

RESULTS

Molecular identification

Comparison of ca. 630 base pairs fragments sequenced in our study with previously published sequence for *Cliona celata* confirmed that the boring sponge sampled on the shells of *Crepidula fornicata* in the bay of Morlaix were *Cliona celata* specimens. This latest species name will be used in the following text.

Presence and infestation level throughout the population survey of C. fornicata

Among the 12049 slipper limpet individuals analyzed, 5084 (42.2%) were found to host *Cliona celata* on their shells. Regardless of the infestation stage, the mean occurrence rate per month (Fig. 2) was 43.1% with a maximum on December 2006 (67.22%) and a minimum on May 2005 (26.09%). The prevalence of the sponge showed neither temporal trend (linear regression, $R^2=0.14$, $P=0.056$) nor seasonal trend (autocorrelation analysis). Although the 3 infestation levels (level 1 to 3) were found in every monthly sample, level 1 was the most common (mean value 53.7%) as compared to level 2 (28%) and level 3 (18.3%) except between October 2006 and June 2007 where level 2 was the most abundant (Fig. 2). Heavily infested limpets (level 3) were observed all over the survey with a proportion increasing over the course of the survey (Linear regression, $y = 0.212x + 15.99$, $R^2 = 0.2$, $P=0.005$). A seasonal trend was observed and an autocorrelation analysis revealed a negative correlation with a lag of 10 months.

Among the 1320 stack analyzed, only 55 (4.2%) were totally free of boring sponge infestation (Fig. 3) and 101 (8%) with only one individual hosting *C. celata*. The majority of the stacks (55.1%) showed between 30 and 50% of individuals with *C. celata* (Fig. 3). At the stack level, the prevalence of the boring sponge was high with 56.7% of the stacks displaying 50% or more infested individuals. Although the mean proportion of stacks with *C. celata* was shown to vary across samples (from 26% on December 2006 to 70% on October 2007), neither temporal nor seasonal trends were detected.

Considering only the samples from May to July 2006, we studied the proportion of infested individuals according to the infestation status of their direct neighbours (Table 1). Over 889 individuals examined, 66.1% (N=588) were shown to carry *C. celata* in their shells. Among individuals with both of their neighbours free of infestation, only 12.1% were infested. Ninety-two percent of the individuals surrounded by two infested limpets were infested and 23% of those with an individual located below in the stack infested were also

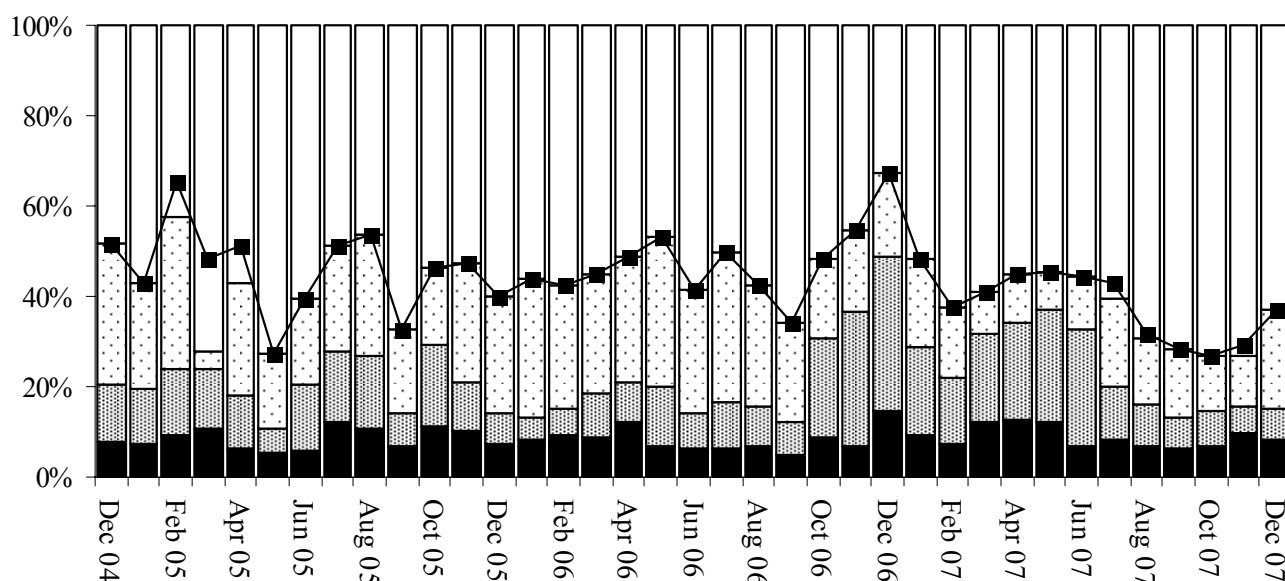


Fig 2. Presence and level of infestation by *Cliona celata* in a population of *Crepidula fornicata* over 37 months.

The proportion of mollusk shells with boring sponge (black line with squares) is indicated together with the relative proportion of each level of infestation as defined in Material and Methods (bars; level 0 (no sponge): white; level 1: light dotted bar; level 2: dark dotted bar; level 3: black).

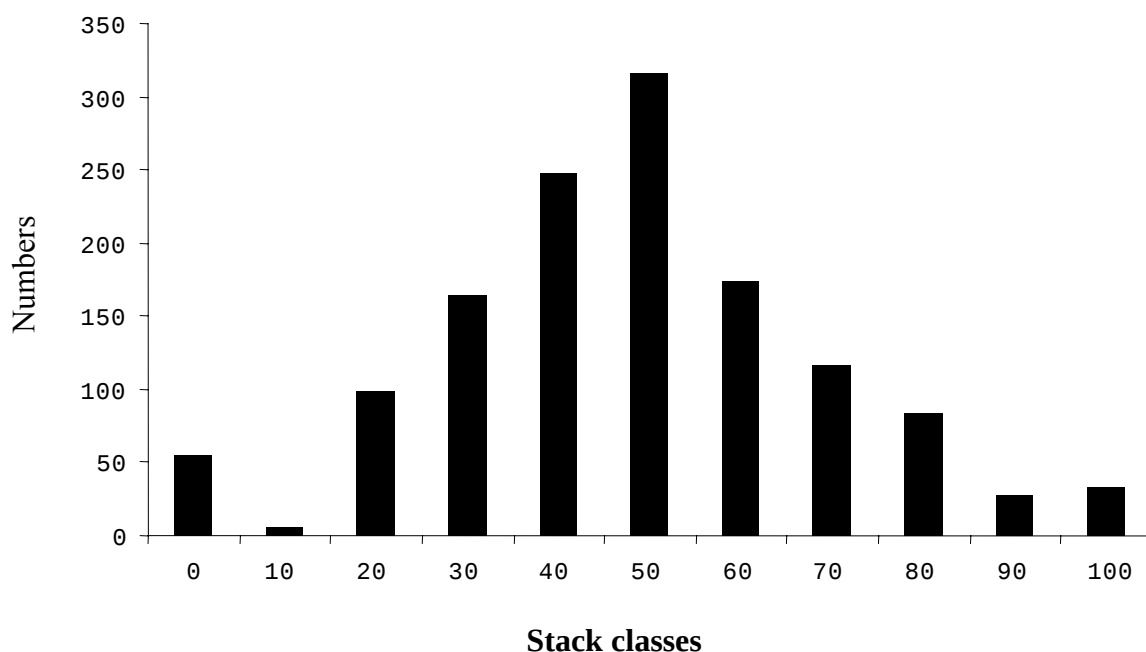


Fig 3. Distribution of the number of stacks of *C. fornicata* according to the percentage of individuals within stack hosting the boring sponge *C. celata* (level 1 to 3).

e.g. 0 corresponds to stack without any individual hosting *C. celata*.

Table 1: Percentage of mollusc individuals with *C. celata* (Cc) sorted according to the infestation status of their neighbours (i.e. individuals above or below the targeted individual)

Status	%
Infested individuals in the study sample (N=889)	66
Infested individuals with:	
Neighbours with Cc above and below	92
Neighbours with Cc above and without Cc below	8
Neighbours with Cc below and without Cc above	24
Neighbours without Cc above and below	12

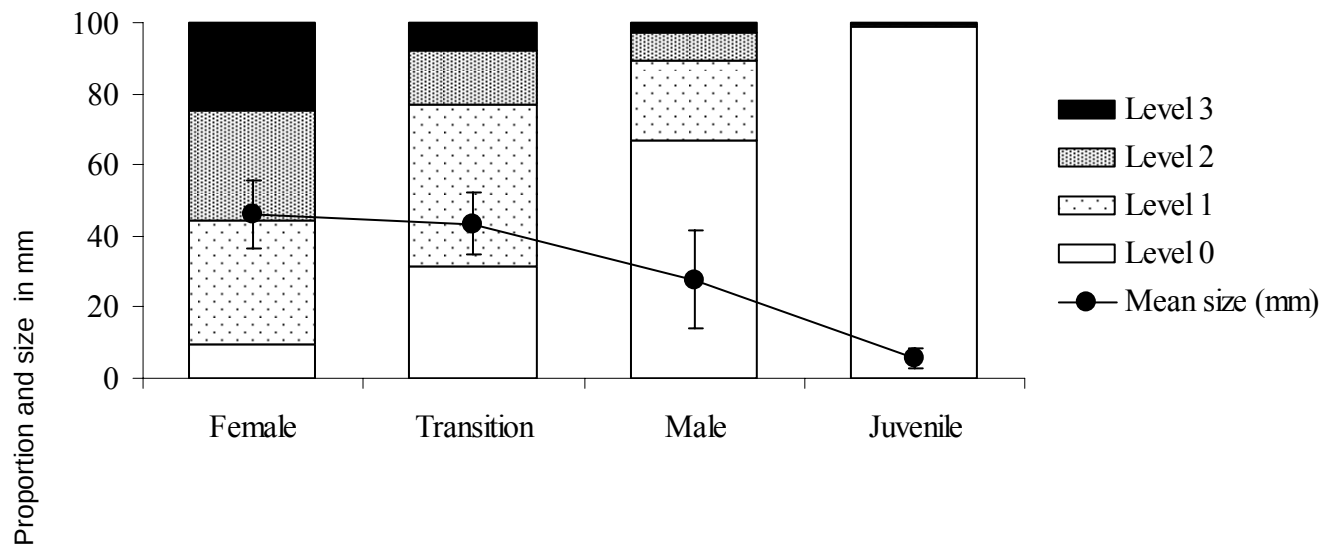


Fig 4: Relative proportion of absence (level 0) and presence (level 1 to 3; see Material and Methods) of *C. celata* per individual categories over the whole survey of the *C. fornicata* study population (N=12049).

The mean size (mm) and standard deviation of each category are indicated by the line with black dots.

infested. These results suggested that the propagation of the boring sponge was facilitated by a physical contact between individuals and preferentially from the basis to the top of the stacks.

Important differences were observed among different categories of individuals in the population (Fig. 4): females appeared to be the most largely infested with 84.4% of them showing the boring sponge with different levels of infestation (32.2 % at level 1, 34.6% at level 2 and 27.2% at level 3 of infestation). The majority of individuals in sexual transition were also found with *C. celata* (57%). Males were comparatively poorly colonized by the sponge with only 26.4% of individuals infested and most of them at level 1 (67.6%). The less infested individuals were juveniles in which the boring sponge was almost absent (0.7%) with only 8 infested individuals among the 1183 juveniles sampled. As expected in a protandrous species like *C. fornicata*, the mean individual size was significantly different between sexual stages (ANOVA, *d.f.* = 2, *F*= 3138.99, *p*<0.001). Yet, the four categories were not a good predictor of the presence of *C. celata* (Table 2), the size of the individual had a significant effect within each category, for males (*p*<0.001), individuals in sexual transition (*p*<0.001) and females (*p*<0.001). Therefore, the larger individuals, regardless of their sex, had higher probability of being infested by the boring sponge. This did not hold for juveniles (*p* = 0.327) which were poorly infested and displayed a narrow range size as compared to mature individuals. Finally, the relative size at sex change (RS) between individuals belonging to stacks with at least one level-3 infested individual was not different from RS of all other individuals of the population (values of 0.65 and 0.66, respectively).

Impact of *C. celata* on female fertility

As expected brood dry weight increased with female size (Linear regression, $y = 1.37x - 14.7$, $R^2 = 0.14$, *p* < 0.001). Broods exhibited highly variable weight (from 2.9 to 146.2mg). Egg masses from mothers at level 3 of infestation showed the highest variation and lowest median (35.7 mg) and mean value (41.8 mg). Average brood dry weight was nevertheless similar across infestation level (*p* = 0.946; Fig. 5; level 0: 45.4; level 1: 17.7 and level 2: 47.7 mg). Conversely brood development stage had a significant effect (*p* = 0.005) on brood dry weight (Table 3a).

Number of capsules varied substantially among the 44 broods analyzed (from 17 to 74). Spearman rank order test did not reveal any correlation between the number of capsules and the size of the mother (Spearman correlation coefficient $r_s = 0.188$, *p* = 0.223) which showed that the size range chosen prevented, as expected, any bias linked to mother size. No

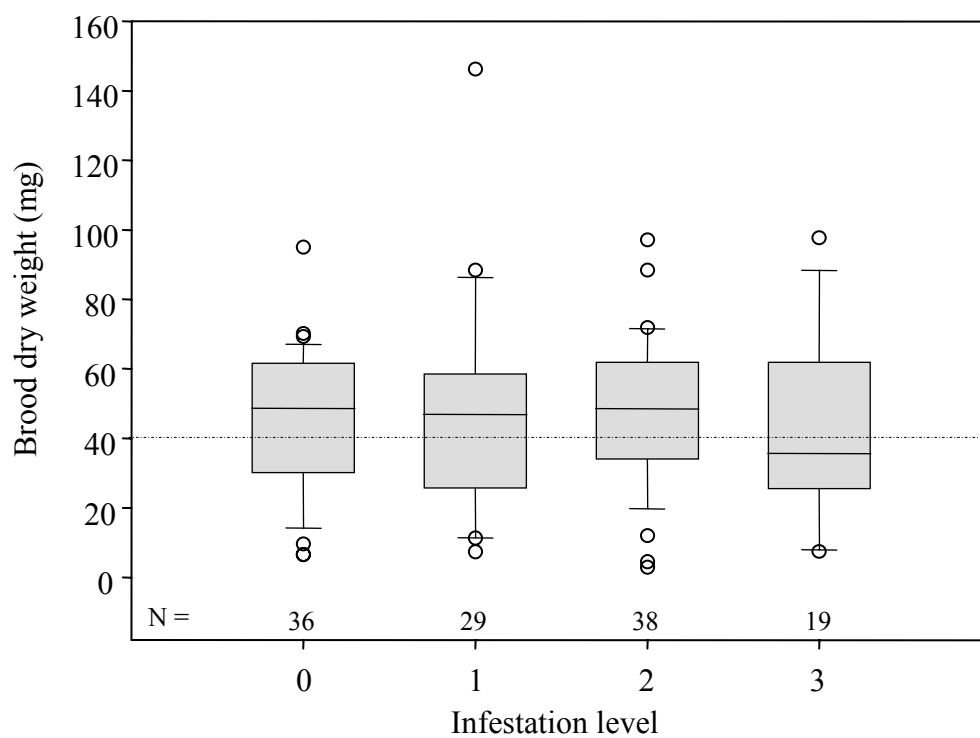


Fig 5. Box plot diagram of the distribution of brood dry weight for females of *C. fornicata* at different level of infestation (see Material and Methods) by the boring sponge *C. celata*

Table 2: Effects of mollusc size and categories (juvenile (I), male (M), individuals in sexual transition (T) and female (F)) on the presence vs. absence of *C. celata*
Output of a binary logistic regression using a hierarchical model with size class nested into sex (n=12018). Hosmer and Lemeshow (HL) goodness-of-fit was tested using χ^2 with $df = 7$.
Probability value higher than 0.05 for HL test indicates no evidence of lack of goodness-of-fit

Variable	β Coeff.	Standardized- β	Z	P	Odds ratio	CI 95%	
						Lower	Upper
Intercept	-11.704	9.491	-1.23	0.217			
Sex							
F	8.559	9.498	0.90	0.368			
T	5.248	9.601	0.55	0.585			
M	5.793	9.492	0.61	0.542			
I	6.227	9.513	0.65	0.513			
Size class (sex)							
Size class (F)	0.413	0.032	12.82	<0.001	1.51	1.42	1.61
Size class (T)	0.592	0.125	4.73	<0.001	1.81	1.41	2.31
Size class (M)	0.563	0.014	39.22	<0.001	1.76	1.71	1.81
Size class (I)	0.251	0.255	0.98	0.327			

Table 3: GLM _{ANOVA} results for comparisons of (a) brood dry weight according to infestation level (0, 1, 2, 3) and brood developmental stage with female size as a co-variable, (b) number of capsules per brood according to presence vs. absence of *Cliona celata* (level 0 vs. level 3) and (c) number of embryos per capsule according to (i) mother identity and infestation degree then (ii) infestation degree with mother size as co-variable. P-value in bold indicates significant effects.

Source of variation	<i>d.f.</i>	Type III M.S.	<i>F</i>	<i>P</i>
(a) Brood dry weight (N=122)				
Mother size	1	6938.0	15.63	<0.001
Infestation level	3	142.2	0.12	0.946
Brood development stage (Infestation level)	8	1299.1	2.93	0.005
Error	109	443.8		
(b) Nb capsules per brood (N=44)				
Infestation degree	1	141.8	0.80	0.377
Error	42	177.7		
(c) Nb embryos per capsule (N=50)				
Infestation degree	1	7272.0	0.34	0.577
Mother(Infestation degree)	8	21516.0	21.83	<0.001
Error	40	986.0		
Mother size	1	19925.0	4.39	0.032
Infestation degree	1	4118.0	1.01	0.320
Error	47	4077.0		

effect of infestation degree was found on the number of capsules per brood ($p = 0.377$, Table 3b).

No correlation was found between the number of embryos per capsules and the total number of capsules in the 10 broods studied. Conversely to the number of capsules, the number of embryos was correlated to the female's size (Spearman rank order test, $r_s = 0.297$, $p = 0.036$). A significant effect of the mother identity ($p = 0.032$) showed that the number of embryos within capsules of the same brood was homogeneous. When taking into account female identity or female size, infestation degree was not correlated significantly with the number of embryos per capsule (Table 3c).

DISCUSSION

Molecular analyses allowed us to confirm the specific status of the boring sponge observed in the study population of *Crepidula fornicata*. Indeed, species of clionid sponges are particularly difficult to determine based on morphological criteria because of the paucity of taxonomic characters (Fromont et al. 2005). *Cliona celata* is considered as a cryptogenic (Orensanz et al. 2002) and cosmopolitan species, distributed along Pacific and Atlantic coasts (Hartman 1958). It had been reported in the native (i.e. New-England, Hartman 1958) and introduction range of *C. fornicata*. Given the monitoring and taxonomic data available, we can not ascertain the origin of *C. celata* now hosted on shells of *C. fornicata*. However, in the study area, *C. celata* sp. has been reported by Topsent (1891) and Levi (1950) long before the introduction of *C. fornicata* (which occurred in the 1960). We can hypothesize that *C. fornicata* had been colonized as a new substrate by the boring sponge from native species located in the vicinity (e.g. *Ostrea edulis*). This hypothesis nevertheless deserves a dedicated study based for instance on a global phylogeography study of *C. celata* including North-East and North-West Atlantic samples which are the areas of origin and of introduction of *C. fornicata* respectively.

With an average prevalence of 43.1% per month, the infestation rate observed in the study population of *C. fornicata* appeared to be at similar level than previous observations in other mollusc species for example, in *L. littorea* from the North East coast of the US (47%, Stefaniak et al. 2005) or in the oyster *Striostrea margaritacea* in South Africa (47%, Schleyer 1991). These values are nevertheless much lower than the 100% of infested individuals observed by Rosell et al. (1999) for *Ostrea edulis* in the North East of the Mediterranean Sea and Wesche et al. (1997) for *Saccostrea commercialis* in South Australia. Recorded

infestation rates (see other examples in the review by Rosell et al. 1999, Table1) seem to be highly variable according to the species and ecosystems and may vary with the substrates available for the sponge.

With an infestation rate ranging from 26 to 67%, the prevalence of *C. celata* in the study population of *C. fornicata* was significant and variable throughout the three years survey. In particular, we observed an increasing proportion of level 3 (presence of the boring sponge in the inner and outer parts of the shell) across the three-year survey. Autocorrelation analyses also seemed to point out a decrease of the most infested individuals every 10 months, a periodical decrease that may be due to mortality events. Level 3 individuals were characterized by numerous galleries excavated by the sponge which have broken the shell integrity including in the inner part of the shell. Such individuals might be more susceptible to predation as already shown in other gastropods (Stefaniak et al. 2005; Buschbaum et al. 2007). *C. fornicata* shells display a small blade separating genital and digestive organs from the mantle muscle. In the most advanced infestation cases, the boring sponge was observed within that small blade with blisters of extra shell (S. Le Cam, pers. obs, Fig 1.). This additional shell material seemed to prevent the mantle muscle development and provoke a weak attachment of the individuals to their substrate with subsequent increased risk of mortality as individuals detached from their substrate can not survive. Laboratory experiments are needed to better check the effects of the boring sponge at the individual level as well as additional monitoring of the slipper limpet populations to analyze if the sponge prevalence follows a seasonal pattern. Such a situation has been described by Warburton (1958) who showed that the ability of oysters to resist to the infestation was strongly correlated with season with shell repair mainly observed during summer.

Size (age) was the best predictor of infestation patterns. Although size at sex change is variable in the protandrous species *Crepidula fornicata*, sex and size are correlated (Collin 1995; Dupont et al. 2007) and consequently females were the most heavily infested individuals. Despite evidence of extra shell production in response to sponge attacks, and potential high sensibility of brooding females when shell integrity is challenged, no deleterious effect of the sponge infestation was observed on the parameters of females fertility measured in this study (i.e. brood dry weight, number of capsules per brood and number of embryos per capsule). One possible explanation for such a result is that energetic cost associated to the presence of the boring sponge was only paid by a somatic growth component but a reproduction component. An alternative hypothesis is the existence of a reproductive cost on other parameters than those measured, for example embryos and larvae quality.

Comparisons of lipid or amino-acids contents of broods of infested and non-infested individuals could be carried out to test for this hypothesis. Altogether the impact of the sponge on female fecundity seemed to be low, at best. Also the relative size at sex change of individuals confronted to heavily infested individuals within a stack did not differ greatly as compared to the other individuals of the population. The only negative effect of *C. celata* suggested in our study was a potential periodical mortality of heavily infested individuals. Because 84% of these individuals were females, a differential mortality between sexes could challenge the sustainability of this invasive population. However, because the slipper limpet is a sequential hermaphrodite with environmental sex determination (Collin 2006), any female mortality might be rapidly balanced through sex change of males (Le Cam et al. in prep).

The slipper limpets form perennial stacks of 8-10 individuals which are attached to shells or small cobbles. Except for small individuals (juveniles and very young males), they are sedentary and thus in permanent contact with conspecifics in immediate vicinity. Old (large) individuals are positioned at the base of the stack, individuals becoming younger towards the top of the stack. This peculiar behaviour was associated with a particular pattern of infestation: 92% of the individuals infested showed a neighbour situated just above or just below also infested. This suggested a stepwise progression of the boring sponge within the stack through probably its asexual clonal reproduction. The particular “stacking” behaviour of *C. fornicata* could be responsible for the sustainable large prevalence of the boring sponge. Similar patterns of joint infestation have been observed between *Ostrea edulis* individuals and the calcareous substrates on which they developed (Rosell et al. 1999). Nevertheless, 12% of the individuals of *C. fornicata* analysed in this study were isolated infested individuals which could have been colonized by *C. celata* through its episodic larval stage. *C. celata* can reproduce both asexually, by fragmentation, budding and formation of over wintering propagules, and sexually *via* oviparity followed by a larval phase which could swim continuously for 20 to 30 hours (Warburton 1958). These larvae can then enter a creeping phase and ultimately metamorphose and settle on calcite or glass substrata. Surprisingly, despite that the activity of boring sponges has long been recognized as important both in terms of ecological issues and economical impacts, very little is known on the population dynamics of these sponges. In particular, the processes by which they propagate are unclear. A study of the larval phase of an other *Cliona* species, *C. viridis*, by Mariani et al. (2000) showed that larvae are present once year over a short time in the water columns with a positive correlation between adult and larvae abundance. Thus, sexual reproduction of this sponge seems to be synchronous and larval dispersal low. Zilberberg et al. (2006) studied the

relative contribution of asexual vs. sexual propagation of *C. delitrix*, a very destructive coral-excavating sponge in the Caribbean coral reef systems, using allozyme analysis. They showed that sponge population maintenance appeared to rely on larval dispersal. To our knowledge no such studies exist for *C. celata* and its dispersal mode has still to be investigated.

Considering the high prevalence of the boring sponge *C. celata* in *C. fornicata* and assuming that no significant impact affects the population dynamics of this invasive species, we can hypothesize important potential impact on surrounding shellfish farms in the study area. The incidence and negative effects of the boring sponge has been documented on a large number of exploited shellfishes like sea scallops (e.g. *Placopecten magellanicus*, Evans 1969; Stokesbury et al. 2007), pearl oysters (references in Fromont et al. 2005), abalones (e.g. *Haliotis tuberculata* (Clavier 1989), *Ostrea edulis* (Rosell et al. 1999) and *Crassostrea gigas* (Snowden 2007). Specific prevention and treatment have even been developed, the most common ones being the clearing of boring sponge from the exploited bottom and suffocation or clear water exposure. Furthermore, beside shell damages linked to the burrowing behaviour of the sponge, its infestation rate has been shown to be correlated to the occurrence of other diseases like the “brown ring disease” in the abalone (Huchette et al. 2006). The three last species cited above are exploited and/or cultivated in the study area. Our study is the first to document the prevalence of a boring sponge in a non-exploited invasive species. Despite its high prevalence, the negative effects of *C. celata* in terms of population dynamics and reproduction of the slipper limpet seemed to be limited or even absent. Considering the longevity of the slipper limpet (8-10 years), *C. fornicata* might be a long-lived and stable reservoir of *C. celata* for neighbouring populations of native species including shellfishes, one consequence to add to the list of deleterious effects of *C. fornicata* on native benthic communities.

Acknowledgments: We are grateful to the scuba-divers of the “Service Mer et Observation” (FR2424) at the Station Biologique de Roscoff, for carrying out all the samplings. We thank Myriam Mylbergue for help in gathering part of this dataset. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the University Pierre & Marie Curie. This work is part of the PhD of S. L C who benefited from a grant by the Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References

- Allsop DJ, West SA, 2003. Changing sex at the same relative body size. *Nature*. 425:783-784.
- Barucca M, Azzini F, Bavestrello G, Biscotti M, Calcinai B, Canapa A, Cerrano C, Olmo E, 2007. The systematic position of some boring sponges (*Demospongiae*, *Hadromerida*) studied by molecular analysis. *Mar Biol*. 151:529-535.
- Blanchard M, 1995. Origin and present state of the slipper limpet (*Crepidula fornicata*) population, (Gastropoda Prosobranchia) on French coasts. *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.
- Brante A, Fernández M, Viard F, 2008. Effect of oxygen conditions on intracapsular development in two calyptraeid species with different modes of larval development. *Mar Ecol Prog Ser*. 368:197-207.
- Buschbaum C, Buschbaum G, Schrey I, Thieltges DW, 2007. Shell-boring polychaetes affect gastropod shell strength and crab predation. *Mar Ecol Prog Ser*. 329:123-130.
- Carlton JT, 1996. Biological invasions and cryptogenic species. *Ecology*. 77:1653-1655.
- Charnov EL, 1982. The theory of sex allocation. Vol. 18:Princeton.
- Charnov EL, Skuladottir U, 2000. Dimensionless invariants for the optimal size (age) of sex change. *Evol Ecol Res*. 2:1067-1071.
- Chipperfield PNJ, 1951. The breeding of *Crepidula fornicata* in the River Blackwater, Essex. *J Mar Biol Assoc UK*. 30:49-71.
- Clavier J 1989 Infestation of *Haliotis tuberculata* shells by *Cliona celata* and *Polydora* species. In Abalone of the world: Biology, fisheries and culture supplementary papers (eds Guzman del Proo SA, Tegner MJ, Shepherd SA), pp. 16-20, La Paz.
- Coe WR, 1938. Conditions influencing change of sex in mollusks of the genus *Crepidula*. *J Exp Zool*. 77:401-424.
- 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.
- Collin R, 2006. Sex ratio, life-history invariants, and patterns of sex change in a family of protandrous gastropods. *Evolution*. 60:735-745.
- Conklin EG, 1898. Environmental and sexual dimorphism in *Crepidula*. *Proc Acad Natl. Sci Phila*. 50:435-444.
- De Montaudouin X, Sauriau PG, 1999. The proliferating Gastropoda *Crepidula fornicata* may stimulate macrozoobenthic diversity. *J Mar Biol Assoc UK*. 79:1069-1077.
- Diaz MC, Rützler K, 2001. Sponges: An essential component of Caribbean coral reefs. *Bull Mar Sci*. 69:535-546.
- Dupont L, Richard J, Paulet YM, 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.
- Dupont L, Bernas D, Viard F, 2007. Sex and genetic structure across age groups in populations of the European marine invasive mollusc, *Crepidula fornicata* L. (Gastropoda). *Biol. J. Linn. Soc*. 90:365-374.

- Evans JW, 1969. Borers in the shell of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. Amer. Zool. 9:775-782.
- Fromont J, Craig R, Rawlinson L, Alder J, 2005. Excavating sponges that are destructive to farmed pearl oysters in Western and Northern Australia. Aquacult Res. 36:150-162.
- Ghiselin MT, 1969. The evolution of hermaphroditism among animals. Q Rev Biol. 44.
- Guida VG, 1976. Sponge predation in the oyster reef community as demonstrated with *Cliona celata* Grant. J Exp Mar Biol Ecol. 25:109-122.
- Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT Nucl Acids Symp Ser. 41:95-98.
- Hart AM, Friedman KJ 2004. Mother-of-pearl shell (*Pinctada maxima*): Stock evaluation for management and future harvesting in Western Australia. WA Marine Research Laboratories, North Beach.
- Hartman WD, 1958. Natural history of the marine sponges of the Southern New England. Bulletin of the Peabody Museum of the Natural History. 12:1-155.
- Hayward PJ, Ryland JS, 1996. Handbook of the marine fauna of North-West Europe. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Hoagland KE, 1978. Protandry and the evolution of environmentally-mediated sex change: a study of the Mollusca. Malacologia. 17:365-391.
- Hoeksema BW, 1983. Excavating patterns and spiculae dimensions of the boring sponge *Cliona celata* from SW Netherlands. Senckenbergiana marit. 15:55-85.
- Huchette S, Paillard C, Clavier J, Day R, 2006. Shell disease: abnormal conchiolin deposit in the abalone *Haliotis tuberculata*. Dis Aquat Organ. 68:267-271.
- Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ, 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. Trends Biochem Sci. 23:403-405.
- Le Cam S, Pechenik JA, Cagnon M, Viard F, 2009. Fast vs. slow larval growth in an invasive marine mollusc: does paternity matter? J Hered. Available on-line.
- 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.
- Levi C, 1950. Inventaire de la faune marine de Roscoff- Spongiaires- Suppl 2. Travaux de la Station Biologique de Roscoff.
- Mariani S, Uriz MJ, Turon X, 2000. Larval bloom of the oviparous sponge *Cliona viridis*: coupling of larval abundance and adult distribution. Mar Biol. 137:783-790.
- McLean R, 1983. Gastropod shells: A dynamic resource that helps shape benthic community structure. J Exp Mar Biol. 69:151-174.
- Orensanz JM, Schwindt E, Pastorino G, Bortolus A, Casas G, Darrigran G, Elías R, López Gappa JJ, Obenat S, Pascual M, Penchaszadeh P, Piriz ML, Scarabino F, Spivak ED, Vallarino EA, 2002. No longer the pristine confines of the world ocean: a survey of exotic marine species in the southwestern Atlantic. Biol Inv. 4:115-143.
- Palmer AR, 1992. Calcification in marine molluscs: how costly is it? Proc Nat Acad Sci USA. 89:1379-1382.
- Pomponi SA, 1980. Cytological mechanisms of calcium carbonate excavation by boring sponges. Int Rev Cytol. 65:301-319.
- Richard J, Huet M, Thouzeau G, Paulet YM, 2006. Reproduction of the invasive slipper limpet, *Crepidula fornicata*, in the bay of Brest, France. Mar Biol. 149:789-801.
- Rosell D, Uriz MJ, 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.
- Rützler K, 2002. Family Clionidae D'Orbigny, 1851. In: Hooper J, Van Soest R, editors. Systema Porifera: a guide to the classification of sponges. New York: Academic/Plenum p. 173-185.
- Sambrook J, Russell DW, 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schleyer MH, 1991. Shell-Borers in the oyster, *Striostrea margaritacea*: pests or symbionts? Symbiosis. 10:135-144.
- Sokal RR, Rohlf FJ, 1995. Biometry. New York: W.H. Freeman and Company.

- Stefaniak LM, McAtee J, Shulman MJ, 2005. The costs of being bored: Effects of a clionid sponge on the gastropod *Littorina littorea* (L.). J Exp Mar Biol Ecol. 327:103-114.
- Stokesbury KDE, Harris BP, Marino MC, Nogueira JI, 2007. Sea scallop mass mortality in a Marine Protected Area. Mar Ecol Prog Ser. 349:151-158.
- Snowden E, 2007. *Cliona celata*. A sponge. Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme [on-line]. Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom. [cited 21/11/2008]. Available from: <http://www.marlin.ac.uk/species/Clionacelata.htm>
- Thieltges DW, 2005. Impact of an invader: epizootic American slipper limpet *Crepidula fornicata* reduces survival and growth in European mussels. Mar Ecol Prog Ser. 286:13-19.
- Topsent E, 1891. Essai sur la faune des spongiaires de Roscoff. Arch. Zool. Exp. Gen., 2^{ème} série, 9: 523-554.
- Warburton FE, 1958. Control of the boring sponge on oyster beds. Progress reports of the Atlantic Coast stations of the Fisheries Research Board of Canada. 69:7-11.
- Wesche SJ, Adlard RD, Hooper JNA, 1997. The first incidence of clionid sponges (Porifera) from the Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley, 1933). Aquaculture. 15:173-180.
- Zilberberg C, Maldonado M, Solé-Cava AM, 2006. Assessment of the relative contribution of asexual propagation in a population of the coral-excavating sponge *Cliona delitrix* from the Bahamas. Coral Reefs. 25:297-301.

L'étude de la population de C. fornicata au cours de trois saisons de reproduction nous a permis d'observer la rythmicité des patrons de reproduction et de recrutement et leurs implications sur les patrons de changement de sexe. Cette rythmicité couplée à une variabilité inter-annuelle dans l'intensité du recrutement a induit de profonde modification démographique et sexuelle dans la population. Ces résultats soulignent l'importance de poursuivre des études intra-population, encore trop rares, pour évaluer la flexibilité du changement de sexe au sein des espèces et préciser les conditions d'évolution de tels mécanismes.

PARTIE IV

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

IV-A. SYNTHÈSE DES RESULTATS

Cette thèse a eu pour objectif d'étudier les liens entre les patrons de changement de sexe et d'autres traits d'histoires de vie tels que la polyandrie, la grégarité ou encore le potentiel de dispersion larvaire, en travaillant à partir de données issues d'analyses ou de suivis de populations naturelles chez deux espèces proches du genre *Crepidula*, *C. convexa* et *C. fornicata*.

Les résultats obtenus par l'étude des processus intervenant sur trois étapes clés du cycle de vie de *C. fornicata*, (i) la dispersion, (ii) le recrutement et (iii) le changement de sexe, permettent de proposer un scénario d'interactions entre les compartiments benthiques et pélagiques constituant la population. Ces interactions sont schématisées dans la figure IV-A-1.

Le suivi de la dynamique démographique d'une population de crépidules durant plus de 3 années a montré une stabilité des patrons de reproduction de la population benthique tels que décrits par la présence de femelles ovigères, autant en termes de saisonnalité que d'effort reproducteur (Chap IIIA). Elles ne semblent pas affectées par la présence de l'éponge perforante *Cliona celata*, dont le degré d'infestation s'avère élevé chez les femelles en comparaison du reste de la population (Chap IIIC). Cette régularité et importance de l'effort reproducteur des femelles peut être mis en relation avec les capacités de stockage spermatique des femelles ainsi que des schémas de reproduction internes aux « chaînes » tels que révélés au cours des analyses de paternité (Chap. IIA).

La dynamique d'arrivée des post larves dans la population semble également régulière d'une année sur l'autre, se couplant bien aux périodes de reproduction et de présence de larves dans la colonne d'eau. En revanche, une importante variation inter-annuelle du taux de sédentarisation, à mettre en relation avec la variabilité du milieu, a été observée. En particulier, deux événements de sédentarisation majeurs ont été notés au cours des deux dernières années de ce suivi, entraînant un changement dans la structure démographique, depuis une population dominée par des individus âgés jusqu'à une situation où les plus jeunes groupes d'âge représentent une proportion importante de la population (Chap. IIIA). L'analyse de l'évolution des patrons de changement de sexe au cours du temps dans cette même population a montré que la dynamique de réversion sexuelle répondait au patron saisonnier de sédentarisation, avec un

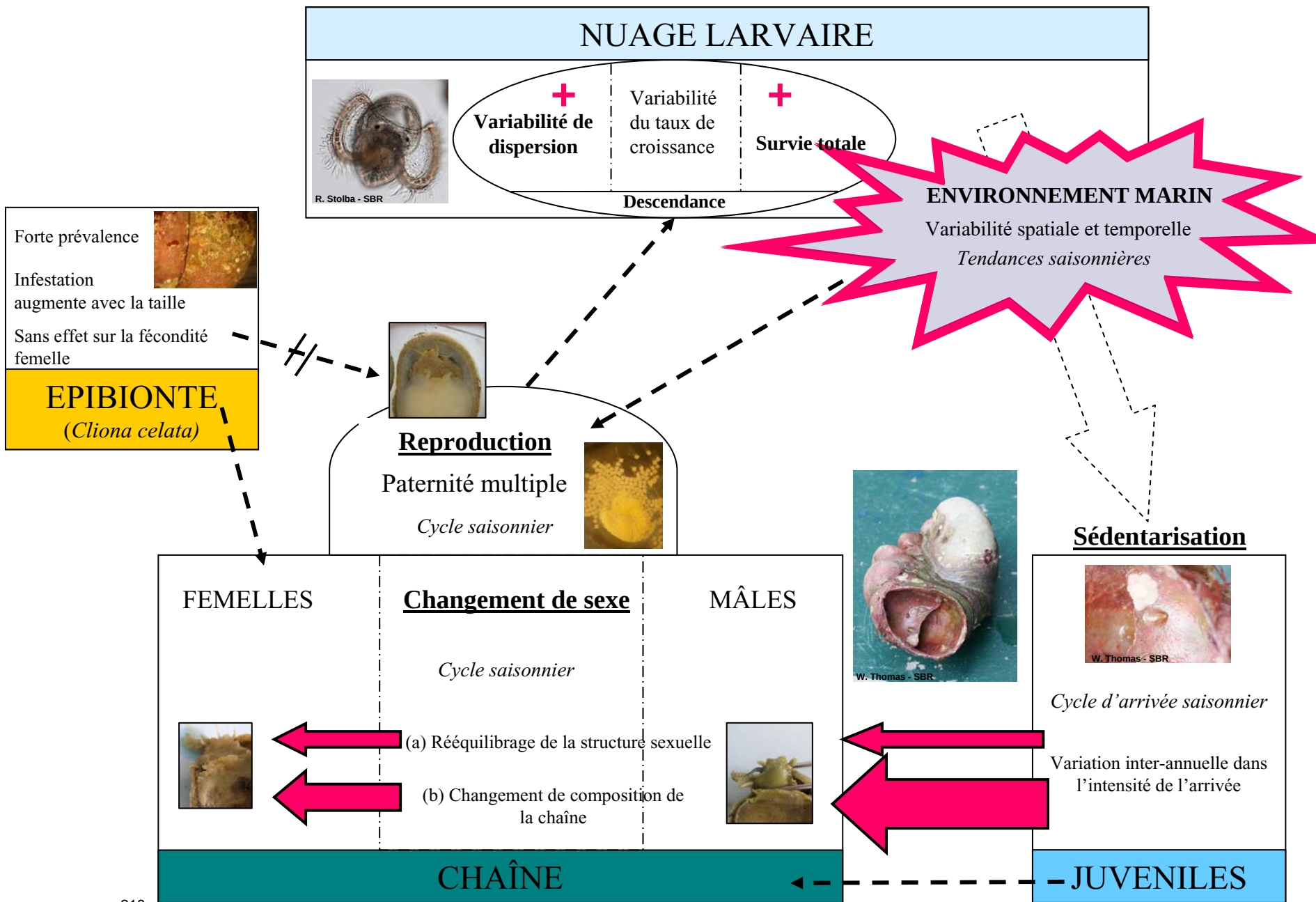


Fig. IV-A-1. Schéma général des interactions entre les différentes composantes du cycle de vie et de reproduction chez *C. fornicata*

délai conforme aux attendus chez cette espèce protandre à déterminisme « environnemental » (i.e. ici social) du sexe (Chap IIIB). Un rééquilibrage de la composition sexuelle a été ainsi observé suite au premier événement de recrutement (« modéré »). Cependant, en cas de recrutement majeur, comme observé durant les deux dernières années du suivi, la structure sexuelle de la population se trouve profondément modifiée, malgré le maintien des processus saisonniers de changement de sexe visibles à l'échelle des chaînes d'individus, validant ainsi l'hypothèse d'un contrôle social du sexe chez cette espèce en des conditions *in situ*.

La structure sexuelle globale de la population est modifiée du fait de l'augmentation de la proportion des chaînes composées d'un grand nombre d'individus, en réponse à des recrutements massifs (Chap IIIB). La composition des chaînes, en termes de nombre d'individus et de sex-ratio, est un élément majeur qui impacte directement les modalités de reproduction et plus précisément les croisements possibles. L'analyse moléculaire des profils de paternité chez des descendances issues de femelles prélevées dans la population suivie confirme la présence de polyandrie dans cette population et ainsi la probable ubiquité de ce type de reproduction chez *C. fornicata* (ChapIIA). **Les modifications de la composition des chaînes pourraient modifier le succès reproducteur des mâles en particulier via des mécanismes de compétitions entre mâles ou des choix cryptiques femelles.** En outre, ces patrons de reproduction ont une incidence sur les caractéristiques de la composante pélagique : la diversité des contributions paternelles joue sur la variabilité intra-ponte du taux de croissance larvaire (considéré généralement comme un indicateur des capacités de dispersion). Compte tenu de la grande variabilité spatiale et temporelle des paramètres environnementaux affectant la survie et la dispersion des larves, une variabilité des taux de croissance larvaire pourrait conférer une assurance reproductive à la mère par l'augmentation de la probabilité de survie d'au moins une partie de ces descendants.

L'ensemble de ces résultats démontre ainsi l'interaction étroite entre la dynamique de la population benthique, celle du nuage larvaire (via ses effets sur la sédentarisation) et celle du changement de sexe. **Le comportement fortement grégaire des individus de *C. fornicata* est le point central d'une telle interaction**, dans la mesure où les processus de changement de sexe et de reproduction sont modulés à l'échelle du groupe de reproducteurs défini par les chaînes de crépidules.

Si la protandrie est commune à l'ensemble des espèces du genre *Crepidula*, les comportements agrégatifs et les modes de développement y sont variables. Néanmoins, l'analyse des modalités de reproduction chez *C. convexa*, couplée aux résultats déjà connus chez *C. fornicata* et *C. coquimbensis* suggère **l'association entre protandrie et polyandrie au sein de ce genre, indépendamment du mode de développement (direct vs indirect) et du mode d'agrégation**. Deux stratégies, illustrées par la figure IV-A-2, pourraient être distinguées au sein de ces trois espèces de crépidules, toutes deux à l'origine d'une forte diversité génétique des populations naturelles en dépit des différences de cycle de vie:

- Chez *C. fornicata*, espèce à développement larvaire hautement grégaire, la présence d'une phase pélagique contribue à l'association d'individus non apparentés génétiquement diversifiés au sein des chaînes, mais ces dernières limitent la diversité des partenaires. La protandrie associée à la polyandrie peut apparaître comme un mécanisme compensateur permettant un équilibre des individus des deux sexes et une augmentation de la diversité de la descendance larvaire. La capacité à changer de sexe en fonction de l'environnement social chez *C. fornicata* est une caractéristique permettant d'accroître le degré de polyandrie. En effet, la compétition mâle-mâle est peut être ajustée au sein d'une ponte, certains individus retardant ou avançant le moment de leur changement de sexe. Ceci se traduit par un large chevauchement entre les tailles femelles et les tailles mâles.

- Chez *C. coquimbensis* et *C. convexa*, l'absence de phase larvaire est compensée par une importante mobilité des mâles qui accroît la diversité des partenaires rencontrés. La plus grande grégarité décrite chez *C. coquimbensis* est d'ailleurs liée à une moindre mobilité des mâles en comparaison de *C. convexa*. Ainsi le degré de polyandrie est lié à la probabilité de rencontre des partenaires sexuels. Chez *C. convexa*, les femelles isolées se sont avérées monoandres, du fait d'une faible fréquence de rencontre de partenaires et/ou une utilisation rapide du sperme. En revanche, lorsque les « conditions de rencontre » sont réunies, c'est-à-dire lorsque plusieurs individus sont associés, le niveau de polyandrie est similaire à celui des deux autres espèces.

Nos résultats suggèrent qu'au sein du genre *Crepidula*, l'intensité de la polyandrie pourrait dépendre des probabilités de rencontre entre les partenaires sexuels à une échelle intra- comme inter-spécifique.

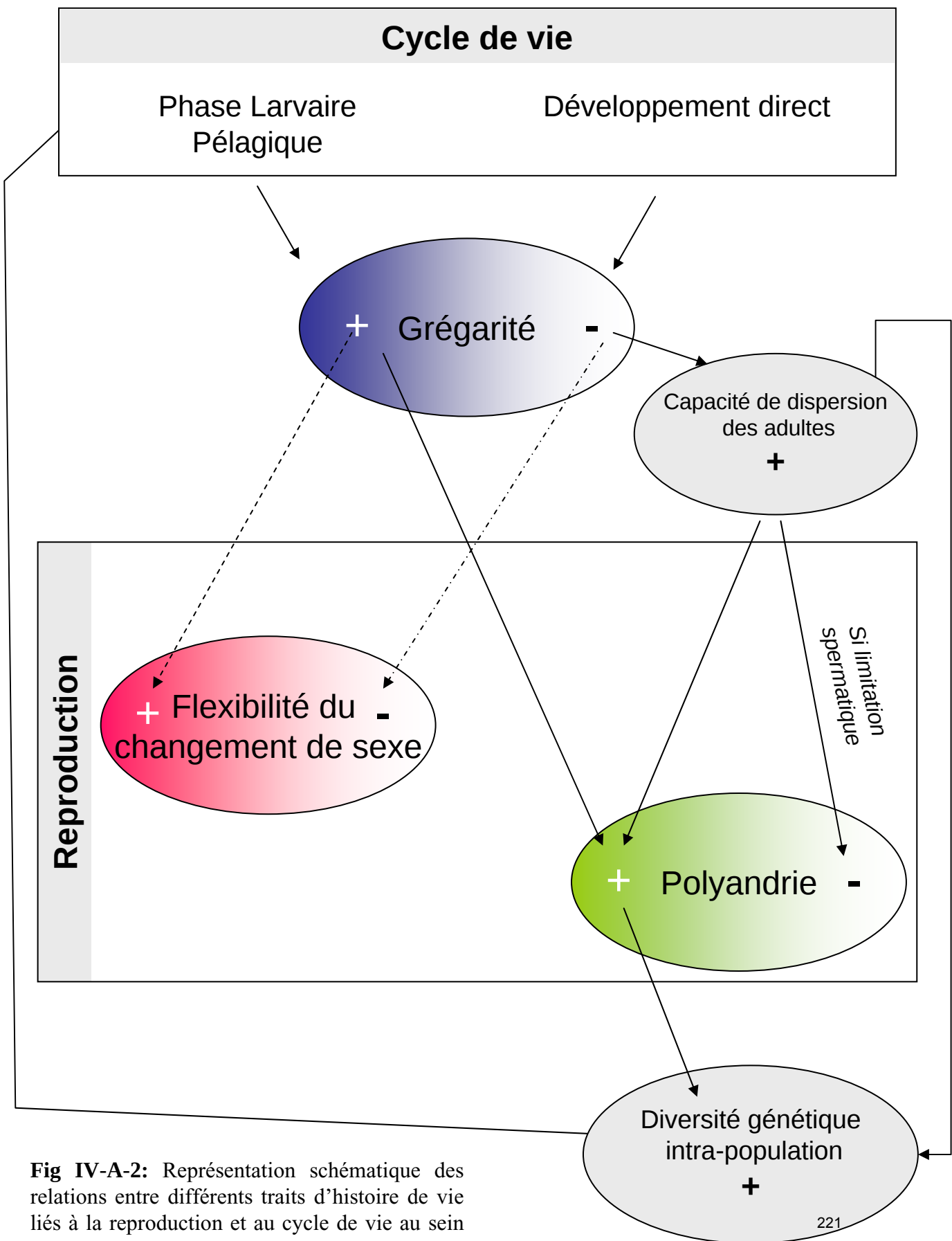


Fig IV-A-2: Représentation schématique des relations entre différents traits d'histoire de vie liés à la reproduction et au cycle de vie au sein du genre *Crepidula*.

IV-B. PERSPECTIVES

IV-B-1. RELATION ENTRE PROTANDRIE, POLYANDRIE ET CYCLE DE VIE

Comme explicité ci-dessus, l'étude des modalités de la reproduction chez *C. convexa* et la mise en perspective de ces résultats avec ceux connus chez *C. fornicata* et *C. coquimbensis* a permis de caractériser les relations existant entre la biologie de ces espèces, en termes de développement et de grégarité, et les processus de reproduction et de changement de sexe. La diversité des cycles de vie est telle au sein du genre *Crepidula* que l'étude de nouvelles espèces permettrait de valider les hypothèses proposées et d'affiner notre compréhension des interactions entre ces différents traits de vie. A court terme, l'espèce *C. plana*, espèce vivant en sympatrie avec *C. fornicata* et *C. convexa* sur la côte Nord-Est des Etats-Unis, apparaît particulièrement intéressante à étudier pour compléter le « tableau ébauché » ci-dessus. En effet, cette espèce présente un cycle benthopélagique et les adultes sont peu mobiles. La plupart vivent en petits groupes, à l'intérieur de coquilles de gastéropodes occupées par *Eupagurus bernhardus* (Conklin 1898). L'étude des distributions de tailles mâles et femelles et l'analyse moléculaire des modalités de reproduction chez cette espèce permettrait de voir où se situe cette espèce par rapport aux deux stratégies discutées plus haut (IV-A), et d'étudier l'importance relative des modes de développement et des comportements agrégatifs dans la modulation du déterminisme du changement de sexe et des patrons de reproduction.

IV-B-2. COMMUNICATION ENTRE INDIVIDUS : ETUDES DES FACTEURS PROXIMAUX IMPLIQUES DANS L'AGREGATION ET LA RECONNAISSANCE DU SEXE

Les résultats obtenus au cours de cette thèse soulignent l'importance de la grégarité et de l'environnement local social dans la modulation de processus de reproduction et de changement de sexe (cf. Partie III). Dans ce contexte, il serait intéressant de coupler ces résultats avec des approches d'écologie chimique, afin de vérifier la présence et préciser la nature de signaux proximaux intervenant d'une part dans l'attraction entre individus conspécifiques (adultes-jeunes

adultes ou larves-adultes) mais également dans les interactions entre partenaires sexuels (mâles-femelles).

Le comportement grégaire des larves de certaines espèces benthopélagiques a été montré comme un paramètre pouvant grandement affecter la distribution des populations adultes (Pawlik 1992). Chez *C. fornicata*, Pechenik & Heyman (1987), en soumettant des larves à de l'eau conditionnée par des adultes (y ayant résidé entre 24 et 36 heures), ont démontré que la présence d'adultes induisait la métamorphose chez les larves, et ceci par l'émission d'un signal chimique dans la colonne d'eau. L'origine et la nature de ces signaux sont mal connues et une étude précise de différents inducteurs pourrait par exemple permettre de préciser si le patron observé par Pechenik & Heyman (1987) résulte effectivement d'un signal émis par les adultes ou si d'autres inducteurs entrent en jeu. Parmi ces autres inducteurs, les épibiontes présents à la surface de la coquille des adultes sont des candidats particulièrement intéressants. Les coquilles de crépidules sont en effet colonisées par une grande variété d'organismes dont certains largement étudiés pour leurs effets chimiques : les algues encroûtantes de la famille des Corallinacées. Ces algues relâchent une substance chimique, le dibromométhane (DBM), qui induit la métamorphose de certaines larves d'invertébrés marins (e.g. les espèces d'oursins *Strongylocentrotus nudus* et *Strongylocentrotus intermedius*, Agatsuma *et al.* 2006) dont *C. fornicata* (Taris *et al.* in prep. ; F. Viard & T. Comtet données non publiées).

Dans le cadre de l'étude de l'éponge perforante *Cliona celata* sur la crépidule, j'ai réalisée deux séries d'expériences préliminaires pour tester les effets (positifs ou négatifs) de cette éponge perforante sur la métamorphose des larves. Ces résultats illustrés dans les encadrés Expérience 1 et Expérience 2, sont exploratoires et constituent ici uniquement une base de réflexion pour l'élaboration d'études plus poussées. L'expérience 1 a montré que l'induction de la métamorphose des larves est supérieure dans tous les traitements à celle du contrôle (i.e. larves dans de l'eau de mer filtrée), suggérant que la présence d'adultes vivants n'est pas une condition exclusive de la présence d'inducteur. Toutefois le taux de métamorphose est toujours le plus faible dans les traitements avec des coquilles seules (i.e absence des adultes vivants). Le résultat de l'expérience 2 est intrigant car, malgré des écart-types importants, les moyennes de taux de métamorphoses les plus élevées sont constatées pour les traitements où la clione est présente,

Expérience 1 : EFFET DE *CLIONA CELATA* ET DE LA PRESENCE D'ADULTES DE *CREPIDULA FORNICATA* SUR LA METAMORPHOSE DES LARVES DE CREPIDULES

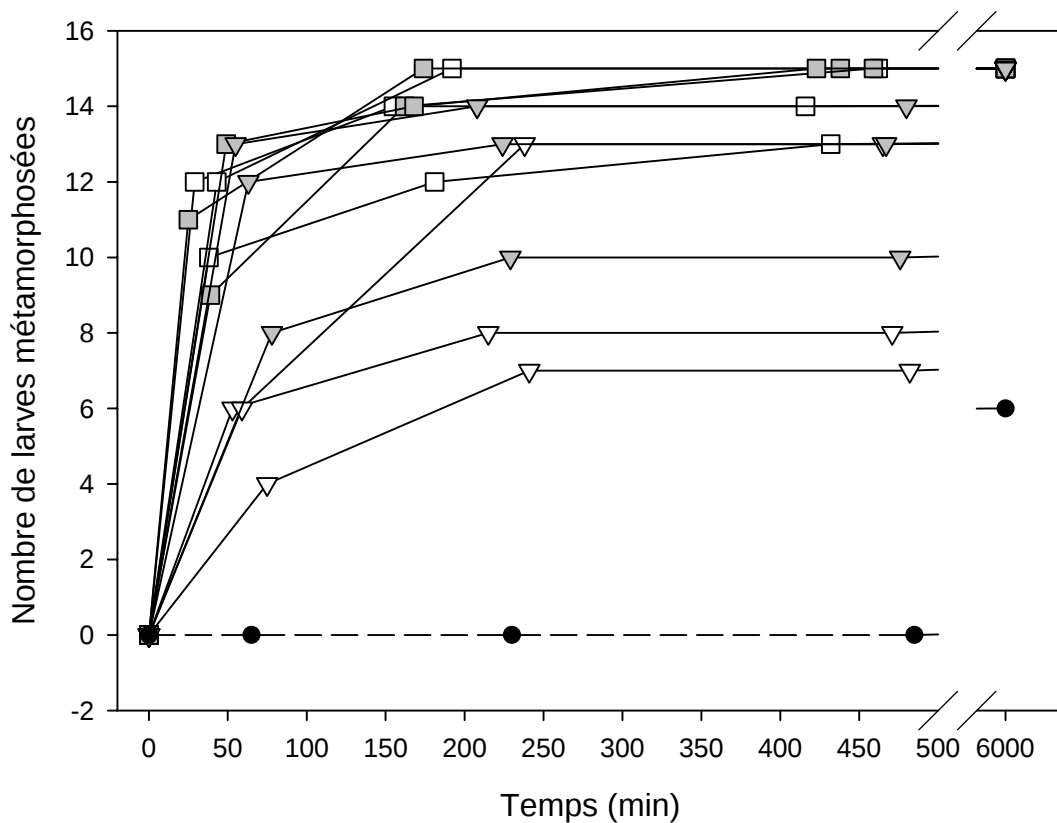
Protocole : 15 larves compétentes ont été isolées dans des récipients contenant :

- (a) Femelle vivante + Base sans *Cliona celata* □
- (b) Femelle vivante + Base avec *Cliona celata* (individus lourdement infestés) ■
- (c) Coquille de femelles sans *Cliona celata* ▽
- (d) Coquille de femelles avec *Cliona celata* (individus lourdement infestés) ▾
- (e) Un contrôle : récipient contenant seulement 15 larves ●

Trois réplicats de chaque traitement ont été effectués

Les tailles des femelles et des coquilles ont été contrôlées

Le nombre de larves métamorphosées a été noté à intervalles réguliers au cours du temps



Evolution du nombre de larves métamorphosées au cours du temps pour les différents traitements présentés ci-dessus.

Expérience 2 : EFFET DE *CLIONA CELATA* ET DE LA PRESENCE D'ALGUES ENCROUTANTES SUR LA METAMORPHOSE DES LARVES DE CREPIDULES :

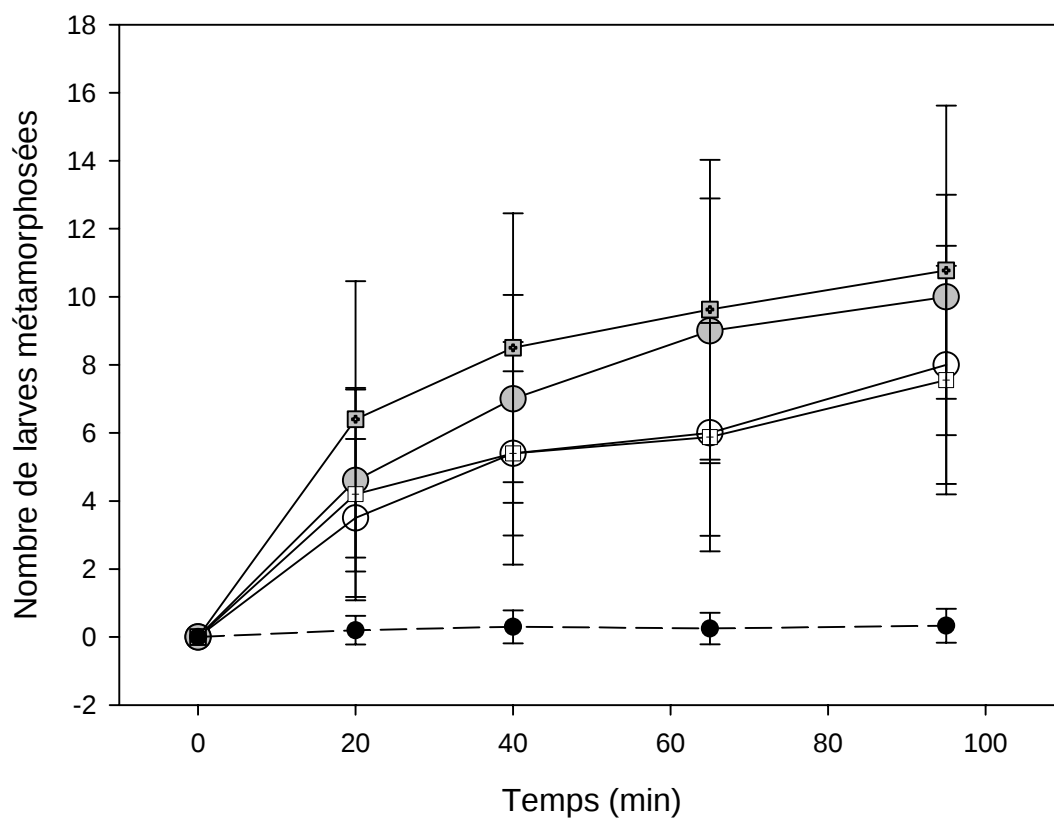
Protocole : 20 larves compétentes ont été isolées dans des récipients contenant :

- (a) Coquille sans algue encroûtant et sans *Cliona celata* ○
- (b) Coquille sans algue encroûtant et avec *Cliona celata* ●
- (c) Coquille avec algue encroûtant et sans *Cliona celata* □
- (d) Coquille avec algue encroûtant et avec *Cliona celata* ■
- (e) Un contrôle : récipient contenant seulement 20 larves ●

Cinq réplicats de chaque traitement ont été effectués

Les tailles des coquilles ont été contrôlées

Le nombre de larves métamorphosées a été noté à intervalles réguliers au cours du temps



Evolution du nombre de larves métamorphosée au cours du temps. Chaque point représente la moyenne et l'écart-type des 5 réplicas effectués pour chaque traitement présenté ci-dessus.

indépendamment de la présence d'algues encroûtantes. Nous avons constaté lors du suivi une augmentation des taux d'individus au stade 3 d'infestation et en parallèle une augmentation des proportions de juvéniles dans la population suivie. Se pourrait-il que la clone ait été, en partie, à l'origine de la sédentarisation massive de juvéniles observée en 2006 et 2007 dans la population étudiée? Les résultats de l'expérience 2 sont trop préliminaires pour soutenir cette hypothèse : la construction d'un protocole combinant une approche expérimentale qui permettra d'identifier la source des inducteurs et de quantifier leurs effets, à une approche d'écologie chimique visant à caractériser la nature des substances inductrices serait nécessaire pour comprendre le comportement de sédentarisation des larves de *C. fornicata*.

En étudiant les effets de *C. celata*, j'ai également réalisé quelques petites expériences visant à déterminer si l'infestation de l'éponge perforante pouvait influencer le pouvoir attractif des femelles sur de jeunes mâles, encore mobiles. De jeunes mâles de tailles similaires avaient été isolés dans des pondoires avec deux femelles, l'une lourdement infestée par l'éponge perforante et l'autre vierge d'infestation, toutes deux situées à égale distance du mâle. Les mouvements des jeunes mâles avaient été notés au cours du temps. Six séries d'expériences avec 10 pondoires chacune ont été menées. Les résultats avaient été décevants car 76% ne s'étaient pas associés à des femelles. Parmi les 24% restant, 60% se groupaient de préférence avec des femelles sans *C. celata*. D'autres expériences seraient clairement nécessaires pour confirmer ou infirmer cette tendance. En revanche, la faible attraction générale des femelles peut être expliquée par les récents résultats de Ambrogio & Pechenik (2008) qui ont montré que les mâles de *C. fornicata* semblent s'associer de préférence à d'autres mâles plutôt qu'avec des femelles. Ce comportement pourrait être interprété comme un « pari sur l'avenir » suggérant le potentiel avantage à s'associer avec un mâle susceptible de changer de sexe en réponse à cette association. Ces résultats sont intéressants à resituer dans le cadre du rôle des « jeunes mâles mobiles », une hypothèse souvent avancée dans les analyses de paternité chez *C. fornicata* pour expliquer les quelques pourcents de jeunes non assignés à des individus de la chaîne. Si effectivement les jeunes mâles sont attirés de préférence par d'autres mâles, nous devrions observer des taux de larves non assignées plus importants dans le cas de chaînes où la proportion de femelles est la plus grande.

Des communications chimiques peuvent également intervenir entre individus adultes, notamment pour la reconnaissance des sexes préalable à un déterminisme social de changement

de sexe. Il a été depuis longtemps constaté (Coe 1938) que les mâles isolés changeaient de sexe rapidement. Durant cette thèse, j'ai également observé ce processus (réversion sexuelle de l'ordre d'un mois) pour des mâles isolés physiquement mais partageant le même milieu que d'autres individus mâles. Les questions sur ce point sont nombreuses. Par exemple, dans quelle mesure le contact est-il nécessaire dans la reconnaissance des sexes ? Quelles sont les substances impliquées et à quelles distances les doses sont-elles efficaces (gradient de concentration) ? Des approches expérimentales (par exemple immerger des mâles de tailles équivalentes dans un milieu hébergeant des groupes d'individus de différents sex-ratio, avec une barrière physique) couplées à des études systématiques des molécules relarguées pourrait permettre de répondre à ces questions. Ces études de communications chimiques potentielles entre les adultes seraient encore plus intéressantes à mener chez des espèces où le comportement est non grégaire par exemple chez *C. convexa*. Ambrogio & Pechenik (2008) ont, en effet observé chez *C. convexa* un patron différent de celui observé chez *C. fornicata* : Chez *C. convexa*, les mâles s'associaient systématiquement avec des femelles, ce qui semble cohérent du fait de la présence fréquente de femelles isolées sur des substrats et pourtant reproductives. Compte tenu des résultats obtenus au cours de ma thèse sur les différences dans le degré de polyandrie des femelles en fonction du nombre d'individus par substrat, il serait intéressant de tester si l'attraction des mâles est plus forte pour les substrats contenant plusieurs femelles par rapport à des femelles isolées.

IV-B-3. PATRONS DE CHANGEMENT DE SEXE ET SUCCES REPRODUCTEUR MALE

Chez *C. convexa*, le chevauchement entre les tailles femelles et mâles est relativement faible mais il existe tout de même une flexibilité dans la taille au changement de sexe, particulièrement en comparaison de *C. coquimbensis* qui ne présente absolument aucun chevauchement de taille entre les deux sexes (Brown & Olivares 1996, Brante *et al.* in prep). Au cours de notre étude de modalités de reproduction de *C. convexa*, peu de pères ont été échantillonnés, néanmoins ces derniers présentaient tous une taille élevée par rapport aux autres mâles et qui correspondait à celle des petites femelles de la population. Par ailleurs ces mâles participaient de façon souvent majoritaire à la descendance. Plusieurs hypothèses seraient à tester pour expliquer ce résultat : (1) vérifier si la mobilité des grands mâles est équivalente à celle des petits mâles, le cas contraire expliquerait la probabilité plus élevée d'échantillonner les grands

pères à proximité de la mère. (2) A partir d'une certaine taille, le succès à la copulation pourrait déclencher la réversion sexuelle, entraînant la sédentarisation de ces individus et (3) le succès reproducteur pourrait être supérieur chez les grands mâles, hypothèse qui expliquerait à la fois la forte contribution observée et la présence d'une flexibilité dans le changement de sexe, mais s'opposant par contre à l'hypothèse d'avantage à la taille (Charnov 1982; Ghiselin 1969). Plus généralement, il serait important de caractériser la mobilité des individus de *C. convexa* : (1) estimer sur quelle distance se font ces déplacements par un échantillonnage spatial fin et des analyses génétiques d'apparentement des individus, et (2) mesurer l'incidence réelle de l'association avec *Pagurus sp* sur cette mobilité et les probabilités de rencontres entre individus.

Chez *C. fornicata*, les modalités de reproduction sont beaucoup plus documentées que chez les autres espèces du genre. Néanmoins dans toutes les études d'analyse de paternité menées jusqu'alors sur cette espèce, la descendance d'une seule femelle de la chaîne a été étudiée. Il conviendrait d'analyser ces processus à l'échelle d'une chaîne entière, c'est-à-dire d'étudier simultanément toutes les descendance des différentes femelles présentes dans une chaîne. Cette expérience est envisageable à partir de femelles prélevées dans le milieu naturel au pic de reproduction pendant lequel les taux de femelles portant des pontes sont de l'ordre de 90% (voir les résultats du chapitre III-A et III-B) avec certaines chaînes présentant 100% des femelles avec des pontes. Une telle étude permettrait d'évaluer le succès reproducteur mâle total à un temps t et surtout permettrait de comparer la distribution des contributions paternelles en fonction de la position des différentes femelles. Globalement, on trouve chez *C. fornicata* une association relative entre la proximité des mâles et le taux de paternité sur la femelle de la base de la chaîne et une contribution des mâles situés dans des positions supérieures (e.g. jusqu'à 5 individus au dessus de la femelle ; Dupont *et al.* 2006). Cependant, rien n'est documenté pour les femelles en position intermédiaires qui pourraient montrer des taux de polyandrie plus faibles (i.e. copulations restreintes aux mâles situés au dessus ?).

En parallèle de ces analyses, des expériences de croisement en conditions contrôlées seraient intéressantes à réaliser, en dépit de la difficulté de les mener à bien chez une espèce longévive à fécondation interne (nécessitant par exemple la mise au point de systèmes d'insémination). De telles expériences permettraient notamment de tester si des paramètres tels

que la taille des mâles, l'ordre d'accouplement ou encore la quantité de sperme, sont susceptibles de moduler le succès reproducteur.

Enfin, nous avons mis en évidence le rôle des contributions paternelles sur la variabilité des taux de croissance larvaire. Une analyse similaire sur d'autres traits déterminants pour la survie de la descendance, dont les caractéristiques sont déjà documentées chez cette espèce, tels que le délai à la métamorphose ou la croissance juvénile, serait nécessaire pour vérifier si un tel patron s'applique à différents traits dans la descendance.

En conclusion, ce travail de thèse a fait appel à différentes approches (démographie, analyse de paternités) et s'est intéressé à différentes échelles (inter- et intra-spécifique) pour étudier des processus s'étant déroulés dans une population naturelle et évaluer leurs interactions à l'échelle de l'espèce. Ces résultats pourraient servir de base de réflexion à des approches expérimentales, indispensables pour confirmer et expliquer les hypothèses soulevées par ces travaux. Il conviendrait également de confronter ces données obtenues à une plus large gamme de populations, en particulier dans son aire d'origine, les processus d'introduction étant susceptibles de modifier les traits d'histoire de vies, en réponse à un nouvel environnement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(Hors articles)

A

-
- Agatsuma, Y., T. Seki, K. Kurata, et K. Taniguchi. 2006. Instantaneous effect of dibromomethane on metamorphosis of larvae of the sea urchins *Strongylocentrotus nudus* and *Strongylocentrotus intermedius*. *Aquaculture* **251**:549-557.
- Allsop, D. J. et S. A. West. 2003a. Changing sex at the same relative body size - Similar forces may select for gender switching across taxa in all animals with this facility. *Nature* **425**:783-784.
- Allsop, D. J. et S. A. West. 2003b. Constant relative age and size at sex change for sequentially hermaphroditic fish. *Journal of Evolutionary Biology* **16**:921-929.
- Allsop, D. J. et S. A. West. 2004. Sex-ratio evolution in sex changing animals. *Evolution* **58**:1019-1027.
- Amar, K. O., M. E. Chadwick, et B. Rinkevich. 2007. Coral planulae as dispersion vehicles: biological properties of larvae released early and late in the season. *Marine Ecology Progress Series* **350**:71-78.
- Ambrogio, O. et J. Pechenik. 2008. When is a male not a male? Sex recognition and choice in two sex-changing species. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **62**:1779-1786.
- Arnqvist, G. et T. Nilsson. 2000. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour* **60**:145-164.

B

-
- Baeza, J. A. et R. T. Bauer. 2004. Experimental test of socially mediated sex change in a protandric simultaneous hermaphrodite, the marine shrimp *Lysmata wurdemanni* (Caridea: Hippolytidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **55**:544-550.
- Baldwin, A. P. et R. T. Bauer. 2003. Growth, survivorship, lifespan, and sex change in the hermaphroditic shrimp *Lysmata wurdemanni* (Decapoda: Caridea: Hippolytidae). *Marine Biology* **143**:157-166.
- Baur, B. 1998. Sperm competition in molluscs. Pages 255-305 in T. R. Birkhead and A. P. Møller, editors. *Sperm competition and sexual selection*. Academic Press, London.
- Bergström, B. I. 1997. Do protandric pandalid shrimp have environmental sex determination? *Marine Biology* **128**:397-407.

- Birkhead, T. R. 1998. Sperm competition in birds. *Reviews of Reproduction* **3**:123-129.
- Birkhead, T. R. et A. P. Møller. 1998. Sperm competition and sexual selection. Academic Press, London.
- Blanchard, M. 1995. Origin and present state of the slipper limpet (*Crepidula fornicata*) population, (*Gastropoda Prosobranchia*) on French coasts. *Haliotis* **24**:75-86.
- Blanchard, M. 1997. Spread of the slipper limpet *Crepidula fornicata* (L.1758) in Europe. Current state and consequences. *Scientia marina* **61**:109-118.
- Brante, A. 2007. Intracaspular limitations in two gastropod species with contrasting developmental modes: *Crepidula fornicata* and *C. coquimbensis* Pontificia Universidad Católica de Chile & Université Pierre & Marie Curie, Santiago.
- Brante, A., M. Fernández, et F. Viard. In prep. Microsatellite evidence for sperm storage and extreme multiple paternity in the adelphophagic protandrous gastropod *Crepidula coquimbensis*.
- Bretman, A., N. Wedell, et T. Tregenza. 2003. Molecular evidence of post copulatory inbreeding avoidance in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Proceedings of the Royal Society, Serie B : Biological Sciences* **271**:159-164.
- Brown, D. I. et C. A. Olivares. 1996. A new species of *iCrepidula/i* (Mollusca: Mesogastropoda: Calyptraeidae) from Chile: additional characters for the identification of eastern Pacific planar *iCrepidula/i* group. *Journal of Natural History* **30**:1443-1458.
- Buston, P. M. 2003. Size and growth modification in the clownfish. *Nature* **424**:145-146.
- Buston, P. M., P. L. Munday, et R. R. Warner. 2004. Sex change and relative body size in animals. *Nature* **428**:1.

C

-
- Cabioch, L. 1968. Contribution à la connaissance des peuplements benthiques de la Manche occidentale. *Cahiers de Biologie Marine* **9**:493-720.
- Caley, M. J., M. H. Carr, M. A. Hixon, T. P. Hughes, G. P. Jones, et B. A. Menge. 1996. Recruitment and local dynamics of open marine populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**:477-500.
- Charnov, E. L. 1982. The theory of sex allocation. **Vol. 18**:Princeton.

- Charnov, E. L. 1993. Life history invariants: some explorations of symmetry in evolutionary ecology Oxford University Press, Oxford.
- Charnov, E. L. et J. Bull. 1977. When is sex environmentally determined? *Nature* **266**:828-830.
- Charnov, E. L. et J. J. Bull. 1989. Non-Fisherian Sex-Ratios with Sex Change and Environmental Sex Determination. *Nature* **338**:148-150.
- Charnov, E. L. et U. Skuladottir. 2000. Dimensionless invariants for the optimal size (age) of sex change. *Evolutionary Ecology Research* **2**:1067-1071.
- Chen, M. H. et K. Soong. 2002. Estimation of age in the sex-changing, coral-inhabiting snail *Coralliophila violacea* from the growth striae on opercula and a mark-recapture experiment. *Marine Biology* **140**:337-342.
- Chen, M. H., K. Soong, et M. L. Tsai. 2004. Host effect on size structure and timing of sex change in the coral-inhabiting snail *Coralliophila violacea*. *Marine Biology* **144**:287-593.
- Chiba, S., S. Goshima, et T. Mizushima. 2000. Factors affecting the occurrence of early maturing males in the protandrous pandalid shrimp *Pandalus latirostris*. *Marine Ecology Progress Series* **203**:215-224.
- Chiba, S., S. Goshima, et Y. Shinomiya. 2003. Male-male competition selects for delayed sex change in the protandrous shrimp *Pandalus latirostris*. *Marine Biology* **142**:1153-1157.
- Chipperfield, P. N. J. 1951. The breeding of *Crepidula fornicata* in the River Blackwater, Essex. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **30**:49-71.
- Cipriani, R. et R. Collin. 2005. Life-history invariants with bounded variables cannot be distinguish from data generated by random processes using standard analyses. *Journal of Evolutionary Biology* **18**:1613-1618.
- Cobb, W. R. 1969. Penetration of calcium carbonate substrates by the boring sponge *Cliona*. *American Zoologist* **9**:783-790.
- Coe, W. R. 1938. Conditions influencing change of sex in mollusks of the genus *Crepidula*. *The journal of experimental zoology* **77**:401-424.
- Coe, W. R. 1942. The reproductive organs of the posobranch mollusk *Crepidula onyx* and their transformation during the change from male to female phase. *Journal of Morphology* **71**:501-512.
- Coe, W. R. 1953. Influence of association, isolation, and nutrition on the sexuality of snails of the genus *Crepidula*. *The journal of experimental zoology* **122**:5-19.

- Cole, K. S. et D. Y. Shapiro. 1995. Social facilitation and sensory mediation of adult sex change in a cryptic, benthic marine goby. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **186**:65-75.
- Collin, R. 1995. Sex, size and position: a test of models predicting size at sex change in the protandrous gastropod *Crepidula fornicata*. *The American Naturalist* **146**.
- Collin, R. 2003. Worldwide patterns in mode of development in calyptraeid gastropods. *Marine Ecology Progress Series* **247**:103-122.
- Collin, R. 2006. Sex ratio, life-history invariants, and patterns of sex change in a family of protandrous gastropods. *Evolution* **60**:735-745.
- Collin, R. et D. McHugh. 2004. Phylogenetic effects, the loss of complex characters, and the evolution of development in Camypteraeid gastropods. *Evolution* **58**:1488-1502.
- Collin, R., M. McLellan, K. Gruber, et C. Bailey-Jourdain. 2005. Effects of conspecific associations on size at sex change in three species of calyptraeid gastropods. *Marine Ecology-Progress Series* **293**:89-97.
- Coma, R., M. Ribes, J.-M. Gili, et M. Zabala. 2000. Seasonality in coastal benthic ecosystems. *Trends in Ecology & Evolution* **15**:448-453.
- Conklin, E. G. 1898. Environmental and sexual dimorphism in *Crepidula*. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* **50**:435-444.
- Cowen, R. K., K. M. Lwiza, M. S. Sponaugle, C. B. Paris, et D. B. Olson. 2000. Connectivity of marine populations: open or closed? *Science* **287**:857-859.

D

-
- Deslous-Paoli, J.-M. 1985. *Crepidula fornicata* L. (gastéropode) dans le bassin de Marennes-Oléron : structure, dynamique et production d'une population. *Oceanologica Acta* **8**:453-460.
- Dunstan, P. K. et N. Bax. 2007. How far can marine species go? Influence of population biology and larval movement on future range limits. *Marine Ecology Progress Series* **344**:15-28.
- Dupont, L. 2004. Invasion des côtes françaises par le mollusque exotique *Crepidula fornicata* : contribution de la dispersion larvaire et du système de reproduction au succès de la colonisation. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie, Paris.

- Dupont, L., D. Bernas, et F. Viard. 2007. Sex and genetic structure across age groups in populations of the European marine invasive mollusc, *Crepidula fornicata* L. (Gastropoda). *Biological Journal of the Linnean Society* **90**:365-374.
- Dupont, L., D. Jollivet, et F. Viard. 2003. High genetic diversity and ephemeral drift effects in a successful introduced mollusc (*Crepidula fornicata*: Gastropoda). *Marine Ecology Progress Series* **253**:183-195.
- Dupont, L., J. Richard, Y. M. Paulet, G. Thouzeau, et F. Viard. 2006. Gregariousness and protandry promote reproductive insurance in the invasive gastropod *Crepidula fornicata*: evidence from assignment of larval paternity. *Molecular Ecology* **15**:3009-3021.

E

- Eberhard, W. G. et C. Cordero. 1995. Sexual selection by cryptic female choice on male seminal products - a new bridge between sexual selection and reproductive physiology. *Trends in Ecology and Evolution* **10**:493-496.
- Eckert, G. L. 2003. Effects of the planktonic period on marine population fluctuations. *Ecology* **84**:372-383.
- Edwards, K. P., J. A. Hare, F. E. Werner, et H. Seim. 2007. Using 2-dimensional dispersal kernels to identify the dominant influences on larval dispersal on continental shelves. *Marine Ecology Progress Series* **352**:77-87.
- Evans, J. P., F. Garcia-Gonzales, et D. J. Marshall. 2007. Sources of genetic and phenotypic variance in fertilization rates and larval traits in a sea urchin. *Evolution* **61**:2832-2838.
- Evans, J. P. et D. Marshall. 2005. Male-by-female interactions influence fertilization success and mediate the benefits of polyandry in the sea urchin *Heliocidaris erythrogramma*. *Evolution* **59**:106-112.

F

-
- Fromont, J. et P. R. Bergquist. 1994. Reproductive biology of three sponge species of the genus *Xestospongia* (Porifera: Demospongiae: Petrosida) from the Great Barrier Reef. *Coral Reefs* **13**:119-126.
- Frontier, S. et D. Pichod-Viale. 1991. Ecosystèmes : structure, fonctionnement, évolution. Masson, Paris.

G

-
- Gaffney, P. M. et B. McGee. 1992. Multiple paternity in *Crepidula fornicata* (Linnaeus). *The Veliger* **35**:12-15.
- Gaines, S. et J. Roughgarden. 1985. Larval settlement rate: a leading determinant of structure in an ecological community of the marine intertidal zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **82**:3707-3711.
- Gaines, S. D. et M. D. Bertness. 1992. Dispersal of juveniles and variable recruitment in sessile marine species. *Nature* **360**:579-580.
- Garcia-Gonzalez, F. et L. W. Simmons. 2007. Paternal indirect genetic effects on offspring viability and the benefits of polyandry. *Current Biology* **17**:32-36.
- Gardner, A., D. J. Allsop, E. L. Charnov, et S. A. West. 2005. A Dimensionless Invariant for Relative Size at Sex Change in Animals: Explanation and Implications. *The American Naturalist* **165**:551-566.
- Ghiselin, M. T. 1969. The evolution of hermaphroditism among animals. *The Quarterly Review of Biology* **44**.
- Giese, A. C. et J. S. Pearse. 1974. Introduction: general principles. Pages 1-49 in A. C. Giese and J. S. Pearse, editors. *Reproduction of marine invertebrates*. Academic Press, New York.
- Gosselin, L. A. et P.-Y. Qian. 1997. Can bacterivory alone sustain larval development in the polychaete *Hydroides elegans* and the barnacle *Balanus amphitrite*? *Marine Ecology Progress Series* **161**:93-101.

Gosselin, T., B. Sainte-Marie, et L. Bernatchez. 2005. Geographic variation of multiple paternity in the American lobster, *Homarus americanus*. *Molecular Ecology* **14**:1517-1525.

H

Hart, M. W. 1995. What are the costs of small egg size for a marine invertebrate with feeding planktonic larvae? *The American Naturalist* **146**:415.

Hartman, W. D. 1958. Natural history of the marine sponges of the Southern New England. *Bulletin of the Peabody Museum of the Natural History* **12**:1-155.

Hellberg, M. E., R. S. Burton, J. E. Neigel, et S. R. Palumbi. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of marine science* **70**:273-290.

Heller, J. 1993. Hermaphroditism in molluscs. *Biological Journal of the Linnean Society* **48**:19-42.

Hendler, G. et D. R. Franz. 1971. Population dynamics and life history of *Crepidula convexa* say (Gastropoda: Posobranchia) in Delaware Bay. *Biological Bulletin* **141**:514-526.

Herzka, S. Z. 2005. Assessing connectivity of estuarine fishes based on stable isotope ratio analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **64**:58-69.

Hilbish, T. J., K. Sasada, L. S. Eyster, et J. A. Pechenik. 1999. Relationship between rates of swimming and growth in veliger larvae: genetic variance and covariance. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **239**:183-193.

Hoagland, K. E. 1975. Reproductive strategies and evolution in the genus *Crepidula* (Gastropod: Calyptraeidae). Harvard University, Cambridge, Massachusetts.

Hoagland, K. E. 1978. Protandry and the evolution of environmentally-mediated sex change: a study of the Mollusca. *Malacologia* **17**:365-391.

Hoeksema, B. W. 1983. Excavating Patterns and Spiculae Dimensions of the Boring Sponge *Cliona celata* from SW Netherlands. *Senckenbergiana marit.* **15**:55-85.

Hsieh, C.-h., C. S. Reiss, J. R. Hunter, J. R. Beddington, R. M. May, et G. Sugihara. 2006. Fishing elevates variability in the abundance of exploited species. *Nature* **443**:859-862.

J

-
- Jenkins, S. R. 2005. Larval habitat selection, not larval supply, determines settlement patterns and adult distribution in two chthamalid barnacles. *Journal of Animal Ecology* **74**:893-904.
- Jennions, M. D. et M. Petrie. 2000. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews* **75**:21-64.
- Johnson, M. P., A. L. Allcock, S. E. Pye, S. J. Chambers, et D. M. Fitton. 2001. The effects of dispersal mode on the spatial distribution patterns of intertidal molluscs. *Journal of Animal Ecology* **70**:641-649.
- Johnson, S. L. et P. O. Yund. 2007. Variation in multiple paternity in natural populations of a free-spawning marine invertebrate. *Molecular Ecology* **16**:3253-3262.
- Jollivet, D., A. Empis, M. C. Baker, S. Hourdez, T. Comtet, C. Jouin-Toulmond, D. Desbruyères, et P. A. Tyler. 2000. Reproductive biology, sexual dimorphism, and population structure of the deep sea hydrothermal vent scale-worm, *Branchipolynoe seepensis* (Polychaeta: Polynoidae). *Journal of the Marine Biological Association of the U. K.* **80**:55-68.
- Jones, G. P., S. Planes, et S. R. Thorrold. 2005. Coral reef fish larvae settle close to home. *Current Biology* **15**:1314-1318.

K

-
- Keough, M. J. et B. J. Downes. 1982. Recruitment of marine invertebrates: the role of active larval choices and early mortality *Oecologia* **54**:348-352.
- Kokko, H. et D. J. Rankin. 2006. Lonely hearts or sex in the city? Density-dependent effects in mating systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **361**:319-334.
- Krug, P. J. 2001. Bet-hedging dispersal strategy of a specialist marine herbivore: a settlement dimorphism among sibling larvae of *Alderia modesta*. *Marine Ecology Progress Series* **213**:177-192.

L

-
- Lamunyon, C. W. 2000. Sperm storage by female of the polyandrous noctuid moth *Heliothis virescens*. *Animal Behaviour* **59**:395-402.
- Lasbleiz, R. 2003. Etude de la distribution spatio-temporelle des larves de mollusques en baie du Mont Saint-Michel. Cas des bivalves et de la crépidule. Rapport de DES Sciences Naturelles. Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- 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*. Université de Caen, Caen.
- Leigh, E. G., E. L. Charnov, et R. R. Warner. 1976. Sex ratio, sex change and natural selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the US* **73**:3656-3660.
- Levin, L. A. 2006. Recent progress in understanding larval dispersal: new directions and digressions. *Integrative and Comparative Biology* **46**:282-297.
- Levin, L. A. et T. S. Bridges. 1995. Pattern and diversity in reproduction and development. Pages 1-48 *in* L. McEdward, editor. *Ecology of marine invertebrate larvae*. CRC Press, Boca Raton.
- Lewin, R. 1986. Supply-Side Ecology. *Science* **234**:25-27.
- Li, W. et J. A. Pechenik. 2004. A forced association between the slippersnail *crepidula convexa* and the hermit crab *Pagurus longicarpus*? possible influence of a third party. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **311**:339-354.
- Lima, G. M. et J. A. Pechenik. 1985. The influence of temperature on growth rate and length of larval life of the gastropod, *Crepidula plana* Say. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **90**:55-71.
- Lorion, J. 2005. Suivi temporel de *Crepidula fornicata* (Linné, 1758) en baie de Morlaix. Structure de la population et recrutement. Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- Lubet, P. et P. Le Gall. 1972. Recherches préliminaires sur la structure des populations de *Crepidula fornicata* Philb., mollusque mésogastéropode. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **97**:211-222.

M

-
- Makinen, T., M. Panova, et C. Andre. 2007. High Levels of Multiple Paternity in *Littorina saxatilis*: Hedging the Bets? *Journal of Heredity* **98**:705-711.
- Maldonado, M. et C. M. Young. 1999. Effects of the duration of larval life on postlarval stages of the demosponge *Sigmadocia caerulea*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **232**:9-21.
- Marshall, D. et J. P. Evans. 2005. The benefits of polyandry in the free-spawning polychaete *Galeolaria caespitosa*. *Journal of Evolutionary Biology* **18**:735-741.
- Marshall, D., J. A. Pechenik, et M. J. Keough. 2003a. Larval activity levels and delayed metamorphosis affect post-larval performance in the colonial ascidian *Diplosoma listerianum*. *Marine Ecology Progress Series* **246**:153-162.
- Marshall, D. et T. Uller. 2007. When is a maternal effect adaptive? *Oikos* **116**:1957-1963.
- Marshall, D. J., R. M. Allen, et A. J. Crean. 2008. The ecological and evolutionary importance of maternal effects in the sea. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* **46**:203-250.
- Marshall, D. J., T. F. Bolton, et M. J. Keough. 2003b. Offspring size affects the post-metamorphic performance of a colonial marine invertebrate. *Ecology* **84**:3131-3137.
- Marshall, D. J. et J. P. Evans. 2007. Context-dependent genetic benefits of polyandry in a marine hermaphrodite. *Biology Letters* **3**:685-688.
- Marshall, D. J. et M. J. Keough. 2008. The relationship between offspring size and performance in the sea. *The American Naturalist* **171**:214-224.
- Marteil, L. 1963. La crépidule (*Crepidula fornicata* L.) en France. *Science et Pêche* **121**:1-6.
- Maynard Smith, J. 1964. Evolution and the theory of games. *Amer. Sci.* **64**:41-45.
- Møller, A. P. 1992. Frequency of female copulations with multiple males and sexual selection. *The American Naturalist* **139**:1089.
- Molloy, P. P., N. B. Goodwin, I. M. Côté, J. D. Reynolds, et M. J. G. Gage. 2007. Sperm Competition and sex change: a comparative analysis across fishes. *Evolution* **61**:640-652.
- Morgan, S. G. 1995. Life and death in the plankton: larval mortality and adaptation. Pages 279-321 in L. McEdward, editor. *Ecology of marine invertebrate larvae*. CRC Press, Boca Raton.

- Munday, P. L., P. M. Buston, et R. R. Warner. 2006. Diversity and flexibility of sex-change strategies in animals. *Trends in Ecology and Evolution* **21**:89-95.
- Munday, P. L., M. J. Caley, et G. P. Jones. 1998. Bi-directional sex change in a coral-dwelling goby. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **43**:371-377.
- Munoz, R. C. et R. R. Warner. 2003. A new version of the size-advantage hypothesis for sex change: Incorporating sperm competition and size-fecundity skew. *The American Naturalist* **161**:749-761.
- Munoz, R. C. et R. R. Warner. 2004. Testing a new version of the size-advantage hypothesis for sex change: sperm competition and size-skew effects in the bucktooth parrotfish, *Sparisoma radians*. *Behavioral Ecology* **15**:129-136.

N

- Nee, S., N. Colegrave, S. A. West, et A. Grafen. 2005. The Illusion of Invariant Quantities in Life Histories. *Science* **309**:1236-1239.
- Neff, B. D. et T. E. Pitcher. 2005. Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Molecular Ecology* **14**:19-38.
- Neufeld, C. J. et A. R. Palmer. 2008. Precisely proportioned: intertidal barnacles alter penis form to suit coastal wave action. *Proceedings of the Royal Society of London B* **275**:1081-1087.
- Newcomer, S. D., J. A. Zeh, et D. W. Zeh. 1999. Genetic benefits enhance the reproductive success of polyandrous females. *PNAS* **96**:10236-10241.

O

- O'Connor, M. I., J. F. Bruno, S. D. Gaines, B. S. Halpern, S. E. Lester, B. P. Kinlan, et J. M. Weiss. 2007. Temperature control of larval dispersal and the implications for marine ecology, evolution, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**:1266-1271.
- Olive, P. J. W. 1995. Annual breeding cycles in marine invertebrates and environmental temperature: probing the proximate and ultimate causes of reproductive synchrony. *Journal of Thermal Biology* **20**:79-90.

- Oppliger, A., Y. Naciri-Graven, G. Ribi, et D. J. Hosken. 2003. Sperm length influences fertilization success during sperm competition in the snail *Viviparus ater*. *Molecular Ecology* **12**:485-492.
- Orton, J. H. 1909. On the occurrence of protandric hermaphroditism in the mollusc *Crepidula fornicata*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological sciences* **81**:468-484.

P

- Palmer, A. R. 1981. Do carbonate skeletons limit the rate of body growth? *Nature* **292**:150-152.
- Paterson, I. G., V. Partridge, et J. Buckland-Nicks. 2001. Multiple paternity in *Littorina obtusata* (Gastropoda, Littorinidea) Revealed by microsatellite analyses. *Biological Bulletin* **200**:261-267.
- Pawlik, J. R. 1992. Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates. *Oceanography and Marine Biology* **30**:273-335.
- Pearse, J. S. et R. A. Cameron. 1991. Echinodermata: Echinoidea. Pages 513-662 in A. C. Giese, J. S. Pearse, and V. B. Pearse, editors. *Reproduction of marine invertebrates. Echinodermata and Lophophorates VI* Boxwood Press.
- Pearse, J. S., V. B. Pearse, et K. K. Davis. 1986. Photoperiodic regulation of gametogenesis and growth in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Journal of Experimental Zoology* **237**:107-118.
- Pechenik, J. A. 1984. The relationship between temperature, growth-rate, and duration of planktonic life for larvae of the gastropod *Crepidula fornicata* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **74**:241-257.
- Pechenik, J. A. 1999. On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles. *Marine Ecology Progress Series* **177**:269-297.
- Pechenik, J. A., M. Blanchard, et R. Rotjan. 2004. Susceptibility of larval *Crepidula fornicata* to predation by suspension-feeding adults. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **306**:75-94.
- Pechenik, J. A. et C. C. Gee. 1993. Onset of metamorphic competence in larvae of the gastropod *Crepidula fornicata* (L.), judged by a natural and artificial cue. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **167**:59-72.

- Pechenik, J. A., T. Gleason, D. Daniels, et D. Champlin. 2001. Influence of larval exposure to salinity and cadmium stress on juvenile performance of two marine invertebrates (*Capitella* sp. I and *Crepidula fornicata*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **264**:101-114.
- Pechenik, J. A. et W. D. Heyman. 1987. Using KCl to determine size at competence for larvae of the marine gastropod *Crepidula fornicata* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **112**:27-38.
- Pechenik, J. A., T. J. Hilbish, L. S. Eyster, et D. Marshall. 1996. Relationship between larval and juvenile growth rates in two marine gastropods, *Crepidula plana* and *C. fornicata*. *Marine Biology* **125**:119-127.
- Pechenik, J. A., J. N. Jarrett, et J. Rooney. 2002. Relationships between larval nutritional experience, larval growth rates, juvenile growth rates, and juvenile feeding rates in the prosobranch gastropod *Crepidula fornicata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **280**:63-78.
- Pechenik, J. A. et S. H. Levine. 2007. Estimates of planktonic larval mortality using the marine gastropods *Crepidula fornicata* and *C. plana*. *Marine Ecology Progress Series* **344**:107-118.
- Pechenik, J. A. et G. M. Lima. 1984. Relationship between growth, differentiation, and length of larval life for individually reared larvae of the marine gastropod, *Crepidula fornicata*. *Biological Bulletin* **166**:537-549.
- Pineda, J. 2000. Linking larval settlement to larval transport: assumptions, potentials, and pitfalls. *Oceanography of the Eastern Pacific* **1**:84-105.
- Policansky, D. 1982. Sex change in plants and animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* **13**:471-495.
- Proestou, D. A., M. R. Goldsmith, et S. Twombly. 2008. Patterns of male reproductive success in *Crepidula fornicata* provide new insight for sex allocation and optimal sex change. *Biological Bulletin* **214**:194-202.

R

-
- Richard, J. 2005. *Crepidula fornicata* : un modèle biologique pour l'étude du rôle de la variabilité des caractères phénotypique(reproduction, croissance et nutrition) sur les processus de colonisation en milieu marin. Université de Bretagne Occidentale, Université de Genève, Genève.

- Richard, J., M. Huet, G. Thouzeau, et Y. M. Paulet. 2006. Reproduction of the invasive slipper limpet, *Crepidula fornicata*, in the bay of Brest, France. *Marine Biology* **149**:789-801.
- Rideout, R. M., E. A. Trippel, et M. K. Litvak. 2004. Paternal effects on haddock early life history traits. *Journal of Fish Biology* **64**:695-701.
- Rigal, F. 2009. Dynamique spatio-temporelle du nuage larvaire du gastéropode introduit *Crepidula fornicata* au sein d'une baie mégatidale, la baie de Morlaix (France, Finistère). Thèse de doctorat. Université de Pierre et Marie Curie, Paris.
- Rigal, F., T. Comtet, et F. Viard. In prep-a. Does larval supply explain the low proliferation of the invasive gastropod *Crepidula fornicata* in a tidal estuary?
- Rigal, F., T. Comtet, et F. Viard. In prep-b. Invasion in a changing world: can increase in temperature promote connectivity in a marine invader?
- Ronce, O. 2007. How does it feel to be like a rolling stone? Ten questions about dispersal evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **38**:231-253.
- Rosell, D., M. J. Uriz, et D. Martin. 1999. Infestation by excavating sponges on the oyster (*Ostrea edulis*) populations of the Blanes littoral zone (north-western Mediterranean Sea). *Journal Marine Biological Association of U.K.* **79**:409-413.
- Roughgarden, J., S. Gaines, et H. Possingham. 1988. Recruitment dynamics in complex life cycles. *Science* **241**:1460-1466.
- Royer, J., M. Ropert, M. Mathieu, et K. Costil. 2006. Presence of spionid worms and other epibionts in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) cultured in Normandy , France. *Aquaculture* **253**:461-474.
- Rützler, K. 2002. Sistema Porifera: a guide to the classification of sponges(Family Clionaidae D'Orbigny, 1851.), New York.

S

-
- Sakai, Y. 1997. Alternative spawning tactics of female angelfish according to two different contexts of sex change. *Behavioral Ecology* **8**:372-377.
- Schärer, L. et D. Vizoso. 2003. Earlier sex change in infected individuals of the protogynous reef fish *Thalassoma bifasciatum*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **55**:137-143.
- Schleyer, M. H. 1991. Shell-Borers in the Oyster, *Striostrea margaritacea*: Pests or Symbionts? *Symbiosis* **10**:135-144.

- Sewell, M. A. 1994. Small Size, Brooding, and Protandry in the Apodid Sea Cucumber *Leptosynapta clarki*. Biological Bulletin **187**:112-123.
- Shanks, A. L., B. A. Grantham, et M. H. Carr. 2003. Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. Ecological Applications **13**:S159–S169.
- Shaw, P. W. et W. H. H. Sauer. 2004. Multiple paternity and complex fertilisation dynamics in the squid *Loligo vulgaris reynaudii*. Marine Ecology Progress Series **270**:173-179.
- Simmons, L. W. 2005. The evolution of polyandry : Sperm Competition, Sperm Selection, and Offspring Viability. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics **36**:125-146.
- Simmons, L. W., M. Beveridge, et W. J. Kennington. 2007. Polyandry in the wild: temporal changes in female mating frequency and sperm competition intensity in natural populations of the tettigoniid *Requena verticalis*. Molecular Ecology **16**:4613-4623.
- Soong, K. et J.-L. Chen. 1991. Population structure and sex change in the coral-inhabiting snail *Coraplliohila violacea* at Hsiao-Liuchu, Taiwan. Marine Biology **111**:81-86.
- Sprenger, D., N. Anthes, et N. K. Michiels. 2008a. Multiple mating affects offspring size in the opisthobranch *Chelidonura sandrana*. Marine Biology **153**:891-897.
- Sprenger, D., J. Faber, N. K. Michiels, et N. Anthes. 2008b. Natural female mating rate maximizes hatchling size in a marine invertebrate. Journal of Animal Ecology **77**:696-701.
- Stefaniak, L. M., J. McAtee, et M. J. Shulman. 2005. The costs of being bored: Effects of a clionod sponge on the gastropod. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **327**:103-114.
- Stockley, P. 1997. Sexual conflict resulting from adaptations to sperm competition. Trends in Ecology and Evolution **12**:154-159.
- Strathmann, M. F. et R. R. Strathmann. 2007. An Extraordinarily Long Larval Duration of 4.5 Years from Hatching to Metamorphosis for Teleplanic Veligers of *Fusitriton oregonensis*. The Biological Bulletin **213**:152-159.
- Strathmann, R. R. 1985. Feeding and Nonfeeding Larval Development and Life-History Evolution in Marine Invertebrates. Annual Review of Ecology and Systematics **16**:339-361.
- Swearer, S. E., J. S. Shima, M. E. Hellberg, S. R. Thorrold, G. P. Jones, D. R. Robertson, S. G. Morgan, K. A. Selkoe, G. M. Ruiz, et R. R. Warner. 2002. Evidence of self-recruitment in demersal marine populations. Bulletin of marine science **70**:251-271.

T

-
- Thieltges, D. W., M. Strasser, J. E. E. van Beusekom, et K. Reise. 2004. Too cold to prosper- winter mortality prevents population increase of the introduced American slipper limpet *Crepidula fornicata* in northern Europe. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **311**:375-391.
- Thornhill, R. 1983. Cryptic Female Choice and Its Implications in the Scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *American Naturalist* **22**:765-788.
- Thorson, G. 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biological Reviews* **25**:1-45.
- Tomas, F., J. Romero, et X. Turon. 2004. Settlement and recruitment of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in two contrasting habitats in the Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series* **282**:173-184.
- Toonen, R. J. 2004. Genetic evidence of multiple paternity of broods in the intertidal crab *Petrolisthes cinctipes*. *Marine Ecology Progress Series* **270**:259-263.
- Toonen, R. J. et J. R. Pawlik. 2001. Foundations of gregariousness: A dispersal polymorphism among the planktonic larvae of a marine invertebrate. *Evolution* **55**:2439-2454.
- Topsent E, 1891. Essai sur la faune des spongiaires de Roscoff. *Archives de zoologie expérimentale et générale*, 2ème série, 9:523-554.

U

-
- Underwood, A. J. et P. G. Fairweather. 1989. Supply-side ecology and benthic marine assemblages. *Trends in Ecology & Evolution* **4**:16-20.

V

-
- Van Der Meer, J., J. J. Beukema, et R. Dekker. 2001. Long-term variability in secondary production of an intertidal bivalve population is primarily a matter of recruitment variability. *Journal of Animal Ecology* **70**:159-169.

W

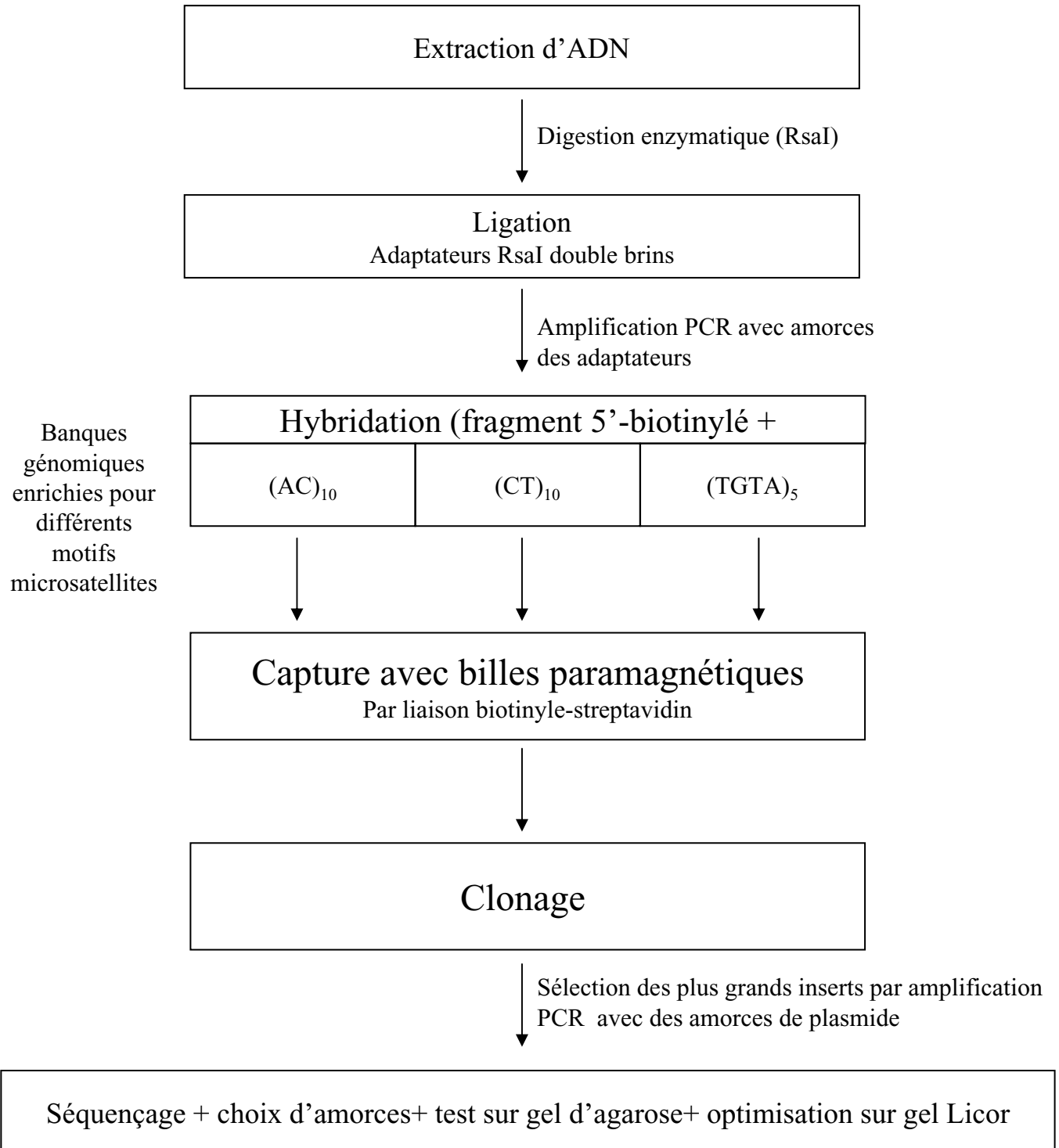
-
- Walker, D., A. Power, M. Sweeney-Reeves, et J. Avise. 2007. Multiple paternity and female sperm usage along egg-case strings of the knobbed whelk, *Busycon carica* (Mollusca; Melongenidae). *Marine Biology* **151**:53-61.
- Warburton, F. E. 1958. Control of the boring sponge on oyster beds. Progress reports of the Atlantic Coast tations of the Fisheries Research Board of Canada **69**:7-11.
- Warner, R. R., D. L. Fitch, et J. D. Standish. 1996. Social control of sex change in the shelf limpet, *Crepidula norrisiarum*: size-specific responses to local group composition. *Journal of Experimental Marine Biology* **204**:155-167.
- Warner, R. R., D. R. Robertson, et E. G. Leigh. 1975. Sex Change and Sexual Selection. *Science* **190**:633-638.
- Warner, R. R. et S. E. Swearer. 1991. Social Control of Sex Change in the Blue Wrasse, *Thalassoma bifasciatum* (Pisces: Labridae). *Biological Bulletin* **181**:199-204.
- Warner, R. R., S. E. Swearer, et J. E. Caselle. 2000. Larval accumulation and retention: implications for the design of marine reserves and essential habitat. *Bulletin of marine science* **66**:821-830.
- Werner, B. 1955. Über die Anatomie, die Entwicklung und Biologie des Veligers und der Veliconcha von *Crepidula fornicata* L. (Gastropoda Prosobranchia). *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* **5**:169-217.
- Wright, W. G. 1988. Sex change in the Mollusca. *Trends in Ecology & Evolution* **3**:137-140.
- Wright, W. G. 1989. Intraspecific density mediates sex-change in the territorial patellacean limpet *Lottia gigantea*. *Marine Biology* **100**:353-364.

Y-Z

-
- Yasui, Y. 1998. The 'genetic benefits' of female multiple mating reconsidered. *Trends in Ecology & Evolution* **13**:246-250.
- Zeh, D. W. et J. A. Zeh. 2001. Reproductive mode and the genetic benefits of polyandry. *Animal Behaviour* **61**:1051-1063.

ANNEXES

Annexe II-B-1 : Diagramme synoptique des différentes étapes relatives au développement de marqueurs microsatellites (d'après Daguin-Thiébaud et al 2009)



Annexe II-B-2 : Conditions d'amplification des 6 locus microsatellites utilisés pour réaliser les analyses de paternité chez *Crepidula convexa*

Composition des mélanges réactionnels pour réaliser l'amplification PCR

La composition du mélange réactionnel est la même pour les 6 loci

Produit	Concentration de la solution mère	Concentration finale	Volume (µl) pour 1 réaction
Tampon	10 x	1 x	1.5
dNTP	2.5 mM	0.25 mM	1.5
MgCl ₂	50 mM	1.67 mM	0.5
BSA	1mg/ml	0.13 µg/µl	2
Amorce sens marquée	5 µM	0.13 µM	0.4
Amorce sens non marquée	10 µM	0.33 µM	0.5
Amorce anti sens	10 µM	0.4 µM	0.6
Taq EuroTaq Euroclone®	5 unités/µl	0.5 unités	0.1
H ₂ O			3.9
ADN			4
Volume réactionnel			15

Programme d'amplification

Les mêmes conditions d'amplification sont utilisées pour tous les loci :

Dénaturation initiale : 3 minutes à 95°C

Cycles – série « Touch-down » ⁽¹⁾

95°C – 45 secondes	} Touch-Down (10 cycles)
T _{max} – 45 secondes (-1°C par cycle)	
72°C – 45 secondes	

Cycles – Température d'hybridation constante

95°C – 45 secondes	} (25 cycles)
T _{min} – 45 secondes	
72°C – 45 secondes	

Elongation finale : 7 minutes à 72°C

⁽¹⁾ Le protocole « Touch Down » consiste en l'utilisation d'une température d'hybridation, élevée (T_{max}) lors des premiers cycles (permettant une bonne spécificité mais un faible rendement), qui est diminuée de façon progressive à chaque cycle (-1°C/ cycle) jusqu'à une température plus faible (T_{min} ; permettant un bon rendement).

Intervalles de température utilisés dans la réaction pour chaque locus :

	AC2G8	CT2C3	CT3F5	CT6F1	CT3B10	CT5H8
T _{min} -T _{max} (°C)	62-52	62-52	65-55	60-50	62-52	62-52

Annexe II-B-3. Fréquences alléliques et diversité génique (He, diversité génétique non biaisée de Nei (1987) et Ho, hétérozygotie observée) dans les populations de Nahant et Barnastable de *Crepidula convexa*. (Logiciel Fstat 2.9.3, Goudet 2001)

AC2G8			CT2C3			CT3F5			CT6F1			CT3B10			CT5H8		
Allèle	Barn. N = 98	Nah N = 24	Allèle	Barn. N = 97	Nah N = 24	Allèle	Barn. N = 96	Nah N = 24	Allèle	Barn. N = 97	Nah N = 24	Allèle	Barn. N = 72	Nah N = 24	Allèle	Barn. N = 88	Nah N = 24
166	0.010	0.000	179	0.005	0.000	204	0.005	0.000	152	0.005	0.000	227	0.000	0.042	404	0.000	0.0208
242	0.015	0.083	187	0.005	0.000	210	0.010	0.000	154	0.000	0.021	237	0.014	0.021	406	0.000	0.0208
244	0.010	0.000	189	0.005	0.000	214	0.005	0.000	156	0.016	0.000	238	0.007	0.146	430	0.006	0.0208
246	0.005	0.000	191	0.005	0.000	218	0.010	0.000	158	0.005	0.000	239	0.250	0.458	432	0.017	0.0833
248	0.046	0.083	193	0.016	0.063	222	0.010	0.000	160	0.052	0.000	240	0.014	0.021	434	0.034	0.125
250	0.026	0.208	195	0.016	0.042	226	0.005	0.000	162	0.031	0.021	243	0.000	0.021	436	0.051	0.1458
252	0.036	0.021	197	0.046	0.188	230	0.005	0.000	164	0.052	0.042	255	0.083	0.021	438	0.011	0.0625
254	0.026	0.000	199	0.098	0.125	234	0.005	0.000	166	0.046	0.063	256	0.194	0.063	440	0.091	0.1667
256	0.041	0.083	201	0.036	0.167	236	0.010	0.000	168	0.119	0.042	257	0.007	0.021	442	0.074	0.0417
258	0.077	0.042	203	0.083	0.042	242	0.010	0.000	170	0.093	0.063	258	0.222	0.042	444	0.023	0.000
260	0.066	0.146	205	0.057	0.000	244	0.010	0.000	172	0.103	0.063	259	0.174	0.146	446	0.028	0.0000
262	0.128	0.021	207	0.108	0.042	246	0.010	0.063	174	0.134	0.104	260	0.028	0.000	448	0.091	0.1667
264	0.117	0.042	209	0.119	0.104	248	0.005	0.000	176	0.052	0.021	261	0.007	0.000	450	0.142	0.0625
266	0.092	0.125	211	0.067	0.083	250	0.021	0.021	178	0.093	0.083				452	0.023	0.0208
268	0.092	0.021	212	0.005	0.000	252	0.031	0.063	180	0.041	0.083				454	0.034	0.000
270	0.071	0.021	213	0.134	0.021	254	0.026	0.042	182	0.057	0.063				456	0.011	0.000
272	0.051	0.042	215	0.072	0.021	256	0.016	0.000	184	0.031	0.021				458	0.017	0.000
274	0.036	0.000	217	0.005	0.021	258	0.026	0.042	186	0.026	0.063				460	0.006	0.000
276	0.015	0.042	219	0.021	0.000	260	0.068	0.125	188	0.021	0.063				464	0.051	0.000
278	0.010	0.000	221	0.005	0.042	262	0.057	0.104	190	0.005	0.104				466	0.079	0.0208
280	0.010	0.000	223	0.005	0.000	264	0.037	0.125	192	0.005	0.063				468	0.034	0.000
282	0.015	0.021	229	0.010	0.000	266	0.109	0.042	194	0.005	0.021				470	0.040	0.000
284	0.005	0.000	231	0.005	0.000	267	0.005	0.000	196	0.005	0.000				472	0.040	0.0417
			233	0.005	0.000	268	0.115	0.083	198	0.005	0.000				474	0.045	0.000
			235	0.021	0.000	270	0.052	0.000							476	0.028	0.000
			243	0.005	0.000	272	0.130	0.000							478	0.006	0.000
			245	0.016	0.000	274	0.078	0.104							480	0.006	0.000
			249	0.005	0.000	276	0.016	0.063							522	0.006	0.000
			255	0.005	0.000	278	0.021	0.063							524	0.006	0.000
			261	0.005	0.042	280	0.037	0.021									
			263	0.010	0.000	282	0.005	0.021									
						284	0.021	0.000									
						286	0.016	0.000									
						288	0.005	0.021									
						294	0.005	0.000									
He	0.926	0.890	He	0.921	0.890	He	0.933	0.918	He	0.922	0.931	He	0.812	0.738	He	0.9339	0.8872
Ho	0.918	0.833	Ho	0.845	0.917	Ho	0.917	1.000	Ho	0.918	1.000	Ho	0.722	0.750	Ho	0.7273	0.8333

RESUME

Le succès reproducteur et l'environnement social local apparaissent comme des facteurs prépondérants pour expliquer la diversité des stratégies de changement de sexe des hermaphrodites séquentiels. Cette thèse a eu pour objectif d'étudier les liens entre les patrons de changement de sexe et d'autres traits de vie tels que la polyandrie et la grégarité au sein de deux espèces de gastéropodes protandres (i.e. réversion sexuelle de mâle vers femelle) du genre *Crepidula*.

La première partie de cette thèse reposait sur des analyses de paternité réalisées avec des locus microsatellites chez deux espèces du genre *Crepidula*. Chez *C. fornicata*, une relation entre la diversité des contributions paternelles et la variabilité d'un trait larvaire (i.e. le taux de croissance) a été montré. La polyandrie pourrait conférer un avantage reproductif aux femelles selon une stratégie de type « bet-hedging ». Une analyse de paternité menée chez une seconde espèce, *C. convexa*, a également montré de la polyandrie mais à des degrés dépendant du nombre de partenaires potentiels environnant. Plus généralement, les résultats de ces études combinés à des données de la littérature suggèrent, au sein du genre *Crepidula*, un lien entre protandrie, polyandrie et grégarité qui pourrait être modulé par le mode de développement de l'espèce (direct vs. indirect).

Chez *C. fornicata*, gastéropode invasif en Europe, ce travail de thèse a eu également cherché à mieux appréhender le couplage entre la dynamique de changement du sexe et la dynamique de la population. L'analyse de la taille, du sexe et de l'état reproducteur de ca. 13000 individus d'une population de crépidules, suivie sur 40 mois, a mis en évidence l'importance d'un paramètre démographique, la sédentarisation de post-larves, dans la modulation des patrons de changement de sexe. Ce processus est régulé à l'échelle de la chaîne (i.e. association pérenne d'individus formant un groupe reproducteur) mais se répercute sur la structure globale de la population. La présence importante d'une éponge perforante *Cliona celata* dans la population étudiée est sans effet sur la fécondité des femelles et peu susceptible de modifier les patrons de changement de sexe. En revanche, cette population de crépidules pourrait être un réservoir de cet épibionte pour les espèces locales.

Ces différents résultats ont permis de mieux comprendre les facteurs individuels et populationnels influençant les modalités de changement de sexe chez une espèce marine protandre.

Mots clés : Hermaphrodisme séquentiel, paternité multiple, grégarité, larves, démographie, sex-ratio

ABSTRACT

Diversity and flexibility of sex change strategies of sequential hermaphrodites rely on variation in reproductive success and local social environment. This work aimed at examining relationships between sex change patterns and life traits, like polyandry and gregariness, in two protandrous (i.e. sex change from male to female sex) gastropods of the genus *Crepidula*.

First, paternity analyses were carried out with microsatellite loci in two *Crepidula* species. In *C. fornicata*, a correlation was shown between the diversity of the paternal contributions and the variability of a larval characteristic, namely the larval growth rate. Polyandry may here give a female reproductive advantage in light of a « bet-hedging » strategy. Then, polyandry was evidenced in a second species, *C. convexa*. The number of fathers nevertheless depended on the number of neighbouring mates. Together with previous published studies, our results suggested a link between protandry, polyandry and gregariness within the genus *Crepidula*; this link is likely to be modulated by the developmental mode (direct vs. indirect) of the species.

In *C. fornicata*, an invasive mollusc in Europe, the relationships between sex change and population dynamics was also examined. By analyzing size, sex, reproductive stage of ca 13000 individuals from a population surveyed over 40 months, we showed a major influence of one demographic parameter, namely the settlement of juveniles, on the sex change dynamics. This latter process was shown to be regulated at the stack level (i.e. perennial grouping of individuals forming a mating group) with effects at the whole population level. The presence of a boring sponge, *Cliona celata*, in the study population, did not influence female fecundity and is unlikely to influence sex change dynamics. Yet, *C. fornicata* might be a reservoir of this harmful epibiont for local species.

Altogether, this work allowed a better understanding of the factors acting at individual and population level which are likely to influence sex change dynamics in marine protandrous species.

Keywords: Sequential hermaphrodite, multiple paternity, gregariousness, larva, demography, sex-ratio