

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques de l'Environnement
Laboratoire de recherche en Ecologie et Environnement

THÈSE
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biologie-Santé-Environnement

Présentée par
ABDELLI Meriem

Thème

**Etude de la variation de la morphologie de la spermathèque chez des individus
adultes *Helix aperta* appartenant à diverses populations**

Soutenue le :

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mr SAHNOUNE Mohamed

Professeur

Univ. de Bejaia

Président

Mme TAFOUGHALT-BENBELLIL Saida

Professeur

Univ. de Bejaia

Rapporteur

Mr Koene M. Joris

Maître de
conférences

Univ. Vrije des Pays
Bas

Co-
rapporteur

Mme MEDJDOUB-BENSAAD Ferroudja

Professeur

Univ. de Tizi-ouzou

Examinatrice

Mr IGUEROUADA Mokrane

Professeur

Univ. de Bejaia

Examinateur

Mr BALLA Elhacene

Maître de
conférences A

Univ. de Bejaia

Examinateur

Année Universitaire : 2017-2018

Dédicaces

Une grande pensée à mon cher papa qui m'a malheureusement quitté tôt et n'a pas vu l'aboutissement de mes études mais je sais qu'il en aurait été très fier.

Je dédie ce travail

A l'être le plus cher pour moi, ma « maman ». Elle m'a soutenu tout au long de mes études, elle m'a comblé sur tous les plans et a su parfaitement m'être une maman formidable et compréhensive et une amie très proche.

A mes frères et sœurs; Fatsah, Karima, Lila, Djamel, Badia et Nabil qui ont toujours été à mes côtés. Leurs encouragements, confiance en moi et en mes capacités ainsi que leur aide matériel et moral m'ont été un grand utile tout au long de ces années d'études. Je n'oublie pas mes chers neveux; Nassim, Melissa, Dziri, Adem, Dahlia et Malek que j'aime beaucoup.

A mes chers amies Faiza, Rabia, Souhila et Rahima qui m'ont beaucoup aidé et soutenu et avec qui j'ai partagé des moments inoubliables.

Et pour terminer, à toute personne qui m'a soutenu.

Remerciements

*Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent
du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers
par qui nos âmes sont fleuries.*

Marcel Proust

*Le temps met tout
en lumière.*

Thalès

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Pr. TAFOUGHALT-BENBELLIL Saida qui fut pour moi une directrice de thèse attentive et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence, sa rigueur scientifique et surtout sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur. Je lui serai toujours reconnaissante pour m'avoir confié un projet de recherche novateur et stimulant, pour sa confiance en moi, son implication et tous ses encouragements et conseils.

Je dois beaucoup à mon co-directeur de thèse Dr. KOENE Michael Joris qui m'a accueilli en son laboratoire et a mis en ma disposition tous les moyens nécessaires pour mener à bien mes travaux de recherche. Je le remercie pour m'avoir guidé tout au long de ma découverte du monde de la recherche et pour m'avoir aidé à m'impliquer dans un tel domaine impressionnant, celui de l'écologie évolutive. Je lui serai toujours reconnaissante pour sa disponibilité, son implication et son orientation.

Toute ma gratitude à Pr. SAHNOUNE Mohamed, Professeur à l'université de Bejaia et directeur de notre laboratoire Ecologie et Environnement pour m'avoir permis de travailler dans d'aussi bonnes conditions. Je le remercie vivement pour son support, ses encouragements et pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse et d'honorer ma soutenance.

J'exprime mes remerciements à Pr. IGUEROUADA Mokrane, Professeur à l'université de Bejaia, qui m'a fait l'honneur d'accepter l'évaluation de mon modeste travail et de faire partie du jury de ma thèse.

Un grand merci également à Dr. BALA Elhacene, Maître de conférences à l'université de Bejaia, pour avoir répondu favorablement à l'invitation de juger ce travail et de faire également partie du jury de ma thèse.

Je remercie particulièrement Pr. MEDJDOUB-BENSAAD Ferroudja, Professeur à l'université de Tizi-ouzou, qui m'a fait un grand honneur en acceptant l'évaluation de mon travail et de faire partie du jury malgré la distance à parcourir.

Ce travail n'aurait pas pu s'accomplir sans l'aide précieuse des ingénieurs du laboratoire d'Anatomie Pathologique à la faculté de médecine de l'université de Bejaia; Hakima, Lynda et Louisa. Elles se sont impliquées pleinement dans mon travail et ont taché à réunir tous les moyens et conditions nécessaires pour la réalisation de mes expériences. Je vous serai toujours reconnaissante. Je n'oublie pas également Dr. CHEBOUT qui a accepté sans aucune hésitation de m'accueillir dans le laboratoire pour une durée indéterminée jusqu'à achèvement de mes travaux.

Mr. BENSaid Elkarim, maitre de conférences à l'université de Bejaia, était toujours prêt à m'apporter de l'aide en réalisant mes analyses statistiques tout en m'initiant et m'apprenant à être autonome et c'est réussi. Un grand merci à lui.

Je remercie tous mes collègues au laboratoire d'Ecologie et Environnement; ingénieurs, enseignants et doctorants; avec qui j'ai pu travailler dans un climat sympathique. Mention spéciale à Rabia, Souhila, Mourad, Khaled, Mokrane et Malik pour l'énergie positive qu'ils dégagent me motivant ainsi, leur partage et encouragements répétés ainsi que pour leur humour.

STAIKOU Alexandra, professeur à l'université de Grèce m'a fourni une méthode efficace pour la quantification de la densité. De plus, la discussion avec elle m'a clarifié beaucoup de choses qui m'ont été obscures concernant mon travail. Pour ce je tiens à lui exprimer mes remerciements les plus vifs.

Mon initiation aux méthodes d'histologie s'est fait grâce à l'accompagnement de Mme. MONTAGNE-WAJER Kora, technicienne à l'université Vrije d'Amsterdam. Elle m'a fait découvrir les techniques d'histologie en détails et m'a permis d'utiliser son espace de travail. Je la remercie infiniment.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à ma maman. Leur confiance, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Je vous aime.

Liste des figures

Introduction générale

Fig. 1. Illustrations d'armements et ornements chez les animaux. (E) bois d'un mâle du cerf rouge *Cervus elaphus*, (D) opisthosome coloré de couleurs vives d'un mâle de l'araigné paon *Maratus volans*, (C) épaulettes d'un rouge vif d'un mâle de merle à ailes rouges *Agelaius phoeniceus*, (A) queue extravagant du mâle du paon *Pavo cristatus*, (B) rougeur chez le mâle du pinson domestique *Carpodacus mexicanus*. **01**

Chapitre I : synthèse bibliographique

Fig.1.1. Conflits sexuels chez les hermaphrodites simultanés. Conflits d'accouplement entre individus A et B pouvant provenir d'intérêts incompatibles à donner et / ou recevoir du sperme (Schärer *et al.* 2015). **17**

Fig.1.2. Partie de l'appareil reproducteur de l'espèce *Cornu aspersum* montrant le sac à dard contenant le dard; les glandes multifides produisant le mucus; le canal de copulation conduisant à la bourse copulatrice; la bourse copulatrice responsable de la digestion du dard et les restes du spermatophore; le diverticulum, l'organe receveur du spermatophore du partenaire; le spermoviduct, à travers lequel le sperme migre vers la spermathèque (organe de stockage du sperme) (Lodi & Koene 2016). **20**

Fig.1.3. Phylogénie des escargots terrestres et leurs dards. Les coupes transversales et les profils des dards sont illustrés. La représentation de deux coupes transversales signifie que l'espèce possède deux dards fonctionnels. Cette phylogénie est obtenue par inférence bayésienne (Koene & Schulenburg 2005). **22**

Fig.1.4. Diversité des dards. Photos prises au microscopique électronique illustrant les différentes formes des dards. Les faces latérales (la barre d'échelle indique 500 µm) et les sections transversales (la barre d'échelle indique 50 µm) des dards de différentes espèces sont représentées (Koene & Schulenburg 2005). **25**

Fig.1.5. (A) un escargot *Cornu aspersum* ayant reçu un dard sur la tête (indiqué par une flèche). (B) profil du même individu, avec le dard empêchant le tentacule de s'étendre complètement de sorte qu'il paraît plus court que l'autre (Lodi & Koene 2016). **26**

Fig.1.6. Phylogénie montrant le processus de stockage du sperme, répandu et presque omniprésent chez les espèces à fertilisation interne. Les couleurs indiquent le nombre d'espèces exerçant le stockage de sperme. Le mode de fertilisation est indiqué par un I (pour fertilisation interne), E (pour fertilisation externe) ou la combinaison des deux avec le mode le plus commun cité en premier. La durée de stockage du sperme est indiquée en jours ainsi que le site de stockage quand il est connu (Orr & Brennan 2015). **28**

Fig.1.7. L'espèce *Formica execta* à la plus longue durée de stockage de sperme pouvant atteindre 30 ans. Photo par Alex Wild à téléchargement libre de Wikipedia. **33**

- Fig.1.8.** Dessin schématique d'un oviducte aviaire. Après l'ovulation, l'ovocyte est incorporé dans l'infundibulum de l'oviducte et le sperme où il est fécondé dans les 15 minutes suivant l'ovulation. Après fécondation, la surface du zygote est enveloppée dans de l'albumine, membrane de coquille et cuticule en passant par l'oviducte. La position de la jonction utéro-vaginale est indiquée par une flèche. La durée approximative de la présence du zygote dans chaque partie est aussi indiquée (Sasanami *et al.* 2013).....**35**
- Fig.1.9.** Observation de l'ultra-structure du sperme résidents dans les tubules de stockage de sperme chez un oiseau. Echelle= 2.5 µm (Sasanami *et al.* 2013).....**36**
- Fig.1.10.** Reconstitution de la poche de fertilisation de l'espèce hermaphrodite simultanée *Arianta arbustorum*. Fc= chambre de fertilisation, t= tubules spermathécaux, hd= canal hermaphrodite, so= spermoviducte. Echelle: la barre indique 500 µm. (Haase & Baur 1995).....**37**
- Fig.1.11.** Appareils reproducteurs femelles de *Drosophila pseudoobscura* (gauche) et *Drosophila bifurca* (droit) dessinés à la même échelle. *Drosophila pseudoobscura* possède un réceptacle- séminal de 0,41 mm et celui de *Drosophila bifurca* est de 81,67 mm. Les abréviations: o, ovaires; lo, oviducte latéral; co, oviducte commun; u, utérus; v, vagin; s, spermathèque; sr, réceptacle séminal; p, parovarium. (Pitnick *et al.* 1999).....**38**
- Fig.1.12.** Mouche *Dryomyza anilis* détenant 3 spermathèques. Photo par Kurt Hennige à téléchargement libre de Wikipedia (gauche). Araigné *Mecysmaucheniid* détenant plus de 100 spermathèques. Photo par H. Wood à téléchargement libre de Wikipedia (droit).....**38**
- Fig.1.13.** Variation de la forme des spermatozoïdes chez les animaux (Pitnick *et al.* 2009)...**39**
- Fig.1.14.** Variation du nombre de tubules spermathécaux chez quelques espèces d'escargots terrestres.....**41**
- Fig.1.15.** Coupe transversale à 10 µm de la poche de fertilisation à quatre tubules spermathécaux de l'espèce *Arianta arbustorum*. L'actine F marquée avec la rhodamine-phalloïdine et les noyaux avec le DAPI. Les flèches indiquent la gaine musculaire autour des tubules spermathécaux, les pointes de flèches entourent l'épithélium. Abréviations: ag, glande à albumine; fc, chambre de fertilisation; hd, canal hermaphrodite; t, tubule spermathecal. Echelle = 100 µm (Bojat *et al.* 2001a).....**42**
- Fig.1.16.** Coupe sagittale à travers la partie proximale de la poche de fertilisation de l'espèce *Arianta arbustorum*. A noter les différences de ciliation épithéliale. Abréviations: cd, Canal commun ; fc, chambre de fertilisation; l, tubule latéral; m, tubule principal (Bojat *et al.* 2001b).....**48**

Chapitre II: Présentation de l'espèce étudiée « *Helix aperta* »

- Fig.2.1.** Photo d'un escargot adulte *Helix aperta* à coquille globuleuse et sphérique, sans bandes et d'une couleur foncée.....**51**

Fig.2.2. Photos d'individus <i>Helix aperta</i> de différents stades de vie. (A) escargot juvénile d'une couleur jaune verdâtre, (B) escargot juvénile avec une couleur jaune mixé avec du marron, (C) escargot adulte d'une couleur marron foncé.....	52
Fig.2.3. Distribution géographique de l'espèce <i>Helix aperta</i> (selon Kerney & Cameron, 1979).....	53
Fig.2.4. Photo d'un escargot adulte <i>Helix aperta</i> en état de diapause, avec l'ouverture de sa coquille fermée par un épiphragme calcaire blanc.....	54
Fig.2.5. Appareils génitaux d' <i>Helix aperta</i> de Tunisie au moment des accouplements. Le tractus est 3,6 fois plus développé d'un individu de type femelle (2,45 g à gauche, avec une très grosse glande à albumine : 0,98 g) que celui d'un individu de type mâle (0,67 g à droite). (de Vaufleury & Gimbert 2009).....	55
Fig.2.6. Photo d'un appareil reproducteur d'un escargot adulte <i>Helix aperta</i> avec tous les organes le constituant (l'ovotestis est absent mais son emplacement est indiqué par un petit cercle).....	58
Fig.2.7. Photo illustrant le rapprochement de deux escargots adultes <i>Helix aperta</i> ayant la motivation à s'accoupler.....	59
Fig.2.8. Photo illustrant deux partenaires d'accouplement de l'espèce <i>Helix aperta</i> durant la phase introductive de l'accouplement. On note un rapprochement corporel étroit et un échange de touches de tentacules (voir le cercle).....	60
Fig.2.9. Photo illustrant deux partenaires d'accouplement de l'espèce <i>Helix aperta</i> en phase de préparation au « tir du dard ». On note un contact très étroit des pieds des deux partenaires, position idéale pour le « tir du dard ».....	61
Fig.2.10. Photo illustrant un individu adulte <i>Helix aperta</i> ayant reçu un dard tout près du tentacule.....	62
Fig.2.11. Photos d'escargots <i>Helix aperta</i> en accouplement. (A) phase de rapprochement corporel et début de pénétration, (B) phase de pénétration.....	63

Chapitre III: Matériel et méthodes

Fig.3.1. Photos illustrant le péristome bien prononcé chez l'espèce <i>Cornu aspersum</i> (à gauche) et moins prononcé et à peine visible chez l'espèce <i>Helix aperta</i> (à droite).....	64
Fig.3.2 Photos illustrant des escargots <i>Helix aperta</i> de couleurs coquille et corps divergentes selon la maturité sexuelle ou non. (A) escargot juvénile non mature sexuellement, (B) escargot sub-adulte non mature sexuellement, (C) escargot adulte mature sexuellement, (D) groupe d'escargot dont le seul adulte est celui encerclé.....	65

Fig.3.3. Les quatre sites d'échantillonnage situés à Bejaia. SA, Sidi Ahmed; St, place du Stade; TH, Tala Hamza; Ba, Baccaro. Image obtenue de Google Earth.....	66
Fig.3.4. Photo du premier site d'échantillonnage « Baccaro ».....	66
Fig.3.5. Photo du deuxième site d'échantillonnage « Tala Hamza ».....	67
Fig.3.6. Photo du troisième site d'échantillonnage « la place du Stade ».....	67
Fig.3.7. Photo du quatrième site d'échantillonnage « Sidi Ahmed ».....	68
Fig.3.8. Quadra installé sur un site d'échantillonnage. Image de Wikipedia.....	70
Fig.3.9. Photo illustrant les escargots échantillonnés logés dans des boîtes en plastique pour subir une période d'acclimatation.....	73
Fig.3.10. Photo illustrant l'isolement des escargots chacun dans une boîte en plastique individuelle.....	74
Fig.3.11. Dessin schématique d'une coquille du genre <i>Helix</i> . La hauteur (L) et le diamètre (D) sont définis perpendiculaires et parallèles à l'axe d'enroulement. (Van Osselaer & Tursch 2000).....	75
Fig.3.12. Photo d'un escargot adulte <i>Helix aperta</i> au pied complètement apparent.....	76
Fig.3.13. Photo d'un escargot adulte <i>Helix aperta</i> subissant une anesthésie.....	76
Fig.3.14. Photo d'un escargot adulte <i>Helix aperta</i> euthanasié suite à l'injection de $MgCl_2H_2O$	77
Fig.3.15. Photo illustrant les lignes à suivre pour extirpation stratégique et facile de la coquille.....	77
Fig.3.16. Photo illustrant un individu adulte <i>Helix aperta</i> après extirpation de la coquille....	78
Fig.3.17. Photo illustrant la fixation d'un escargot sur un support pour la dissection.....	78
Fig.3.18. Photo illustrant la dissection d'un escargot <i>Helix aperta</i> . La ligne rouge indique la première incision à réaliser.....	79
Fig.3.19. Photo illustrant un escargot <i>Helix aperta</i> disséqué avec tous les organes apparents.....	79
Fig.3.20. Photo d'un escargot <i>Helix aperta</i> disséqué et repérage des premiers organes reproducteurs; sac à dard, pénis et glandes multifides (encerclés).....	80
Fig.3.21. Photo illustrant le repérage et l'extraction du spermoviducte.....	81
Fig.3.22. Photo illustrant le repérage de la glande à albumen.....	81
Fig.3.23. Photo illustrant le repérage et l'extraction de la bourse copulatrice et son canal.....	82

Fig.3.24. Photo d'un appareil génital d' <i>Helix aperta</i> illustrant les organes reproducteurs considérés dans cette étude.....	83
Fig.3.25. Photo d'un appareil reproducteur d' <i>Helix aperta</i> illustrant l'emplacement de la poche de fertilisation de l'espèce indiquée par le carré rouge.....	85
Fig.3.26. Photo du matériel utilisé pour l'extraction des poches de fertilisation; ciseaux de dissection et deux pinces fines et pointues.....	86
Fig.3.27. Photo illustrant une glande à albumen isolée avec des petites parties du spermoviduct et canal hermaphrodite.....	86
Fig.3.28. Photo illustrant la délimitation de l'emplacement de la poche de fertilisation (lignes rouges).....	87
Fig.3.29. Photo montrant la fixation des poches de fertilisation dans le fixateur AFA.....	88
Fig.3.30. Photo d'un automate d'inclusion Leica.....	90
Fig.3.31. Photos d'un échantillon placé dans une cassette d'histologique (gauche) et d'un ensemble de cassettes introduites dans la corbeille pour la porter sur l'automate d'inclusion (droite).....	91
Fig.3.32. Photo des poches de fertilisation dans des boîtes de pétri contenant de la paraffine fondue placées sur une plaque chauffante.....	92
Fig.3.33. Photo des blocs de paraffine durcie.....	93
Fig.3.34. Photo montrant l'aspect des blocs après inclusion en paraffine (les poches de fertilisation ou fragments des glandes à albumen apparaissent en jaune).....	93
Fig.3.35. Photo de deux blocs de paraffine après dégrossissage avec les poches de fertilisation incluses.....	94
Fig.3.36. Photo d'un bloc collé à la pince porte-objet du microtome.....	95
Fig.3.37. Photos illustrant le bloc monté sur le microtome.....	95
Fig.3.38. Photos illustrant la réalisation de coupes sériées et l'obtention de rubans.....	96
Fig.3.39. Photo d'une lame identifiée comportant son numéro (1), la date de la réalisation des coupes (06.06.2015), la provenance de l'échantillon (B=Baccaro) et le numéro de l'individu (13).....	97
Fig.3.40. Photo de lames avec rubans placés en ordre.....	97
Fig.3.41. Photo d'une platine chauffante pour histologie.....	98
Fig.3.42. A gauche, photo de lames en position à plat sur un porte-lames; à droite, photo des portes- lames incubées dans une étuve à 37°C.....	99

Fig.3.43. Photo illustrant le matériel et les solutions utilisés pour la réalisation des opérations allant de la réhydratation jusqu'à la coloration.....	101
Fig.3.44. Photo de lames montées prêtes pour les observations microscopiques.....	102
Fig.3.45. Photo du microscope photonique «Olympus» lié à une caméra, utilisé pour les observations des lames préparées.....	103
Fig.3.46. A gauche est un dessin schématique de la poche de fertilisation et les traits rouges représentent l'orientation des coupes sériées réalisées. A droite est un schéma explicatif de la méthode suivie pour le dénombrement des tubules de la spermathèque. A noter, fc = chambre de fertilisation; t1, t2, t3, t4, t5 = tubules spermathécaux.....	104
Fig.3.47. Photo d'un moule en plastique utilisé pour la préparation des blocs de résine.....	107
Fig.3.48. Photo de la résine utilisée pour la préparation des blocs.....	108
Fig.3.49. Photo d'un moule rempli à un 1/5 de résine (flèche rouge) pour servir de support au dard.....	108
Fig.3.50. Photo d'un dard émergé dans de la résine.....	109
Fig.3.51. Photo d'une scie liée à un moteur électrique utilisée pour la réalisation des coupes du dard.....	110
Fig.3.52. Photo d'un bloc de résine avec dard inclus prêt à la coupe.....	110
Fig.3.53. Photo des deux coupes obtenues pour chaque bloc.....	111
Fig.3.54. Photos de sections transversales du dard de l'espèce <i>Cornu aspersum</i> avant et après les retouches. (A) est la photo prise par la caméra liée au microscope, (B) montre l'accentuation du périmètre réalisée sous Photoshop, (C) montre le changement de l'arrière plan réalisé avec ImageJ pour obtenir un périmètre plus apparent. (Lodi <i>et al.</i> 2017).....	112
Fig.3.55. Visualisation des mesures des dards et glandes multifides réalisées. Notez que sur la troisième ligne, les pointillées représente l'emplacement de coupe du dard pour l'obtention des sections transversales. Sur la dernière ligne, les pointillés indiquent le périmètre de la section transversale. (Lodi <i>et al.</i> 2017).....	112
Fig.3.56. Graduations d'une règle photographiées avec une caméra liée à un stéréomicroscope sous le même grossissement utilisé pour les échantillons.....	113
Fig.3.57. Capture d'écran du logiciel ImageJ montrant le bouton utilisé pour mesurer les différentes structures.....	114
Fig.3.58. Capture d'écran du logiciel ImageJ montrant la mesure de l'échelle utilisée pour la calibration du programme.....	114
Fig.3.59. Capture d'écran du logiciel ImageJ montrant les données obtenues pour l'échelle mesurée.....	115

Fig.3.60. Capture d'écran du logiciel ImageJ montrant la méthode d'enregistrement de toutes les mesures obtenues pour l'échelle.....	115
Fig.3.61. Capture d'écran d'une fenêtre du logiciel ImageJ montrant l'introduction des données relatives à l'échelle pour la calibration du programme.....	116
Fig.3.62. Capture d'écran du logiciel ImageJ montrant l'option utilisé pour la mesure des structures.....	117
Fig.3.63. Capture d'écran du logiciel ImageJ montrant la méthode de mesure des structures.....	117

Chapitre IV: Résultats


Fig.4.1. Représentation schématique de l'appareil reproducteur d'un gastéropode stylommatophore. Le schéma indique l'emplacement exact de la poche de fertilisation-complexe de la spermathèque ainsi que les différentes structures les constituant à savoir; HD=canal hermaphrodite, FP=chambre de fertilisation, ST=tubules de la spermathèque (Beese <i>et al.</i> 2008).....	124
Fig.4.2. Dessin schématique représentant la reconstitution de la poche de fertilisation d' <i>Helix aperta</i> : fc, chambre de fertilisation; hd, canal hermaphrodite; so, spermoviduct; mt, tubule principal; lt, tubules latéraux (numérotés de 1-6). On note que la chambre de fertilisation est clairement la plus longue structure de toute la poche de fertilisation.....	125
Fig.4.3. Photo d'une coupe transversale de la poche de fertilisation d' <i>Helix aperta</i> . La chambre de fertilisation (CF) apparaît en forme d'un C. Echelle: 100 µm.....	126
Fig.4.4. Photos de quelques coupes transversales d'une poche de fertilisation d' <i>Helix aperta</i> montrant l'apparition de ses différentes structures. (A), début d'apparition de la chambre de fertilisation; (B), début de bifurcation du tubule principal indiqué par une flèche; (C), bifurcation du tubule principal à partir de la chambre de fertilisation; (D), apparition nette du tubule principal de la spermathèque; (E), début de bifurcation d'un premier tubule latéral de la spermathèque (indiqué par une flèche) directement à partir du tubule principal; (F), apparition nette du tubule latéral à côté du tubule principal; (G), début de bifurcation d'un deuxième tubule latéral à partir du tubule principal; (H), apparition nette du deuxième tubule latéral à côté du tubule principal et premier tubule latéral; (I), apparition d'un troisième tubule latéral; (J), disparition du premier tubule latéral; (K), disparition du deuxième tubule latéral. Echelle: 100 µm 	128
Fig.4.5. Distribution des fréquences du nombre de tubules spermathécaux (principal et latéraux) dans les quatre populations d'escargots <i>Helix aperta</i> analysées.....	129
Fig.4.6. Comparaison des longueurs de la chambre de fertilisation, tubule principal et tubules latéraux entre les quatre populations d' <i>Helix aperta</i> analysées présentant différentes densités. Les box-plot montrent la médiane, le 1 ^{er} et 3 ^{ème} quartiles et le rang.....	133

Fig.4.7. Photo montrant une vue latérale d'un dard d'amour de l'espèce *Helix aperta* prise avec un stéréo-microscope liée à une caméra.....134

Fig.4.8. Photo d'une coupe transversale d'un dard de l'espèce *Helix aperta* prise avec un stéréo-microscope liée à une caméra.....135

Chapitre V: Discussion

Fig.5.1. Principales caractéristiques du dard. La première ligne indique d'un ou plusieurs dards peuvent être présents contenus dans un ou plusieurs sacs à dard. La deuxième ligne illustre les différentes formes des dards. La dernière ligne montre des sections transversales de dards et montre que la surface de ces derniers peut être lisse, élargie avec des lames ou même avec des lames perpendiculaires supplémentaires. Des exemples d'espèces avec le nom de leur famille (entre parenthèse) sont indiqués. Notez que, en principe, toutes les combinaisons de lignes sont possibles (Lodi & Koene 2016).....148

Liste des tableaux

Chapitre IV: Résultats

- Tableau 4.1.** Densités enregistrées chez les quatre populations d'escargots étudiées.....120
- Tableau 4.2.** Hauteur et diamètre des coquilles de quatre populations d'escargots *Helix aperta* (valeurs moyennes en mm \pm écart type). Les valeurs F et P proviennent des tests de comparaisons ANOVA à un facteur ou Kruskal-Wallis. N désigne le nombre d'individus (taille de chaque population). Populations: Ba, Baccaro; SA, Sidi Ahmed; St, place de Stade; TH, Tala Hamza.....120
- Tableau 4.3.** Comparaison des longueurs des organes reproducteurs entre les quatre populations *Helix aperta* en appliquant les tests ANOVA à un facteur ou Kruskal-Wallis. Les moyennes en mm \pm écart type sont indiquées. N réfère au nombre d'individus dans les populations (taille des échantillons). Les populations: Ba, Baccaro; SA, Sidi Ahmed; St, Stade; TH, Tala Hamza.....122
- Tableau 4.4.** Coefficients de corrélation et valeurs P des différents organes reproducteurs considérés. Les valeurs en gras désignent les corrélations significatives. Abréviations: canal copul., canal de la bourse copulatrice; glandes m., glandes multifides.....123
- Tableau 4.5.** Coefficients de corrélation et valeurs P de la taille de la coquille et les longueurs des organes reproducteurs. Abréviations: Canal copul., canal de la bourse copulatrice; Glandes m., glandes multifides.....123
- Tableau 4.6.** Coefficients de corrélation et valeurs P de la taille de la densité locale les longueurs des organes reproducteurs. Abréviations: Canal copul., canal de la bourse copulatrice; Glandes m., glandes multifides.....124
- Tableau 4.7.** Nombre de tubules spermathécaux, leur longueurs (principal et latéraux) et longueur de la chambre de fertilisation chez quatre populations *Helix aperta*. Les populations sont comparées en appliquant les tests ANOVA à un facteur ou Kruskal-Wallis. Abréviations des noms des populations: Ba, Baccaro; SA, Sidi Ahmed; St, place de Stade; TH, Tala Hamza.....130
- Tableau 4.8.** Coefficients de corrélation et valeurs P des différentes structures de la poche de fertilisation. Les valeurs en gras indiquent des corrélations significatives. Abréviations: CF, longueur de la chambre de fertilisation; TP, longueur du tubule principal; LMTL, longueur moyenne des tubules latéraux; NT, nombre des tubules spermathécaux.....131
- Tableau 4.9.** Coefficients de corrélation et valeurs P des structures de la poche de fertilisation et les organes reproducteurs mâles et femelles. Abréviations: CF, longueur de la chambre de fertilisation; TP, longueur du tubule principal; LMTL, longueur moyenne des tubules latéraux; NT, nombre des tubules spermathécaux; Canal copul., canal de la bourse copulatrice; Glandes m., glandes multifides.....131

Tableau 4.10. Résultats des modèles utilisés pour tester l'effet des facteurs fixes, densité de chaque population et diamètre de la coquille des individus, sur les mesures des structures de la poche de fertilisation (variables de réponse).....**132**

Tableau 4.11. Coefficients de corrélation de la taille de la coquille (diamètre) et les différents traits des dards et glandes multifides. Abréviations: L., longueur; Périm., périmètre du dard; Nbre. Branch., nombre de branches des glandes multifides.....**135**

Tableau 4.12. Comparaison des différents traits des dards et glandes multifides entre les quatre populations *Helix aperta* en appliquant les tests ANOVA à un facteur ou Kruskal-Wallis. Les moyennes en mm \pm écart type sont indiquées. N réfère au nombre d'individus dans les populations (taille des échantillons). Les populations: Ba, Baccaro; SA, Sidi Ahmed; St, Stade; TH, Tala Hamza. Les valeurs significatives sont marquées par *.....**136**

Tableau 4.13. Coefficients de corrélation et valeurs P de la densité locale et les différents traits des dards et glandes multifides. Les valeurs en gras désignent les corrélations significatives.....**137**

Tableau 4.14. Coefficients de corrélation et valeurs P entre les différents traits des dards et glandes multifides. Les valeurs en gras indiquent les corrélations significatives. Abréviations: L. dard, longueur du dard; Périm., périmètre du dard; L. glandes, longueur des glandes multifides; Nbre. Branch., nombre de branches des glandes mutifides.....**137**

Sommaire

Introduction générale

"Sélection sexuelle" et "conflit sexuel".....	01
Contexte générale et problématique.....	06
Approches.....	08

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Hermaphroditisme simultané et sélection sexuelle

I.1. Qu'est ce que les l'hermaphroditisme.....	09
I.1.2 L'hermaphroditisme séquentiel.....	09
I.1.3 L'hermaphroditisme simultané.....	10
I.2. Pourquoi être hermaphrodite?.....	10
I.2.1. Modèle d'allocation des ressources.....	10
I.2.2. Rendements décroissants pour le sexe masculin et/ou féminin.....	10
I.2.3. L'autofécondation.....	11
I.3. L'hermaphroditisme simultané et la sélection sexuelle.....	11
I.3.1. Compétition spermatique.....	12
I.3.2. Choix cryptique de la femelle.....	14
I.3.3. Conflit sexuel.....	16
I.4. Le dard d'amour.....	20
I.4.1. La fonction du dard.....	21
I.4.1.a. Rôle dans l'accouplement.....	21
I.4.1.b. Rôle dans la reconnaissance des congénères.....	21
I.4.1.c. Rôle dans la ponte.....	21
I.4.1.d. Source de calcium?.....	23
I.4.1.e. Augmentation du succès reproducteur du receveur.....	23
I.4.1.f. Signal 'honnête' pour le choix d'un partenaire d'accouplement.....	24
I.4.2. Morphologie des dards.....	24

I.4.3. Utilisation du dard.....	25
I.4.4. Transfert du mucus.....	26
II. Stockage du sperme <i>in vivo</i> par les femelles	
II.1. Définition du stockage de sperme <i>in vivo</i>.....	28
II.2. Avantages du stockage de sperme <i>in vivo</i>.....	29
II.2.1. Amélioration de la diversité génétique de la descendance.....	29
II.2.2. Extension du succès reproducteur.....	29
II.2.3. Prévention du vieillissement du sperme.....	30
II.2.4. Prévention de la polyspermie.....	30
II.2.5. Prolongation des durées de reproduction.....	31
II.2.6. Modification du sex-ratio.....	31
II.2.7. Régulation de la capacitation du sperme.....	31
II.2.8. Augmentation de la proportion des mâles produits.....	32
II.2.9. Minimisation d'accouplements et les coûts y associés.....	32
II.3. Durée de stockage de sperme <i>in vivo</i>.....	32
II.4. Sites de stockage de sperme <i>in vivo</i>.....	33
II.4.1. Pas de site particulier de stockage.....	33
II.4.2. Tubules de stockage de sperme (TSS).....	35
II.4.3. Organes spécialisés et sophistiqués « les spermathèques ».....	36
II.4.4. Plus d'un type d'organes de stockage.....	37
II.4.5. Plusieurs organes de stockage.....	38
II.5. Causes de la variabilité des organes de stockage de sperme	39
II.5.1. Corrélation avec la forme et taille des spermatozoïdes.....	39
II.5.2. Différences des traits d'histoire de vie.....	40
II.5.3. Sélection sexuelle.....	40
II.6. Mécanismes de stockage de sperme.....	43
II.6.1. L'anatomie mâle et femelle canalise le sperme vers les sites de stockage	43

II.6.2. Pompage du sperme par les contractions musculaires.....	43
II.6.3. Facilitation du mouvement du sperme par le fluide séminal mâle.....	44
II.6.3.a. Motilité.....	44
II.6.3.b. Association du sperme.....	44
II.6.3.c. Stimulation des contractions de l'appareil génital femelle.....	45
II.6.3.d. Coagulation.....	45
II.6.3.e. Osmose.....	46
II.6.4. Secrétions de l'appareil génital femelle.....	46
II.6.5. Motilité du sperme.....	46
II.6.6. Système nerveux femelle.....	46
II.7. Maintenance de la survie du sperme dans les organes de stockage.....	47

Chapitre II : Présentation de l'espèce étudiée « *Helix aperta* »

1. Position systématique.....	50
2. Description de l'espèce.....	50
3. Origine, distribution et habitat.....	52
4. Rythme d'activité.....	54
5. Reproduction.....	55
6. Morphologie de l'appareil reproducteur.....	56
7. Etapes de l'accouplement.....	59
7.1. Prélude.....	59
7.1.1. Comportement introductif.....	60
7.2. «Tir du dard d'amour».....	61
7.3. Accouplement.....	62
7.3.1. Tentatives d'accouplement.....	62
7.3.2. Accouplement.....	62

Chapitre III : Matériel et méthodes

I. Echantillonnage.....	64
--------------------------------	-----------

II. Description des sites d'échantillonnage	66
III. Quantification de l'intensité de la compétition spermatique	68
III.1. Estimation de la densité : Méthode des quadras.....	69
III.2. Application de la méthode d'Elliot (1971).....	70
III.3. Calcul de la densité d'escargots adultes par mètre carré.....	72
IV. Conditions d'élevage	73
IV.1. Acclimatation.....	73
IV.2. Isolement	74
V. Dissection des escargots	75
V.1. Mesures de la coquille.....	75
V.2. Anesthésie.....	76
V.3. Extirpation de la coquille.....	77
V.4. Isolement de l'appareil reproducteur.....	78
V.5. Mesures des organes reproducteurs.....	82
VI. Investigation des poches de fertilisation et spermathèques	84
VI.1. Extraction des poches de fertilisation.....	85
VI.2. Préparation histologique des poches de fertilisation.....	88
VI.2.1. Fixation des tissus.....	88
VI.2.2. Déshydratation.....	89
VI.2.3. Eclaircissement (clarification).....	89
VI.2.4. Imprégnation à chaud.....	90
VI.2.5. Inclusion (enrobage) et préparation des blocs.....	91
VI.2.6. Microtomie « réalisation de coupes sériées ».....	94
VI.2.7. Préparation des lames histologiques.....	96
VI.2.8. Séchage des lames.....	98
VI.2.9. Coloration.....	99
VI.2.9.a. Déparaffinage.....	100

VI.2.9.b. Réhydratation.....	100
VI.2.9.c. Coloration.....	100
VI.2.9.d. Déshydratation.....	101
VI.2.10. Montage des lames.....	102
VI.2.11. Observations microscopiques.....	102
VII. Investigation des dards et glandes multifides.....	104
VII.1. Dissection des poches à dards et glandes multifides.....	105
VII.2. Estimation du taux de production de mucus (quantification des glandes multifides).....	106
VII.3. Estimation de la quantité de mucus transférée par les dards (quantification des dards).....	106
VII.3.1. Extraction des dards depuis les sacs à dards.....	106
VII.3.2. Mesure de la longueur des dards.....	107
VII.3.3. Réalisation de sections transversales des dards.....	107
VII.3.3.a. Préparation des blocs.....	107
VII.3.3.b. Réalisation des coupes.....	109
VII.3.3.c. Réalisation des mesures.....	111
VIII. Manipulation du logiciel de traitement d'images ImageJ.....	113
VIII.1. Calibrage du programme.....	113
VIII.2. Réglage des paramètres du programme.....	116
VIII.3. Réalisation des mesures des échantillons.....	117
IX. Analyses statistiques des résultats.....	118
IX.1. Tailles des coquilles.....	118
IX.3. Dards et glandes multifides.....	118

Chapitre IV: Résultats

I. Densités des populations.....	120
II. Taille des escargots.....	120
II.1. Variation de la taille de la coquille.....	120

II.2. Relation densité-taille de la coquille.....	121
III. Organes reproducteurs mâle et femelle.....	122
III.1. Variation de la longueur des organes de reproduction.....	122
III.2. Relation entre les organes de reproduction mâles et femelles.....	122
III.3. Effet de la taille de la coquille sur la longueur des organes de reproduction.....	123
III.4. Effet de la densité sur la longueur des organes de reproduction.....	124
IV. Investigation des poches de fertilisation et spermathèques.....	124
IV.1. Morphologie de la poche de fertilisation et de la spermathèque.....	124
IV.2. Variation des structures de la poche de fertilisation.....	129
IV.2.1. Nombre de tubules spermathécaux.....	129
IV.2.2. Longueur des structures de la poche de fertilisation (chambre de fertilisation, tubule principal et tubules latéraux).....	130
IV.3. Relation entre les différentes structures de la poche de fertilisation.....	130
IV.4. Relation entre les structures de la poche de fertilisation et les organes reproducteurs..	131
IV.5. Effet de la densité, de la taille de la coquille (diamètre) et de leur combinaison sur les structures de la poche de fertilisation.....	132
V. Investigation des dards et des glandes multifides.....	134
V.1. Morphologie des dards et glandes multifides de l'espèce <i>Helix aperta</i>	134
V.2. Effet de la taille de la coquille sur les traits des dards et glandes multifides.....	135
V.3. Variation des traits des dards et glandes multifides entre les quatre populations.....	136
V.4. Effet de la densité local sur les traits des dards et glandes multifides.....	136
V.5. Relations entre les traits des dards et glandes multifides.....	137

Chapitre V: Discussion

I. Densités des populations.....	138
II. Taille des escargots.....	138
II.1. Variation de la taille de la coquille.....	138
II.2. Relation densité-taille de la coquille.....	138
III. Organes reproducteurs mâles et femelles.....	139

III.1. Variation de la longueur des organes reproducteurs mâles et femelles et leur relation avec la densité locale.....	139
III.2. Effet de la taille de la coquille sur la longueur des organes reproducteurs.....	140
IV. Poches de fertilisation et spermathèques.....	140
IV.1. Morphologie de la poche de fertilisation et de la spermathèque.....	140
IV.2. Variation des structures de la poche de fertilisation entre les quatre populations et leur relation avec la densité locale.....	141
IV.2.1. Nombre de tubules spermathécaux.....	141
IV.2.2. Longueur des structures de la poche de fertilisation.....	143
IV.3. Effet de la taille de la coquille sur les structures de la poche de fertilisation.....	146
IV.4. Relation entre les organes reproducteurs et les structures de la poche de fertilisation..	147
V. Dards et glandes multifides.....	147
V.1. Morphologie des dards et glandes multifides.....	147
V.2. Effet de la taille de la coquille (diamètre) sur les traits des dards et glandes multifides.....	149
V.3. Variation des traits des dards et glandes multifides entre les quatre populations et leur relation avec la densité locale.....	149
V.4. Relation entre les traits des dards et glandes multifides.....	151
Conclusion générale et perspectives	
Conclusion générale.....	152
Perspectives.....	154
Références bibliographiques.....	156

Annexes

Introduction générale

- "Sélection sexuelle" et "conflit sexuel"
- Contexte générale et problématique
- Approches

Introduction générale

"Sélection sexuelle" et "conflit sexuel"

[Sexual selection] "Depends, not on a struggle for existence, but on a struggle between the males for the possession of females; the result is not death to the unsuccessful competitors but few or no offspring". (Darwin 1859, p 88).

Le concept de la sélection sexuelle fut proposé par Darwin en 1859 dans "*On the origin of species*". Il désigne brièvement la sélection pouvant en résulter des différences de succès reproducteur dérivant essentiellement de la compétition pour l'accès aux partenaires sexuels. Pendant de longues années, en raison de l'influence des travaux de Darwin, la sélection sexuelle était considérée comme surgissant exclusivement avant l'union des sexes. Ceci semble évident, vu que les femelles étaient supposées être sexuellement monogames ne pouvant admettre qu'un seul partenaire sexuel. Néanmoins, au cours des 40 dernières années, la sélection de la polyandrie par les femelles a été démontrée et une grande variété d'hypothèses visant essentiellement à expliquer cette tendance a été proposée (Jennions & Petrie 2000, Birkhead & Pizzari 2002).

La sélection sexuelle est considérée comme une force évolutive majeure conduisant à l'évolution de nombreux traits qui favorisent un individu dans la reproduction (Darwin 1871). Cette forme de sélection est généralement divisée en processus se produisant avant la copulation (=sélection pré-copulatoire) et d'autres après la copulation (=sélection post-copulatoire).

La sélection sexuelle pré-copulatoire concerne à la fois la compétition entre les mâles d'une même espèce pour l'accès aux femelles (=sélection intra-sexuelle), et le choix classique des femelles se rapportant à la sélection non aléatoire des partenaires mâles par ces dernières (=sélection inter-sexuelle) (Andersson 1994, Birkhead & Møller 1998, Miller 2013). Cependant, dans de nombreux cas, les rôles sexuels sont inversés et les mâles deviennent ainsi le sexe limitant alors que les femelles entrent en compétition pour assurer des copulations, comme c'est le cas chez plusieurs espèces de poissons de la famille des Syngnathidae (rapporté dans Vincent *et al.* 1992). La sélection sexuelle pré-copulatoire est supposée être responsable de l'émergence de dimorphismes sexuels chez plusieurs espèces animales. En effet, la sélection intra-sexuelle résulte en un combat entre les individus du même sexe, à l'issue duquel les vainqueurs

Introduction générale

s'accouplent avec les individus réceptifs du sexe opposé, menant ainsi à l'évolution d'armements ou badges de statut. La sélection inter-sexuelle quant à elle, correspond au processus de choix du partenaire par les femelles qui se doivent de préférer les mâles les plus vigoureux ou les mieux armés. Elle mène donc à l'évolution d'ornements chez les mâles leur permettant plus d'attractivité ayant ainsi plus de chances d'être sélectionnés par les femelles. Remarquablement, les mâles sont souvent le sexe qui arbore le plus de traits exagérés signalant leur dominance. L'évolution de bois plus développés chez les cerfs, le plumage coloré, les comportements de parade nuptiale sont des exemples emblématiques de l'action de la sélection sexuelle (Darwin 1871) (fig.1).

D'une autre part et comme indiqué plus haut, la polyandrie (c.à.d. le fait qu'une femelle s'accouple avec plusieurs mâles au cours de la même saison de reproduction), a fait en sorte que la sélection sexuelle peut se prolonger après la copulation (=sélection sexuelle post-copulatoire) (Parker 1970, Birkhead & Pizzari 2002). La sélection sexuelle post-copulatoire se manifeste principalement de manière intra-sexuelle via "la compétition spermatique" et de manière inter-sexuelle via "le choix cryptique des femelles". La compétition spermatique est définie comme étant la compétition entre les éjaculats de différents mâles pour la fertilisation d'un groupe d'œufs donné (Parker 1970). C'est le mécanisme post-copulatoire pour lequel nous avons plus d'évidence (Parker & Pizzari 2010) par rapport au choix cryptique de la femelle. Ce dernier est défini comme étant la capacité, pour une femelle, de discriminer et d'utiliser de façon différentielle les spermatozoïdes de différents mâles conspécifiques (Birkhead 1998). Il est dit cryptique vu qu'il se déroule à l'intérieur de l'appareil reproducteur femelle et ne peut donc être observé directement (Thornhill 1983, Eberhard 1996). Ces mécanismes évolutifs sont cependant difficiles à séparer l'un de l'autre, vu que tous les deux prédisent une utilisation différentielle des éjaculats dans la fertilisation et favorisent l'évolution d'adaptations post-copulatoires chez les deux sexes visant principalement à augmenter le succès reproducteur (Eberhard 1996, Birkhead & Pizzari 2002, Snook 2005, Orr & Brennan 2015). Chez les mâles, les adaptations peuvent être offensives visant principalement à combattre les éjaculats déjà présents dans la femelle inséminée; ou défensives visant à empêcher la femelle d'être inséminée par les mâles subséquents. Parmi les exemples d'adaptation les plus communément citées; l'augmentation de la longueur des spermatozoïdes (rapporté par Snook 2005), de leur motilité (voir Birkhead *et al.* 1999) et le développement de plus grands testicules (voir Dziminski *et al.* 2010).

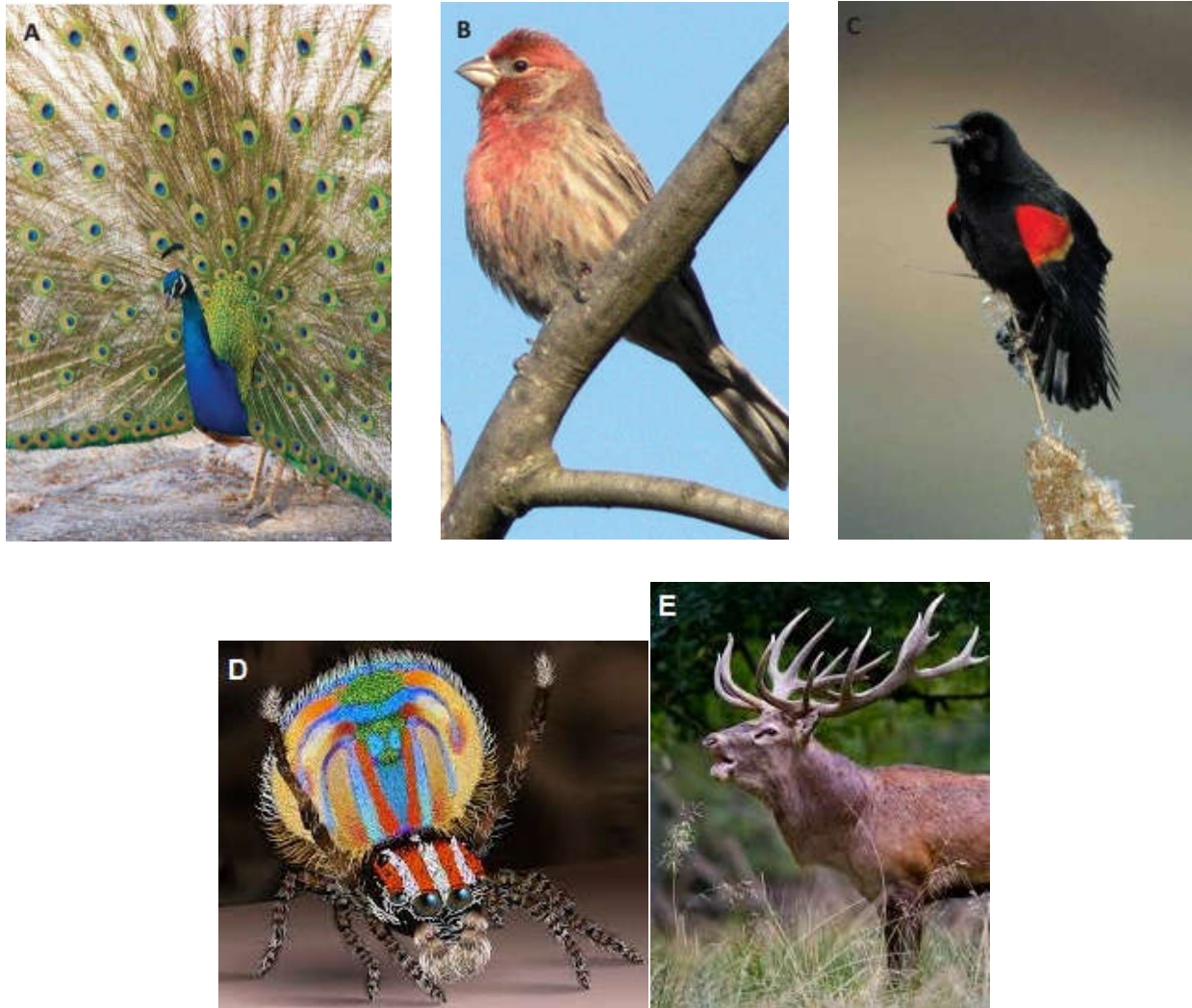


Fig. 1. Illustrations d'armements et ornements chez les animaux. (E) bois d'un mâle du cerf rouge *Cervus elaphus*, (D) opisthosome coloré de couleurs vives d'un mâle de l'araigné paon *Maratus volans*, (C) épaulettes d'un rouge vif d'un mâle de merle à ailes rouges *Agelaius phoeniceus*, (A) queue extravagante du mâle du paon *Pavo cristatus*, (B) rougeur chez le mâle du pinson domestique *Carpodacus mexicanus*.

Du point de vue comportementale, la surveillance de la femelle encore appelé comportement de garde copulatoire, qui est une stratégie adoptée par les mâles visant principalement à éliminer la compétition en empêchant les femelles de s'accoupler avec des partenaires subséquents (exp. le criquet *Gryllus bimaculatus*, Wynn & Vahed 2004). Physiologiquement, les mâles sont en mesure de transférer des substances pouvant agir sur la physiologie des femelles; conduisant

Introduction générale

typiquement à altérer leur aptitude à contrôler l'usage du sperme et même à réduire leur intention à se ré-accoupler (rapporté par Gillott 2003).

Du point de vue des femelles, les meilleures évidences que nous avons de l'évolution de traits en réponse à la sélection sexuelle; imposée spécialement par la compétition spermatique concernent; le retrait du sperme reçu immédiatement après l'accouplement en l'éjectant de leurs appareils reproducteurs ou simplement en le digérant dans des organes spécialisés (exp. volailles sauvages: Pizzari & Birkhead 2000, *Succinea putris*: Dillen *et al.* 2009, respectivement). De plus, les femelles, spécialement des espèces polyandres, ont développé une multitude d'organes de stockage de sperme leur permettant de contrôler l'usage de ce dernier et de choisir potentiellement la paternité de leur descendance (exp. Hillriegel & Ward 1998).

En outre, contrairement à la vision traditionnelle de la reproduction comme étant l'un des meilleurs exemples de coopération harmonieuse dans la nature (Darwin, 1871); une sélection post-copulatoire intense peut résulter en un conflit d'intérêt (=conflit sexuel) entre les deux sexes (Parker 1979, Rice 1998, Arnqvist & Rowe 2005). Le conflit sexuel surgit essentiellement du fait de la divergence d'intérêts reproducteurs entre les individus de sexes différents. Il s'agit d'une théorie évolutive définie, au sens large, comme étant "les différences d'intérêts évolutifs entre mâles et femelles" (Parker 1979). De telles différences sont probablement le résultat de l'investissement différentiel des mâles et femelles dans le processus de la reproduction, qui prend son origine de l'anisogamie (c.à.d. asymétrie dans la production des gamètes entre mâles et femelles) (Parker *et al.* 1972, Andersson 1994, Chapman 2006). En effet, chez la majorité des espèces, les femelles sont souvent le sexe qui investit le plus dans la reproduction (Trivers 1972). De ce fait, leur succès reproducteur est principalement limité par la disponibilité de ressources, nécessaires pour la production de gamètes et les soins parentaux (Bateman 1948). En contraste, les mâles contribuent toujours moins dans tout événement de reproduction (Kvarnemo & Simmons 2013) et leur succès reproducteur dépend typiquement du nombre de femelles disponibles pour s'accoupler avec (Bateman 1948). Par conséquent, les femelles ont tendance à être sélectives dans leur choix de partenaires sexuels (Berglund *et al.* 2005) alors que les mâles entrent en compétition dans le but d'avoir accès aux femelles (Bateman 1948). En effet, lors de son fameux travail empirique sur la *Drosophile*, Bateman (1948) a apporté un des premiers aperçus d'une telle asymétrie dans les rôles sexuels. Il a montré que la fécondité relative des

Introduction générale

mâles (considérée comme indice du succès reproducteur) augmentait avec l'augmentation du nombre des femelles. En revanche, une augmentation du nombre des femelles n'entraînait pas forcément une augmentation de la fertilité des mâles. Ainsi, il a conclu que les femelles étaient limitées par leur aptitude à produire des œufs tandis que les mâles par le nombre de copulations à assurer. Les conflits sexuels sont donc omniprésents et inévitables et peuvent surgir lors des processus de la parade nuptiale, d'investissement parental (Trivers 1972, Houston *et al.* 2005), de ré-accouplement des femelles (Arnqvist & Rowe 2005), de la sélection de l'habitat (Morris & MacEachern 2010), de la fertilisation (Parker 2006) et peuvent aussi porter sur le taux d'accouplement (Arnqvist & Nilsson 2000). La résolution de tels conflits sexuels nécessite l'établissement des optimums de chacun des deux sexes. Les mâles ont donc tendance à développer des traits (=adaptations) visant à augmenter la fréquence des accouplements, et les femelles des contre-adaptations pour réduire les coûts d'accouplement et résister à la manipulation des mâles (rapporté dans Chapman 2006, Cordeo-Rivera 2017). Cependant, dans de nombreuses situations, les traits développés pour promouvoir les intérêts d'un sexe par rapport à l'autre ont le potentiel d'évoluer de manière antagoniste (voir Rice & Holland 1997, Rowe & Arnqvist 2002, Parker 2006) où les traits bénéfiques pour un sexe sont nuisibles pour l'autre. Il en résulte ce qui est appelé «course aux armements» évolutive entre les deux sexes (Birkhead & Møller 1993, Rice 1996, Rice & Holland 1997, Arnqvist & Rowe 2002, Chapman *et al.* 2003, Arnqvist & Rowe 2005). Cette dernière est supposée entraîner une évolution rapide des traits sexuels qui peuvent potentiellement induire l'isolement reproductif (voir Parker & Partridge 1998, Gavrillets 2000, Martin & Hosken 2003, Pennell & Morrow 2013).

Un exemple intéressant d'une telle coévolution antagoniste se produit chez les Coléoptères. Les mâles de ces animaux sont dotés d'épines sur leurs pénis qui peuvent endommager l'appareil reproducteur femelle lors de l'accouplement (Crudgington & SivaJothy 2000, Hotzy & Arnqvist 2009). Une analyse comparative entreprise par Rönn *et al.* (2007) a révélé que chez les espèces où les mâles sont équipés d'épines péniennes plus élaborées, les femelles ont développé une couche conjonctive plus épaisse au niveau du vagin, qui constitue probablement une contre-adaptation qui les protège des blessures pouvant s'engendrer.

Jusqu'à présent, la plupart des travaux, notamment empiriques, portant sur la sélection et le conflit sexuels ont été exclusivement entrepris sur les animaux à sexes séparés (=gonochoriques)

Introduction générale

(Andersson 1994, Arnqvist & Rowe 2005). Cependant, beaucoup de travaux théoriques récents indiquent clairement que ces mécanismes peuvent aussi agir sur les animaux hermaphrodites simultanés, qui expriment les deux fonctions sexuelles mâle et femelle à la fois (Baur 1998a, Michiels 1998, Chase 2007, Schärer & Janicke 2009, Anthes *et al.* 2010, Nakadera & Koene 2013).

Dans ce contexte, la présente thèse vise essentiellement à démontrer empiriquement la relation potentielle entre les morphologies reproductrices hautement complexes que présentent les escargots terrestres, faisant parti du groupe d'animaux hermaphrodites simultanés, et les pressions de la sélection sexuelle post-copulatoire notamment la compétition spermatique.

Contexte générale et problématique

Chez beaucoup de gastéropodes notamment les escargots terrestres, qui sont tous hermaphrodites simultanées, les accouplements multiples et le stockage du sperme semblent être une règle. L'association des deux processus crée un contexte favorable à la manifestation de processus post-copulatoires faisant ainsi de ces organismes un excellent modèle à explorer dans ce contexte.

Les travaux de la présente thèse se situent dans le cadre de la sélection sexuelle post-copulatoire conflictuelle et portent sur l'influence potentielle de la compétition spermatique sur certains traits morphologiques pouvant influencer le succès reproducteur des individus. Ces traits concernent essentiellement l'organe de stockage du sperme "spermathèque" ainsi que l'organe mâle de manipulation "dard" de l'espèce *Helix aperta*.

L'organe de stockage de sperme "spermathèque" chez la plupart des escargots terrestres est constitué de tubules dont le nombre varie nettement non seulement d'une espèce à une autre mais aussi entre les individus appartenant à une même espèce (exp. Baminger & Haase 1999, Koentzoulous & Staikou 2007). Une telle augmentation de la complexité de la spermathèque, traduite par la divergence du nombre de tubules, a été théoriquement connectée à l'intensité de la compétition spermatique suggérant que sous des situations de compétition spermatique intenses, ces organes tendent à se compliquer davantage (Koentzopoulos & Staikou 2007). Il s'agit vraisemblablement de la stratégie adoptée par les femelles pour mieux contrôler le stockage et l'utilisation du sperme dans le cadre du « choix cryptique de la femelle ». Seulement peu d'études empiriques ont été entreprises dans ce contexte et certaines ont émis des doutes sur

Introduction générale

l'exactitude de ces hypothèses (voir Chase & Darbyson 2008, Baminger & Haase 1999, Koemtzoulous & Staikou 2007). Il est donc nécessaire d'entreprendre d'autres études similaires sur d'autres espèces, du moment que les seules utilisées jusqu'à présent étant *Arianta arbustorum* et *Cornu aspersum*.

Un autre phénomène observé exclusivement chez les escargots terrestres stylommatophores, est le « tir du dard » durant la première phase de l'accouplement. Pour l'espèce *Cornu aspersum*, il a été démontré que la pénétration du dard à travers le corps du receveur, transfère des produits glandulaires dans le sang de ce dernier (Adamo & Chase 1990). Il s'est révélé que ces produits provoquent des changements de conformation dans le système reproducteur femelle, conduisant à la fermeture de l'entrée de la bourse copulatrice, l'organe de digestion du sperme (Koene & Chase 1998 a, b). Par conséquent, ceci augmente le succès reproducteur du « tireur du dard » en doublant sa paternité (confirmé par Chase & Blanchard 2006). Outre les avantages pour le donneur du sperme, le receveur du dard quand à lui est blessé, le risque d'infection chez lui augmenté et le processus de stockage du sperme altéré (Rogers & Chase 2002, Landolfa *et al.* 2001). Par conséquent, un tel conflit sexuel semble conduire à des contre-adaptations causant des changements évolutifs dans les organes récepteurs du spermatophore ainsi qu'à des dards et glandes plus élaborés (Koene & Schulenburg 2005). Néanmoins, toutes les conclusions ci-dessus sont tirées de recherches portant seulement sur l'espèce *Cornu aspersum* (Lodi & Koene 2016), bien qu'il existe beaucoup de membres de la famille des Helicidae qui tirent aussi un dard et qui reste incrusté dans le corps du receveur.

Actuellement, beaucoup d'études montrant des variations morphologiques considérables du dard existent pour un bon nombre d'espèces (exp. Koene & Schulenburg 2005, Koene & Chiba 2006). Par contre, les preuves d'une variation intra-spécifique dans la forme et l'efficacité du dard font défaut (Reyes-Tur *et al.* 2015). Pour ce, nous nous efforçons à travers cette thèse d'aborder l'interaction potentielle entre la taille et la forme du dard avec l'intensité de la compétition spermatique au sein de différentes populations d'une même espèce. La prédiction est que, des spécimens ayant des dards et des glandes plus larges et plus élaborés découlent d'un milieu évolutif avec un niveau de compétition spermatique élevé. En outre, nous nous attendons à trouver une concordance entre la forme et taille du dard et le degré de sophistication des glandes multifides ayant pour fonction principale la production du mucus.

Introduction générale

L'escargot Hermaphrodite simultané *Helix aperta* est l'espèce d'intérêt dans ce projet. Très peu d'études ont été menées sur cette espèce, ainsi de nombreux aspects de sa biologie restent inconnus.

Approches

1- Quantification de l'intensité de la compétition spermatique

La densité des escargots adultes dans chaque site d'échantillonnage est considérée comme une mesure de l'intensité de la compétition spermatique au sein de la population provenant de ce dernier.

En effet, l'augmentation de la densité entraîne un accroissement du nombre d'accouplements (Michiels 1998) résultant probablement en une compétition spermatique plus intense.

2- Investigation des spermathèques

Les spermathèques d'escargots appartenant à quatre populations différentes sont investiguées au moyen de coupes histologiques sériées.

3- Investigation des dards

L'étude des dards et des glandes multifides est réalisée en se basant sur une approche développée au département d'Ecologie Animale à l'université Vrije d'Amsterdam. Elle consiste essentiellement en la réalisation de sections transversales normalisées et le calcul de ce qui est appelé "dart-elaborateness-index" en utilisant une analyse de composante principale.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Hermaphrodisme simultané et sélection sexuelle

I.1. Qu'est ce que les l'hermaphrodisme

I.2. Pourquoi être hermaphrodite?

I.3. L'hermaphrodisme simultané et la sélection sexuelle

I.4. Le dard d'amour

I. Hermaphrodisme simultané et sélection sexuelle

I.1. Qu'est ce que l'hermaphrodisme

L'hermaphrodisme réfère aux cas où les organismes vivants expriment les deux fonctions sexuelles mâles et femelles à la fois au moins pendant une partie de leur vie.

Ce type d'expression sexuelle est omniprésent chez les plantes (Barrett 2002) et très répandu dans le règne animal (Ghiselin 1969). En effet, il s'exprime chez environ 30% des espèces animales avec exception des insectes qui sont extrêmement riches en espèces mais qui ne sont généralement pas hermaphrodites (Jarne & Auld 2006, Schärer 2009). Néanmoins, un seul cas d'hermaphrodisme semble évoluer chez ces derniers, résultant d'une transmission transovarienne de tissu produisant du sperme (Normark 2009, Gardner & Ross 2011).

Parmi les 28 phylums répertoriés, dans 20 d'entre eux existent au moins quelques représentants hermaphrodites alors qu'un nombre de 7 sont purement hermaphrodites (Michiels 1998). Il s'agit des éponges, Entoproctes, ectoproctes, vers plats et vers parasites, Chétognathes, Gastrotriches ainsi que les cténophores. Trois autres phylums comprennent quelques classes majeures ou des ordres qui sont entièrement hermaphrodites à savoir, (1) les anémones de mer et les coraux, (2) les limaces de mer et les escargots pulmonés, (3) Les Gnathostomulida, les sangsues et les vers de terre (voir Michiels 1998). Dans les autres groupes, bien que l'hermaphrodisme soit moins courant, les exceptions sont néanmoins bien étudiées comme par exemple le cas du nématode *Caenorhabditis elegans* qui s'avère l'hermaphrodite le mieux investigué (Wood 1988).

Il existe deux formes majeures d'hermaphrodisme : séquentiel et simultané

I.1.2 L'hermaphrodisme séquentiel

Encore appelé hermaphrodisme successif, correspond à une acquisition d'un caractère sexuel puis le changement vers l'autre au cours de la vie. Chez certains polychètes et poissons, ce changement peut être répétitif et alterné (Teuchert 1968, Kuwamura *et al.* 1994, Nakashima *et al.* 1995).

I.1.3 L'hermaphrodisme simultané

Il s'agit de la forme d'hermaphrodisme la plus étudiée et qui est aussi l'objectif principal dans cette thèse.

Les espèces hermaphrodites simultanées possèdent des organes génitaux mâles et femelles simultanément pendant la plus grande partie de leur vie et les actes reproducteurs impliquent généralement les fonctions, masculine et féminine, fonctionnelles au même temps dans chaque individu.

I.2. Pourquoi être hermaphrodite?

Plusieurs modèles visant principalement à comprendre les causes de la maintenance évolutive de l'hermaphrodisme au sein des espèces sont proposés :

I.2.1. Modèle d'allocation des ressources

L'hypothèse prédominante du maintien évolutif de l'hermaphrodisme comme stratégie de reproduction, est que les rendements de l'investissement dans une seule fonction sexuelle diminuent (Charnov *et al.* 1976, Charnov 1979a, Charlesworth 1981). Dans ce cas, l'hermaphrodisme est favorisé; spécialement lorsque le succès reproducteur général est atteint et largement supérieur que lorsque les deux fonctions mâle et femelle s'expriment séparément (Charnov *et al.* 1976, Charnov 1982).

Le modèle d'allocation des ressources prédit qu'à chaque fois que le nombre de la progéniture produite par un sexe pur accroit, il serait plus efficace de limiter l'investissement dans la fonction donnée et devenir hermaphrodite. De ce fait, les ressources restantes peuvent ensuite se transférer vers l'autre fonction sexuelle chez le même individu. Cependant, les coûts supplémentaires que nécessite la combinaison des deux fonctions sexuelles, ne devraient pas dépasser les avantages qui peuvent être obtenus (Heath 1977, Charnov 1982).

I.2.2. Rendements décroissants pour le sexe masculin et/ou féminin

Les rendements décroissants de la fonction masculine, qui ont suscité le plus d'attention (Charnov 1979a, Arnold 1994), peuvent survenir sous plusieurs conditions. L'une d'elle est par exemple la réduction des opportunités d'accouplements (Charnov 1979b) de sorte que l'insémination d'un nombre limité de partenaires soit facilement envisageable ; alors que

l'insémination d'un nombre de partenaires plus important soit très coûteux ou simplement impossible en raison d'une faible mobilité (Puurtinen & Kaitala 2002) et/ou de densité (Ghiselin 1969). De plus, un rendement décroissant de la fonction mâle peut aussi être associé au processus de déplacement du sperme rival par les mâles compétiteurs (Charnov 1979b, 1996, Pen & Weissing 1999) ou dans le cas des plantes, la saturation des vecteurs du pollen (Charnov 1979b).

La diminution des rendements lors de l'investissement dans la fonction femelle est par contre peu étudiée. Elle survient généralement lorsque l'espace de couvain des embryons est limité ou lorsque le temps disponible pour la ponte n'est pas suffisant (Heath 1979). Cependant, l'occurrence des deux n'a pas été sujette à beaucoup de recherches antérieures (Schärer 2009).

I.2.3. L'autofécondation

En principe, les hermaphrodites ont la capacité de s'autoféconder. En effet, l'autofécondation est très répandue chez les plantes (Jarne & Charlesworth 1993) et fréquente chez les vers parasites (Joyeux & Baer 1961), les oligochètes (Needham 1990), les vers Chétognathes (Reeve & Walter 1972, Alvarino 1990) et les escargots pulmonés (Jarne *et al.* 1993).

Initialement, l'autofécondation semble être la solution en l'absence de partenaires sexuels (Ghiselin 1969). Cependant, aux cas où la reproduction consanguine n'est pas trop coûteuse, la fusion d'autofécondation et de la fécondation croisée peut permettre une combinaison et un accroissement des avantages provenant des deux (Jarne & Charlesworth 1993).

I.3. L'hermaphroditisme simultané et la sélection sexuelle

Bien que l'hermaphroditisme simultané soit répandu dans le règne animal, les études portant sur la sélection sexuelle ont été exclusivement entreprises sur les animaux à sexes séparés (=gonochoriques) (Andersson 1994, Arnqvist & Rowe 2005). La cause remonte principalement à Darwin qui a exclu la possibilité que la sélection sexuelle puisse agir sur les espèces avec ce mode de reproduction. Selon lui, ceci peut être dû soit à leur limitation dans l'expression de caractères sexuels spécifiques ou à leur capacité sensorielle réduite qui limiterait la détection de tels traits chez le partenaire (voir aussi Morgan 1994, Greeff & Michiels 1999).

En opposition, beaucoup de travaux récents indiquent clairement que les animaux hermaphrodites simultanés sont intrinsèquement plus enclins à s'impliquer dans des

copulations plus coûteuses que les gonochoriques (Baur 1998b, Michiels 1998, Chase 2007, Schärer & Janicke 2009, Anthes *et al.* 2010, Nakadera & Koene 2013) et de ce fait plus exposés aux mécanismes de la sélection sexuelle. Ceci est probablement dû au fait que lors d'un accouplement, un hermaphrodite simultané peut gagner la paternité (=succès reproducteur mâle) pouvant dépasser les pertes dans le succès reproducteur femelle (Michiels & Koene 2006).

En effet, les espèces hermaphrodites simultanées, spécialement celles à fécondation interne, sont souvent dotées d'organes de reproduction à morphologies diverses et extrêmement complexes. De plus, leur reproduction implique fréquemment des comportements bizarres et des mécanismes d'agression nuisibles pour le partenaire (Michiels 1999). Les exemples les plus étranges et communément cités dans ce contexte sont par exemple; le comportement d'Apophallation observé chez les limaces *Ariolimax* (voir Leonard *et al.* 2002), l'insémination hypodermique répétée chez les vers plats tropicaux (Michiels & Newman 1998) ou encore l'injection d'Allohormones (Koene & ter Maat 2001) dans le corps du partenaire sexuel via les soies copulatrices chez *Lumbricus terrestris* (Koene *et al.* 2002, Koene *et al.* 2005) et via le fameux « dard » chez les escargots terrestres (exp. Chase & Blanchard 2006).

Toutes ces structures et beaucoup d'autres sont supposées manipuler le partenaire sexuel en faveur du succès reproducteur du donneur de sperme ce qui provoque probablement des contre-adaptations par le receveur de sperme (Rice & Holland 1997). Ceci conduit à des cycles d'évolution antagonistes des traits sexuels (Rice & Holland 1997) et peut même résulter en l'apparition de nouveaux caractères.

I.3.1. Compétition spermatique

Comme expliqué plus haut, une faible densité peut être une des causes de l'émergence de l'hermaphroditisme comme système de reproduction chez certaines espèces, ce qui implique normalement une faible compétition spermatique chez ces dernières. Cependant, bien que les densités soient faibles chez de nombreux taxons; elles peuvent être remarquablement élevées chez beaucoup d'autres (Peters *et al.* 1996, Michiels 1998) comme c'est le cas chez de nombreuses espèces hermaphrodites. En effet, ces dernières présentent généralement des densités importantes résultant en une fréquence d'accouplements élevée (Michiels 1998) et par conséquent une compétition spermatique intense au même titre que chez les gonochoriques (voir Parker 1970, Charnov 1979b, Eberhard 1996, Michiels 1998, Schärer *et al.* 2014). De plus, même si la faible densité était la règle chez ces espèces, elle aurait pu

entraîner quatre préadaptations à la compétition spermatique (voir Michiels 1998): (1) la faible densité favorise la promiscuité vu la rareté des partenaires d'accouplement; (2) le stockage du sperme à long terme est nécessaire afin d'assurer une fertilité continue et il semble être la règle chez tous les hermaphrodites à fertilisation interne ce qui offre l'opportunité pour la compétition spermatique; (3) lorsque de nouvelles opportunités d'accouplement se présentent, un contrôle précis des chances de fécondation par l'ancien ou le nouveau sperme peut être favorisé; (4) une densité faible peut aussi favoriser l'autofécondation.

Cependant, les preuves de l'occurrence de la compétition spermatique chez les hermaphrodites simultanés sont plutôt rares, à l'exception des espèces d'escargots terrestres ou d'eau douce *Cornu aspersum*, *Arianta arbustorum*, *Succinea putris* et *Biomphalaria glabrata* (Baur 1994, Rogers & Chase 2002, Jordaens *et al.* 2005, Chase & Vaga 2006). En effet, chez cette dernière par exemple, qui est une espèce d'escargots d'eau douce, les individus qui se sont accouplés deux fois avaient tendance à utiliser préférentiellement les spermatozoïdes d'un partenaire pigmenté que ceux d'un partenaire albinos (Vianey-Liaud 1995). Probablement, les escargots pigmentés et albinos, en plus de présenter des différences de taille de la coquille et de la fécondité, se distinguent par la capacité compétitive de leurs spermatozoïdes (Vianey-Liaud *et al.* 1989). Pour *Arianta arbustorum*, une espèce d'escargots terrestres, les analyses de paternité au sein de la descendance d'individus échantillonnés dans la nature, ont indiqué qu'au moins 63% d'entre eux ont utilisé les spermatozoïdes de différents partenaires pour la fertilisation des ovules (Baur 1994).

Cependant, chez d'autres individus *Arianta arbustorum* qui se sont accouplés deux fois; la préséance du sperme était influencée par l'intervalle de temps entre les deux accouplements quand ce dernier dépassait une période de 70 jours, qui correspond à la durée d'une saison de reproduction chez cette espèce. La préséance (=priorité) du sperme (en anglais, sperm precedence) étant l'utilisation différentielle des spermatozoïdes des partenaires sexuels pour la fécondation des ovules selon l'ordre d'accouplement avec eux. Il est généralement estimé en tant que la proportion d'œufs fécondés par le second partenaire en cas de double accouplement (valeur P_2). En effet, chez ces individus la valeur P_2 était de 0,34 chez les escargots qui se sont accouplés deux fois au cours des 70 jours indiquant potentiellement la préséance du sperme du premier partenaire (Baur 1994). En revanche, la valeur P_2 était de 0,76 chez les escargots qui se sont ré-accouplés durant la saison suivante indiquant une diminution de la viabilité du sperme du premier partenaire. L'analyse de l'utilisation du

sperme à long terme chez 23 escargots ayant pondu de 3 à 9 lots sur une période de 2 ans a révélé des différences frappantes entre les individus. Effectivement, 21,7% d'individus ont montré la présence du sperme du premier partenaire d'accouplement, 34,8% du deuxième alors que les 43,5% d'individus restant semble avoir mixé du sperme provenant d'accouplements successifs. Ces observations indiquent probablement que différents mécanismes peuvent être impliqués dans l'occurrence de telles variations entre les individus dans la présence du sperme.

I.3.2. Choix cryptique de la femelle

Jusqu'à récemment, la plupart des recherches se concentraient sur les aspects masculins de la compétition spermatique tout en considérant les femelles comme sexes passifs et uniquement des arènes de combats. Cependant, Au cours des dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour la possibilité que les femelles puissent influencer le résultat de la compétition spermatique en contrôlant les processus de stockage et d'utilisation du sperme, un processus connu sous le nom de « choix cryptique de la femelle » (Eberhard 1996). De plus, les femelles semblent être en mesure de distinguer et d'utiliser différemment le sperme de différents partenaires, ce qui est appelé « le choix du sperme » (Birkhead 1998a). Il existe différentes définitions, larges et spécifiques, de ce dernier et la plupart des auteurs le considère synonyme du « choix cryptique de la femelle » (Eberhard 2000, Kempnaers *et al.* 2000, Pitnick & Brown 2000). Le choix cryptique de la femelle est défini comme le biais de paternité non-aléatoire résultant de la morphologie, physiologie ou du comportement de la femelle après l'accouplement (Pitnick & Brown 2000). Cependant, un problème récurrent avec ce processus est qu'il s'avère difficile d'exclure l'influence directe des mâles (exp. Edvardsson & Arnqvist 2000).

Dans le contexte du choix cryptique de la femelle, les sites de stockage du sperme, de fertilisation et de digestion chez les femelles sont d'un intérêt majeur. En effet, Lorsque plusieurs éjaculats se chevauchent chez le receveur, ce dernier peut développer des mécanismes post-copulatoires pour la sélection de spermatozoïdes 'spécifiques' (Michiels 1998). Ceci est particulièrement important chez les espèces hermaphrodites, car chez elles le choix pré-copulatoire d'un partenaire peut refléter la préférence de l'individu en tant que donneur plutôt que sa préférence en tant que receveur (Michiels 1998). Il semble donc important de développer des mécanismes discriminant le sperme reçu de différents partenaires après l'accouplement (Michiels 1998). Cependant, l'évidence suggestive de l'existence de tels

mécanismes de sélection est plutôt rare chez les hermaphrodites. La résorption du sperme dans les voies génitales femelles est l'un des exemples de ces mécanismes qui se produit essentiellement chez les vers plats (Fischlschweiger 1991, 1994), les oligochètes (Adiyodi 1988) et les escargots. Un autre mécanisme, aussi étrange, se produisant chez les Chétognathes et qui consiste en la consommation du sperme reçu avant même qu'il ait accès au réceptacle et fertiliser les ovules (John 1933). En outre, l'utilisation sélective du sperme peut également être acquise grâce au stockage du sperme de différents donneurs séparément.

Chez l'espèce *Arianta arbustorum* par exemple, les sites de stockage du sperme « spermathèque » ont été examinés avec beaucoup de détails en visant principalement à détecter le mode d'utilisation du sperme stocké. Chez certains individus, une partie des tubules, constituant la spermathèque, était remplie de sperme tandis que chez d'autres les spermatozoïdes ont été exclusivement condensés dans la bourse copulatrice (=organe de digestion du sperme) et aucun n'a été trouvé dans la spermathèque (Haase & Baur 1995). Ceci témoigne probablement de la capacité du système reproducteur femelle de l'espèce *Arianta arbustorum* à contrôler la fertilisation via la digestion sélective du sperme de certains partenaires d'accouplement (voir Eberhard 1991, 1996). En outre, la morphologie de l'organe de stockage du sperme semble pouvoir influencer le résultat de la compétition spermatique chez les stylommatophores comme a été démontré pour les insectes (Simmons & Siva-Jothy 1998). Lors d'une expérience antérieure, Bojat & Haase (2002) ont évalué la quantité d'allo-sperme (=sperme reçu) stockée dans la spermathèque de 18 individus appartenant à l'espèce *Arianta arbustorum* qui se sont accouplés une seule fois. Deux d'entre eux ont utilisé tous leurs tubules pour le stockage du sperme reçu alors que les autres ont utilisé moins. En effet, deux ont utilisé uniquement 80% de leurs tubules, trois 75%, deux 66,7%, un 50%, deux 40%, trois 33,3%, deux 25% et un 20%. Dans la plupart d'entre eux, le tubule principal de la spermathèque contenait toujours une plus grande quantité du sperme (51-100% de la quantité totale). En outre, il s'est avéré que la quantité du sperme stockée n'était pas corrélée avec le volume du spermatophore reçu mais plutôt avec le nombre de tubules spermathécaux. Ceci suggère que la fonction femelle du receveur de sperme est peut être en mesure de contrôler le nombre de spermatozoïdes stockés (voir Baur 2010) et probablement aussi leur utilisation dans la fécondation.

I.3.3. Conflit sexuel

Comme brièvement indiqué dans l'introduction, les conflits sexuels surgissent suite aux intérêts divergents des mâles et femelles dans la reproduction. En effet, les mâles ont généralement tendance à s'accoupler fréquemment et avec un nombre maximum de femelles, alors que ces dernières préfèrent être sélectives.

Les conflits sexuels peuvent aussi survenir après l'insémination, suite aux mâles ayant intérêt à voir tous leurs spermatozoïdes utilisés pour la fécondation, alors que les femelles préfèrent s'accoupler avec d'autres partenaires afin d'assurer la meilleure descendance possible ce qui peut causer le déplacement du sperme coexistant ou encore sa digestion (voir Baur 2010).

Les conflits sexuels sont aussi fréquents chez les espèces hermaphrodites simultanées vu que les deux fonctions, mâle et femelle, conservent leurs propres intérêts malgré leur union dans le même individu (Michiels 1998). Chez ces espèces, les conflits sexuels peuvent se manifester sous plusieurs formes. Néanmoins, le conflit portant sur les rôles d'accouplement est exclusivement le plus répandu du fait que les deux partenaires tentent le plus souvent d'exprimer le même rôle sexuel lors de l'accouplement (Leonard 1991, Michiels 1998).

Effectivement, les individus hermaphrodites auraient avantage à s'accoupler principalement dans le rôle sexuel qui stimule leur valeur sélective et leur procurant un succès reproducteur plus important ce qui conduit à un conflit d'intérêt entre deux éventuels partenaires d'accouplement (Charnov 1979b). Le 'champ de bataille' évolutionnaire d'un tel conflit, peut être visualisé comme une matrice d'interactions comportementales compatibles et incompatibles, définies par l'intérêt de deux individus de jouer le rôle du donneur de sperme, receveur de sperme ou les deux (fig.1.1) (Michiels 1998). En somme, les conflits d'accouplement se produisent chaque fois que les individus en interaction veulent adopter des rôles sexuels incompatibles (Michiels 1998).

Les conflits d'accouplement chez les espèces hermaphrodites simultanées peuvent être résolus de différentes manières allant de l'imposition 'égoïste' du rôle non préféré sur le partenaire d'accouplement, contrôlant ainsi la fertilisation (Leonard 1991), jusqu'au transfert réciproque du sperme (Schärer *et al.* 2015).

Cependant, alors que ces stratégies puissent résoudre les conflits pré-copulatoire, elles augmentent le potentiel des conflits sexuels post-copulatoire portant essentiellement sur l'utilisation du sperme reçu (Arnqvist & Rowe 2005). De tels conflits, surviennent exclusivement lorsque le sperme de différents partenaires est stocké avant la fécondation des œufs offrant ainsi l'opportunité à la «compétition spermatique» et «le choix cryptique des femelles» à agir (Parker 1970, Charnov 1979b, Eberhard 1996) (voir plus haut).

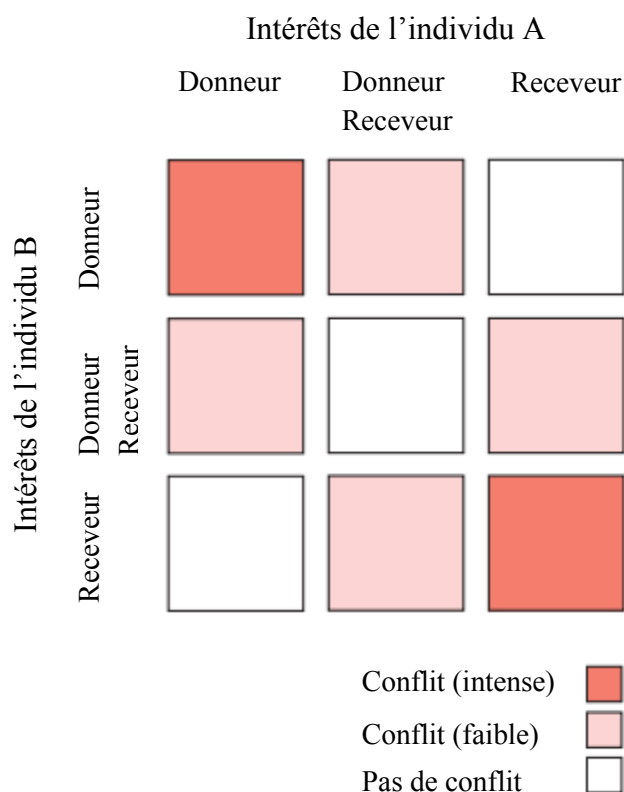


Fig.1.1. Conflits sexuels chez les hermaphrodites simultanés. Conflits d'accouplement entre individus A et B pouvant provenir d'intérêts incompatibles à donner et / ou recevoir du sperme (Schärer *et al.* 2015).

Les conflits sexuels post-copulatoires semblent être particulièrement pertinents chez les espèces hermaphrodites simultanées (voir Schärer *et al.* 2015). D'une part, parce que la rareté apparente de caractères sexuels pré-copulatoires et la volonté fréquente des deux partenaires à s'accoupler (ou leur incapacité à éviter cela) (Schärer *et al.* 2015), ce qui conduit probablement à un changement général et brusque de la sélection sexuelle en passant de la phase pré- à la phase post-copulatoire (Schärer *et al.* 2015). D'une autre part, parce que les hermaphrodites simultanés créent des cibles uniques pour les conflits sexuels, notamment en manipulant également la fonction sexuelle masculine et l'allocation au sexe globale du

partenaire sexuel (Charnov 1979b, Arnqvist & Rowe 2005, Schärer 2009, Schärer & Janicke 2009).

Dans le contexte du conflit sexuel, l'aptitude de la fonction femelle à contrôler la fertilisation (=choix cryptique de la femelle), constitue un problème majeur au donneur du sperme dont l'intérêt réside dans l'utilisation de tout son sperme pour la fécondation. Cependant, les cadeaux nuptiaux coûteux semblent être une solution improbable pour ce dernier vu que les deux fonctions (mâle et femelle) du partenaire sexuel en bénéficieront (Michiels 1998). En effet, une 'progéniture paternelle' (=influence paternelle sur la progéniture) produite par un tel cadeau est donc susceptible d'être encore plus coûteuse que d'utiliser le cadeau soi-même pour produire une 'progéniture maternelle' supplémentaire (Birkhead & Møller 1998). De ce fait, la sélection sexuelle chez les hermaphrodites est supposée être basée sur des indicateurs moins coûteux.

Tout comme chez les gonochoriques (voir Edward *et al.* 2015), plusieurs adaptations ont évolué chez les espèces hermaphrodites simultanés ayant probablement pour but de maximiser le succès reproducteur du donneur de sperme. Ces adaptations englobent à la fois des organes et morphologies reproducteurs ainsi que des stratégies d'accouplement étonnamment complexes impliquant fréquemment des mécanismes agressifs ou nuisibles (Michiels 1999).

Les exemples les plus pertinents et communément cités concernent le nombre (exp. Velando *et al.* 2008) et la morphologie des spermatozoïdes transférés (exp. Schärer *et al.* 2011); les mécanismes d'un transfert efficace du sperme (exp. Janicke & Schärer 2009); le déplacement physique du sperme déposé précédemment (exp. Sekizawa *et al.* 2013); la suppression des réaccouplements par le receveur du sperme et l'augmentation de la quantité du sperme destiné au stockage pour une fertilisation subséquente (exp. Landolfi *et al.* 2001, Rogers & Chase 2002, Chase & Blanchard 2006, Dillen *et al.* 2009, Garefalaki *et al.* 2010, Kimura & Chiba 2013).

L'une des cibles de manipulation les plus importantes, observées chez les espèces hermaphrodites simultanées, est particulièrement les aspects de l'allocation au sexe du receveur de sperme (Charnov 1979a, Michiels 1998). Deux types de manipulation de l'allocation au sexe peuvent être envisagés (Schärer 2009, 2014, Schärer & Janicke 2009). D'abord, le donneur de sperme peut directement affecter la fonction femelle du receveur du sperme d'une manière à maximiser son propre succès reproducteur, qui est exactement

similaire à la manipulation de la femelle par le mâle chez les animaux gonochoriques (Schärer *et al.* 2015). De plus, le donneur du sperme peut aussi stimuler indirectement la fonction femelle de son partenaire sexuel en attaquant la fonction mâle de ce dernier ce qui est supposé mener à une réallocation des ressources chez la fonction femelle du bénéficiaire (Schärer 2014). De plus, il semble que le donneur de sperme lui-même en tire un avantage par rapport à ses concurrents (Schärer 2014). La manipulation de l'allocation au sexe du partenaire d'accouplement devrait donc être particulièrement avantageuse chez les espèces à faible taux d'accouplements multiples, chez lesquelles la manipulation apporterait probablement des avantages exclusivement ou principalement à l'individu manipulateur (Schärer *et al.* 2015).

L'un des mécanismes majeurs à travers lequel les substances manipulatrices (généralement appelées 'allohormones', Koene & Chase 1998, Koene & ter Maat 2001) peuvent se transférer du donneur au receveur du sperme serait à travers les éjaculats (Zizzari *et al.* 2014). Les effets des substances transférées à travers le liquide séminal sont de plus en plus reconnus comme une source majeure de conflit sexuel (voir Sirot *et al.* 2015), même chez les hermaphrodites simultanés, comme l'a prédit Charnov (1979b).

En ce qui concerne l'investigation de la fonction du liquide séminal chez les hermaphrodites, l'escargot d'étang *Lymnaea stagnalis* semble être de loin le mieux étudié. En effet, chez ce dernier, plusieurs composants du liquide séminal ont récemment été identifiés et qui influencent le comportement reproducteur et/ou l'allocation des ressources du partenaire d'accouplement. Par exemple, une protéine appelée LyAcp10 semble pouvoir affecter la production d'œufs à court terme (Koene *et al.* 2010) en réduisant le nombre d'œufs produits (voir aussi Van Duivenboden *et al.* 1985, Koene *et al.* 2006, 2009) mais résultant apparemment en l'augmentation de leur masse (Hoffer *et al.* 2012). De plus, une expérience récente entreprise par Nakadera *et al.* (2014) a révélé que deux protéines (LyAcp5 et LyAcp8b) provoquent, chez l'espèce *Lymnaea stagnalis*, la diminution de manière significative de la quantité du sperme transférée lors d'un accouplement.

De tels résultats sont clairement très pertinents dans le contexte des processus de manipulation de l'allocation au sexe discutés plus haut. Cependant, il s'avère difficile de les interpréter vu qu'ils concernent uniquement des mesures à court terme des effets sur la reproduction mâle et femelle (Schärer 2014).

Un autre moyen de transfert des substances manipulatrices, et qui semble exclusivement commun chez les espèces hermaphrodites simultanées (Lange *et al.* 2013), serait à travers des structures ayant probablement évoluées spécialement à cet effet (Zizzari *et al.* 2014).

Dans ce contexte, le tir du « dard » au partenaire d'accouplement est de loin le comportement reproducteur le plus particulier qui survient exclusivement chez les stylommatophores au cours de la longue parade nuptial qui précède l'accouplement (Leonard 1992).

I.4. Le dard d'amour

Le dard d'amour est un stylet calcaire tranchant contenu dans un sac musculaire éversible appelé sac à dard (Tompa 1984). Il est utilisé lors de la première phase qui précède l'accouplement pour percer le corps du partenaire. Son emplacement dans l'appareil reproducteur est illustré sur (Fig.1.2).

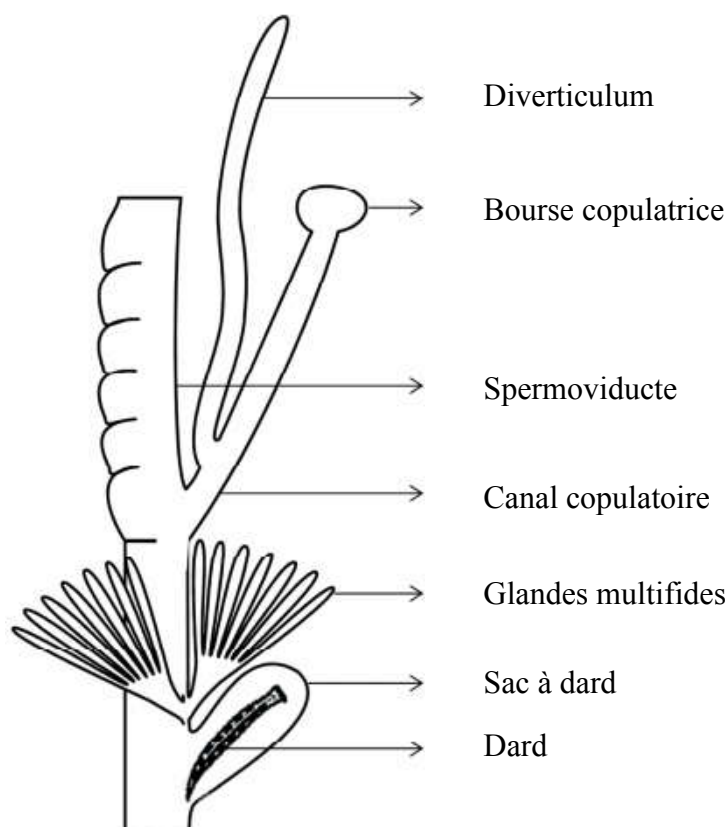


Fig.1.2. Partie de l'appareil reproducteur de l'espèce *Cornu aspersum* montrant le sac à dard contenant le dard; les glandes multifides produisant le mucus; le canal de copulation conduisant à la bourse copulatrice; la bourse copulatrice responsable de la digestion du dard et les restes du spermatophore; le diverticulum, l'organe receveur du spermatophore du partenaire; le spermoviduct, à travers lequel le sperme migre vers la spermathèque (organe de stockage du sperme) (Lodi & Koene 2016).

Selon des études phylogénétiques récentes (Koene & Schulenburg 2005, Davison *et al.* 2006), le dard n'est utilisé que dans 4-9 familles de Stylommatophores qui comprend environ 60 familles d'escargots et limaces au total (voir Fig.1.3). La plupart des recherches portant sur les dards des mollusques ont été entreprises exclusivement sur des escargots hélicidés, en particulier l'espèce *Cornu aspersum*.

I.4.1. La fonction du dard

Bien qu'il soit généralement admis que le dard a évolué comme conséquence du conflit sexuel, sa fonction a été pendant longtemps un objet de controverses (voir Chase 2007) et plusieurs hypothèses visant à comprendre son rôle exact ont été proposées.

I.4.1.a. Rôle dans l'accouplement

Depuis sa découverte, Swammerdam (1737) a déjà soupçonné que le dard devrait avoir un rôle dans la reproduction. Il a d'abord été proposé qu'il sert à stimuler et/ou synchroniser le comportement sexuel ou à faciliter l'accouplement (Tompa 1984, Baur 1998b). Cependant, des études empiriques entreprises dans ce contexte n'ont parvenu à détecter aucune influence du tir du dard sur aucun trait du processus de l'accouplement (Lind 1976, Chung 1987).

I.4.1.b. Rôle dans la reconnaissance des congénères

Une autre idée est que le dard pourrait être impliqué dans la reconnaissance des congénères avant l'accouplement (Diver 1940). Cependant, une telle reconnaissance s'effectue chez les escargots terrestres bien avant l'usage du dard, via la détection chimique des traces du mucus d'autres individus (Chase *et al.* 1978) ou encore le contact corporel durant la parade nuptial qui précède l'accouplement (Chase *et al.* 2010).

I.4.1.c. Rôle dans la ponte

Dans une autre proposition, Tompa (1980) a supposé que le dard induit la ponte chez le receveur, augmentant de ce fait la paternité du tireur. Néanmoins, les travaux de Koene et Chase (1998a) n'ont révélé aucun effet significatif d'un tir de dard réussi, ni sur le moment de la ponte ni sur le nombre d'œufs pondus chez l'espèce *Cornu aspersum*.

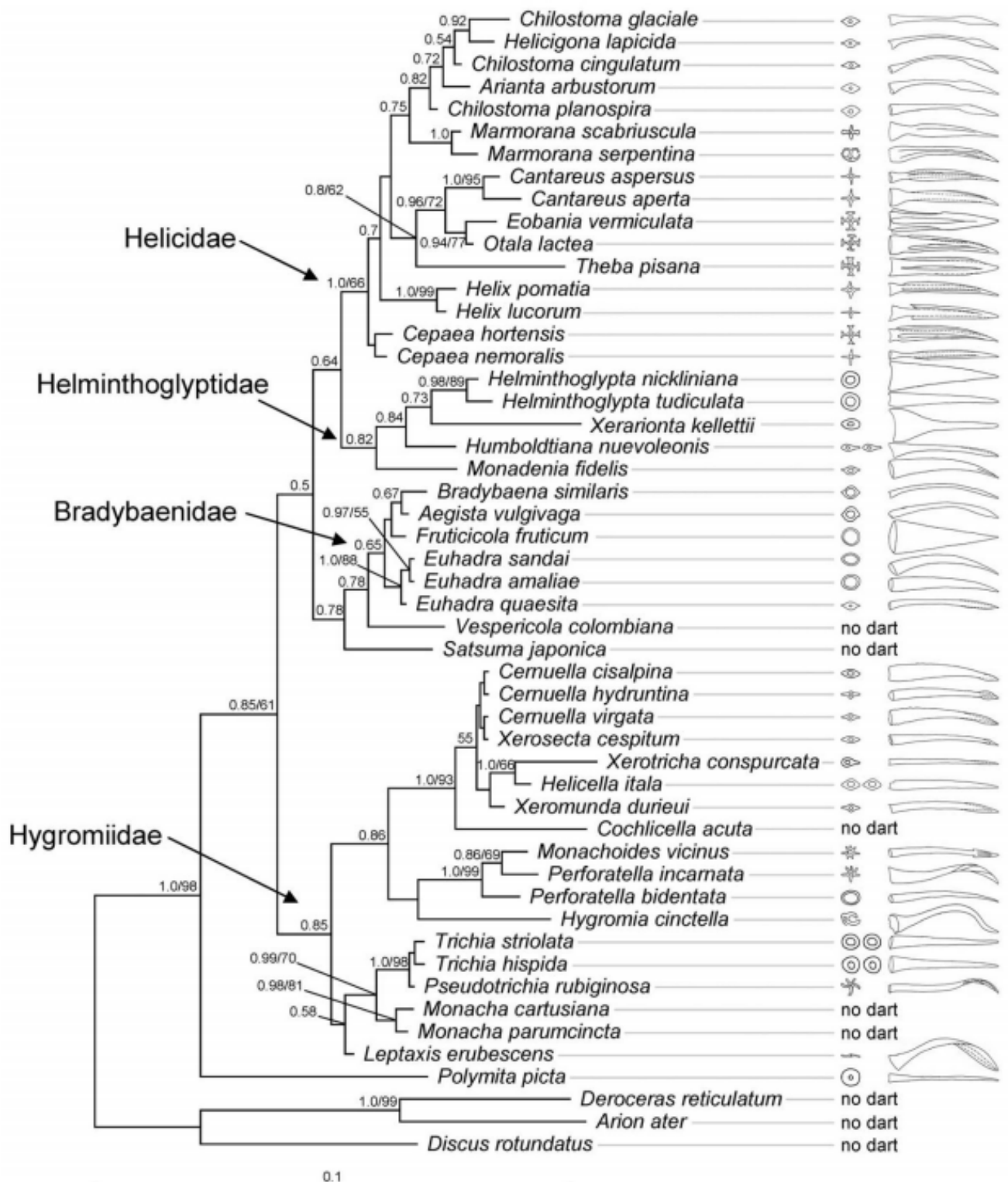


Fig.1.3. Phylogénie des escargots terrestres et leurs dards. Les coupes transversales et les profils des dards sont illustrés. La représentation de deux coupes transversales signifie que l'espèce possède deux dards fonctionnels. Cette phylogénie est obtenue par inférence bayésienne (Koene & Schulenburg 2005).

I.4.1.d. Source de calcium?

Une autre hypothèse stipule que le dard sert de source de calcium chez certains escargots hélicidés (Charnov 1979b). Vu que le calcium est indispensable pour le développement des escargots (Tompa 1980), le dard peut donc augmenter le succès reproducteur mâle par un apport supplémentaire de calcium (Charnov 1979b). Cependant, cette hypothèse a été rejetée pour beaucoup de raisons à savoir; (1) le tir du dard est une composante facultative du processus de l'accouplement; comme a été démontré pour l'espèce *Arianta arbustorum* (Baminger *et al.* 2000); (2) le dard est rarement incorporé et internalisé dans le corps du receveur et dans la plupart des cas le tir est raté (Koene & Chase 1998b); (3) le dard ne contient pas suffisamment de calcium pour pouvoir contribuer de manière significative à la production d'œufs. En effet, un dard contient en moyenne 0,369 mg de calcium soit à peu près la quantité que contient un seul œuf (0,411 mg). De plus, il a été confirmé chez l'espèce *Cornu aspersum* que l'embryon en développement épuise le calcium à partir de la coquille (Koene & Chase 1998b) comme a été rapporté aussi chez d'autres espèces (Tompa 1975, 1980).

I.4.1.e. Augmentation du succès reproducteur du receveur

Une autre hypothèse, largement soutenue (Rogers & Chase 2001), stipule que le dard influe directement sur la physiologie reproductrice du partenaire d'accouplement. Cette idée a conduit Koene & Chase (1998a) à tester empiriquement l'effet probable du mucus transporté par le dard sur l'appareil reproducteur de l'espèce *Cornu aspersum* en appliquant des extraits des glandes multifides (=mucus) sur ce dernier *in vitro*. Le mucus appliqué a induit des contractions dans les parties femelles de l'appareil reproducteur qui ont causé l'obturation de l'entrée vers l'organe de digestion des spermatozoïdes. Ceci est supposé faciliter l'absorption du spermatophore dans le diverticulum et par conséquent augmenter la quantité du sperme stockée dans la spermathèque. En effet, lors de leur expérience sur l'espèce *Cornu aspersum* Rogers & Chase (2001) ont pu établir un lien positif entre la réception d'un dard et le taux de stockage du sperme. Chez les escargots fécondés une fois, ils ont observé un taux de stockage d'environ 0,025% du nombre moyen des spermatozoïdes transférés; avec une augmentation d'environ 116% pour les escargots qui ont reçu un dard de leurs partenaires d'accouplement. De plus, la même étude a révélé que le succès reproducteur des escargots au tir de dard réussi, est souvent meilleur que celui des escargots qui ont raté leur tir confirmant ainsi son influence

positive. Au final, une telle augmentation du nombre de spermatozoïdes stockés double la paternité du tireur du dard (Landolfi *et al.* 2001) mais affecte négativement le succès reproducteur du receveur en diminuant son contrôle sur la fécondation (Rogers & Chase 2001, 2002, Chase & Blanchard 2006).

I.4.1.f. Signal 'honnête' pour le choix d'un partenaire d'accouplement

Il a été suggéré, dans l'hypothèse qui précède, que le mucus transporté par le dard sert probablement à manipuler le partenaire d'accouplement en influant le processus de stockage du sperme transféré. Cependant, l'introduction de cette substance peut aussi simplement être considérée comme un signal pour le choix du partenaire d'accouplement (Koene 1999).

Cette hypothèse a soulevé une question importante, à savoir ; si l'effet du tir du dard sur le succès reproducteur paternel est considéré comme une sorte de manipulation du partenaire ou simplement un moyen pour choisir le partenaire d'accouplement. Afin de résoudre cette question, Koene (1999) a appliqué « la théorie des jeux évolutionnistes » afin de démêler ces deux hypothèses alternatives. Les résultats obtenus, bien qu'ils prédisent différentes stratégies évolutives et stables pour les deux hypothèses lancées, mais ont révélé que le dard est utilisé principalement en tant qu'instrument pour manipuler l'appareil reproducteur du partenaire d'accouplement uniquement pour augmenter le succès reproducteur du tireur.

I.4.2. Morphologie des dards

Parmi les espèces possédant un dard, la morphologie de ce dernier est très variable et diffère généralement d'une espèce à une autre. La forme la plus commune semble être un stylet tranchant pointu et conique transportant les sécrétions des glandes multifides sur sa surface. Le nombre de dards chez un individu est également variable et va de un à huit dards. Les espèces *Humboldtiana* par exemple possèdent quatre sacs à dard, chacun contenant deux dards (Webb 1980, Schileyko 1989), arrangés autour du canal vaginal et situés sous un anneau de glandes multifides (Thompson & Brewer 2000).

De plus, les dards diffèrent dans leur courbure. Ils peuvent être droits comme chez l'espèce *Trichia hispida*, courbés comme chez l'espèce *Hygromia cinctella* ou courbé et tordu comme chez l'espèce *Leptaxis erubescens*.

Les dards peuvent aussi être équipés de lames comme c'est le cas de l'espèce *Cepaea hortensis* ou dépourvus de lames comme chez l'espèce *Polymita picta* (Koene & Schulenburg

2005). Quand les lames sont présentes, elles peuvent varier en nombre, en longueur ainsi qu'en la présence ou non de lames perpendiculaires supplémentaires. Ces dernières, quand elles sont présentes, sont supposées servir à augmenter la surface de dard et éventuellement la quantité de mucus transférée (voir Lodi & Koene 2016 pour revue).

Les principales caractéristiques des dards ainsi que les différences de leurs traits observées entre les différentes espèces sont illustrées sur (fig.1.4).

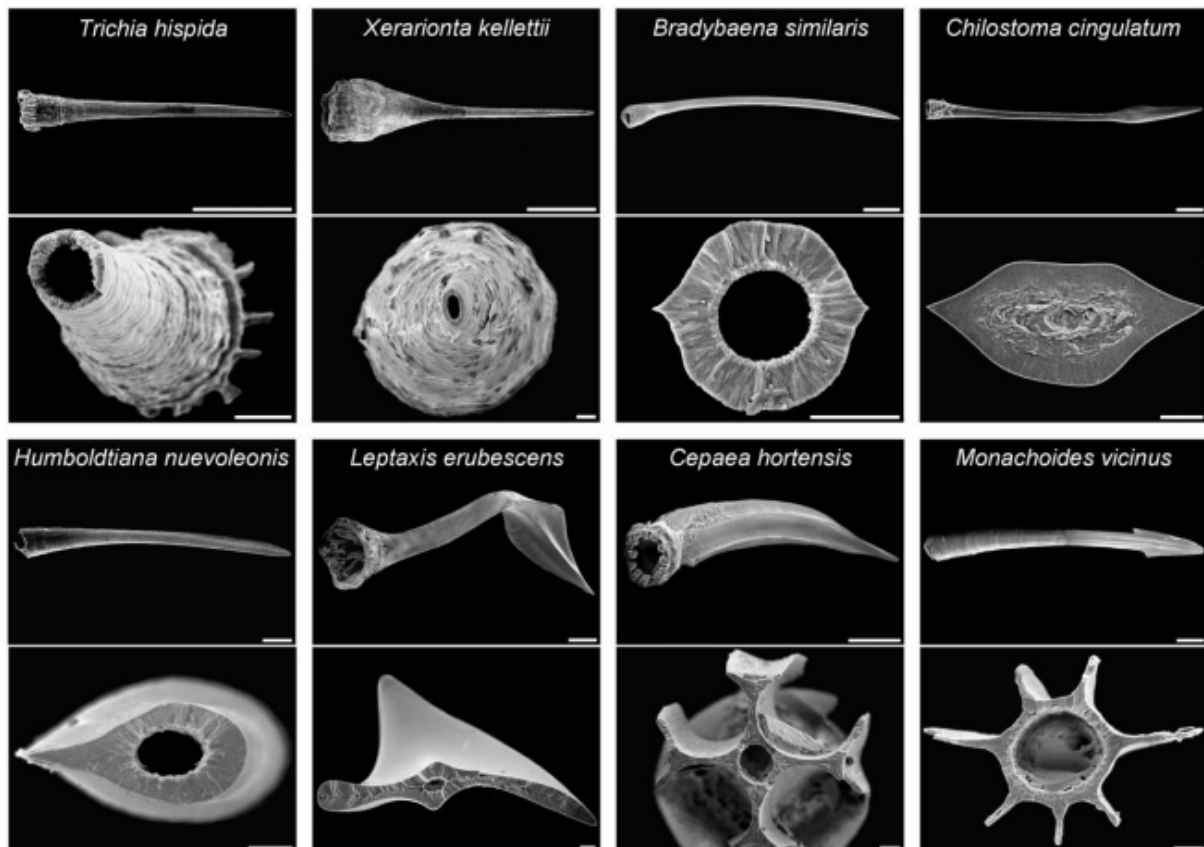


Fig.1.4. Diversité des dards. Photos prises au microscopique électronique, illustrant les différentes formes des dards. Les faces latérales (la barre d'échelle indique 500 µm) et les sections transversales (la barre d'échelle indique 50 µm) des dards de différentes espèces sont représentées (Koene & Schulenburg 2005).

I.4.3. Utilisation du dard

Durant la phase qui précède l'accouplement et avant le transfert du spermatophore, le dard est rapidement expulsé du pore génital grâce à l'action musculaire du sac à dard. Il atteint le corps du partenaire d'accouplement où il reste incrusté et parfois internalisé (Koene & Chase 1998b, voir fig.1.5). Parfois quand le tir n'est pas assez puissant, le dard risque de ne pas se

décoller du sac à dard et ne pas atteindre sa cible, un phénomène se produisant dans 8,3% des cas chez l'espèce *Cornu aspersum* (Koene and Chase 1998b). Après son utilisation, un autre dard est produit en 5-7 jours par le sac à dard (*Cornu aspersum*, Tompa 1981; *Helix pomatia*, Jeppesen 1976). Chez les hélicidés, le dard est généralement utilisé simultanément par les deux partenaires d'accouplement et constitue une composante intégrale des séquences d'accouplement. Une exception se produit chez l'espèce *Arianta arbustorum* qui utilise le dard uniquement dans 23–50% des accouplements (Baminger *et al.* 2000).

Une différence majeure entre les hélicidés et d'autres familles possédant un dard (les Hygromiidae, les Bradybaenidae et les Helminthoglyptidae), est que ces dernières peuvent utiliser le même dard plus d'une fois vu qu'il reste attaché au sac à dard (voir Lodi & Koene 2016).

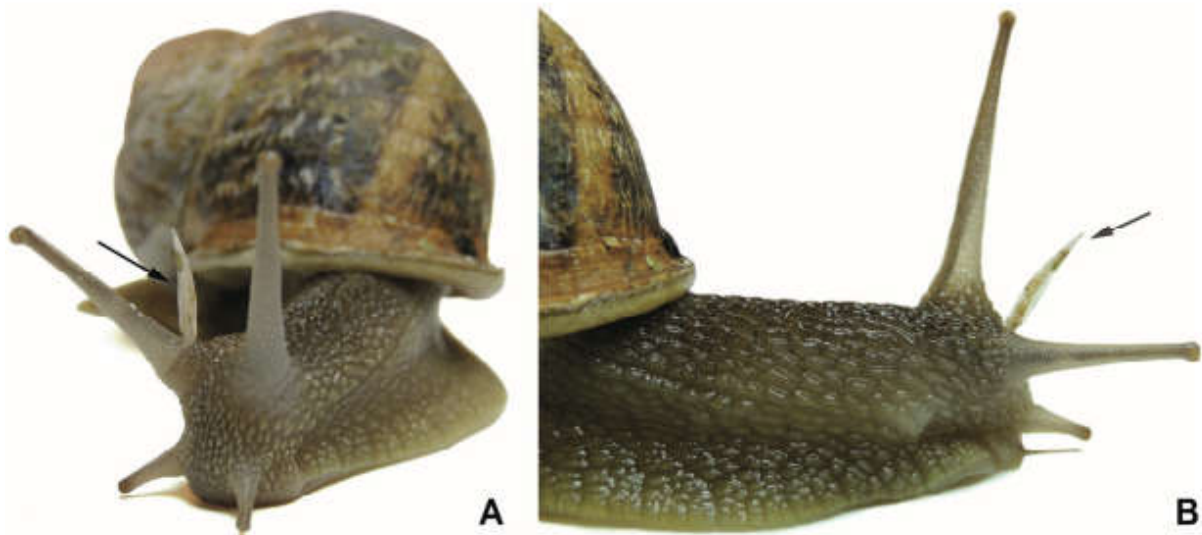


Fig.1.5 (A) un escargot *Cornu aspersum* ayant reçu un dard sur la tête (indiqué par une flèche). (B) profil du même individu, avec le dard empêchant le tentacule de s'étendre complètement de sorte qu'il parait plus court que l'autre (Lodi & Koene 2016).

I.4.4. Transfert du mucus

Le tir du dard facilite l'introduction d'une « allohormone » (Koene & ter Maat 2001), contenue dans le mucus, dans le corps du partenaire d'accouplement. Chez la plupart des espèces possédant un dard; le transfert du mucus qui est produit dans les glandes multifides sur la surface du dard a été clairement observé (Lodi & Koene 2016). Chez les familles qui utilisent le même dard à plusieurs reprises, ce dernier est d'abord enrobé dans le mucus avant

chaque utilisation (Koene & Chiba 2006). Il existe donc deux stratégies pour le transfert du mucus; soit en le tir répété d'un simple dard et le transfert de petites quantités de mucus à chaque fois ou via le tir du dard une seule fois mais avec puissance ; ce qui résultera en le transfert d'une quantité importante de mucus (voir Lodi & Koene 2016).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

II. Stockage du sperme *in vivo* par les femelles

II.1. Définition du stockage de sperme *in vivo*

II.2. Avantages du stockage de sperme *in vivo*

II.3. Durée de stockage de sperme *in vivo*

II.4. Sites de stockage de sperme *in vivo*

II.5. Causes de la variabilité des organes de stockage de sperme

II.6. Mécanismes de stockage de sperme

II.7. Maintenance de la survie du sperme dans les organes de stockage

II. Stockage du sperme *in vivo* par les femelles

II.1. Définition du stockage de sperme *in vivo*

Les femelles de nombreux animaux à fertilisation interne, vertébrés (Diesel 1989, Taylor *et al.* 2000, Baer *et al.* 2003) et invertébrés (Gist & Jones 1989, Krutzsch & Crichton 1991, Birkhead & Møller 1992) (fig.1.6), ont tendance à stocker le sperme reçu durant l'accouplement dans des organes spécialisés au sein de leur appareil reproducteur afin d'assurer la fécondation des ovules même en l'absence de partenaires sexuels. Ceci s'avère très utile vu que le processus de l'insémination, naturel ou artificiel, ne soit pas toujours synchronisé avec le moment de l'ovulation qui, lui est régulé par des facteurs endocriniens (Matsuzaki *et al.* 2014). De ce fait, chez de nombreuses espèces animales, le stockage de sperme par les femelles semble être une partie intégrante de leur stratégie reproductrice (Neubaum & Wolfner 1999).

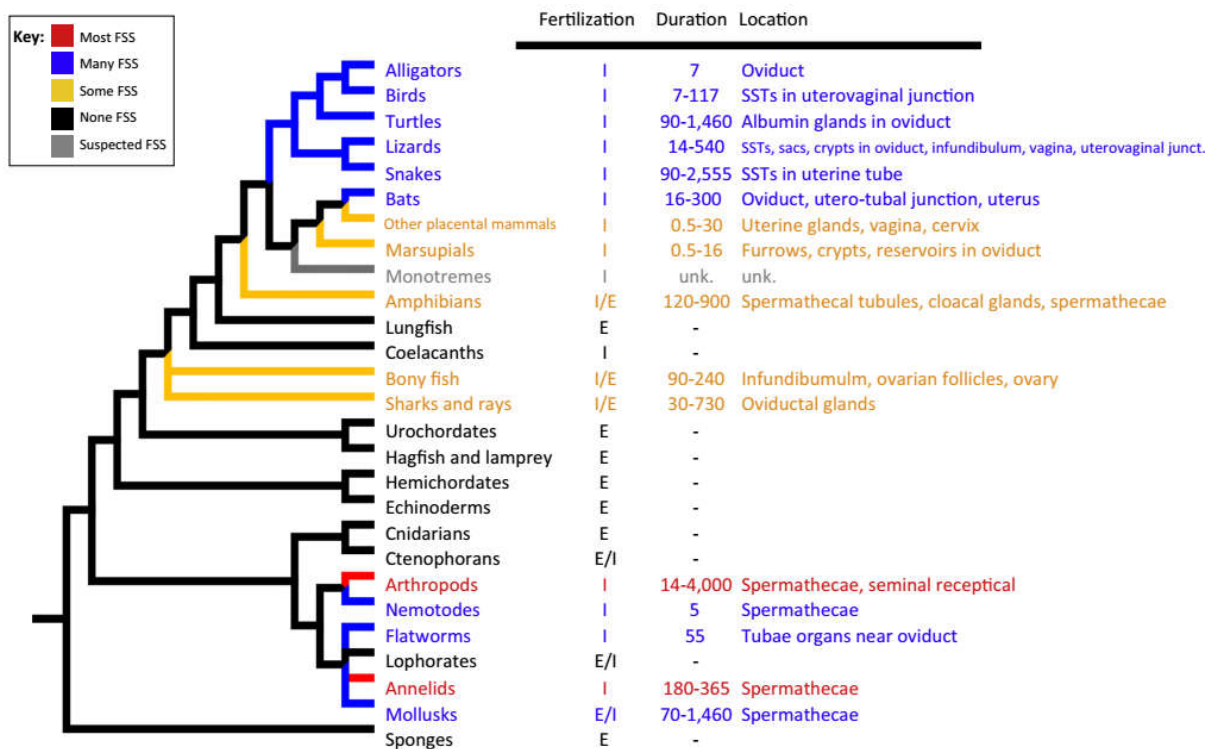


Fig.1.6 Phylogénie montrant le processus de stockage de sperme, répandu et presque omniprésent chez les espèces à fertilisation interne. Les couleurs indiquent le nombre d'espèces exerçant le stockage de sperme. Le mode de fertilisation est indiqué par un I (pour fertilisation interne), E (pour fertilisation externe) ou la combinaison des deux avec le mode le plus commun cité en premier. La durée de stockage de sperme est indiquée en jours ainsi que le site de stockage quand il est connu (Orr & Brennan 2015).

II.2. Avantages du stockage de sperme *in vivo*

Comme indiqué plus haut, la capacité de stockage de sperme représente une partie intégrante des stratégies reproductrices chez beaucoup d'espèces animales et peut fournir une multitude d'avantages (Neubaum & Wolfner 1999).

II.2.1. Amélioration de la diversité génétique de la descendance

Le stockage de sperme par les femelles est très fréquemment associé à la polyandrie, qui est un mode de reproduction où une femelle s'accouple avec plusieurs mâles au cours de la même saison de reproduction. Il en résulte d'une telle association, la création d'une banque riche en spermatozoïdes provenant de plusieurs mâles. Par conséquent, les femelles, en plus de pouvoir assurer la diversité génétique de leur descendance, gagnent l'opportunité de déterminer la paternité de cette dernière ; non seulement lors de leur choix de partenaires d'accouplement mais même au cours de tous les événements de reproduction.

Un exemple dans ce contexte se produit chez la Scatophage du fumier. En fait, les environnements fréquentés par ces espèces nécessitent souvent des caractéristiques différentes et des traits spécifiques pour y survivre. Les femelles sont donc dotées de la capacité de fertiliser préférentiellement leurs ovules et de manipuler la diversité génétique de leur descendance d'une manière appropriée. En effet, il paraît qu'elles soient en mesure de faire correspondre plusieurs spermatozoïdes provenant de différents mâles afin de réunir les gènes et les traits requis pour leur progéniture (Ward 2000).

II.2.2. Extension du succès reproducteur

Le stockage du sperme par la femelle est une solution évolutive pouvant séparer dans le temps les deux processus de l'insémination et la fertilisation quand leur union n'est pas avantageuse pour l'espèce. En effet, si l'on considère par exemple une espèce hypothétique chez laquelle les trois événements de reproduction à savoir ; l'accouplement, la fertilisation et la ponte sont liés d'une manière à ce que le dernier (la ponte) se produit toujours neuf mois après le premier (la fertilisation). En considérant, d'une part, que la descendance de cette espèce ayant un temps optimal de naissance, donc l'accouplement devra se réaliser neuf mois à l'avance. D'une autre part, si l'espèce dispose d'un temps optimal pour la recherche d'un partenaire d'accouplement qui ne soit pas neuf mois avant la saison de ponte optimale, un problème

surgit. La solution est donc le stockage du sperme jusqu'au moment idéal pour son utilisation (Birkhead & Møller 1993).

D'une autre part, le stockage du sperme semble être indispensable chez les espèces aux deux mécanismes d'insémination et fertilisation naturellement séparés. Chez l'escargot hermaphrodite simultané *Cornu aspersum* par exemple, Madec *et al.* (1998) ont observé que la fécondation des ovules se produit généralement plusieurs heures voir quelques jours après l'accouplement. De même, l'espèce *Arianta arbustorum* s'accouple fréquemment après la période de ponte et des fois quelques jours avant l'hibernation les poussant ainsi à stocker le sperme jusqu'à la saison qui suit. Donc, il paraît que les longues périodes d'estivation et d'hibernation que subissent ces animaux soient la cause principale de la séparation des deux processus d'insémination et de fécondation dans le temps (voir Minorette *et al.* 2011). Cela fait du stockage du sperme un processus indispensable chez ces espèces contribuant à l'extension de leur succès reproducteur.

II.2.3. Prévention du vieillissement du sperme

Le vieillissement causé par les radicaux libres provoque l'accumulation de dommages sur les spermatozoïdes conduisant subséquemment à leur dégradation. Par conséquent, ceci affecte négativement la fertilité féminine et diminue son succès reproducteur.

Lors d'une étude menée par Ribou & Reinhardt (2012), les auteurs ont constaté que le sperme, une fois stocké, son métabolisme tend à se réduire de même que le taux de production de radicaux libres. Une telle réduction prévient probablement le vieillissement du sperme et les effets délétères y associés d'où l'intérêt de son stockage.

II.2.4. Prévention de la polyspermie

La polyspermie est un mode de fécondation fréquent chez beaucoup d'animaux. Il consiste en la pénétration de plus d'un spermatozoïde dans le cytoplasme des ovules. Ce mode de fécondation peut être considéré comme un phénomène régulier lorsqu'un seul spermatozoïde s'unit avec le nucléus. Cependant, il peut devenir pathologique et anormale lorsque plus d'un spermatozoïde fertilisent l'ovule. Parmi les facteurs conduisant à un tel phénomène, la présence d'un nombre élevé de spermatozoïdes sur le site de la fertilisation comme le cas du cochon ; qui présente un risque de polyspermie relativement élevé (Polge *et al.* 1970, Hunter & Léglise 1971, Hunter 1973).

Dans de telles situations, le processus de stockage du sperme est d'une grande utilité. En effet, il contribue à prévenir la polyspermie, probablement par un dégagement progressif de spermatozoïdes à partir des sites de stockage (Suarez 2008) évitant ainsi un éventuel excès.

II.2.5. Prolongation des durées de reproduction

Les femelles, en stockant le sperme, acquièrent une indépendance reproductrice en ayant toujours la possibilité de se reproduire même en l'absence de partenaire sexuel.

Le stockage du sperme s'avère aussi très utile dans les cas où les ovules d'une espèce ne peuvent être fertilisés qu'au cours d'un intervalle de temps bien précis. Dans de telles situations, le stockage du sperme assure donc la disponibilité de sperme à tout moment.

Ceci explique en partie la tendance de tous les oiseaux à stocker le sperme, vu que leurs ovules soient uniquement fertilisés durant les 20 minutes qui suivent leur ponte (Birkhead & Møller 1993).

II.2.6. Modification du sex-ratio

Chez certains animaux, tels que les guêpes et les abeilles, appartenant à l'ordre des insectes Hyménoptères, le sexe des descendants est déterminé par un système particulier appelé haploïdie. Ce dernier permet de contrôler le sex-ratio d'une manière à ce que ; les femelles se développent à partir de l'union d'un ovule et d'un spermatozoïde et sont donc diploïdes, tandis que les mâles se développent à partir d'œufs non fécondés et sont haploïdes.

Cependant, ce système est prédit être responsable du développement, chez beaucoup d'insectes, de l'eusocialité ; qui est un mode d'organisation sociale suivant lequel un ensemble d'animaux vivant ensemble sont divisés en individus fertiles et non fertiles.

Néanmoins, il semble que beaucoup d'hyménoptères sont en mesure de modifier le sex-ratio (Clausen 1939) probablement grâce au processus de stockage du sperme par les femelles leur permettant de contrôler la libération des spermatozoïdes et l'accès aux ovules.

II.2.7. Régulation de la capacitation du sperme

La capacitation est le premier processus que subit le sperme après son dégagement de l'appareil génital mâle. Il consiste en la déstabilisation de la membrane plasmique des spermatozoïdes leur permettant par la suite de subir une réaction acrosomique pour acquérir la capacité d'accéder au cytoplasme de l'oocyte. La capacitation est donc un pré-requis d'une

chaîne entière d'événements menant à la fertilisation. Elle se déroule dans l'appareil reproducteur femelle, généralement dans l'oviducte, qui présente un environnement approprié pour le transport, stockage et capacitation du sperme chez beaucoup de mammifères (exp. vaches et cochons, voir Rodriguez-Martinez 2007). Le phénomène de la capacitation peut également être réalisé *-in vitro-* dans un milieu fluide simple. Cependant, le problème de la capacitation *-in vitro-* est que les spermatozoïdes se condensent au même temps; ce qui peut résulter en l'altération de leurs membranes plasmiques et conduire à leur dégradation. Par contre, s'ils sont stockés par les femelles, la déstabilisation de la membrane se produit sélectivement sous contrôle oviductale évitant ainsi leur dégradation (Rodriguez-Martinez 2007).

II.2.8. Augmentation de la proportion des mâles produits

Selon une étude menée sur le lézard dragon d'Australie *Ctenophorus pictus*, Olsson *et al.* (2007) ont remarqué que les spermatozoïdes stockés ont une probabilité de 23% de plus pour générer des mâles que des femelles. Si répandu chez les autres espèces, cela peut être d'une grande utilité en termes de disponibilité de mâles et production de quantités suffisantes de sperme qui font défauts chez beaucoup de populations animales.

II.2.9. Minimisation d'accouplements et les coûts y associés

Les accouplements sont souvent accompagnés de coûts parfois délétères pour la femelle. Cependant, en stockant le sperme, la femelle minimise les accouplements avec beaucoup de mâles; réduisant ainsi les coûts y associés mais tout en gardant un taux de succès reproducteur relativement élevé.

II.3. Durée de stockage de sperme *in vivo*

La durée de stockage du sperme varie considérablement d'une espèce à une autre et peut s'étendre sur quelques heures, quelques jours, des mois ou même des années.

En effet, le sperme reste stocké par les femelles pour une durée généralement équivalente ou supérieure à la saison reproductrice des animaux et peut même se prolonger dans certains cas jusqu'à plusieurs saisons (Neubaum & Wolfner 1999).

Certains mammifères par exemple stockent le sperme pour une période moins de 48 heures uniquement. Le stockage du sperme pour le long terme semble néanmoins très fréquent chez beaucoup d'espèces (Tompa 1984) comme c'est le cas chez les insectes. Ces derniers

présentent des durées de stockage impressionnantes avec la plus longue enregistrée chez l'espèce de fourmis *Formica execta* et qui peut atteindre les 30 années (Pamilo 1991, fig.1.7).



Fig.1.7. L'espèce *Formica execta* à la plus longue durée de stockage de sperme, pouvant atteindre 30 ans. Photo par Alex Wild à téléchargement libre de Wikipedia.

II.4. Sites de stockage de sperme *in vivo*

Afin de stocker le sperme et le garder dans un état viable jusqu'au moment de la fertilisation, beaucoup d'espèces ont développé des organes spécialisés au sein de leurs appareils reproducteurs ayant une grande affinité pour le sperme.

Plusieurs études explorant la structure et la physiologie de ces organes, spécialement leur implication probable dans les mécanismes de la sélection sexuelle, ont été entreprises sur plusieurs espèces animales. Ces études ont révélé que les organes de stockage de sperme présentent une variabilité inter- et intra-spécifique dramatique que ça soit en terme de nombre, taille, morphologie et même degrés de sophistication.

II.4.1. Pas de site particulier de stockage

Certaines espèces ne disposent d'aucun site particulier dédié au stockage de sperme. Cependant, elles ont la capacité de garder les spermatozoïdes en état viable pour des durées relativement longues pouvant atteindre plusieurs mois ; simplement en les accumulant dans des structures dans leur appareil reproducteur initialement évolués pour d'autres fonctions.

Les chauves souris présentent le meilleur exemple de cette situation. En effet, ces dernières ne disposent d'aucun organe spécialisé pour le stockage mais peuvent néanmoins garder le

sperme viable pendant plusieurs mois en l'accumulant dans l'oviducte ou l'utérus durant toute la période d'hibernation et jusqu'au moment de la fertilisation (Racey *et al.* 1987, Bernard & Cumming 1997). En outre, du sperme a été trouvé dans les glandes utérines chez le chien (Whelan & Strong 2014), les glandes sécrétrices de l'albumine chez les tortues (Sarkar *et al.* 2003) et les glandes oviductales chez les requins (Holt & Lloyd 2010) et même à l'intérieur des ovaires chez certains poissons (Vila *et al.* 2007). Ces organes, en plus de leur rôle initial, sont supposés servir de sites pour le stockage de sperme chez les animaux concernés. Cependant, la présence de spermatozoïdes dans ces organes n'est pas une preuve suffisante pour considérer ces derniers comme sites de stockage. Il se peut simplement que les spermatozoïdes soient piégés par hasard lors de leur passage, probablement suite à la structure et la position de ces organes (Gomendio *et al.* 1998). La meilleure évidence que ceux-ci soient des sites de stockage de sperme serait de savoir ; si le sperme y contenu est capable de fertiliser les ovules. En l'absence de telles données, un suivi de plusieurs individus pourrait révéler si les spermatozoïdes se dirigent toujours vers le même endroit. Un autre élément pouvant servir de preuve, serait probablement l'examen anatomique des différences épithéliales (=ultra-structure) dans les sites de stockage putatifs. A titre d'exemple, la présence de tissus glandulaires pourrait être considérée comme une source de nutrition pour le sperme.

Une autre preuve que les femelles stockent le sperme en l'absence d'organes spécialisés pourrait découler de l'examen des changements ontogéniques des sites putatifs de stockage de sperme. En effet, si les caractéristiques de stockage de sperme ne sont apparentes que lorsqu'une femelle atteint la maturité sexuelle, cela peut indiquer en quelque sorte que ces dernières jouent un rôle dans le processus de stockage de sperme. Cependant, les changements anatomiques et physiologiques qui surviennent dans l'appareil reproducteur après l'accouplement, peuvent résulter de la sélection sur les mâles et les femelles et les processus de coévolution (Orr & Brennan 2015). Des changements induits suite à l'accouplement ont été par exemple observés dans les plis épithéliaux chez l'opossum «*Trichosurus vulpecula*» (Jungnickel *et al.* 2000), les cellules sécrétrices chez la tortue à carapace molle «*Lissemys punctata*» (Sarkar *et al.* 2003), l'opossum gris à queue courte «*Monodelphis domestica*» (Kress & Morson 2007) ainsi que dans le col de l'utérus chez certains mammifères (Suarez & Pacey 2006). Intéressant à noter, si le mécanisme responsable de la modification de ces structures en vue de stocker le sperme dérive de changements anatomiques ou mécaniques se produisant durant l'accouplement; les mâles auront probablement le potentiel de manipuler les femelles pour un stockage préférentiel des spermatozoïdes (Orr & Brennan 2015).

II.4.2. Tubules de stockage de sperme (TSS)

Chez les espèces aviaires par exemple, le sperme est stocké dans invaginations tubulaires spécialisées, appelées tubules de stockage de spermatozoïdes (TSS) qui se trouvent dans l'oviducte (Bohr *et al.* 1964, Brillard 1993) (fig.1.8). La présence de ces structures permet aux spermatozoïdes éjaculés dans l'appareil reproducteur féminin de survivre jusqu'à 2-15 semaines chez les oiseaux domestiques, y compris les poules, dindes, cailles et canards (Bakst *et al.* 1994, Bakst 2011), en contraste à la durée de vie relativement courte des spermatozoïdes chez les mammifères qui est de quelques jours seulement. Les TSS sont localisées dans la lamina propria des plis muqueux de la jonction utéro-vaginale et dans l'infundibulum de l'oviducte (Burke & Ogasawara 1969, Brillard 1993) (fig.1.8).

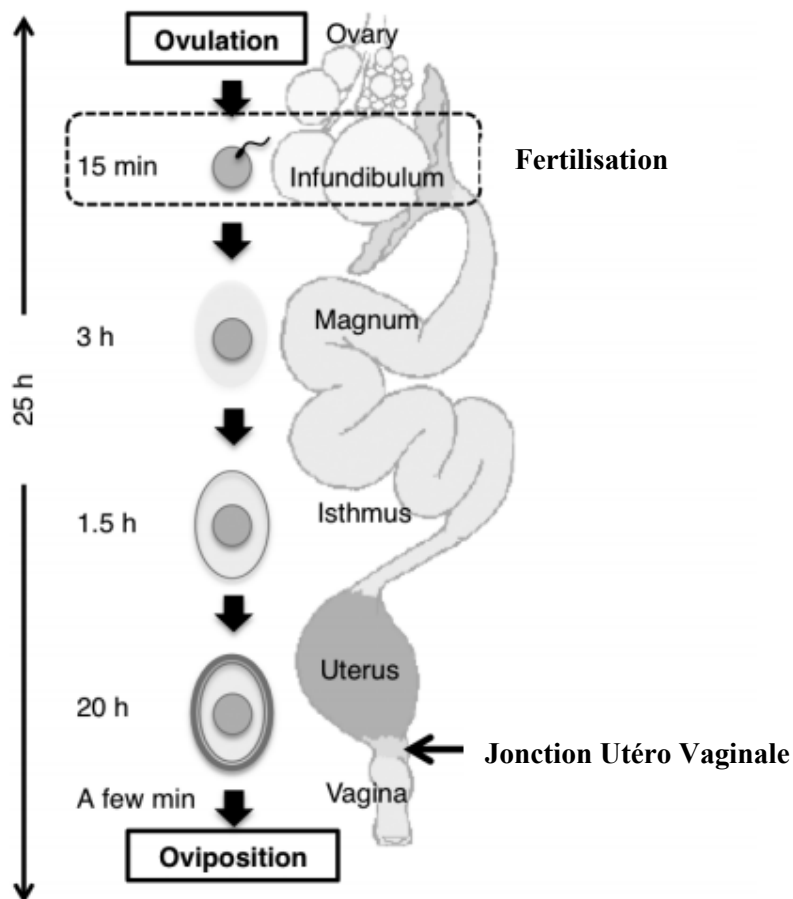


Fig.1.8. Dessin schématique d'un oviducte aviaire. Après l'ovulation, l'ovocyte est incorporé dans l'infundibulum de l'oviducte et le sperme où il est fécondé dans les 15 minutes suivant l'ovulation. Après fécondation, la surface du zygote est enveloppée dans de l'albumine, membrane de coquille et cuticule en passant par l'oviducte. La position de la jonction utéro-vaginale est indiquée par une flèche. La durée approximative de la présence du zygote dans chaque partie est aussi indiquée (Sasanami *et al.* 2013).

En outre, les tubules de stockage de sperme chez les oiseaux possèdent une seule ouverture et les spermatozoïdes s'alignent dans l'ordre de leur pénétration dans le tubule. Par conséquent les derniers spermatozoïdes à s'introduire sont les premiers à sortir ce qui crée la présence du dernier sperme chez les oiseaux (Briskie 1996, Birkhead 1998b). La figure suivante illustre du sperme stocké dans un tubule chez un oiseau (fig.1.9).

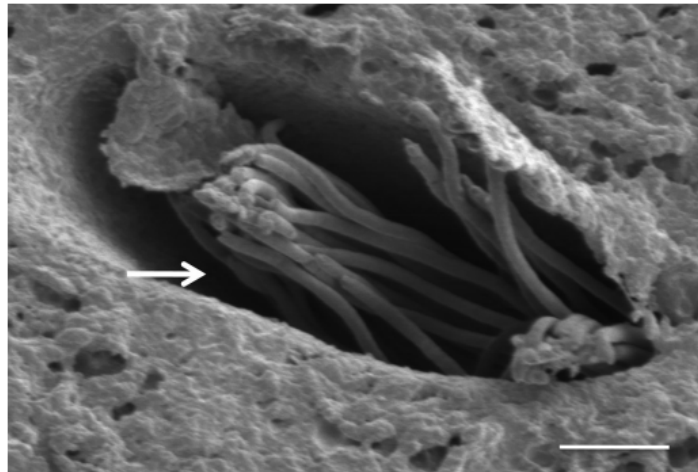


Fig.1.9. Observation de l'ultra-structure du sperme résidents dans les tubules de stockage de sperme (TSS) chez un oiseau. Echelle= 2.5 μm (Sasanami *et al.* 2013).

II.4.3. Organes spécialisés et sophistiqués « les spermathèques »

Les insectes, les mollusques, les vers oligochètes, certains amphibiens et beaucoup d'autres animaux, vertébrés et invertébrés, stockent le sperme dans des organes hautement sophistiqués. Dans la plupart des cas, il s'agit d'une « spermathèque » qui est généralement d'une structure très complexe et constituée principalement de plusieurs compartiments (Eberhard 1985, 1996). Une fonction probable d'une telle structure serait la ségrégation du sperme reçu de différents partenaires pour une utilisation différentielle subséquente.

La spermathèque est également appelée réceptacle séminal et peut servir de site de fertilisation en plus de sa fonction de stockage de sperme.

Certaines espèces animales ont développé plusieurs spermathèques. Les vers de terre par exemple, possèdent quatre paires de spermathèques, chacune située dans le sixième, septième, huitième et neuvième segment. Elles sont revêtues d'un épithélium et peuvent se présenter sous différentes formes à savoir; minces, enroulées...etc. (voir Pechenik 2010).

La spermathèque des gastéropodes, qui a suscité beaucoup d'attention, se présente sous forme tubulaire avec un nombre très variable de tubules (discuté en-dessous).

Elle est généralement située dans la partie distale de l'appareil reproducteur et y faisant partie d'un organe entier appelé poche de fertilisation pour former ce qui est connu sous le nom de « poche de fertilisation-complexe de la spermathèque » (voir fig.1.10)

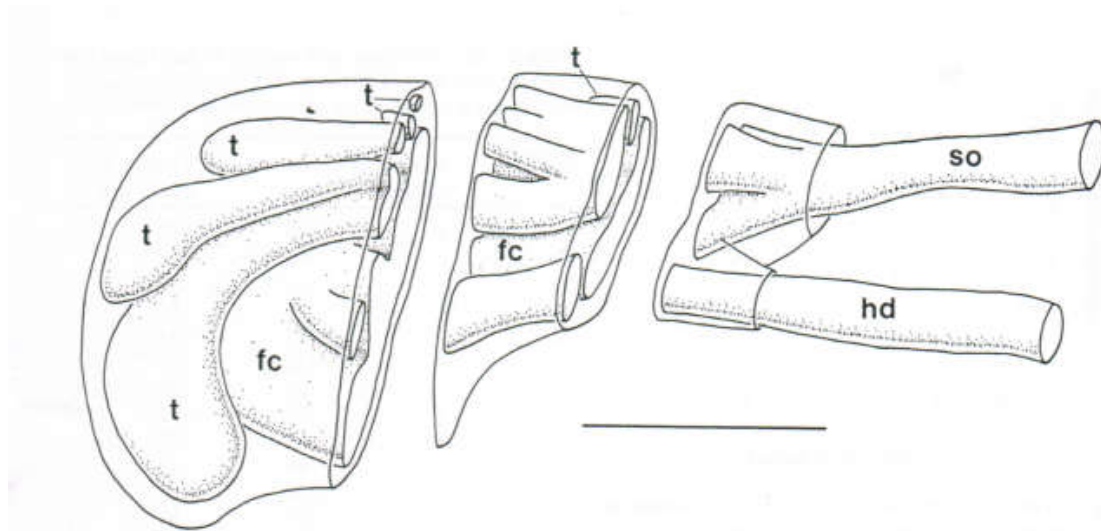


Fig.1.10. Reconstitution de la poche de fertilisation de l'espèce hermaphrodite simultanée *Arianta arbustorum*. Fc= chambre de fertilisation, t= tubules spermathéaux, hd= canal hermaphrodite, so= spermoviducte. Echelle: la barre indique 500 µm. (Haase & Baur 1995).

II.4.4. Plus d'un type d'organes de stockage

La possession de plus d'un type d'organe pour stocker le sperme est limité seulement pour quelques animaux comme c'est le cas chez les femelles de toutes les espèces de *Drosophile*. Ces dernières disposent d'un réceptacle séminal ventral dans lequel sont stockés environ 80% des spermatozoïdes reçus (Boulétreau-merle 1977) ainsi qu'une paire de spermathèques sphériques où sont stockés les 20% restants (Boulétreau-merle 1977) (fig.1.11).

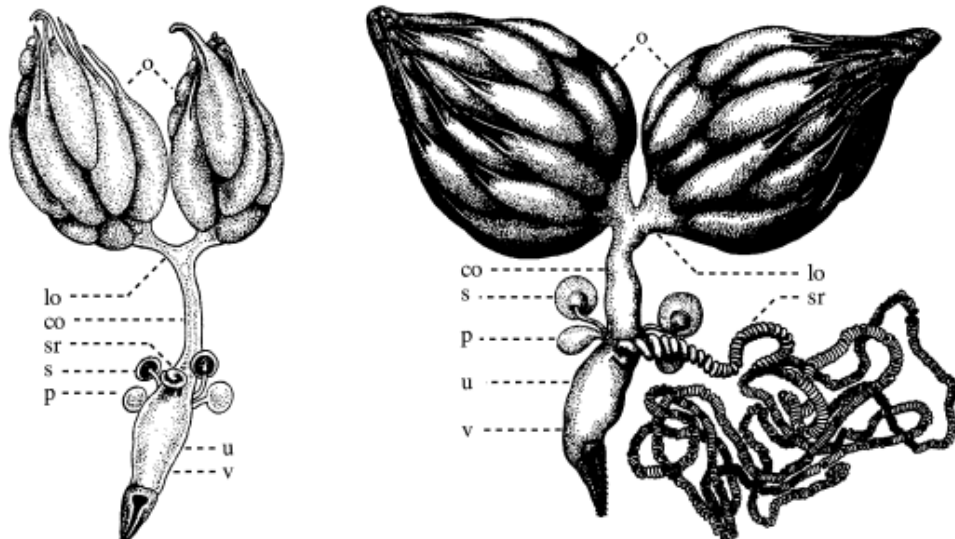


Fig.1.11. Appareils reproducteurs femelles de *Drosophila pseudoobscura* (gauche) et *Drosophila bifurca* (droit) dessinés à la même échelle. *Drosophila pseudoobscura* possède un réceptacle- séminale de 0,41 mm et celui de *Drosophila bifurca* est de 81,67 mm. Les abréviations: o, ovaires; lo, oviducte latéral; co, oviducte commun; u, utérus; v, vagin; s, spermathèque; sr, réceptacle séminale; p, parovarium. (Pitnick *et al.* 1999).

II.4.5. Plusieurs organes de stockage

Chez quelques animaux, le stockage de sperme s'effectue dans une multitude d'organes. Certaines espèces de mouches et araignées par exemple possèdent respectivement de 3 à 100 spermathèques dans leurs appareils génitaux (fig.1.12). Les oiseaux aussi peuvent détenir de 500 à 20000 tubules de stockage de sperme dans leur jonction utéro-vaginale (Pitnick *et al.* 1999).



Fig.1.12. Mouche *Dryomyza anilis* détenant 3 spermathèques. Photo par Kurt Hennige à téléchargement libre de Wikipedia (gauche). Araignée *Mecysmaucheniid* détenant plus de 100 spermathèques. Photo par H. Wood à téléchargement libre de Wikipedia (droit).

II.5. Causes de la variabilité des organes de stockage de sperme

De nombreuses hypothèses ont été émises dans le but d'expliquer les causes des divergences des organes de stockage de sperme citées ci-dessus. Cependant, les vraies raisons restent mal comprises.

II.5.1. Corrélation avec la forme et taille des spermatozoïdes

La divergence observée dans la morphologie et les dimensions des organes de stockage de sperme est supposée être liée à la grande variabilité observée dans la taille et la forme des spermatozoïdes chez différents groupes animaux (voir fig.1.13). Evidemment, puisque ces organes sont destinés à contenir le sperme, ils doivent adopter une forme et taille adéquates pour s'assortir avec la forme et la taille des spermatozoïdes.

Effectivement, une corrélation positive entre la longueur des spermatozoïdes et la longueur des organes de stockage de sperme femelles a été établie pour les coléoptères, les oiseaux, les mouches et les drosophiles (cité par Pitnick *et al.* 1999) confirmant en quelque sorte cette hypothèse.

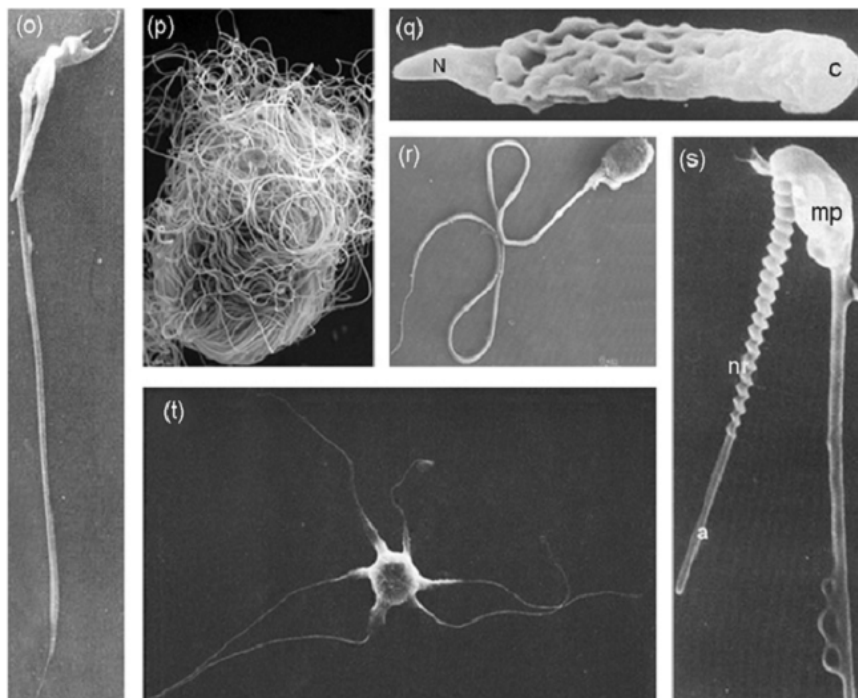


Fig.1.13. Variation de la forme des spermatozoïdes chez les animaux (Pitnick *et al.* 2009)

II.5.2. Différences des traits d'histoire de vie

La différence de la complexité des organes de stockage de sperme femelles peut être largement liée à la longévité des femelles, le nombre des œufs produits et même à leur volume (Pitnick *et al.* 1999). Les femelles à une durée de vie plus importante ou produisant un grand nombre d'œufs semblent opter pour le développement d'organes plus spécialisés avec une grande capacité de stockage et pouvant fournir une nutrition suffisante pour le sperme stocké. Cette hypothèse peut justifier en quelque sorte le développement des spermathèques très sophistiquées chez les populations d'escargots terrestres Hélicidés *Cornu aspersum* et *Helix lucorum* qui ont besoin de stocker les spermatozoïdes pendant les longues périodes d'estivation qu'ils subissent.

II.5.3. Sélection sexuelle

En ce qui concerne l'augmentation de la complexité des organes de stockage de sperme, il a été largement soutenu qu'il s'agit d'une réponse évolutive à la sélection sexuelle post-copulatoire dans un contexte de «compétition spermatique» et «choix cryptique des femelles».

Cette complexité est traduite, chez certains animaux, par une évolution du nombre d'organes stockant les spermatozoïdes ou par leur sophistication quand l'animal ne possède qu'un seul organe de stockage de sperme.

Citons la spermathèque de certains pulmonés terrestres. Cette dernière se présente sous une structure tubulaire et le nombre de ces tubules varie considérablement; non seulement d'une espèce à une autre mais même entre les individus appartenant à la même espèce. Par exemple, 3 à 5 tubules sont survenus chez l'espèce *Helix pomatia* (Lind 1973), 4-6 chez *Cryptomphalus asperses* (Brisson, Régondaud & Collin 1977), 2-8 chez des populations d'*Arianta arbustorum* étudiées par Haase & Baur (1995) et 2-9 chez d'autres étudiées par Baminger & Haase (1999). Staikou (2001) a compté 1-8 tubules dans la spermathèque de l'espèce *Cepaea vindobonensis* et 5-16 dans celle d'*Helix lucorum*. Dans certaines populations appartenant à l'espèce *Cornu aspersum* obtenues à partir de deux régions du sud de la Grèce, 4 à 19 tubules ont été enregistrés par Koemtzopoulos & Staikou (2007) et 3-13 par Evanno & Madec (2007) chez d'autres populations de la même espèce (voir fig.1.14).

Espèce	Nombre de tubules	Auteurs
<i>Helix pomatia</i>	3-5	Lind, 1973
<i>Arianta arbustorum</i>	2-8 2-9	Haase & Baur, 1995 Baminger & Haase, 1999
<i>Cepaea vindobonensis</i>	1-8	Staikou, 2001
<i>Helix lucorum</i>	5-16	Staikou, 2001
<i>Cornu aspersum</i>	4-19	Koentzopoulos & Staikou, 2007

Fig.1.14. Variation du nombre de tubules spermathécaux chez quelques espèces d'escargots terrestres.

Cette augmentation de la complexité de la spermathèque traduite par une discordance dans le nombre de tubules s'explique, dans le contexte de la sélection sexuelle post-copulatoire, en tant que stratégie adoptée par les femelles pour mieux contrôler le stockage et l'utilisation des spermatozoïdes. Ce contrôle semble être possible grâce à la ségrégation des spermatozoïdes reçus de différents partenaires dans les différents tubules spermathécaux. Ceci facilite

probablement l'application du choix de paternité par la femelle (=choix cryptique de la femelle) en la libération des spermatozoïdes désirés pour la fécondation, par une simple contraction du muscle entourant le ou les tubules le contenant (fig.1.15) comme proposé par Bojat *et al.* (2001a) (voir aussi Haase & Baur 1995).

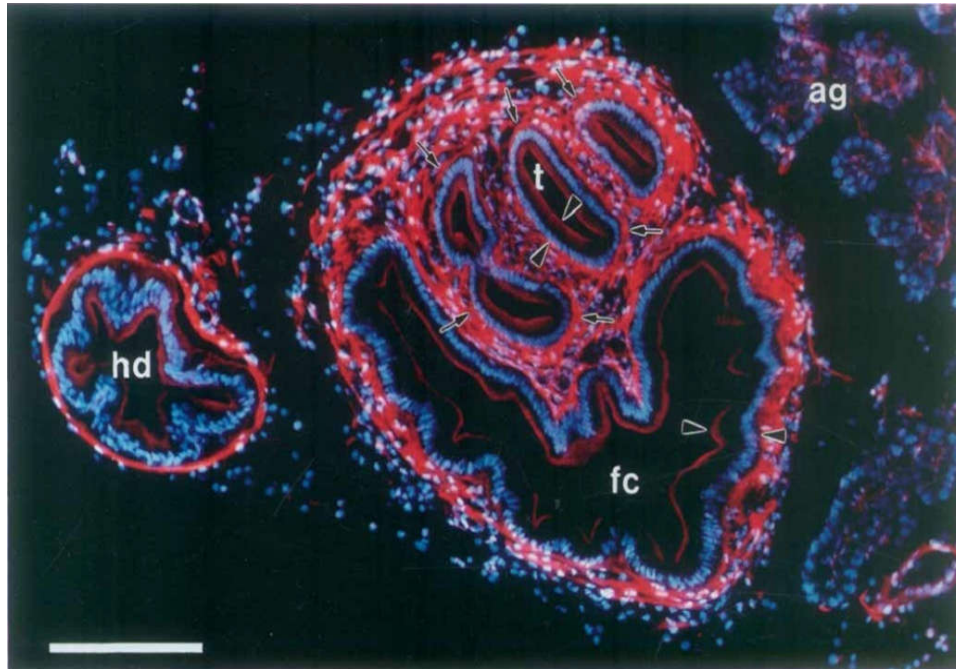


Fig.1.15. Coupe transversale à 10 µm de la poche de fertilisation à quatre tubules spermathécaux de l'espèce *Arianta arbustorum*. L'actine F marquée avec la rhodamine-phalloïdine et les noyaux avec le DAPI. Les flèches indiquent la gaine musculaire autour des tubules spermathécaux, les pointes de flèches entourent l'épithélium. Abréviations: ag, glande à albumine; fc, chambre de fertilisation; hd, canal hermaphrodite; t, tubule spermathecal. Echelle = 100 µm (Bojat *et al.* 2001a).

Cependant, les résultats de certaines autres études ont soulevé des doutes quant à l'exactitude de cette hypothèse. Par exemple, Chase & Darbyson (2008) ont constaté que les spermatozoïdes reçus après un seul accouplement étaient répartis en moyenne sur 75% des tubules de l'escargot terrestre *Cornu aspersum*. Les auteurs ont donc suggéré que si la même distribution se produit après chaque accouplement, le sperme de plusieurs partenaires serait mélangé dans chaque tubule rendant ainsi le contrôle féminin de la paternité impossible à réaliser. D'une autre part et dans un contexte de compétition spermatique, l'évolution du nombre de tubules spermathécaux est supposé être une solution, dans des situations de compétition spermatique intenses, qui permet à la fonction femelle d'augmenter le taux de réception de spermatozoïdes. Cependant, certains auteurs ont complètement nié l'existence

d'une telle relation après avoir échoué d'établir une corrélation entre la densité de populations d'escargots (considérée comme estimation directe de l'intensité de la compétition spermatique) et le nombre de tubules spermathécaux, suggérant ainsi que cette caractéristique de la spermathèque soit génétiquement déterminée (Baminger & Haase 1999, Koemtzoulous & Staikou 2007).

II.6. Mécanismes de stockage de sperme

Pour que le mécanisme de stockage de sperme soit efficace, les femelles doivent séquestrer les spermatozoïdes dans les organes de stockage ou réservoirs dédiés à cet effet et accomplir le stockage quelques heures après achèvement de l'accouplement. Les mécanismes adoptés pour cet effet semblent être aussi divers que la diversité du règne animal elle-même et il est largement admis que le stockage du sperme s'accomplit grâce à la contribution des mâles et les femelles ensemble. Ainsi, les mécanismes cités ci-dessous peuvent dans la pluparts des cas être utilisés en combinaison.

II.6.1. L'anatomie mâle et femelle canalise le sperme vers les sites de stockage

Un des moyens pour faciliter le stockage de sperme consiste simplement en le dépôt des spermatozoïdes le plus près possible des organes de stockage. En effet, beaucoup d'insectes possèdent des organes génitaux spécialisés pour un dépôt stratégique des spermatozoïdes dans ou près des organes de stockage de sperme. Le coléoptère *Aleochara curtula* par exemple introduit directement le spermatophore contenant le sperme dans le canal spermathecal au moyen d'un long organe d'intromission (Gack & Peschke 1994).

Néanmoins, chez beaucoup d'animaux, la morphologie de l'appareil génital femelle en combinaison avec d'autres facteurs à savoir ; les gradients de température (Smith & Yanagimachi 1990), les sécrétions des muqueuses (Suarez *et al.* 1990) ainsi que les contractions musculaires (Hunter 1995) semblent être suffisantes et responsables de la détermination de l'emplacement du sperme reçu et son contrôle.

II.6.2. Pompage du sperme par les contractions musculaires

Un autre moyen largement utilisé par les animaux pour manipuler le processus de stockage de sperme ; consiste en les contractions musculaires de l'appareil génital femelle. L'occurrence de ce mécanisme a été examinée spécialement chez les diptères, les Orthoptères, les Lépidoptères ainsi que chez beaucoup d'autres animaux.

Les contractions des organes de stockage eux mêmes chez la plupart des insectes et de l'utérus et l'oviducte chez les mammifères et certaines espèces d'insectes, semblent pouvoir jouer un rôle important dans le déplacement et l'orientation du sperme vers les organes de stockage (Neubaum & Wolfner 1999). Chez la punaise *Rhodnius prolixus*, les mouvements rythmiques péristaltiques de l'oviducte causent des contractions de la bourse ainsi que de la spermathèque. Par conséquent, ces contractions entraînent la migration des spermatozoïdes dans le canal et réservoir de la spermathèque où ils sont stockés (voir Davey & Webster 1967). Chez le coléoptère *Callosobruchus maculatus*, le sperme commence à s'introduire dans la spermathèque durant l'accouplement causant ainsi une élongation du muscle de cette dernière. À force de son élongation, ce muscle se contracte fortement résultant en l'expulsion du sperme déjà présent, donnant ainsi l'opportunité au nouveau sperme de s'introduire et se stocker (Eady 1994).

Les contractions musculaires chez la femelle sont aussi d'une grande importance dans le processus de stockage de sperme chez les mammifères. Les contractions du muscle lisse semblent être le moyen de transport du sperme à travers l'appareil génital chez ces derniers (Drobnis & Overstreet 1992). Ces contractions sont probablement stimulées soit par l'accouplement lui-même ou sous l'effet de molécules présentes dans le liquide séminal (Hunter 1995).

II.6.3. Facilitation du mouvement du sperme par le fluide séminal mâle

Les composantes du liquide séminal du mâle peuvent probablement faciliter le stockage du sperme par différents moyens:

II.6.3.a. Motilité

Le liquide séminal des mouches, moustiques, papillons, mites et coléoptères semble contenir des substances pouvant activer la motilité du sperme (Davey 1965, Davis 1965). En effet, Davis (1965) a confirmé que le liquide séminal chez la punaise de lit *Cimex lectularius* contribue effectivement à l'activation des spermatozoïdes nécessaire pour leur migration du site d'insémination au site de stockage.

II.6.3.b. Association du sperme

Chez les mammifères, les oiseaux et les insectes, les composantes du liquide séminal mâle peuvent s'associer avec les spermatozoïdes (voir Morris *et al.* 1987, Neubaum & Wolfner

1999). Bien que les fonctions spécifiques des molécules du liquide séminal liées aux spermatozoïdes ne soient pas connues; divers phénomènes importants leur ont été attribués. Chez les vertébrés par exemple, le passage du sperme à travers l'épididyme, où le liquide séminal se lie aux spermatozoïdes, s'est avéré indispensable pour l'acquisition des spermatozoïdes de la capacité à féconder (Moore 1981). De plus, la modification de la surface des spermatozoïdes, se produisant aussi dans l'épididyme, affecte la motilité de ces derniers et peut probablement altérer leur tendance d'agglutination avec d'autres spermatozoïdes ou modifier leur seuil de motilité (Moore 1981).

II.6.3.c. Stimulation des contractions de l'appareil génital femelle

Le liquide séminal des mammifères contient des hormones, des métabolites et des enzymes qui stimulent les contractions de l'appareil génital femelle ; nécessaires pour le transport du sperme (Drobnis & Overstreet 1992). Par exemple, les prostaglandines contenues dans le liquide séminal des mammifères et insectes peuvent stimuler les contractions du muscle lisse de l'appareil génital *in vitro* (Hunter 1988).

II.6.3.d. Coagulation

La localisation des constituants du fluide séminal chez les femelles accouplées peut jouer un rôle important dans le processus de stockage du sperme chez certains organismes (Neubaum & Wolfner 1999, Holt 2011).

Dans une hypothèse intrigante, Bairati (1968) a suggéré que les sécrétions coagulantes du bouchon copulatoire (=l'une des stratégies de sélection sexuelle pré-copulatoire) chez la drosophile *Drosophila melanogaster* forment un support sur lequel les spermatozoïdes se déplacent vers l'utérus. Ces sécrétions sont aussi supposées pouvoir contribuer à confiner le sperme et le déplacer vers l'utérus tout près des organes de stockage du sperme (Bertram *et al.* 1996). De plus, le sperme peut être empêché d'entrer dans l'oviducte suite à la présence d'une barrière dans ce dernier et dont les protéines des glandes accessoires peuvent en faire partie (Bertram *et al.* 1996).

Les molécules du liquide séminal mâle aident probablement à confiner le sperme dans des régions bien limitées à l'intérieur de l'utérus, à partir desquelles le sperme rejoint les organes de stockage. Elles peuvent également participer à la formation de matrices qui serviront de supports à travers lesquelles le sperme peut se déplacer pour atteindre les organes de stockage (Neubaum & Wolfner 1999).

II.6.3.e. Osmose

Un exemple illustrant le rôle de l'osmose dans l'introduction du sperme dans les organes de stockage se trouve chez le criquet *Gryllus domesticus*. Le mâle de ce dernier produit un spermatophore sophistiqué et spécialisé qu'il place dans la femelle avec sa tête insérée dans l'organe de stockage du sperme. Une fois dans la femelle, deux structures à pression se trouvant au centre du spermatophore absorbent le liquide à partir des autres parties de ce dernier. L'expansion résultante de la pression de ces deux structures, contribue à dégager le sperme contenu dans le spermatophore pour l'introduire dans la spermathèque (Holt 2011).

II.6.4. Secrétions de l'appareil génital femelle

Certaines sécrétions de l'appareil génital de la femelle semble faciliter la libération du sperme à partir du spermatophore et faciliter son stockage dans les organes dédiés à cet effet en le dirigeant dans le sens adéquat (Neubaum & Wolfner 1999).

II.6.5. Motilité du sperme

Le sperme peut migrer vers les organes de stockage grâce à leur propre motilité. Effectivement, chez les mammifères, il est généralement accepté que la motilité du sperme seule joue un rôle actif dans leur déplacement dans l'appareil génital femelle (Longo 1997).

Egalement, chez la poule et la dinde, la motilité des spermatozoïdes est nécessaire pour la traversée de la région vaginale (transport actif, Brillard 1990). Cependant, cette motilité n'est pas indispensable pour le franchissement de la partie supérieure de l'oviducte (transport passif, Brillard 1990). En effet, des spermatozoïdes morts déposés à l'entrée du vagin, n'atteignent jamais les glandes de la jonction utéro-vaginales, mais des spermatozoïdes morts ou privé de leur flagelle, placés dans l'utérus, sont retrouvés dans le pavillon chez la poule (Allen & Grigg 1957) et la dinde (Verma & Chermis 1966).

II.6.6. Système nerveux femelle

Chez les femelles d'insectes par exemple, Le système nerveux affecte de nombreux processus impliqués dans le processus de stockage du sperme. En effet, il a la capacité d'induction de contractions musculaires, d'absorption de liquide et de libération d'hormones, qui tous aident à déplacer le sperme vers les organes de stockage.

Lorsque le système nerveux de la Drosophile *Drosophila melanogaster* a été remplacé par un système nerveux d'un mâle à travers une manipulation génétique, le stockage du sperme a été affecté (Clark 2001). Cette observation confirme donc, que le système nerveux féminin de cette espèce est unique et sa présence est nécessaire pour un stockage efficace du sperme (Clark 2001).

II.7. Maintenance de la survie du sperme dans les organes de stockage

La fécondation chez les animaux se produit après l'accouplement à des intervalles de temps variables au sein des différentes espèces (exp. 18 h chez les vaches et jusqu'à 10 ans chez certains insectes sociaux, voir Eberhard 1996, Neubaum & Wolfner 1999, Holt & Lloyd 2010, Holt 2011). Pour cela, le sperme devrait rester viable dans les organes de stockage jusqu'au moment de la fertilisation et peut donc nécessiter un soutien physiologique pouvant inclure une protection contre le stress oxydatif ainsi que de la nourriture.

La plupart des auteurs s'accordent sur le fait que les organes de stockage de sperme réalisent des activités d'alimentation et de protection des spermatozoïdes. Chez les insectes par exemple, le complexe spermathéal contient des cellules glandulaires; qui peuvent apparaître soit sous forme de cellules individuelles simples ou de glandes discrètes (Martoja 1977) dont les sécrétions sont principalement responsables de la nutrition du sperme. Chez la drosophile, la présence d'unités sécrétrices unicellulaires complexes, révélée lors de l'étude de la structure fine de sa glande spermathécale (Filosi & Perotti 1975), peut témoigner d'une telle activité. Cependant, beaucoup d'autres activités peuvent être accomplies grâce à ces sécrétions glandulaires; à savoir la maintenance des spermatozoïdes (exp. Hallberg 1984), l'activation du sperme et son transfert dans la spermathèque (exp. *Anthonomus grandis*, Villavaso 1975) et l'attribution de la capacité locomotrice aux spermatozoïdes (exp. les abeilles *Apis mellifera*, Ruttner & Koeniger 1971).

Chez les animaux qui ne possèdent pas de glandes sécrétrices, la nutrition est assurée par l'organe de stockage de sperme lui-même. Le ver de terre *Hormogaster elisae* par exemple est en mesure de conserver le sperme reçu pendant de longues périodes, grâce à la nutrition fournie par les parois de sa spermathèque et l'environnement favorable et adéquat créé par ceux-ci (Novo *et al.* 2012). Ceci peut donc expliquer la tendance des escargots Hélicidés à stocker le sperme dans les extrémités bulbeuses des tubules spermathécaux avec leurs têtes en contact étroit avec l'épithélium de ces derniers (Bojat *et al.* 2001b, Rogers & Chase 2002, fig.1.16). Cette tendance semble améliorer et étendre la survie des spermatozoïdes, à la fois en

recevant de la nutrition et en étant protégés, grâce à leur enclavement à la surface de l'épithélium (Chase & Darbyson 2008). Par conséquent, il est supposé que les escargots avec un grand nombre de tubules seraient les mieux en termes de maintenance du sperme en état viable (Chase & Darbyson 2008).

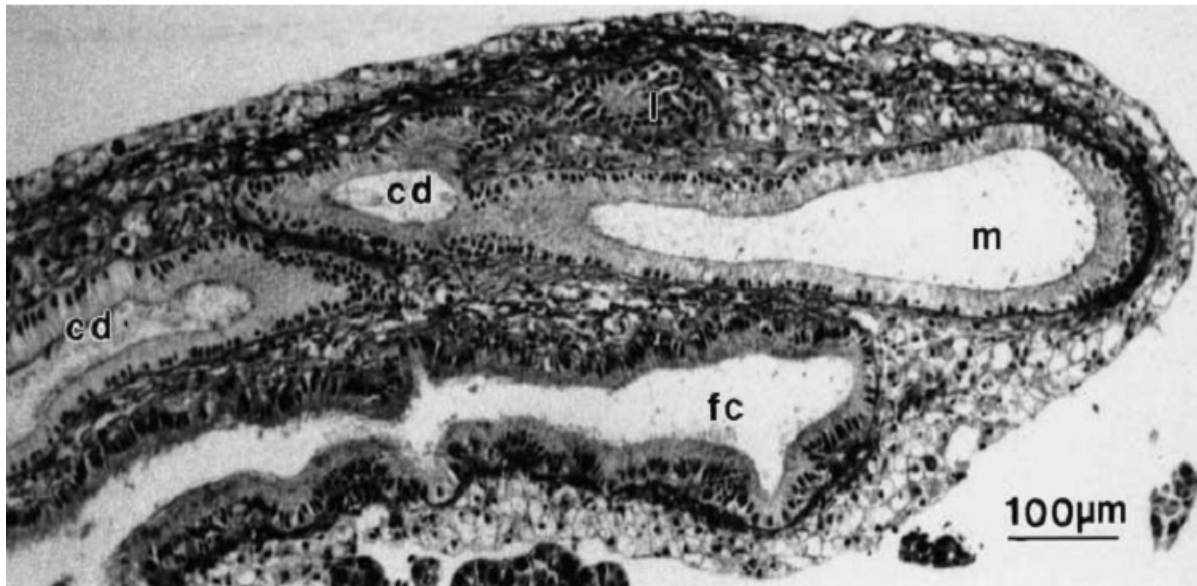


Fig.1.16. Coupe sagittale à travers la partie proximale de la poche de fertilisation de l'espèce *Arianta arbustorum*. A noter les différences de ciliation épithéliale. Abréviations: cd, Canal commun ; fc, chambre de fertilisation; l, tubule latéral; m, tubule principal (Bojat *et al.* 2001b).

Chez les espèces aviaires, les tubules de stockage de sperme (TSS) sont supposés fournir des nutriments aux spermatozoïdes et même éliminer les déchets métaboliques accumulés (Van Krey *et al.* 1967). Cependant, les mécanismes grâce auxquels le sperme est maintenu pendant de longues périodes n'ont pas encore été élucidés (Sasanami *et al.* 2013). Dans le lumen des tubules de stockage de sperme (TSS), les spermatozoïdes apparaissent groupés sous forme de faisceaux parallèles avec leurs têtes dirigées vers les extrémités des tubules (Schuppin *et al.* 1984, Ito *et al.* 2011). De plus, il est rapporté que ces spermatozoïdes stockés sont typiquement immotiles (Bakst 1985, Bakst & Richards 1985) donc probablement métaboliquement quiescents en raison de la consommation réduite d'ATP (Sasanami *et al.* 2013). Ceci est une stratégie raisonnable car elle entraîne également une production réduite d'une sorte d'oxygène réactif (semblables aux radicaux libres synthétisés suite à la respiration des spermatozoïdes) réduisant ainsi d'éventuels dommages du sperme résident dans les tubules et résultant en sa maintenance (Sasanami *et al.* 2013).

Cependant, il s'avère difficile de confirmer que les femelles sécrètent des substances exclusivement pour la nutrition du sperme et non pas pour leur propre besoin. En effet, la présence de glandes aux endroits où les spermatozoïdes sont stockés est démontrée mais il n'existe pas une évidence convaincante que leur rôle est de fournir exclusivement une nutrition pour le sperme stocké.

Chapitre II : Présentation de l'espèce étudiée

« *Helix aperta* »

L'escargot terrestre *Helix aperta*

1. Position systématique (voir Solem 1978, Kerney & Cameron 1979)

Embranchement	Mollusques
Classe	Gastéropodes
Sous-classe	Pulmonés
Super Ordre	Stylommatophores
Ordre	Sigmurethra
Sous-ordre	Holopoda
Super-famille	Helicoïdae
Famille	Helicidae
Sous-famille	Helicinae
Genre	Helix

2. Description de l'espèce

Helix aperta (Born 1778) encore appelé *Cantareus apertus* (Born 1778) ou escargot naticoïde (*Helix naticoides* Draparnaud 1801) est une espèce d'escargot terrestre qui appartient à la famille des Helicidae. Il s'agit d'un gastéropode stylommatophore doté d'un poumon qui est constitué d'un épithélium tapissant la cavité palléale dans laquelle l'air pénètre à travers un orifice appelé pneumostome (Benbellil-Tafoughalt 2009).

Morphologiquement et même phylogénétiquement, l'espèce *Helix aperta* est étroitement liée à l'espèce avoisinante *Cornu aspersum* (Germain 1930, 1931, Ktari & Rezig 1976, Koene & Schulenburg 2005).

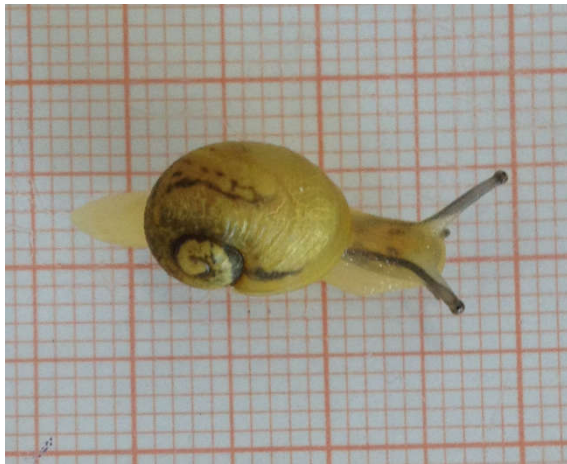
Sa coquille est globuleuse, de forme sphérique et de taille adulte moyenne (en moyenne 27 ± 4 mm). Elle ne présente aucune bande clairement apparente (Yildirim 2004) (fig.2.1) ou du moins des bandes spirales très fines qui se sentent généralement au toucher. Le dernier tour est large, arrondi et légèrement penché vers le bas avoisinant ainsi l'ouverture de la coquille (Germain 1930, 1931, Ktari & Rezig 1976, Cesari 1978, Rezig 1979, Giusti *et al.* 1995).



Fig.2.1. Photo d'un escargot adulte *Helix aperta* à coquille globuleuse et sphérique, sans bandes et d'une couleur foncée.

La couleur du corps et de la coquille varie du jaune verdâtre au vert foncé ou noir selon le stade de vie de l'animal (Benbelli-Tafoughalt 2009). En effet, les jeunes se présentent sous une couleur jaune verdâtre puis acquièrent un mélange d'une teinture marronnée en avançant dans l'âge pour devenir entièrement verts foncés, marrons foncés ou carrément noirs à l'âge adulte (fig.2.2).

De plus, à l'état adulte, cette espèce présente une coquille plus ou moins dure par rapport à celle des juvéniles (observations personnelles), une caractéristique qui s'avère très utile lors de l'inspection d'individus adultes le cas échéant.



-A-



-B-



-C-

Fig.2.2. Photos d'individus *Helix aperta* de différents stades de vie. (A) escargot juvénile d'une couleur jaune verdâtre, (B) escargot juvénile avec une couleur jaune mixé avec du marron, (C) escargot adulte d'une couleur marron foncé.

3. Origine, distribution et habitat

Helix aperta est une espèce circum-méditerranéenne, c'est-à-dire originaire du bassin méditerranéen, généralement distribuée dans le sud de la France, Turquie, Chypre et Afrique du nord (Kerney & Cameron 1979, Schütt 2001) (fig.2.3). En Algérie, elle est fréquemment

présente le long du littoral notamment dans les régions du centre et de l'est de la Kabylie (Benbellil-Tafoughalt *et al.* 2009).

Elle est subséquemment introduite en Amérique (Californie et Louisiane), Nouvelle-Zélande et Australie (Kerney & Cameron 1979, Schütt 2001).

Dans son habitat méditerranéen et côtier, elle est adaptée à vivre sur le sol entre les herbes avec une préférence pour les endroits où sont présents des vignes et des olives (Giusti & Andreini 1988). Cependant, cette espèce ne se trouve jamais à des altitudes dépassant 900 mètres (Germain 1930, 1931).

La teneur du sol en calcium est encore un facteur déterminant de son habitat. En effet, il s'avère qu'elle soit complètement absente dans les milieux dépourvus de calcium comme c'est le cas de tous les Helicidae (Cameron 1973).

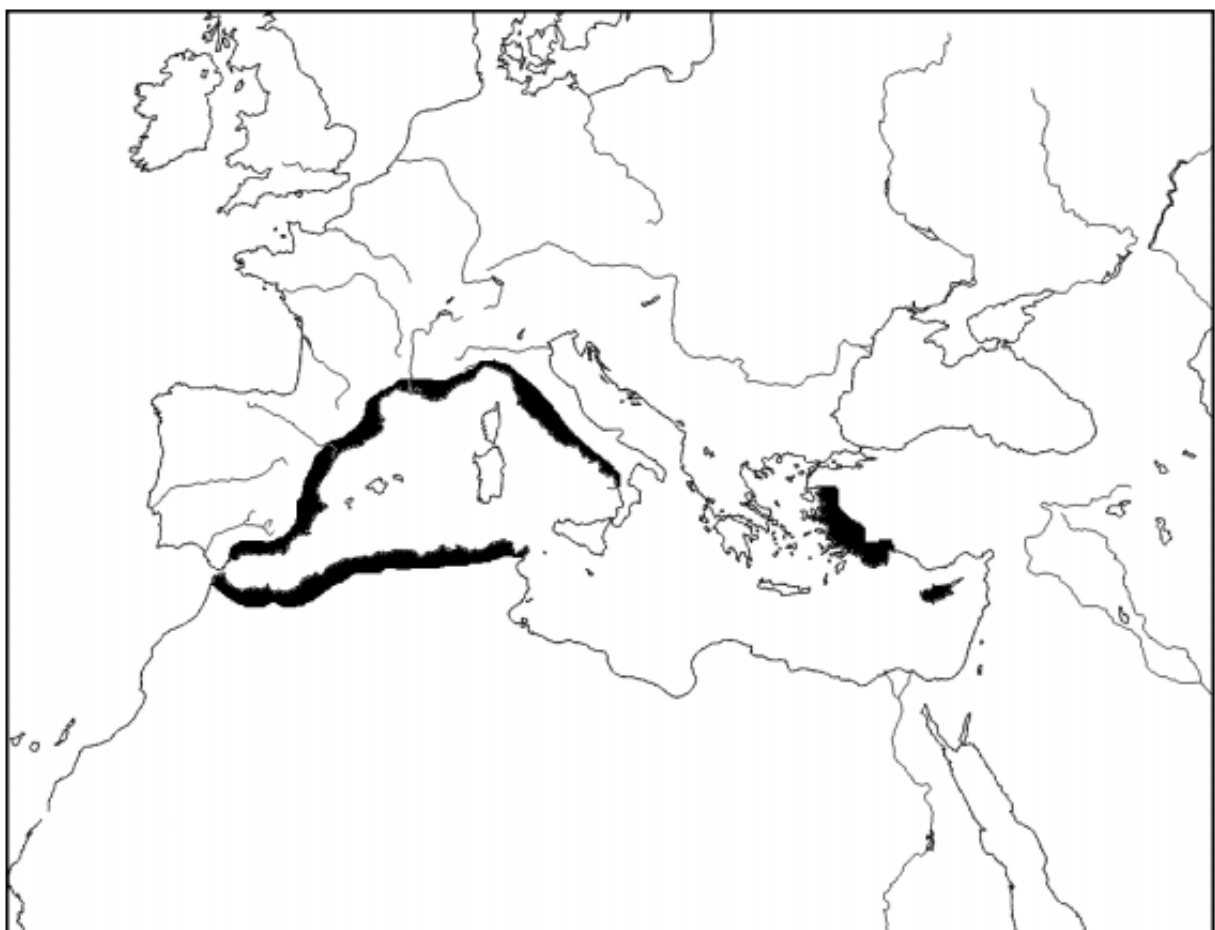


Fig.2.3. Distribution géographique de l'espèce *Helix aperta* (selon Kerney & Cameron 1979).

4. Rythme d'activité

L'activité de cette espèce est très dépendante des conditions environnementales à savoir ; la température, l'humidité et la photopériode (Benbellil-Tafoughalt *et al.* 2009, 2011, Benbellil-Tafoughalt & Koene 2015). Par conséquent, quand ces conditions ne lui sont pas favorables, elle peut passer de longues périodes d'estivation ou d'hibernation. Pour ce, elle s'enfuit dans le sol à une profondeur allant de 7 à 15 cm et entre dans un état de métabolisme ralenti tout en fermant l'ouverture de sa coquille avec un épais épiphragme d'une couleur blanchâtre (fig.2.4) d'où le nom de « l'escargot creuseur ».

Elle reste dans cet état jusqu'à ce que la pluie ramollisse le sol provoquant ainsi son émergence et son lancement dans la reproduction et la recherche de la nourriture.



Fig.2.4. Photo d'un escargot adulte *Helix aperta* en état de diapause, avec l'ouverture de sa coquille fermée par un épiphragme calcaire blanc.

5. Reproduction

Helix aperta est une espèce hermaphrodite simultanée, néanmoins l'autofécondation n'a jamais été observée ; soit pour son absence ou à cause du peu d'études entreprises dans ce contexte sur cette espèce.

Les individus *Helix aperta* s'accouplent plus fréquemment soit en adoptant un comportement de type mâle ou femelle, ce qui a induit probablement les différences observées dans la structure de l'appareil génital (de Vaufleury & Gimbert 2009) (fig.2.5).

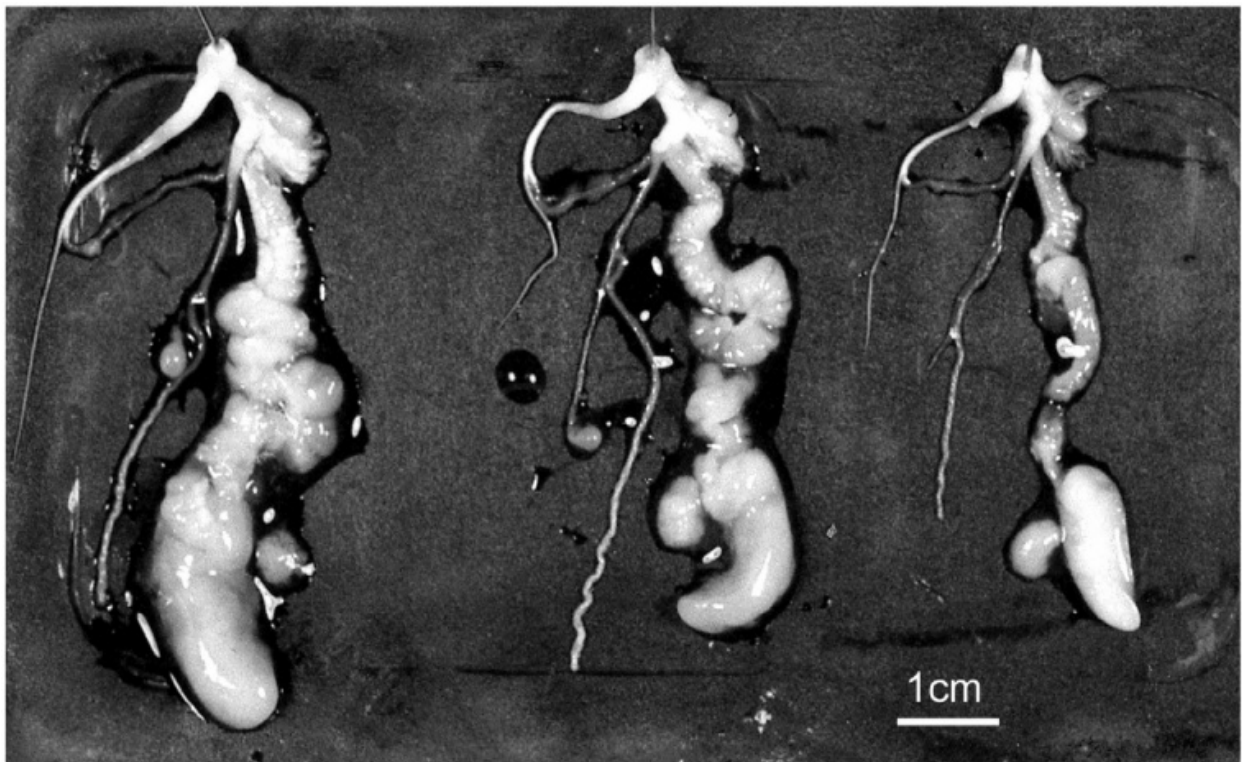


Fig.2.5. Appareils génitaux d'*Helix aperta* de Tunisie au moment des accouplements. Le tractus est 3,6 fois plus développé d'un individu de type femelle (2,45 g à gauche, avec une très grosse glande à albumine : 0,98 g) que celui d'un individu de type mâle (0,67 g à droite). (de Vaufleury & Gimbert 2009).

La reproduction de cette espèce n'est que très peu étudiée. Des spécimens échantillonnés d'Italie et d'Algérie et étudiés au laboratoire, ont montré sa tendance de s'accoupler préférentiellement en automne qui s'étend, dans leurs habitats naturels, du début Octobre à

mi-Décembre sous des températures autour de 20°C et des photopériodes de 16 h Lumière: 8 h Obscurité (Giusti & Andreini 1988, Benbellil-Tafoughalt *et al.* 2011).

En Tunisie par contre, de Vaufleury & Gimbert (2009) ont rapporté que la reproduction de l'espèce survient à la fin de l'été sous des conditions de photopériode correspondant à 6 h Lumière: 18 h Obscurité.

6. Morphologie de l'appareil reproducteur

L'appareil reproducteur de l'espèce *Helix aperta* a été sujet à une description détaillée par plusieurs auteurs tout en le comparant à celui de l'espèce avoisinante *Cornu aspersum* (voir Germain 1930, 1931, Ktari & Rezig 1976, Giusti & Andreini 1988).

Il s'avère que les appareils génitaux des deux espèces soient étroitement similaires (Ktari & Rezig 1976); avec celui d'*Helix aperta* présentant des différences dans la dimension de certains organes en fonction de la provenance des individus (Giusti *et al.* 1995).

En suivant la description de Giusti & Andreini (1988) et à partir de nos observations personnelles, l'appareil reproducteur de l'espèce *Helix aperta* (voir fig.2.6) consiste essentiellement en un ovotestis dans lequel les ovules et le sperme sont produits. Celui-ci est relié à un premier canal hermaphrodite qui fonctionne habituellement comme une vésicule séminale destinée au stockage de l'auto-sperme (=sperme produit par l'individu lui-même).

L'espèce est aussi dotée d'une sorte de sacs (=tubules de la spermathèque) ayant pour fonction le stockage de l'allo-sperme (=sperme reçu pendant l'accouplement) qui est utilisé ultérieurement pour la fertilisation des ovules au sein de la cavité de la poche de fertilisation (=la chambre de fertilisation).

Cette dernière se trouve enfoncée dans une structure semi-lunaire bien développée constituant la glande à albumen. Cet organe est relié à un deuxième canal hermaphrodite appelé ovispermiduct ou spermoviducte où les deux parties, prostatique et utérine, se trouvent côte à côte. La partie utérine s'ouvre dans un petit canal communément appelé utérus libre ou canal utérin. Sur le point où ce dernier se termine, le canal de la bourse copulatrice ainsi que le vagin commencent. Le canal de la copulation bifurque pour former un long diverticulum ainsi que le canal de la bourse copulatrice. Ce dernier est relié au niveau de sa partie distale à une bourse copulatrice dont la fonction semble la digestion de l'excès et du vieux auto- et allo-sperme.

Le vagin est un petit canal qui se trouve près du pénis et de l'orifice génital, auquel est attaché une paire de glandes multifides et un sac à dart (=stylophore). Les glandes multifides consistent en une multitude de branches fines et le sac à dart en une structure d'une forme d'une bouteille dont la fonction est la production du dart. Le dart d'*Helix aperta* est une structure calcaire mince d'une longueur variant de 4.9 à 6.2 mm qui est « tiré » réciproquement (au moins dans les échantillons observés) par les deux partenaires sexuels pendant la parade qui précède l'accouplement.

Sur la partie distale de l'ovispermiducte se forme un long canal connu sous le nom de vas deferens qui se termine à son tour par un autre canal appelé epiphallus. Ce dernier constitue une partie de ce qui est appelé « complexe pénien » qui se compose en plus de l'epiphallus d'un flagelle et du pénis lui-même.

Le flagelle est une sorte de tubule qui se termine sur le point d'entrée du vas deferens dans l'epiphallus et qui, durant l'accouplement, secrète la queue du spermatophore. L'epiphallus, quant à lui, commence du point où le vas deferens se termine et s'étend jusqu'à la jonction du muscle rétracteur du pénis et sa fonction semble être la sécrétion de la tête du spermatophore.

Finalement, le pénis, qui s'ouvre dans le pore génital, a pour rôle le transfert du spermatophore (dans lequel se trouvent les spermatozoïdes) pendant l'accouplement.

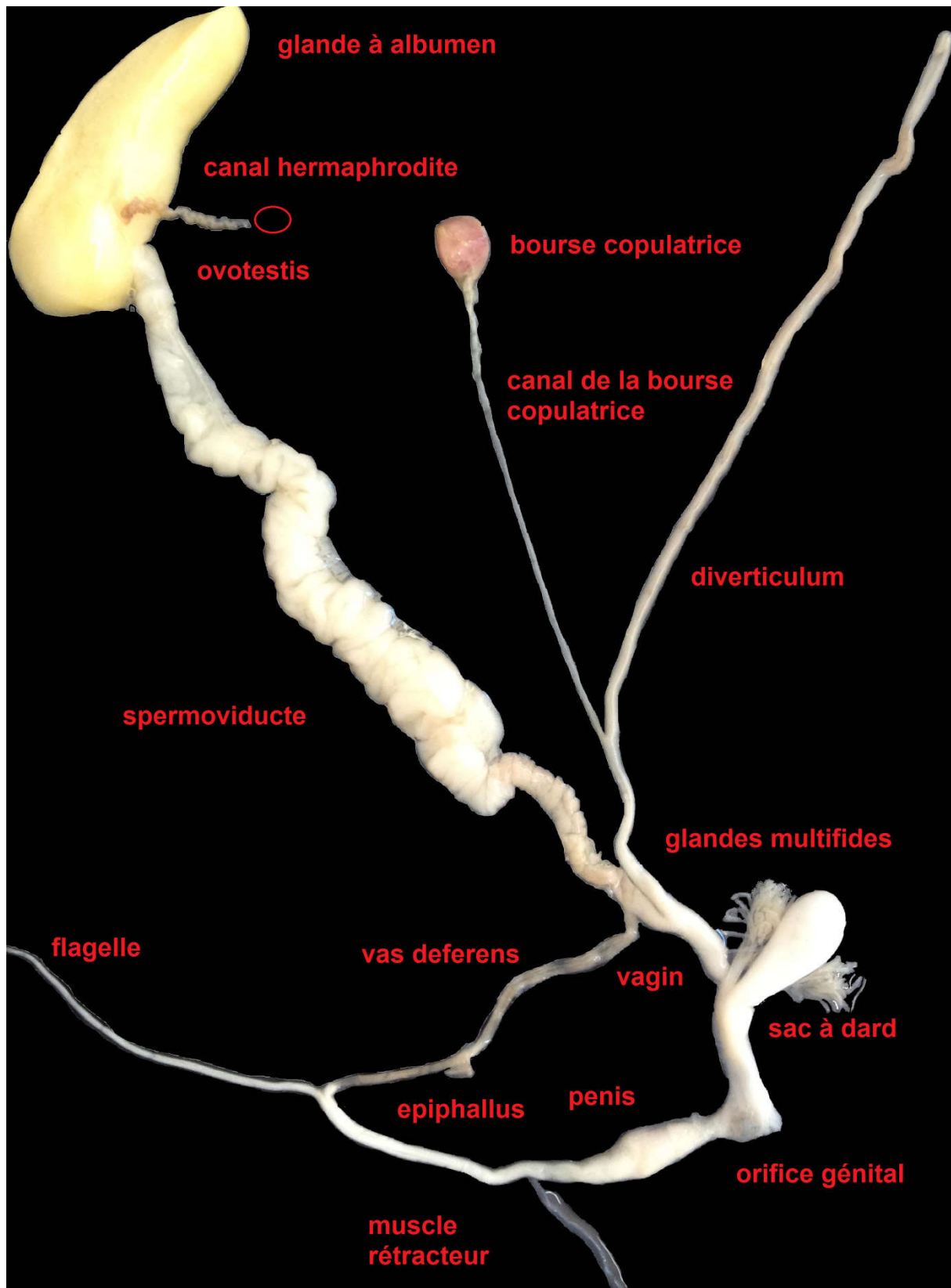


Fig.2.6. Photo d'un appareil reproducteur d'un escargot adulte *Helix aperta* avec tous les organes le constituant (l'ovotestis est absent mais son emplacement est indiqué par un petit cercle).

7. Etapes de l'accouplement

Giustini & Andreini (1988), lors de leur investigation de l'espèce *Helix aperta*, ont décrit en détails toutes les étapes de son accouplement. Ces étapes ont été aussi observées lors d'un petit suivi du comportement reproducteur de quelques spécimens échantillonnés dans la région de Bejaia à cet effet et dont les résultats n'ont pas été rapportés dans cette thèse. Ces étapes peuvent se résumer comme suit :

7.1. Prélude

Cette étape est initiée le plus souvent par un seul partenaire ayant la motivation d'accouplement et qui se reconnaît par le dilatation de son orifice génital. Celui-ci se met donc à chercher activement un partenaire sexuel avec qui il établit un contact avec ses tentacules dès sa rencontre. Au cas où ce partenaire montre également une motivation à s'accoupler, un échange de touches avec les tentacules s'initie suivie par une longue période d'approchement corporelle qui s'établit entre les deux partenaires (fig.2.7).

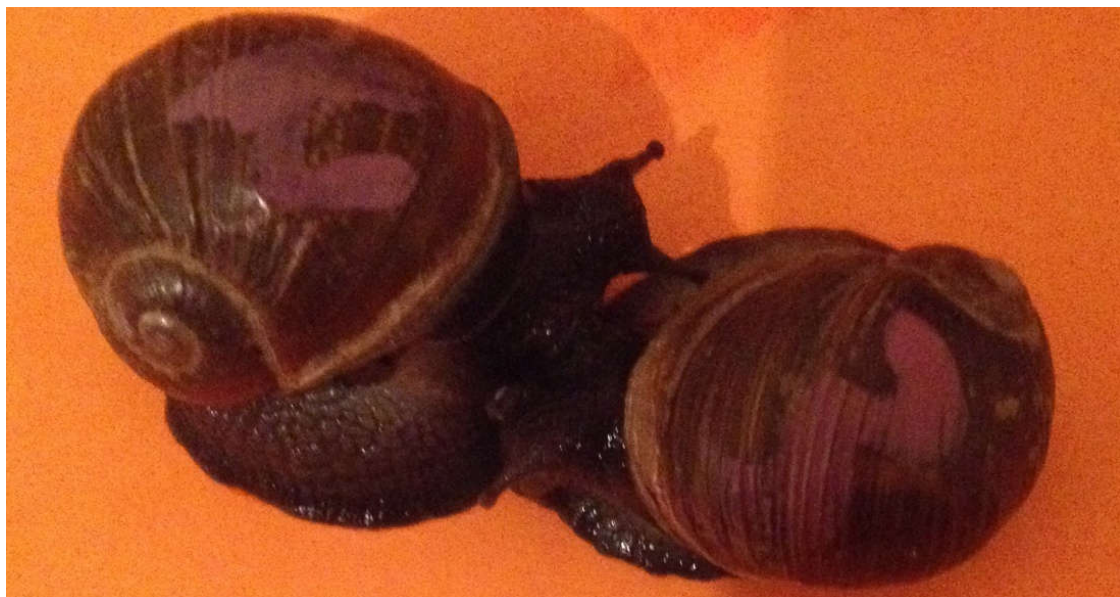


Fig.2.7. Photo illustrant le rapprochement de deux escargots adultes *Helix aperta* ayant la motivation à s'accoupler.

7.1.1. Comportement introductif

Durant cette étape, les deux partenaires continuent l'échange des stimuli en touchant réciproquement les tentacules, les lèvres et même en se mordant l'un l'autre (fig.2.8).

Des courtes périodes réfractaires se succèdent ; durant lesquelles les deux partenaires s'éloignent en suivant une trajectoire circulaire ; l'un dans le sens des aiguilles d'une montre et l'autre dans le sens inverse. Après une période variable, ils finissent par se rejoindre à nouveau et se mettre enfin en contact très étroit.

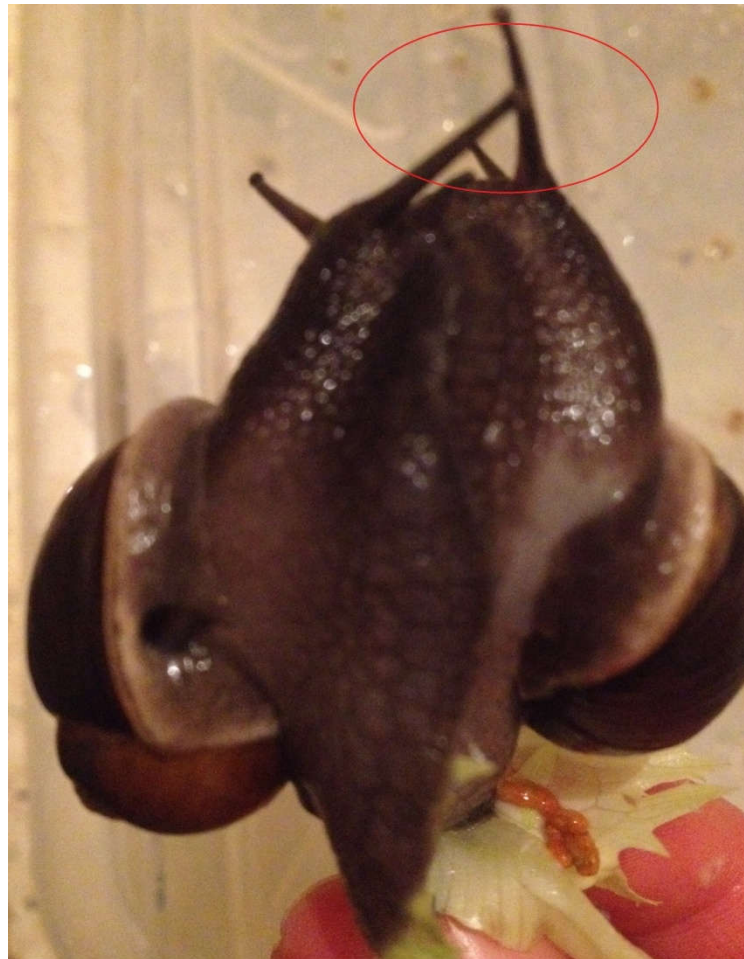


Fig.2.8. Photo illustrant deux partenaires d'accouplement de l'espèce *Helix aperta* durant la phase introductive de l'accouplement. On note un rapprochement corporel étroit et un échange de touches de tentacules (voir le cercle).

7.2. «Tir du dard d'amour»

Cette étape commence d'abord par l'intention du tir du « dard » qui s'exprime en se positionnant l'un contre l'autre et en ayant les organes y impliqués en contact étroit (fig.2.9).

Les orifices génitaux sont ensuite dilatés au maximum et les dards sont poussés réciproquement (au moins chez les spécimens analysés par Giusti & Andreini 1988).

Vu que ce comportement est souvent réalisé quand les individus sont collés l'un sur l'autre, il s'avère impossible de déterminer si les dards sont tirés avec force ou juste poussés.

Une fois poussé, le dard s'incruste dans le corps du partenaire à des endroits variables (fig.2.10).



Fig.2.9. Photo illustrant deux partenaires d'accouplement de l'espèce *Helix aperta* en phase de préparation au « tir du dard ». On note un contact très étroit des pieds des deux partenaires, position idéale pour le « tir du dard ».



Fig.2.10. Photo illustrant un individu adulte *Helix aperta* ayant reçu un dard tout près du tentacule.

7.3. Accouplement

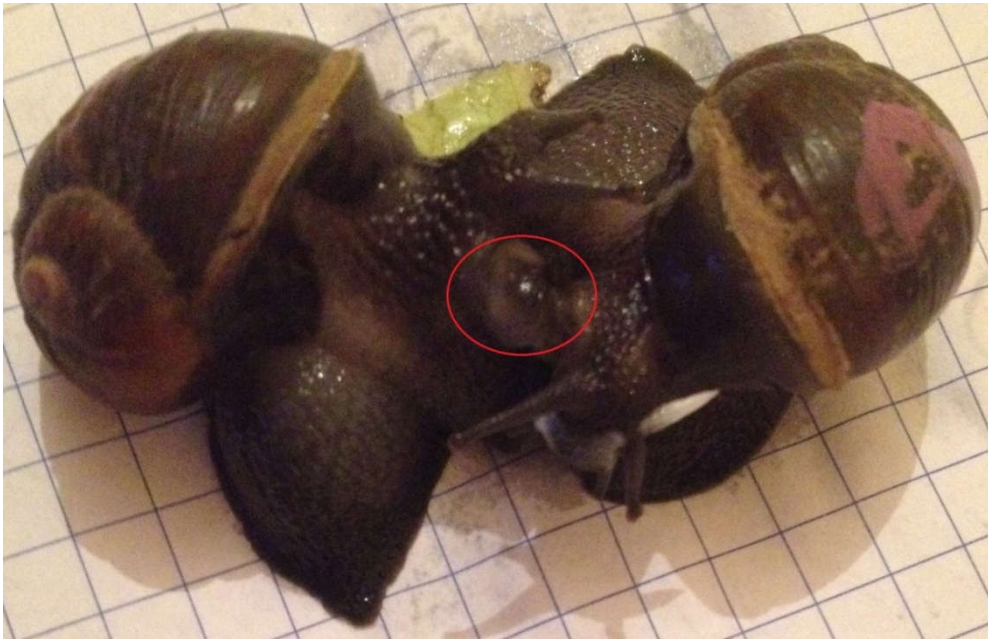
7.3.1. Tentatives d'accouplement

Les deux partenaires procèdent directement aux tentatives d'accouplement sans aucun temps de pause après la phase du « tir du dard ».

Les tentatives d'accouplement entre les deux partenaires sexuels impliquent le fléchissement altéré ou simultané des pénis suivi de périodes réfractaires courtes durant lesquelles les deux partenaires continuent la simulation réciproque à travers les touches et/ou les mords.

7.3.2. Accouplement

Durant cette étape, les pores génitaux des deux partenaires d'accouplement sont finalement parfaitement juxtaposés. Enfin, une pénétration réciproque se produit suivie d'un échange de spermatophores (fig.2.11).



-A-



-B-

Fig.2.11. Photos d'escargots *Helix aperta* en accouplement. (A) phase de rapprochement corporel et début de pénétration, (B) phase de pénétration.

Chapitre III : Matériel et méthodes

I. Echantillonnage

Les escargots utilisés dans ce projet de recherche appartiennent tous à l'espèce *Helix aperta* et proviennent de la wilaya de Bejaia au nord d'Algérie.

Les travaux sont menés sur des escargots adultes, repérés grâce à la couleur et la rigidité de leur coquille. En effet, à l'état adulte, les escargots de cette espèce présentent une coquille plus ou moins rigide par rapport à celle des juvéniles et sub-adultes. De plus, ils présentent une coquille bordée possédant un petit retroussement ou bourrelet (c.à.d. épaissement du bord) appelé péristome (fig.3.1). Néanmoins, chez cette espèce il est moins prononcé et généralement difficile à observer contrairement à celui de l'espèce avoisinante *Cornu aspersum* (fig.3.1) chez laquelle il représente exclusivement le critère de détermination des spécimens adultes.

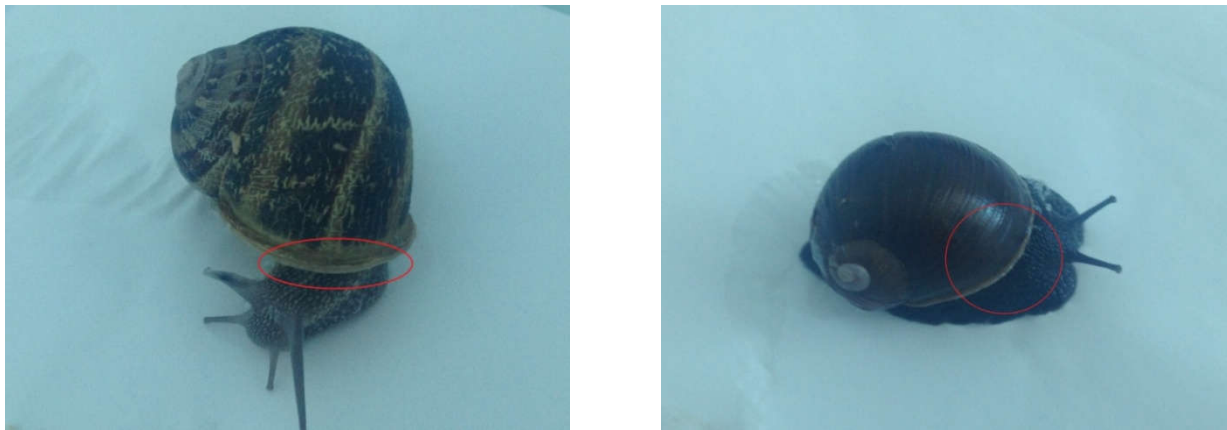


Fig.3.1. Photos illustrant le péristome bien prononcé chez l'espèce *Cornu aspersum* (à gauche) et moins prononcé et à peine visible chez l'espèce *Helix aperta* (à droite).

Quant à la couleur, bien qu'elle ne soit généralement pas un critère de détermination; chez cette espèce les adultes présentent typiquement une couleur de coquille bien différente de celle des juvéniles et sub-adultes (fig.3.2). En effet, les escargots adultes *Helix aperta* possèdent une coquille d'une couleur unie allant du brun très foncé au noir (fig.3.2).

La collecte des escargots a été effectuée au début du mois de Février de l'année 2016 en un intervalle de temps n'excédant pas les deux jours afin d'éviter tout éventuel changement lié aux variations saisonnières. En cette période, les escargots *Helix aperta* avaient déjà émergé de l'estivation et étaient actifs sur le sol, ce qui a facilité leur collecte. Cette dernière s'est faite au hasard et selon disponibilité sur les sites de l'échantillonnage.

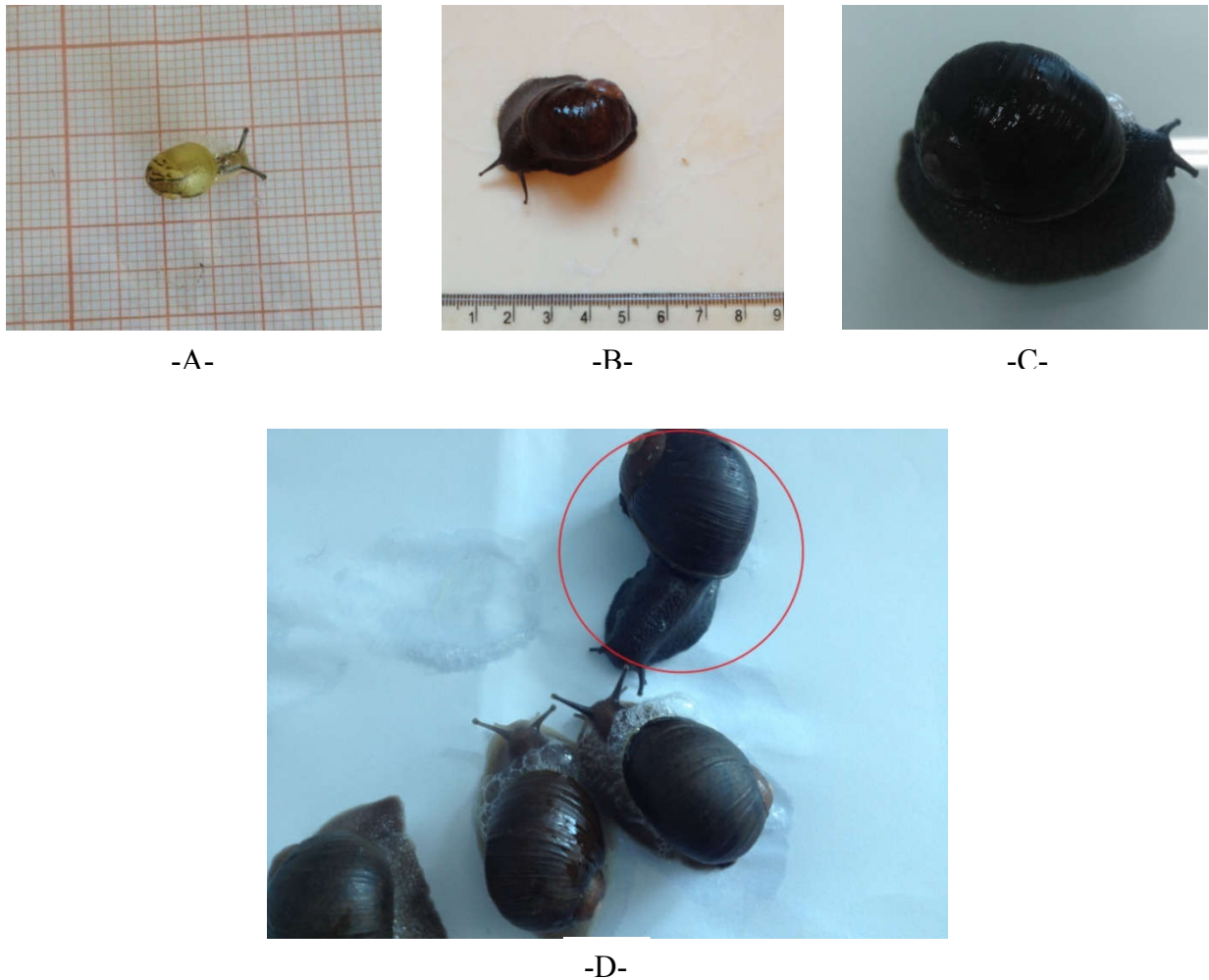


Fig.3.2. Photos illustrant des escargots *Helix aperta* de couleurs de coquille et corps divergentes selon la maturité sexuelle ou non. (A) escargot juvénile non mature sexuellement, (B) escargot sub-adulte non mature sexuellement, (C) escargot adulte mature sexuellement, (D) groupe d'escargot dont le seul adulte est celui encerclé.

Au total, quatre sites ont été choisis pour l'échantillonnage (fig.3.3). Ces derniers sont suffisamment éloignés les uns des autres afin de pouvoir les caractériser de « populations » différentes étant donné que les escargots sont connus par leur faible aptitude de dispersion.

De plus, les sites d'échantillonnage, bien qu'ils soient tous situés dans la même wilaya, ils présentent néanmoins des microclimats très divergents, notamment en termes d'humidité, ce qui influe probablement sur la densité des escargots coexistant.

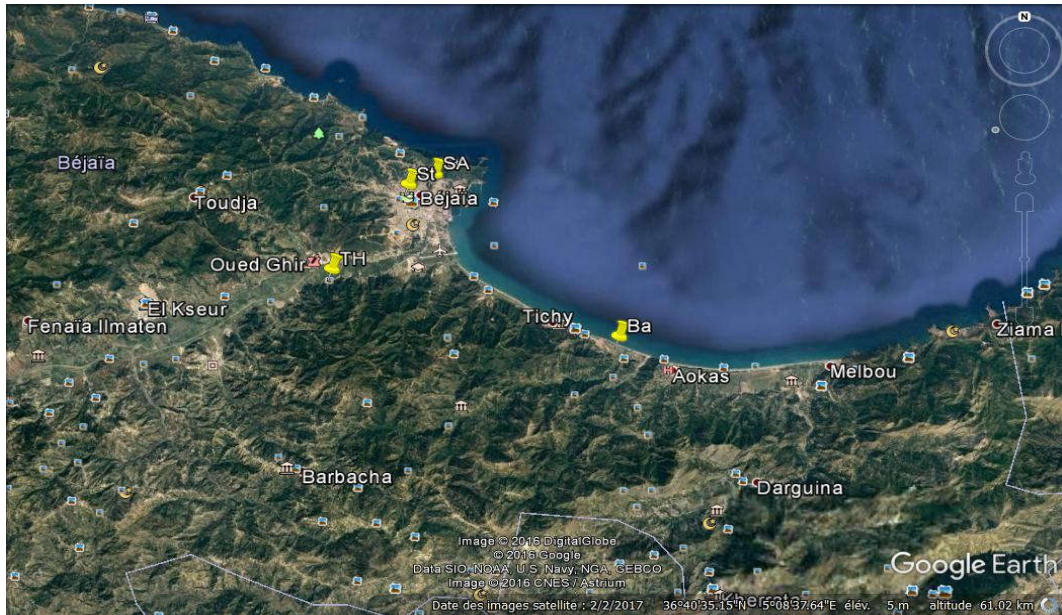


Fig.3.3. Les quatre sites d'échantillonnage situés à Bejaia. SA, Sidi Ahmed; St, place du Stade; TH, Tala Hamza; Ba, Baccaro. Image obtenue de Google Earth.

II. Description des sites d'échantillonnage

La première population provenait d'une monoculture de "Cardon" (artichaut sauvage) située dans une région rurale côtière à Baccaro (coordonnées GPS : 36°39'6.10"N, 5°12'5.09"E) (fig.3.4). Ce milieu est très favorable à l'activité des escargots *Helix aperta* vue qu'il présente un taux d'humidité important; à la fois grâce à sa situation géographique près de la mer et l'irrigation régulière de la monoculture.

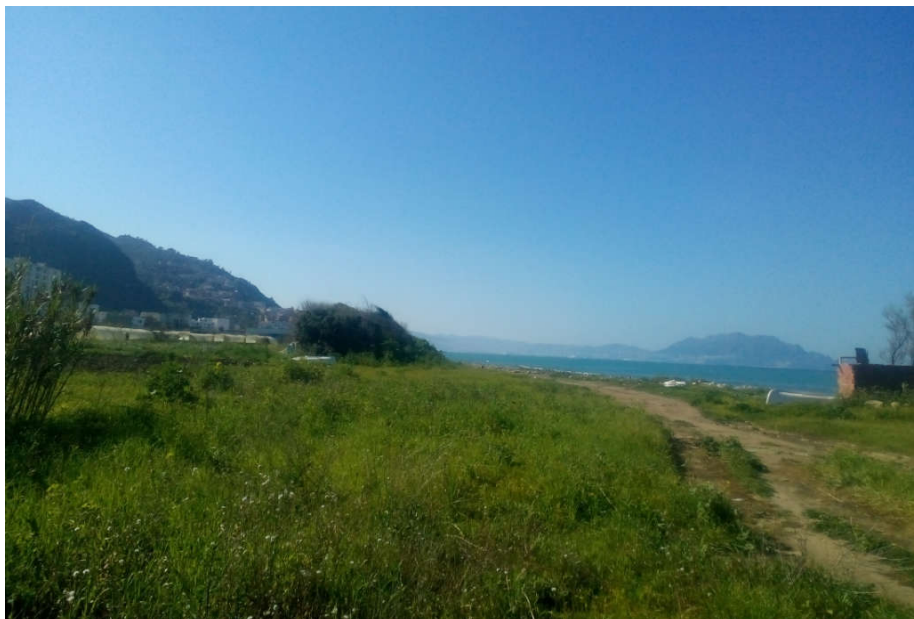


Fig.3.4. Photo du premier site d'échantillonnage « Baccaro ».

La deuxième population provenait aussi d'une monoculture de "Cardon" (artichaut sauvage) mais cette fois située dans une région rurale exposée à Tala Hamza (coordonnées GPS : 36°41'43.49"N, 4°59'17.49"E) (fig.3.5). Le taux d'humidité est aussi élevé dans cette région et surgie essentiellement des irrigations régulières et l'ombre apportée par les arbres épars présentes.



Fig.3.5. Photo du deuxième site d'échantillonnage « Tala Hamza »

La troisième population quant à elle, provenait d'un jardin abandonné couvert d'arbustes, fougères, trèfles et renouées situé pas loin d'une route urbaine à « la place du Stade » (coordonnées GPS : 36°45'1.36"N, 5° 2'42.97"E) (fig.3.6).



Fig.3.6. Photo du troisième site d'échantillonnage « la place du Stade »

Finale­ment, la qua­trième popu­lation, pro­ve­nait d'une pra­irie natu­relle ex­po­sée si­tuée à pro­xi­mi­té d'une zone ur­baine à Sidi Ahmed (coor­don­nées GPS : 36°45'26.10"N, 5° 3'53.40"E) (Fig.3.7). Celle-ci est carac­té­ri­sée par sa dense cou­ver­ture en vé­gé­ta­tion à sa­voir ; des gra­mi­nées, trè­fles et buis­sons éparses.



Fig.3.7. Photo du qua­trième site d'échan­tillon­nage « Sidi Ahmed »

III. Quantification de l'intensité de la compétition spermatique

Dans ce projet, la densité des escargots est utilisée comme estimation de l'intensité de la compétition spermatique. L'hypothèse lancée stipule qu'une population à forte densité en escargots et/ou peuplant un habitat à un taux d'humidité élevé; présenterait un risque plus important d'accouplements multiples et un plus grand nombre de donneurs de sperme ; résultant probablement en une compétition spermatique plus intense (voir aussi Baminger & Haase 1999, Koentzopoulos & Staikou 2007).

En effet, une relation positive entre la densité locale et l'intensité de la compétition spermatique a été détectée chez plusieurs groupes animaux à savoir ; des gastéropodes prosobranches (Oppliger *et al.* 1998), insectes (Gage 1995), oiseaux (Birkhead & Møller 1992), mammifères (Møller & Birkhead 1989), annélides (Tan *et al.* 2004) et amphibiens anoures (Buzatto *et al.* 2015). Chez les escargots terrestres cependant, aucune étude n'a été entreprise dans ce sens.

La seule évidence qui existe provient de l'étude de Koemtzopoulos & Staikou (2007), qui ont observé une différence des fréquences d'accouplement, parmi plusieurs populations d'escargots *Cornu aspersum* présentant des densités locales contrastées, et qui persiste même chez la première génération de descendants.

Ces observations peuvent confirmer en quelque sorte notre hypothèse et justifier notre choix d'utilisation de la densité comme estimation directe de l'intensité de la compétition spermatique.

III.1. Estimation de la densité : Méthode des quadras

Dans ce travail, la densité des escargots est exprimée en nombre d'individus adultes/m². Elle a été mesurée dans chacun des sites d'échantillonnage précédemment cités en adoptant la méthode des quadras.

L'échantillonnage aux quadras est une méthode utilisée depuis longtemps notamment en écologie végétale (exp. Weaver 1918, Gleason 1920). Cette méthode consiste en l'utilisation de cadres rigides de dimensions définies qui sont directement posés sur la zone à inspecter afin de délimiter une partie (Henderson 2003). Les espèces d'intérêt présentes dans cette dernière sont ensuite recensées et/ou collectées (Henderson 2003) et une liste est dressée à cet effet.

En biologie, l'échantillonnage aux quadras est l'une des méthodes les plus robustes pour évaluer la richesse et l'abondance des espèces (Krebs 1999) et l'exploration de microhabitats souvent négligés. Cependant, son efficacité dépend essentiellement de la taille et comportement des organismes à recenser. En effet, cette méthode demeure moins performante quand il s'agit d'organismes actifs et/ou d'une grande taille tels que les criquets, les grillons, les blattes...etc.

L'estimation a été effectuée une seule fois à la fin de l'automne (au début du mois de Décembre 2015) au moment de l'inspection en vue de sélectionner des sites adéquats pour l'échantillonnage. À ce moment de cette année, les escargots *Helix aperta* émergeaient déjà de l'estivation et étaient en pleine activité à la surface du sol. Ceci nous a permis de les repérer facilement, chose qui s'avère impossible aux périodes d'estivation durant lesquelles ils s'enfoncent profondément dans le sol.

Dans chacun des quatre sites sélectionnés, la densité est estimée en suivant ces étapes :

Installation au hasard de carrés (quadras) de 0.25 x 0.25 m chacun (comme indiqué sur fig.3.8) sur le site donné. Pour commencer, un nombre de dix quadras par site suffit.

Dénombrement d'individus adultes *Helix aperta* emprisonnés à l'intérieur de chaque quadra tout en prenant notes.

Détermination du nombre d'unités (quadras) nécessaires pour chaque site en appliquant la méthode d'Elliot (1971) pour une erreur inférieure à 20%.



Fig.3.8. Quadra installé sur un site d'échantillonnage. Image de Wikipedia

III.2. Application de la méthode d'Elliot (1971)

Comme indiqué en haut, l'application de la méthode d'Elliot est importante afin d'estimer le nombre de quadras nécessaires pour chaque site.

Le nombre d'individus recensés dans chacun des quadras installés est noté séparément pour chaque site.

La formule suivante est ensuite appliquée :

$$n = 25 s^2 / \text{moy}^2$$

Où **n** représente le nombre de quadras placés sur le site;

s² étant la variance et **moy** est la moyenne.

Ceci est un exemple pour mieux illustrer la méthode :

Admettons que 10 quadrats sont placés dans un site et les nombres d'individus représentés dans le tableau suivant sont obtenus:

Quadrat n°	nombre d'individus adultes
1	4
2	8
3	2
4	0
5	7
6	12
7	5
8	2
9	14
10	10

Dans cet exemple :

$$n = 10$$

$$\Sigma x = 64$$

$$\text{Moyenne} = 6.4$$

$$\text{Ecart-type} = 4.62$$

$$\text{Variance } s^2 = 21.38$$

En appliquant la formule on obtient

$$25 \times 21.38 / 6.4^2 = 13.05$$

Cela signifie qu'il en faut 13 unités au lieu de 10 pour une erreur de 20%.

Afin de diminuer le taux d'erreur à moins de 20%, le nombre d'unités utilisées peut être augmenté.

Dans cet exemple, il semble plus logique d'utiliser 10 unités de plus (comme indiqué sur le tableau qui suit) puis recalculer le nombre d'unités nécessaires à nouveau.

Quadrat n°	nombre d'individus adultes	Quadrat n°	nombre d'individus adultes
1	4	11	3
2	8	12	2
3	2	13	13
4	0	14	9
5	7	15	5
6	12	16	11
7	5	17	15
8	2	18	7
9	14	19	9
10	10	20	4

Dans ce cas, on obtient :

$$n = 20$$

$$\Sigma x = 142$$

$$\text{Moyenne} = 7.1$$

$$\text{Ecart-type} = 4.44$$

$$\text{Variance } s^2 = 19.67$$

En appliquant la même formule on obtient :

$$25 \times 19.67 / 7.1^2 = 9.76$$

Le résultat signifie donc que 10 unités sont largement suffisantes pour cet exemple.

Calcul de l'erreur de l'échantillonnage

Il ne reste qu'à calculer le taux d'erreur maintenant que le nombre d'unités utilisées est augmenté. Cela se fait en appliquant la formule indiquée ci-dessous:

$$\text{Erreur} = 1/\text{moyenne} \times \sqrt{s^2/n}$$

Dans le cas de l'exemple précédent l'erreur est de :

$$\text{Erreur} = 1/7,1 \times \sqrt{19.67/20} = 0.139$$

Cela signifie qu'il y a un taux d'erreur de 14 % approximativement dans l'estimation de la densité dans cet exemple.

III.3. Calcul de la densité d'escargots adultes par mètre carré

Finalement, la densité d'escargots n'est que la moyenne calculée par quadra.

Cependant, le but est d'obtenir le nombre d'individus adultes par mètre carré et non par quadra de 0.25 x 0.25 m. Il suffit donc de multiplier par le nombre 4 qui est le nombre de quadras de 0.25 x 0.25 m nécessaire pour former un mètre carré.

Dans le cas de l'exemple précédemment cité, la densité est de 7.1 escargots adultes/quadra à savoir 28.4 individus adultes/m².

IV. Conditions d'élevage

IV.1. Acclimatation

Les escargots échantillonnés de chaque site ont été immédiatement transférés au laboratoire où ils ont subi une période d'acclimatation d'une durée d'une semaine.

L'acclimatation est le fait, pour les animaux, de récupérer suite au transport et s'adapter à la nourriture et le nouveau environnement au laboratoire. Dans cette étude, bien qu'elle soit facultative, elle est néanmoins appliquée afin d'éviter au maximum d'éventuelles mortalités qui peuvent en survenir.

Pour ce faire, les escargots appartenant à chaque population sont logés dans une boîte en plastique transparent mesurant 20 cm x 20 cm x 40 cm (fig.3.9). Chaque boîte est tapissée de papier absorbant mouillé afin de maintenir l'humidité à un niveau élevé (90% approximativement) et placée dans une pièce sous des conditions naturelles de température et photopériode. L'eau et la nourriture (laitue) sont fournies régulièrement *ad libitum*.



Fig.3.9. Photo illustrant les escargots échantillonnés logés dans des boîtes en plastique pour subir une période d'acclimatation.

IV.2. Isolement

Après écoulement de la période d'acclimatation, les escargots ont été isolés chacun dans une boîte en plastique transparente mesurant 90 X 60 X 90 mm (fig.3.10) sous des conditions contrôlées de température (20° C) et photopériode (16h de lumière, 8 h d'obscurité). Ces conditions sont démontrées optimales pour l'activité de cette espèce (Benbellil-Tafoughalt *et al.* 2009, Benbellil-Tafoughalt & Koene 2015). Chaque boîte est tapissée de papier absorbant mouillé afin de maintenir l'humidité à un niveau élevé, et les escargots nourris de laitue *ad libitum*. Deux fois par semaine, les boîtes sont nettoyées, la nourriture et le papier absorbant renouvelés.

Chaque boîte est libellée comportant le nom de la station d'échantillonnage ainsi qu'un numéro pour désigner l'individu.

L'isolement a été maintenu pour une période de 10 jours, temps nécessaire pour le renouvellement du "dard" au cas où il a déjà été utilisé lors d'éventuels accouplements ultérieurs (Tompa 1984, Giusti & Andreini 1988).

L'étape de l'isolement est nécessaire pour la deuxième partie du travail portant sur l'étude des "dards" où la présence de ces derniers est nécessaire.



Fig.3.10. Photo illustrant l'isolement des escargots chacun dans une boîte en plastique individuelle.

V. Dissection des escargots

Après l'écoulement de la période d'isolement, les escargots sont disséqués pour extraire les organes d'intérêt tout en passant par les étapes décrites ci-dessous:

V.1. Mesures de la coquille

A l'aide d'un pied à coulisse, le diamètre et la hauteur de la coquille sont mesurés pour chaque individu à 0.5 mm près comme indiqué sur (fig.3.11).

La hauteur est mesurée le long de l'axe de la coquille et représente sa dimension antéro-postérieure. Elle est définie comme étant la distance entre les deux plans perpendiculaires à l'axe de la coquille et touchant les extrémités de cette dernière; à savoir l'apex et l'extrémité opposée (Cox 1960).

Le diamètre quant à lui, représente la longueur d'une perpendiculaire entre deux lignes parallèles à l'axe et tangente respectivement à la saillie extérieure et au côté opposé de la coquille (Cox 1960).

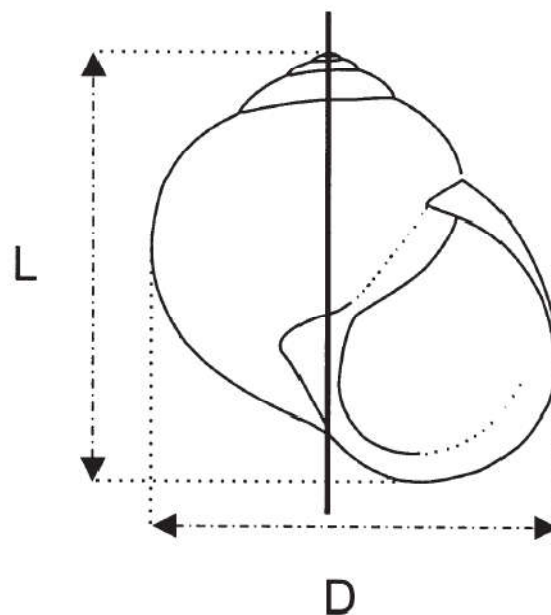


Fig.3.11. Dessin schématique d'une coquille du genre *Helix*. La hauteur (L) et le diamètre (D) sont définis perpendiculaires et parallèles à l'axe d'enroulement (Van Osselaer & Tursch 2000).

V.2. Anesthésie

Cette étape est indispensable avant de procéder aux dissections. Elle permet à la fois d'euthanasier les animaux pour faciliter leur manipulation et de gonfler leurs corps mou, qui est avantageux lors de la dissection.

Vu que les escargots se rétractent dans leur coquille, il est important avant d'entamer la dissection que le pied soit totalement tendu et apparent. Pour ce, chaque escargot est d'abord placé dans une cuvette contenant un peu d'eau et laissé quelques secondes jusqu'à extension total du pied et son expulsion de la coquille (fig. 3.12).

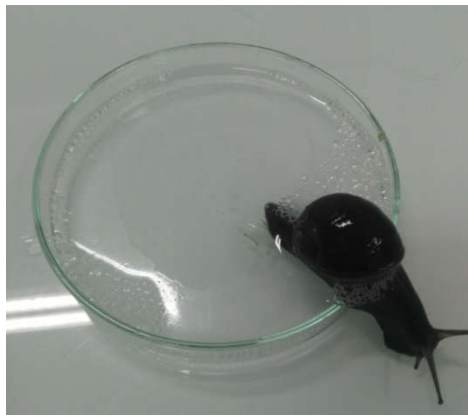


Fig. 3.12. Photo d'un escargot adulte *Helix aperta* au pied complètement apparent

Pour anesthésie, 4 à 5 ml d'une solution $MgCl_2 \cdot H_2O$ à 50 mM est injectée via le côté dorsal de l'arrière du pied de chaque escargot (fig.3.13).



Fig.3.13. Photo d'un escargot adulte *Helix aperta* subissant une anesthésie.

Après environ ± 2 minutes, l'escargot ne réagit plus au toucher des tentacules ce qui indique son euthanasie (fig.3.14).



Fig.3.14. Photo d'un escargot adulte *Helix aperta* euthanasié suite à l'injection de $MgCl_2H_2O$.

V.3. Extirpation de la coquille

L'extirpation de la coquille se fait à l'aide d'une pince à dissection forte après euthanasie et immobilisation complète de l'escargot.

La coquille est d'abord découpée depuis le péristome vers l'apex (sommet de la coquille) en suivant la ligne de suture représentée en ligne rouge sur (Fig.3.15).

La partie bulbeuse de la coquille est découpée latéralement en petits morceaux qui sont ensuite arrachés minutieusement en prenant soin de ne pas abimer les tissus (lignes vertes, fig.3.15).

Arrivé à l'apex (sommet de la coquille), une pince fine est utilisée pour ôter le dernier tour de la coquille en découpant petit à petit le bord d'enroulement de ce dernier.

Après ces étapes, le corps est toujours enroulé autour de l'axe de la coquille appelé columelle qui doit être extrait à son tour. Pour ce faire, le corps est d'abord libéré en le tirant délicatement et la columelle est enfin retirée.

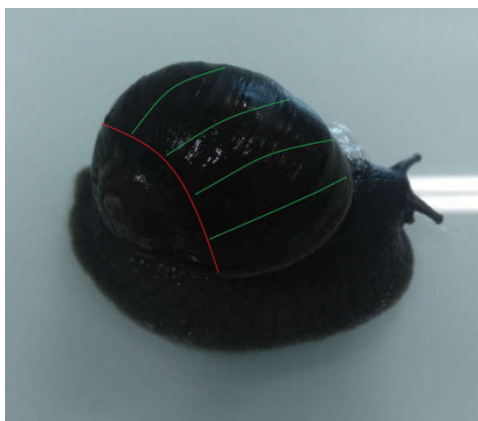


Fig.3.15. Photo illustrant les lignes à suivre pour extirpation stratégique et facile de la coquille

Après extirpation de la coquille, l'escargot est prêt pour la dissection (fig.3.16).



Fig.3.16. Photo illustrant un individu adulte *Helix aperta* après extirpation de la coquille

V.4. Isolement de l'appareil reproducteur

Le prélèvement de l'appareil reproducteur s'effectue préférentiellement le plus tôt possible après euthanasie des animaux.

Dans une cuvette à dissection, l'animal à disséquer est d'abord fixé en l'étirant puis l'épinglant très antérieurement et postérieurement du pied et de la tête (fig.3.17)



Fig.3.17. Photo illustrant la fixation d'un escargot sur un support pour la dissection

Dans un premier temps, une incision cutanée antéro-postérieure est réalisée tout au long du corps à l'aide de ciseaux fine en démarrant de l'orifice génital, situé sur le coté droit de la tête derrière les tentacules, et en passant par le manteau (en suivant la ligne rouge sur fig.3.18).



Fig.3.18. Photo illustrant la dissection d'un escargot *Helix aperta*. La ligne rouge indique la première incision à réaliser.

A l'aide de deux pinces fines, la fine membrane qui enveloppe la masse viscérale est dilacérée délicatement afin d'avoir accès aux organes désirés.

Les volets tégumentaires du pied ainsi que les bordures du manteau sont ensuite écartés, rabattues vers l'extérieur puis épinglées de part et d'autre sur la cuvette afin de faciliter l'extraction de l'appareil reproducteur (fig.3.19).



Fig.3.19. Photo illustrant un escargot *Helix aperta* disséqué, avec tous les organes apparents

L'appareil reproducteur est extrait sous une loupe binoculaire à l'aide d'une pince fine pas trop tranchante pour éviter toute rupture d'organes qui doivent être prélevés intacts. Les escargots pour lesquels un organe (ou plus) est coupé durant la dissection, sont exclus de l'étude.

Les premiers organes repérés sont le pénis, la poche à dard ainsi que les glandes multifides situés tout près de la tête (fig.3.20). Ils sont retirés délicatement en les libérant petit à petit des adhérences qui les maintiennent.



Fig.3.20. Photo d'un escargot *Helix aperta* disséqué, et repérage des premiers organes reproducteurs; sac à dard, pénis et glandes multifides (encerclés)

Suivre l'extraction des autres organes à savoir, l'épiphallus, le flagellum mâle, le canal déférent, et le vagin ; en les saisissant d'abords avec la pince puis en tirant soigneusement vers le haut sans couper. Les organes génitaux des escargots sont tous liés les uns avec les autres ce qui facilite leur repérage.

Le spermoviducte (=canal godronné), qui apparait sous la forme d'un tube à aspect festonné, est ensuite repéré et retiré délicatement à son tour tout en sectionnant d'éventuels organes (non reproducteurs) à qui le spermoviducte peut être adhérent (fig.3.21).

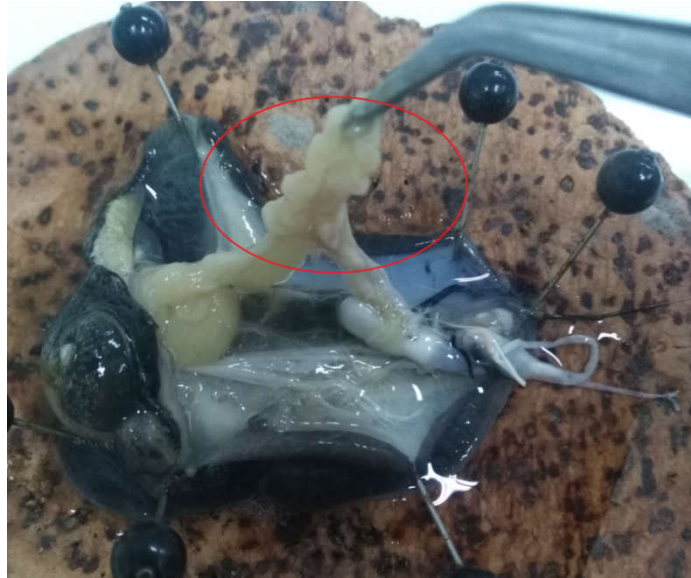


Fig.3.21. Photo illustrant le repérage et l'extraction du spermoviducte

A l'extrémité du spermoviducte est attachée la glande à albumen, qui est libérée avec prudence vu sa structure très fragile (fig.3.22). Il est important de l'extraire intacte et ne pas l'abimer vu que la poche de fertilisation d'intérêt se trouve enfoncée dedans.



Fig.3.22. Photo illustrant le repérage de la glande à albumen

Une fois la glande à albumen retirée, la bourse copulatrice apparait en dessous (fig.3.23).

Elle est délicatement libérée en prenant soin de ne pas abimer son canal très fin (=canal de la bourse copulatrice). Ce dernier est ensuite détaché à son tour des adhérences conjonctives qui le maintiennent.

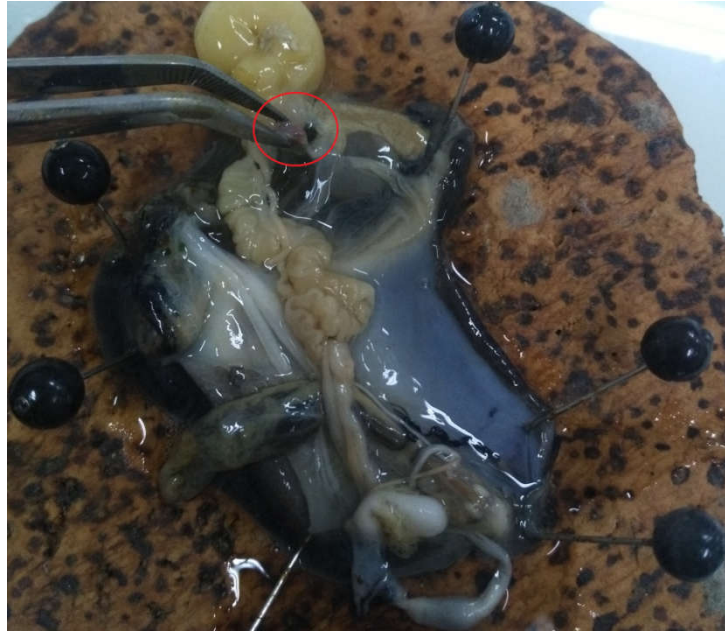


Fig.3.23. Photo illustrant le repérage et l'extraction de la bourse copulatrice et son canal.

Ensuite, le diverticulum (=flagellum femelle), situé près du spermoviducte en jonction avec le réceptacle séminal, est dégagé en tirant délicatement pour le libérer des adhérences avec la glande à albumen et le spermoviducte.

A l'extrémité du tortillon viscéral, dégager avec beaucoup de soin le canal hermaphrodite, très fin et très flexueux, qui nous servira de repère pour la dissection de la poche de fertilisation ultérieurement.

Finalement, une fois que tous les organes sont repérés et libérés, ils sont tous extraits à la fois.

V.5. Mesures des organes reproducteurs

Une fois retiré, l'appareil génital de chaque escargot est transféré dans une boîte de pétri contenant une goutte d'eau distillé afin de faciliter l'étalement des organes et éviter leur dessèchement.

Les organes considérés dans cette étude concernaient :

Des organes mâles : L'épiphallus, le flagellum, le sac à dard et les glandes multifides et ;

Des organes femelles : Le diverticulum et le canal de la bourse copulatrice (voir fig.3.24).

Avant de procéder à la mesure, chaque organe est d'abords étendu tout droit sans convolution puis sa longueur mesurée à l'aide d'un pied à coulisse. Trois mesures sont effectuées pour chacun et la médiane est ensuite calculée pour une utilisation ultérieure dans les analyses statistiques. Pour les glandes multifides, qui se présentent en paire, la longueur de chacune est d'abords mesurée puis la moyenne des deux calculée.

Le choix de se focaliser sur ces organes particuliers n'est pas fortuit, mais motivé par le fait qu'ils soient probablement impliqués dans les mécanismes de la sélection sexuelle post-copulatoire. Plus intéressant encore, ils sont supposés interagir et co-évoluer avec la morphologie des organes de stockage du sperme (Baminger & Haase 2000, Davison *et al.* 2005, Koene & Schulenburg 2005).

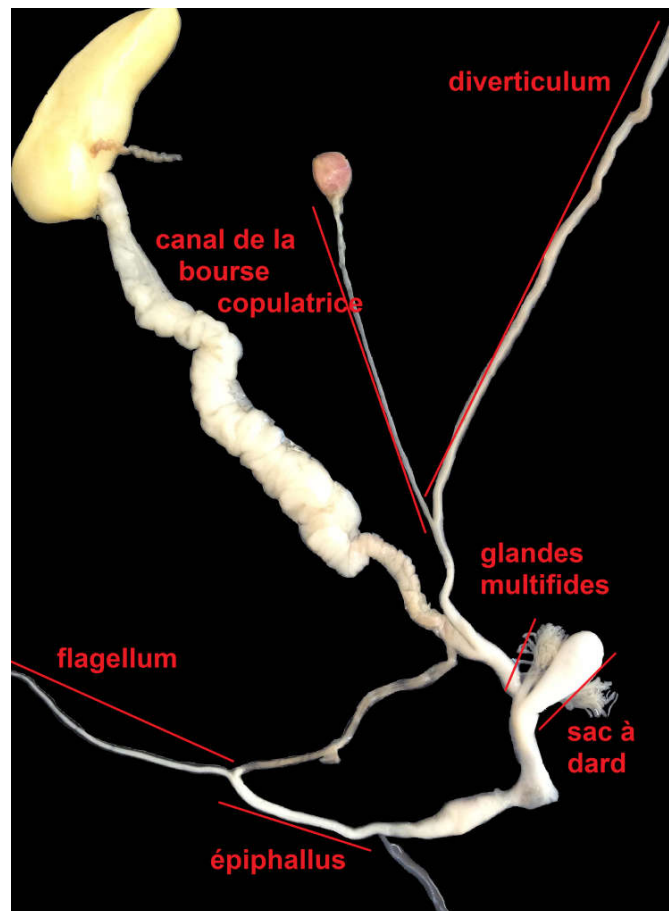


Fig.3.24. Photo d'un appareil génital d'*Helix aperta* illustrant les organes reproducteurs considérés dans cette étude.

En effet, lors de l'accouplement, ces espèces échangent le sperme via une sorte de sac appelé « spermatophore ». Ce dernier consiste en une « queue » formée au niveau du flagellum, une

«tête » ainsi qu'une partie médiane contenant le sperme, toutes les deux formées au niveau de l'épiphallus (Baminger & Haase 2000). Chez l'espèce *Arianta arbustorum*, le nombre de spermatozoïdes transportés par le spermatophore était positivement corrélé avec la taille de sa partie dédiée à cet effet (c.à.d. la partie médiane) (Baur, Locher & Baur, 1998) et la taille totale du spermatophore peut vraisemblablement influencer la quantité du sperme pouvant atteindre les organes de stockage du sperme (Lind 1973). Ceci s'avère intéressant vu que la quantité du sperme transmise durant la copulation constitue un élément important dans le processus de la compétition spermatique (Exp. Parker 1984, 1998). Ainsi, le spermatophore et tous les organes impliqués dans sa formation (cités précédemment) peuvent probablement être sujets aux mécanismes de la sélection sexuelle (Baminger & Haase 2000).

Ceci peut également être le cas pour le « sac à dard », l'organe producteur du « dard », et les glandes multifides y associées. Le « dard », dont la fonction exacte reste controversée (Kothbauer 1988), semble être responsable de la transmission d'une phéromone synthétisée au niveau des glandes multifides (Koene & Chase 1998a). L'application *in vitro* de cette dernière sur l'appareil reproducteur de l'espèce *Cornu aspersum*, a provoqué le rétrécissement du canal conduisant à la bourse copulatrice qui est l'organe de digestion du sperme (Koene & Chase 1998a). Par conséquent, ceci peut résulter en une plus grande quantité de sperme atteignant les organes de stockage ayant ainsi une plus grande chance pour la fertilisation (Koene & Chase 1998a). Hypothétiquement, des dards et glandes d'une plus grande taille sont supposés pouvoir synthétiser et transmettre respectivement une quantité plus importante de phéromone facilitant ainsi le passage vers les organes de stockage de sperme.

Du point de vue de la fonction femelle, la longueur du diverticulum et du canal de la bourse copulatrice semblent également être soumis à la pression de la sélection sexuelle. Effectivement, ces organes jouent le rôle de récepteurs du spermatophore, et leur longueur peut être critique dans le contrôle de la quantité de sperme atteignant les organes de stockage du sperme.

VI. Investigation des poches de fertilisation et spermathèques

La structure de la poche de fertilisation et celle de la spermathèque sont investiguées au moyen de coupes histologiques en série. Cette méthode est la plus adéquate vu la structure de la spermathèque qui se présente en un système compliqué de tubules dont les longueurs sont très divergentes.

La coupe en série est la méthode la plus largement utilisée et la plus accessible pour la reconstruction d'organes en 3 dimensions. Néanmoins, son seul inconvénient réside dans le volume de l'échantillon inévitablement consommé et utilisé. Ceci exclut donc tout réexamen et réutilisation du matériel après l'analyse.

Cette technique consiste d'abords en la préparation des tissus en passant par toutes les étapes utilisées en histologie standard et qui sont décrites ci-dessous. Par la suite, la réalisation de coupes sériées en 2 dimensions et la préparation de lames histologiques sont effectuées.

VI.1. Extraction des poches de fertilisation

La poche de fertilisation encore appelée « poche de fertilisation-complexe de la spermathèque » est un organe complexe constitué d'une chambre de fertilisation et d'un système de tubules formant la spermathèque, l'objet principal de cette étude.

La poche de fertilisation est située dans la partie distale de l'appareil reproducteur et est entièrement enfoncée dans la glande à albumen (fig.3.25).

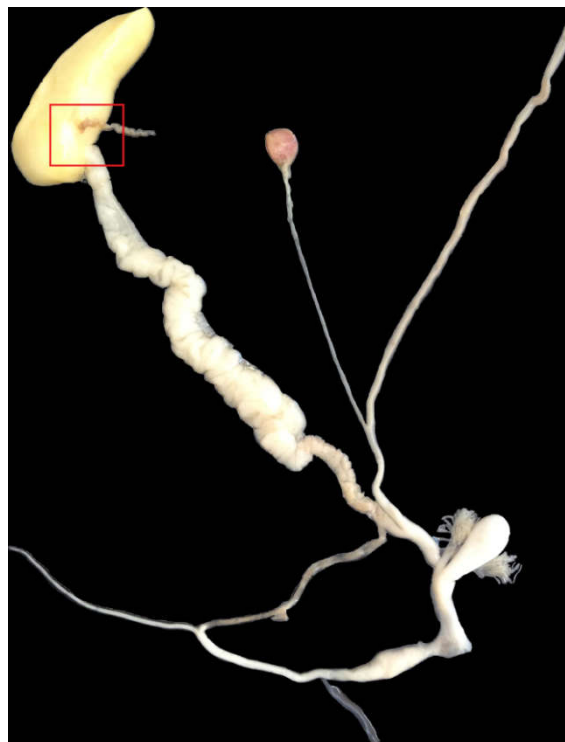


Fig.3.25. Photo d'un appareil reproducteur d'*Helix aperta* illustrant l'emplacement de la poche de fertilisation et qui est indiqué par le carré rouge.

L'extraction de la poche de fertilisation s'est déroulée sous une loupe binoculaire au grossissement 10 en l'utilisation de deux pinces trop fines et pointues et de ciseaux tranchants et fins (fig.3.26).



Fig.3.26. Photo du matériel utilisé pour l'extraction des poche de fertilisation; ciseaux de dissection et deux pinces fines et pointues.

Dans un premier temps, la glande à albumen est isolée du reste de l'appareil reproducteur (fig.3.27). Le spermoviducte et le canal hermaphrodite, qui débouchent dans la poche de fertilisation, sont coupés très près de la glande à albumen en gardant une petite partie de chacun qui nous servira par la suite d'indice pour avoir accès à l'emplacement exact de l'organe d'intérêt (poche de fertilisation) (fig.3.27).



Fig.3.27. Photo illustrant une glande à albumen isolée avec des petites parties du spermoviduct et canal hermaphrodite.

Les tissus découpés sont ensuite transférés dans une petite cuvette à dissection afin d'extraire la poche de fertilisation.

L'extraction de la poche de fertilisation s'est réalisée en écartant délicatement les tissus de la glande à albumen tout en prenant le canal hermaphrodite et le spermoviducte comme indices de son emplacement exact.

Dans la plupart des cas, les poches de fertilisation étaient difficiles à repérer du fait de leur enfoncement profond dans la glande à albumen, comme déjà mentionné plus haut, et de sa couleur transparente. Dans de telles situations, toute la partie de la glande à albumen où elle se trouve est délimitée puis extraite afin de ne risquer de perdre aucune de ses parties ou de la détruire (fig.3.28).

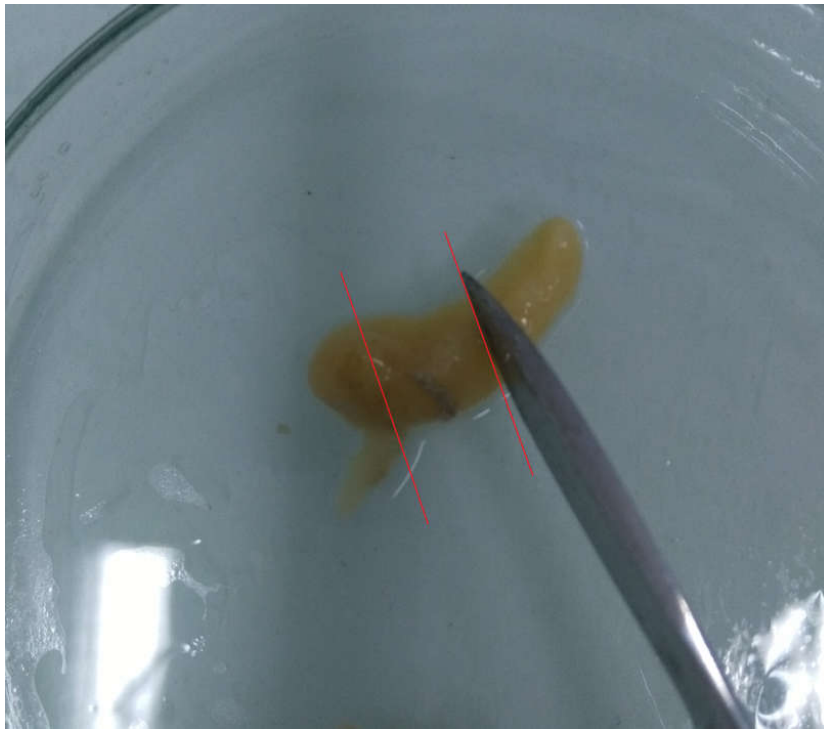


Fig.3.28. Photo illustrant la délimitation de l'emplacement de la poche de fertilisation (lignes rouges).

A chaque fois qu'une poche de fertilisation est extraite, elle est immédiatement fixée puis conservée jusqu'à achèvement de toutes les dissections afin d'entamer ensuite l'étude histologique.

VI.2. Préparation histologique des poches de fertilisation

VI.2.1. Fixation des tissus

La fixation est une étape indispensable dans le processus de la préparation des échantillons histologiques. Elle est préférentiellement réalisée immédiatement après prélèvement des tissus afin d'éviter leur dégradation et conserver les tissus dans un état le plus proche possible de leur état vivant. Le but principal de cette étape est d'immobiliser les constituants des tissus afin de garder leur structure et morphologie intactes. De plus, ça prévient l'autolyse cellulaire et la putréfaction bactérienne post-mortem.

Les fixateurs les plus couramment utilisés sont le formol 10% tamponné, le formaldéhyde 36%, le formaldéhyde 4% ou le liquide de Bouin, qui est un mélange de formol et d'acide picrique.

Dans cette étude, le fixateur utilisé est l'AFA (Alcool Formolé Acétique) dans lequel les poches de fertilisation disséquées sont incubées pour une durée de 24 heures. Ce fixateur est préparé extemporanément à partir de 330 ml d'Ethanol à 95% + 220 ml de formol pur + 115 ml d'Acide acétique et 335 ml d'eau distillée.

Le fixateur AFA est facile à préparer, pénètre rapidement et d'une manière homogène et ne cause pas la rétraction des tissus. De plus, sa couleur transparente, permet une bonne visibilité des colorations réalisées assurant ainsi la conservation d'une image fidèle des tissus étudiés tout en révélant les structures latentes recherchées.

Les tissus à fixer sont donc plongés chacun dans un volume de fixateur dix fois plus important que sa taille en veillant à ce qu'ils n'adhèrent pas au fond ni aux parois des récipients (agitation possible) (fig.3.29).

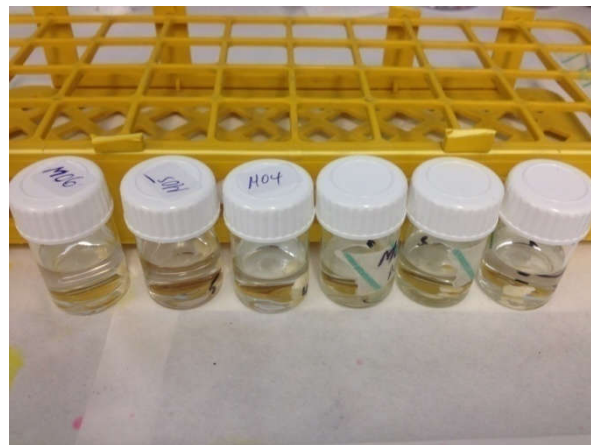


Fig.3.29. Photo montrant la fixation des poches de fertilisation dans le fixateur AFA.

VI.2.2. Déshydratation

La déshydratation a pour but d'éliminer le fixateur et toute l'eau contenus dans les tissus. Cette étape est préparatoire à celle de l'inclusion dans la paraffine. La paraffine étant hydrophobe et pas miscible à l'eau, les pièces fixées devront être déshydratées au préalable.

La déshydratation se fait progressivement pour ne pas causer la distorsion ou le durcissement des tissus.

Pour ce, les tissus sont incubés et passés dans des bains d'alcool de degrés croissants à savoir :

<u>Etape</u>	<u>durée d'incubation</u>
Ethanol 70%	1 heure
Ethanol 80%	1 heure
Ethanol 90%	1 heure
Ethanol 100%	½ heure
Ethanol 100%	½ heure

De cette manière, l'eau et le fixateur sont éliminés et remplacés par l'alcool.

VI.2.3. Eclaircissement (clarification)

Cette étape consiste à imprégner les tissus dans un solvant miscible à la paraffine pour à la fois; éliminer l'alcool contenue dans les tissus et préparer ces derniers à recevoir la paraffine.

Les échantillons sont donc transférés à :

1- Un mélange d'Ethanol 100% et d'Acétate d'amyle en quantités égales pour une durée d'une ½ heure puis ;

2- Une solution d'Acétate d'amyle pendant ½ heure avec renouvellement.

VI.2.4. Imprégnation à chaud

Cette étape s'est déroulée à l'intérieur de l'étuve réglée à 60°C. Elle est principalement destinée à remplacer l'éthanol et l'Acétate d'amylo contenus dans les tissus par de la paraffine, qui servira à les solidifier.

Les tissus sont d'abords imprégnés dans un mélange d'Amylo acétate et paraffine fondue à quantités égales et laissés s'équilibrer à l'étuve pendant une ½ heure.

Par la suite, ils sont transférés dans de la paraffine fondue où ils sont incubés pour une durée d'une heure.

Les étapes décrites jusqu'à présent peuvent être aussi réalisées automatiquement dans un automate d'inclusion (fig.3.30). Cet appareil permet la déshydratation et l'infiltration des tissus biologiques de façon automatique et fait gagner énormément de temps.



Fig.3.30. Photo d'un automate d'inclusion Leica.

Il est composé de 12 cuves en verres remplies avec des solutions d'alcool à concentrations croissantes (70 à 100%), de xylène et de la paraffine maintenue en état liquide.

Dans un premier temps, chaque échantillon est placé dans une cassette numérotée et comportant le nom du site de provenance de l'échantillon (fig.3.31).

L'ensemble de cassettes est ensuite placé dans un panier (fig.3.31) qui est successivement transféré d'un bain à l'autre selon un programme prédéfini par l'utilisateur.

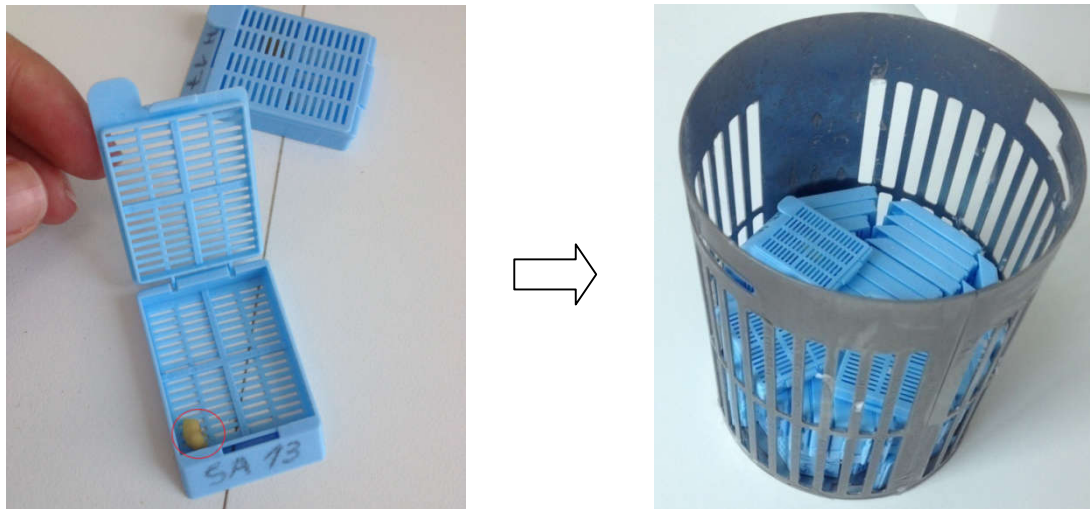


Fig.3.31. Photos d'un échantillon placé dans une cassette histologique (gauche) et d'un ensemble de cassettes introduites dans la corbeille pour la porter sur l'automate d'inclusion (droite).

A la fin du programme, qui dure généralement moins de 12 heures, les échantillons sont récupérés ; avec toute l'eau y contenue remplacée par de la paraffine qui se solidifie à la sortie de l'automate.

VI.2.5. Inclusion (enrobage) et préparation des blocs

Avant de procéder à la réalisation de coupes histologiques, les organes doivent être enrobés dans un matériau (médium) qui servira de support pendant le processus de découpage.

Le Collodion, la celloïdine, l'Esterwax, les Résines Epoxy, les Gommés, les Gels de silice et la Gélatine sont des exemples de médiums utilisés, ayant essentiellement pour but de solidifier les tissus pour pouvoir confectionner des coupes tissulaires minces.

Dans cette étude, la paraffine est utilisée à cet effet vu qu'elle soit la plus adéquate à la nature des tissus étudiés. De plus, elle est utilisée avec la pluparts des fixateurs.

Cette étape consiste en l'inclusion de chaque organe à étudier dans un moule rempli de paraffine chauffée. L'organe est placé dans le moule selon un certain angle ou une certaine position afin de pouvoir réaliser les coupes selon l'orientation désirée (longitudinale ou transversale) pour ensuite avoir accès à toutes les structures recherchées lors de l'examen microscopique.

Dans cette étude, des boîtes de pétri compartimentées sont utilisées comme des moules vu qu'elles permettent après solidification de décoller facilement le bloc de paraffine.

Dans chaque boîte, est versée une quantité de paraffine qui est ensuite laissée fondre sur une plaque chauffante.

Une fois que la paraffine est complètement fondue, chaque organe est transféré rapidement et délicatement dans un compartiment de la boîte de pétri (fig.3.32) à l'aide d'une pince.

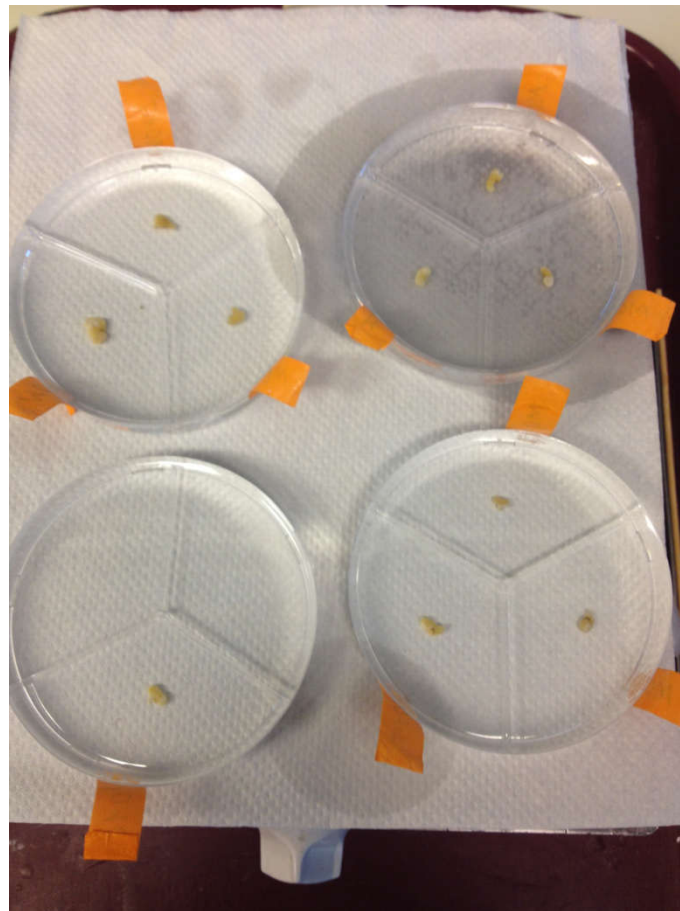


Fig.3.32. Photo des poches de fertilisation dans des boîtes de pétri contenant de la paraffine et fondue placées sur une plaque chauffante.

Les boîtes de pétri sont laissées sur la plaque chauffante pour une durée de deux heures afin de permettre à la paraffine de bien pénétrer dans les tissus.

Passées ces deux heures, les moules sont retirés de la plaque chauffante et gardés à température ambiante pour refroidissement et séchage de la paraffine (fig.3.33).

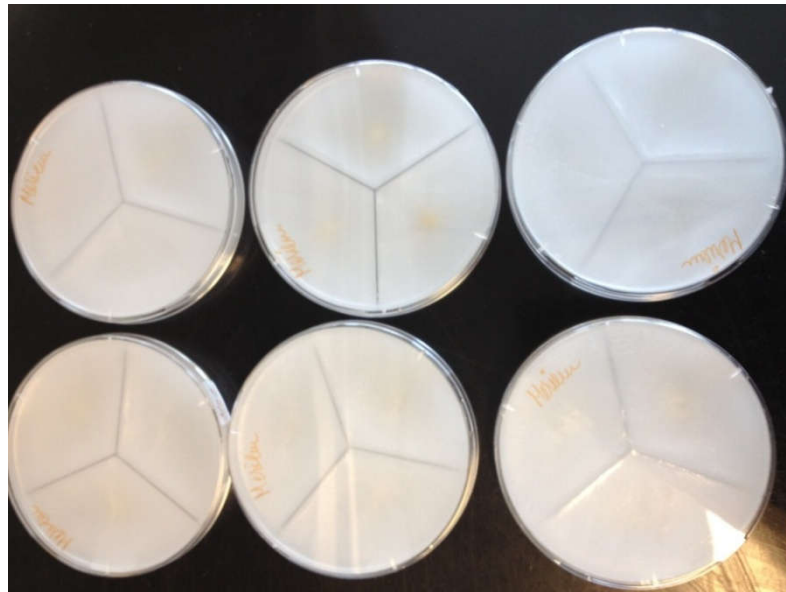


Fig.3.33. Photo des blocs de paraffine durcie

Après refroidissement, des blocs de paraffine ayant un aspect dur sont obtenus, à l'intérieur de chacun la pièce prélevée (poche de fertilisation ou fragment de glande à albumen) est incluse (fig.3.34).

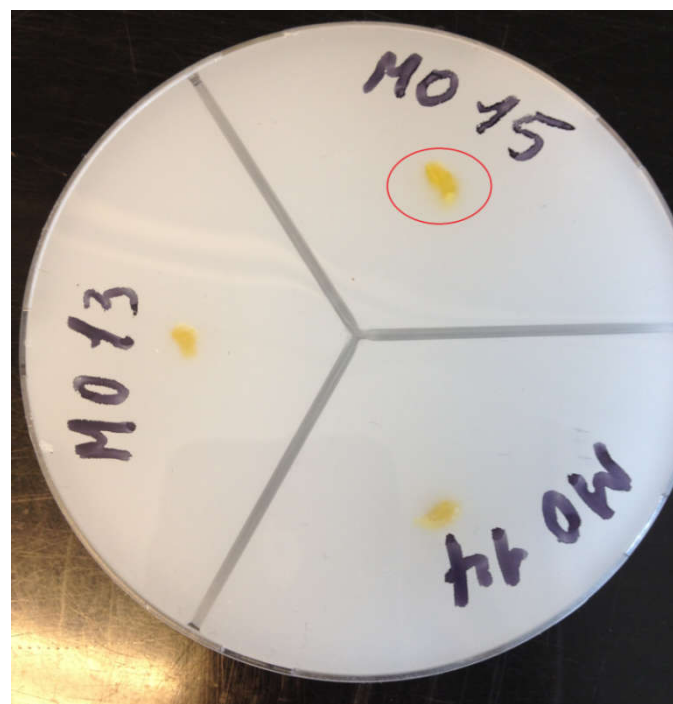


Fig.3.34. Photo montrant l'aspect des blocs après inclusion en paraffine (les poches de fertilisation ou fragments des glandes à albumen apparaissent en jaune).

Un dégrossissage au scalpel est réalisé pour chaque bloc visant à atteindre l'organe inclus. Au final, des petits blocs sont obtenus comme illustré sur (fig.3.35).



Fig.3.35. Photo de deux blocs de paraffine après dégrossissage, avec les poches de fertilisation incluses.

Les blocs sont ensuite placés sur une plaque réfrigérante afin de laisser l'eau pénétrer dans les tissus. Ceci sert à gonfler ces derniers ce qui facilite leur découpage par la suite.

Au cours de la réalisation des coupes histologiques, un nouveau refroidissement du bloc peut s'avérer nécessaire si la face de celui-ci devient chaude afin d'obtenir des coupes les plus homogènes possibles.

VI.2.6. Microtomie « réalisation de coupes sériées »

Les coupes histologiques sont réalisées en l'utilisation d'un microtome motorisé HM 355 S (Microm). Il s'agit d'un microtome rotatif automatique muni d'un mode de "coupes sériées" ainsi que d'un compteur de coupes et cumul de leur épaisseur, qui facilitera par la suite le calcul de la longueur des organes à étudier. De plus, il est doté d'une pince porte-objet à orientation fine avec "position 0", ce qui permettra de placer l'échantillon selon l'orientation désirée.

Dans un premier temps, le bloc est fixé sur la pince porte-objet en suivant une orientation qui permettra par la suite de réaliser des coupes transversales (fig.3.36). Pour ce, la face du bloc à coller est d'abord chauffée au bec benzène pour adhérer à la pince.

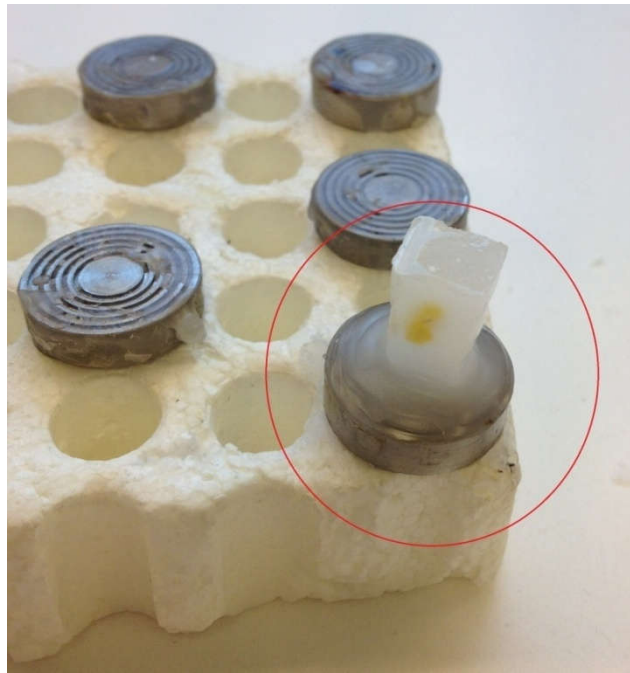


Fig.3.36. Photo d'un bloc collé à la pince porte-objet du microtome

Une fois le bloc fixé sur la pince porte-objet, cette dernière est montée (installée) sur le microtome pour la réalisation de coupes (Fig.3.37).

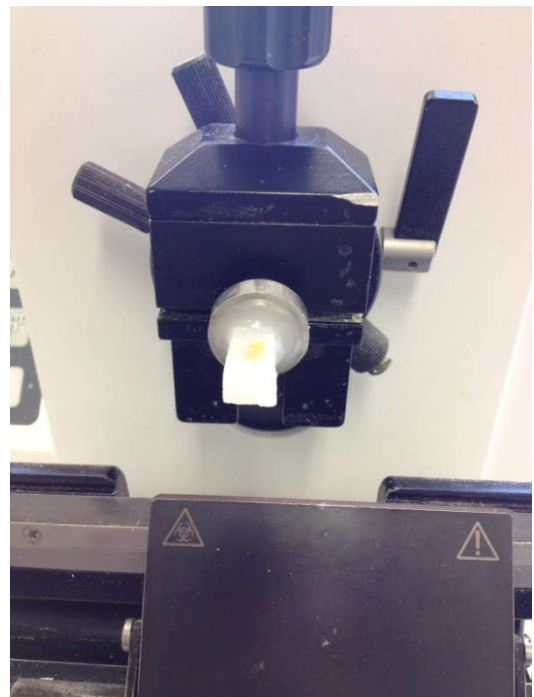


Fig.3.37. Photos illustrant le bloc monté sur le microtome

Le principe de fonctionnement du microtome est d'entraîner un couteau sur la surface du bloc de la paraffine, produisant ainsi des coupes fines d'épaisseur bien précise définie au préalable.

Dans cette étude, des coupes sériées de 7 μm d'épaisseur sont réalisées. Il s'agit de coupes reliées entre elles sous forme d'un ruban continu permettant la reconstruction en 3D des structures observées.

La réalisation des coupes sériées doit se faire soigneusement et systématiquement en plans parallèles jusqu'à épuisement de l'organe (Fig.3.38).

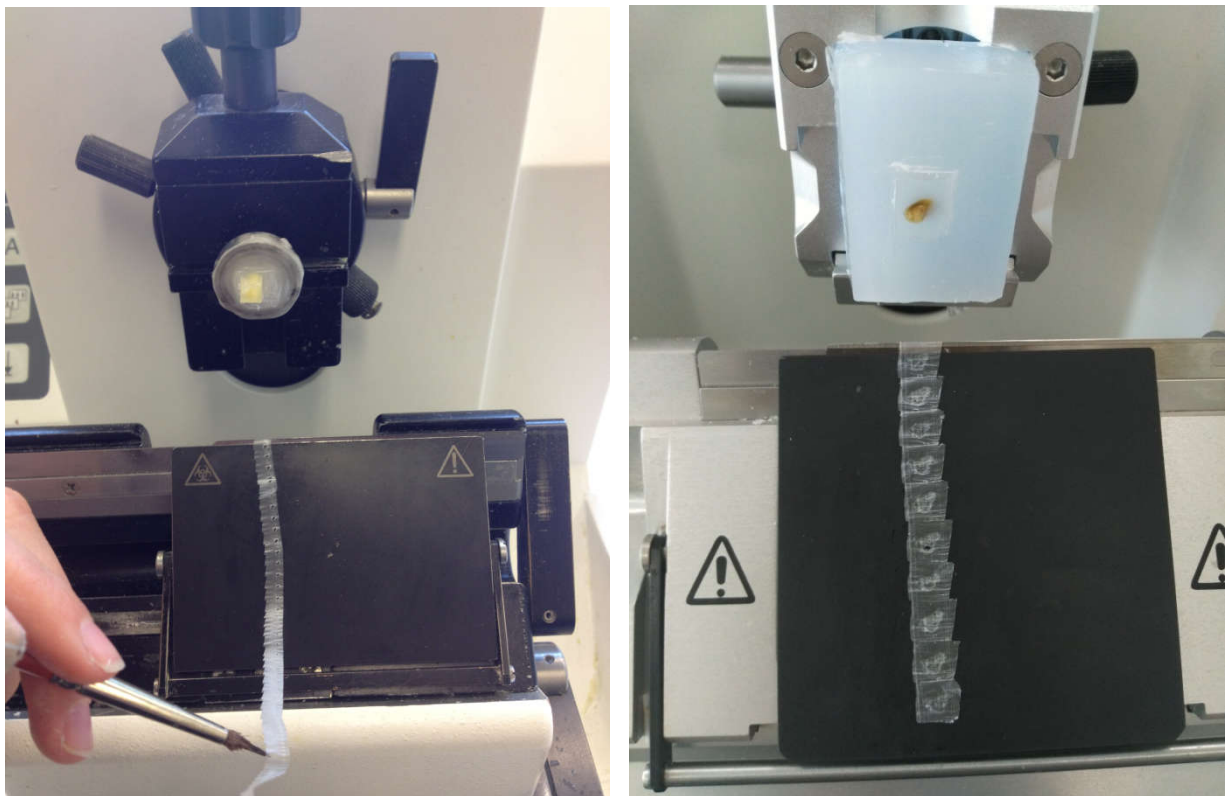


Fig.3.38. Photos illustrant la réalisation de coupes sériées et l'obtention de rubans

VI.2.7. Préparation des lames histologiques

Les lames utilisées sont d'abord identifiées, chacune comportant la date, numéro et provenance de l'échantillon. Un nombre de 15 jusqu'à 20 lames (des fois plus) est destiné pour chaque échantillon vu qu'il est coupé sur toute sa longueur. Pour cela, chaque lame est aussi numérotée afin de garder l'ordre des coupes (fig.3.39).

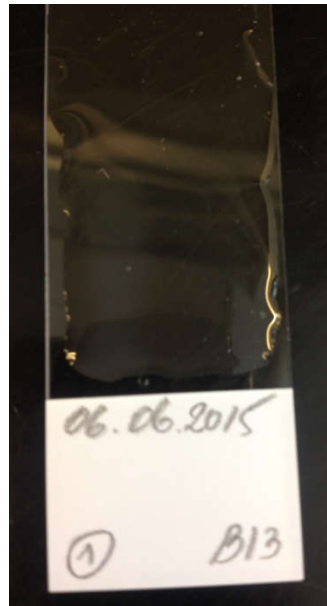


Fig.3.39. Photo d'une lame identifiée comportant son numéro (1), la date de la réalisation des coupes (06.06.2015), la provenance de l'échantillon (B=Baccaro) et le numéro de l'individu (13)

Chaque lame est ensuite recouverte d'une solution visqueuse, préparée en diluant 1/2 ml de blanc d'œuf dans 50 ml d'eau distillée. Cette solution a pour but de permettre aux coupes histologiques de bien se glisser sur la lame (fig.3.39).

A chaque fois qu'un ruban comportant de 10 à 12 sections est réalisé, il est directement coupé et recueilli sur une lame en retenant l'ordre de coupes. Un nombre de 2 à 3 rubans consécutifs sont déposés sur chaque lame (fig.3.40).



Fig.3.40. Photo de lames avec rubans placés en ordre

Afin de bien coller les coupes et les étaler sur les lames, une technique appelée « flottage » est adoptée en histologie standard. Elle a aussi pour but de redonner à la coupe ses dimensions originales en l'étirant et la rendant totalement plate.

Cette technique consiste à tremper les lames verticalement dans un bain-marie à 37°C pour libérer les coupes, les laisser flotter, puis les récupérer en les laissant adhérer à la surface de la lame.

Néanmoins, dans le cas de coupes sériées, cette technique de flottage ne peut être réalisée (ou du moins difficile à accomplir) vu que l'ordre des coupes peut facilement être perdu lors de la libération des rubans sur la surface de l'eau.

Pour ce, l'étalement des coupes se fait sur une platine chauffante pour histologie (fig.3.41).



Fig.3.41. Photo d'une platine chauffante pour histologie

La lame est déposée sur cette dernière, et à l'aide d'un pinceau la solution visqueuse est déplacée petit à petit vers les extrémités de la lame jusqu'à étalement des coupes.

VI.2.8. Séchage des lames

Les lames sont d'abord égouttées et débarrassées de la solution visqueuse en l'aspirant à l'aide d'une pipette disponible.

Elles sont ensuite rangées en position à plat sur des portes lames (fig.3.42) et incubées dans l'étuve à 37°C pendant 2 nuits (fig.3.42) où sont laissées sécher afin que les coupes adhèrent parfaitement aux lames.



Fig.3.42. A gauche, photo de lames en position à plat sur un porte-lames; à droite, photo des portes- lames incubées dans une étuve à 37°C.

Il est important de maintenir une température de 37°C (ou un peu moins) dans l'étuve car une température trop élevée peut bouillir les gouttelettes d'eau sous les coupes causant ainsi leur endommagement.

VI.2.9. Coloration

La coloration a pour but d'accentuer les contrastes afin de pouvoir identifier les tissus recherchés. La coloration réalisée dans cette étude est dite "de routine" ou "topographique", réalisée en utilisant les colorants: Hématoxyline et Éosine.

Les lames sont d'abord insérées dans des corbeilles compartimentées en verre spécialement conçues à cet effet, et ces dernières placées dans des cuves contenant la solution adéquate selon l'étape à réaliser. L'utilisation de ce matériel fait gagner énormément de temps tout en protégeant les lames.

La coloration histologique s'effectue en suivant plusieurs étapes :

VI.2.9.a. Déparaffinage

La paraffine étant hydrophobe et les colorants hydrophiles, l'étape du déparaffinage suivie d'une réhydratation sont indispensables avant de procéder à la coloration et permettre aux colorants de pénétrer dans les tissus.

Le déparaffinage, qui consiste en l'élimination de la paraffine restante sur les lames, s'effectue en incubant ces dernières dans du xylène (dans lequel la paraffine est soluble) pour une durée minimale d'1/2 heure jusqu'à dissolution totale de la paraffine.

VI.2.9.b. Réhydratation

Cette étape est assurée par une succession de bains d'alcool de titre décroissant puis d'eau (voir ci-dessous) assurant la réhydratation finale.

<u>Etape</u>	<u>durée d'incubation</u>
Ethanol 100%	3 minutes
Ethanol 90%	3 minutes
Ethanol 80%	3 minutes
Ethanol 70%	3 minutes
Eau déminéralisé	3 minutes

Il est important de procéder très délicatement lors du trempage dans les différentes solutions afin de minimiser les pertes de sections.

VI.2.9.c. Coloration

Une fois la déshydratation achevée, les lames sont incubées pour une durée de 10 à 15 minutes dans le colorant Hématoxyline de Mayer.

Écoulée cette durée, les lames sont transférées dans une cuve placée sous le robinet (sous faible débit pour ne pas détacher les tissus) pendant 10 à 15 minutes jusqu'à ce que l'eau dans la cuve soit claire et les coupes soient légèrement colorées en bleu.

Les lames sont par la suite incubées durant une minute dans de l'eau distillée et 30 secondes dans l'Ethanol 96% avant de procéder à la coloration à l'éosine.

Cette dernière se fait en versant quelques gouttes d'éosine directement sur chaque lame tout en décantant l'excès.

Après 2 minutes de coloration, les lames sont rincées à l'eau courante.

La figure ci-dessous (fig.3.43) représente un cliché montrant l'ensemble du matériel en place pour les opérations décrites précédemment.

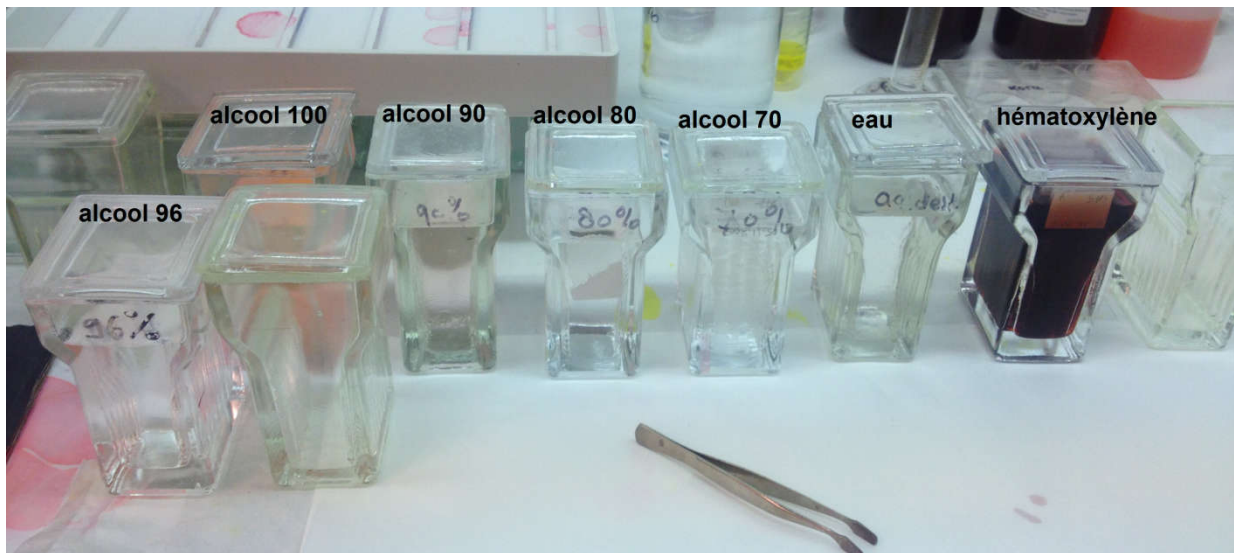


Fig.3.43. Photo illustrant le matériel et les solutions utilisés pour la réalisation des opérations allant de la réhydratation jusqu'à la coloration.

VI.2.9.d. Déshydratation

La déshydratation est l'étape finale avant d'entamer le montage des lames et leur préparation pour les observations microscopiques. Elle est réalisée en plongeant les lames successivement dans les solutions suivantes pendant les durées indiquées:

Ethanol 70%	05-10 bains
Ethanol 85-95%	10 bains
Ethanol 100%	02 minutes
Ethanol 96%	lavage
Xylène	01 minute

VI.2.10. Montage des lames

En cette étape, qui a pour but principale la préservation des préparations, chaque lame est couverte d'une lamelle sur la face où sont déposées les coupes.

Une goutte de résine (le Malinol est utilisé dans cette étude) est déposée sur la lame et une lamelle est placée délicatement d'une manière à étaler la résine sur toute la surface et en faisant attention à ne pas former des bulles d'air qui rendent l'observation microscopique désagréable.

Le Malinol sert d'adhésif qui colle la lame et la lamelle et fixe les coupes davantage.

Après le montage, les lames sont rincées dans du xylène puis pressées contre un bout de papier absorbant afin de les sécher.

Les lames sont désormais prêtes pour les observations microscopiques (fig.3.44).



Fig.3.44. photo de lames montées prêtes pour les observations microscopiques

VI.2.11. Observations microscopiques

L'observation microscopique est effectuée sous un microscopique photonique (de marque Olympus) lié à une caméra numérique (fig.3.45) et visualisant les images sur la plate-forme CellSens Olympus. Le grossissement 10 est utilisé vu qu'il soit suffisant pour le repérage des structures désirées et l'accomplissement des tâches prévues.



Fig.3.45. Photo du microscope photonique «Olympus » lié à une caméra, utilisé pour les observations des lames préparées.

Lors de cette étape, la structure de la poche de fertilisation est examinée pour chaque individu en observant les lames réalisées pour chacun, une par une et par ordre.

Chaque lame est observée sur toute sa surface section par section, toujours en suivant l'ordre des coupes.

La structure de la poche de fertilisation et celle de la spermathèque est examinée en détails pour chaque individu afin de détecter leur morphologie complète et les variations éventuelles entre les différentes populations et probablement entre les individus également.

Les tubules spermathécaux sont dénombrés, qui est en fait l'objectif principal de cette étude, en suivant leur mode de branchement. En effet, les sections sur lesquelles un tubule apparaît sont dénombrées en commençant par la section dans laquelle le tubule est clairement bifurqué (du tubule principal, d'un autre tubule latéral ou parfois même de la chambre de fertilisation) et en s'arrêtant quand le tubule n'apparaît plus et qu'un autre commence à apparaître (fig.3.46).

On note, pour tous les individus, que la chambre de fertilisation apparaît sur toutes les coupes, ce qui signifie que c'est la plus longue structure. Sa longueur représente donc la longueur totale de la poche de fertilisation.

Le schéma suivant illustre la méthode suivie pour le dénombrement des tubules spermathécaux.

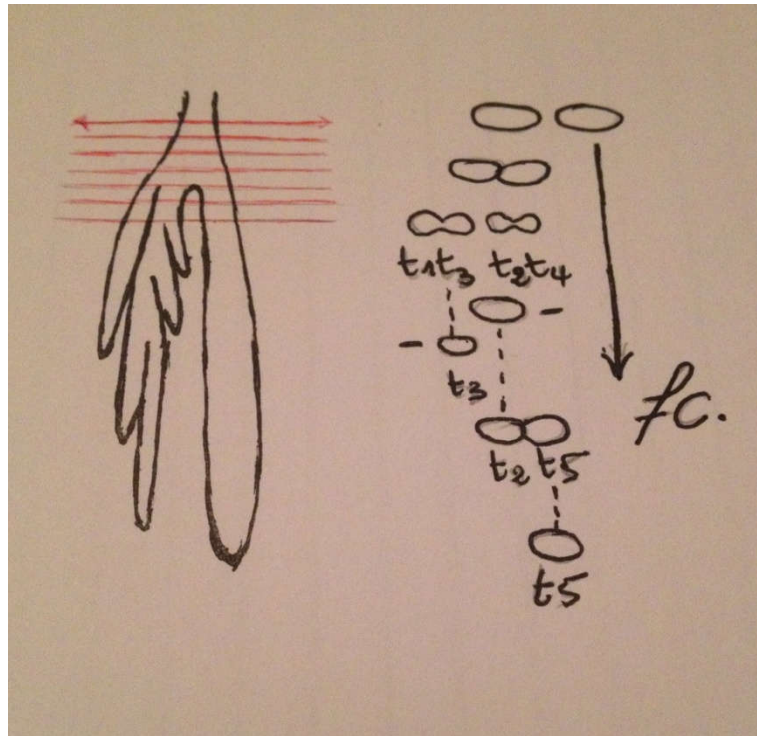


Fig.3.46. A gauche, est un dessin schématique de la poche de fertilisation et les traits rouges représentent l'orientation des coupes sériées réalisées. A droite, est un schéma explicatif de la méthode suivie pour le dénombrement des tubules de la spermathèque. A noter, fc = chambre de fertilisation; t1, t2, t3, t4, t5 = tubules spermathécaux.

La longueur de chaque structure de la poche de fertilisation et de chaque tubule spermathecal est ensuite calculée.

Ceci est effectué en multipliant le nombre de sections sur lesquelles est apparue la structure d'intérêt, par l'épaisseur des coupes qui est de $7\mu\text{m}$.

Finalement, une description détaillée de la spermathèque et de la poche de fertilisation est réalisée, en prenant en compte les différentes sous-unités, leur arrangement et spécialement le nombre des tubules spermathécaux ainsi que leurs longueurs.

VII. Investigation des dards et glandes multifides

Durant la parade nuptiale qui précède l'accouplement, le sac dard, dans lequel le dard est produit puis stocké, est vigoureusement éversé du pore génital provoquant ainsi l'expulsion du dard. Ce dernier est d'abord couvert de mucus provenant des glandes multifides, associées au sac à dard, qui est subséquentement introduit dans le sang du partenaire sexuel (Adamo & Chase 1990).

Les substances bioactives (=allohormones) contenues dans le mucus, provoquent un changement morphologique du système reproducteur femelle ayant pour conséquence l'augmentation de la quantité du sperme stockée (chez l'espèce *Cornu aspersum*, Koene & Chase 1998b).

Un conflit sexuel résulte donc entre le donneur et le receveur du sperme. En effet, la fonction mâle gagne probablement en paternité, emportant de ce fait la compétition spermatique, alors que la fonction femelle subit des dommages et des risques d'infections. De plus, le processus de stockage de sperme est amélioré ce qui interfère avec le choix cryptique de la femelle.

Un tel conflit sexuel chez les escargots terrestres hermaphrodites, semble mener à l'évolution de contre-adaptations pouvant engendrer un changement de la morphologie des organes femelles receveurs du spermatophore en parallèle avec l'évolution de dards et glandes plus élaborés (Koene & Schulenburg 2005).

Chez les escargots terrestres possédant un dard, se produit une large diversité de la forme et taille de ces dernier d'où leur utilisation dans la reconstitution de la phylogénie de ces espèces. De plus, hypothétiquement, une telle variation peut directement être liée aux mécanismes de la sélection et conflits sexuels.

Dans cette partie du travail, la structure du dard et des glandes multifides de l'espèce hermaphrodite simultanée *Helix aperta* est décrite en détail. Par la suite, les variations éventuelles de leur morphologie et taille sont explorées chez des escargots appartenant à plusieurs populations présentant des densités divergentes, qui traduisent probablement différentes intensités de compétition spermatique.

Ceci est réalisé en suivant une méthode de quantification des dards et glandes développée au laboratoire d'Ecologie Animale de l'université Vrije d'Amsterdam (Pays Bas)

VII.1. Dissection des poches à dards et glandes multifides

Vu que les dards ne sont produits qu'après le premier accouplement (Chung 1986), les escargots collectés sont supposés s'être accouplés au moins une fois, du moment qu'ils sont tous ramassés de la nature à l'état adulte.

Pour chaque escargot, le sac à dard ainsi que les glandes multifides sont disséqués depuis l'appareil reproducteur précédemment isolé en utilisant des ciseaux fins et tranchants.

VII.2. Estimation du taux de production de mucus (quantification des glandes multifides)

La quantité de mucus produite par les glandes est difficile à quantifier *in vivo*. Pour ce, vu que le mucus est produit par les glandes multifides, la longueur moyenne de chaque paire ainsi que le nombre de branches les constituant, sont utilisés comme estimation de la quantité de mucus produit.

Pour chaque glande, la longueur de la plus longues branche est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse et la moyenne est calculée par la suite.

Quant au nombre total des branches, il est compté pour les deux glandes sous une loupe binoculaire.

VII.3. Estimation de la quantité de mucus transférée par les dards (quantification des dards)

La quantité de mucus transférée lors de chaque accouplement ne peut aussi être quantifié ou du moins difficile à réaliser. Vu que la fonction du dard semble être le transfert de cette substance au partenaire sexuel, sa taille est supposée corrélérer positivement avec la quantité transférée.

La taille totale du dard est considérée comme la surface disponible pour transporter le mucus. Elle concerne; la longueur du dard, le périmètre de sa section transversale ainsi que la longueur de chacune des deux lames de cette dernière.

La longueur de chacune de ces entités est calculée pour chaque individu en passant par les étapes décrites ci-dessous.

VII.3.1. Extraction des dards depuis les sacs à dards

Les dards ont une nature calcaire les rendant très fragiles et difficiles à manipuler.

Pour les extraire intacts, les sacs à dards sont d'abord incubés pendant deux nuits (voir plus pour certains) dans une solution 2N NaOH (Reyes-Tur & Koene 2007). Cette solution dissout les tissus et le mucus mais garde le dard intact.

Une fois récupérés, les dards sont lavés à l'eau distillée et nettoyés de tout éventuels débris de tissus puis remis dans une solution fraîche 2N NaOH où ils sont incubés pendant une nuit.

VII.3.2. Mesure de la longueur des dards

Comme indiqué plus haut, la longueur du dard est utilisée comme l'un des indices de sa capacité de transport du mucus.

Le dard de chaque individu est d'abords photographié à l'aide d'une caméra connectée à un stéréo microscope puis sa longueur mesurée sous le logiciel de traitement d'images ImageJ (Abramoff *et al.* 2004).

La manipulation de ce logiciel est expliquée en détails ci-dessous.

VII.3.3. Réalisation de sections transversales des dards

Cette étape consiste à réaliser des coupes transversales des dards dans le but de détecter leur morphologie puis mesurer le périmètre considéré comme un autre indice de la capacité de transport de mucus.

VII.3.3.a. Préparation des blocs

Dans un premier temps, les dards sont émergés dans de la résine transparente dans le but de préparer des blocs facilitant la réalisation de coupes.

Des petits moules en plastique sont utilisés à cet effet (fig.3.47).



Fig.3.47. Photo d'un moule en plastique utilisé pour la préparation des blocs de résine

Ils sont d'abords remplis à environs 1/5 avec deux composantes d'époxy (®Epoxycoating, Polyestershoppen B.V) à raison de 60% d'Araldite D et 40% de durcisseur (harder H956) (fig.3.48) puis laisser durcir la résine à température ambiante (fig.3.49).

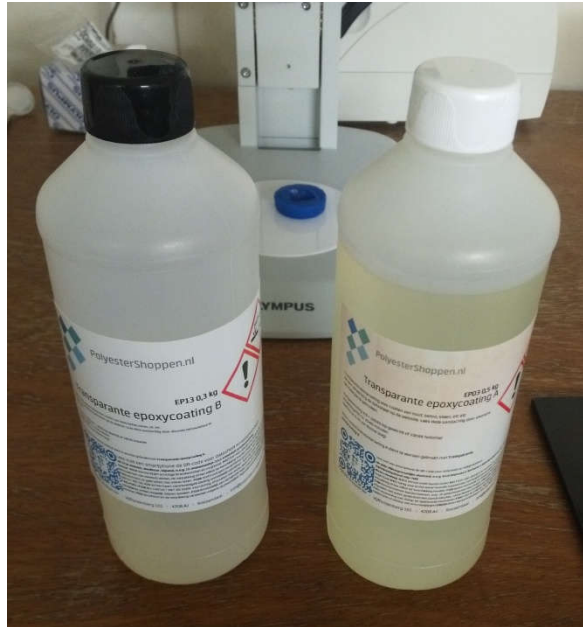


Fig.3.48. Photo de la résine utilisée pour la préparation des blocs

Cette première couche est réalisée afin de déposer les dards en dessus les empêchant ainsi d'adhérer directement aux fonds des moules (fig.3.49).



Fig.3.49. Photo d'un moule rempli à 1/5 de résine (flèche rouge) pour servir de support au dard

Chaque dard est ensuite transféré dans un moule, où il est collé horizontalement sur la surface de la résine en utilisant une goutte d'Araldite transparente rapide. Cette étape a pour but d'éviter que le dard ne soit déplacé en versant la deuxième couche de résine.

Une fois que le dard est bien adhérent sur la surface, une deuxième couche de résine est déversée délicatement pour éviter la formation de bulles et d'une manière à couvrir toute la surface du dard.

Une fois durci, un bloc de résine dur au milieu duquel le dard est horizontalement positionné est obtenu (fig.3.50).



Fig.3.50. Photo d'un dard émergé dans de la résine

VII.3.3.b. Réalisation des coupes

Les coupes sont effectuées à l'aide d'une scie circulaire électrique qui consiste en une lame d'une épaisseur de 0.5 mm activée par un moteur électrique (Fig.3.51).

Les blocs circulaires sont d'abord décollés des moules puis dégrossis tout près des dards y inclus (fig.3.52).



Fig.3.51. Photo d'une scie liée à un moteur électrique utilisée pour la réalisation des coupes du dard



Fig.3.52. Photo d'un bloc de résine, avec dard inclus, prêt à la coupe

Les coupes sont réalisées au niveau de la plus large partie des dards (à approximativement $1/3$ de sa longueur), où les lames de sa section transversale sont plus longues.

Au final, deux coupes sont obtenus pour chaque dard (fig.3.53).

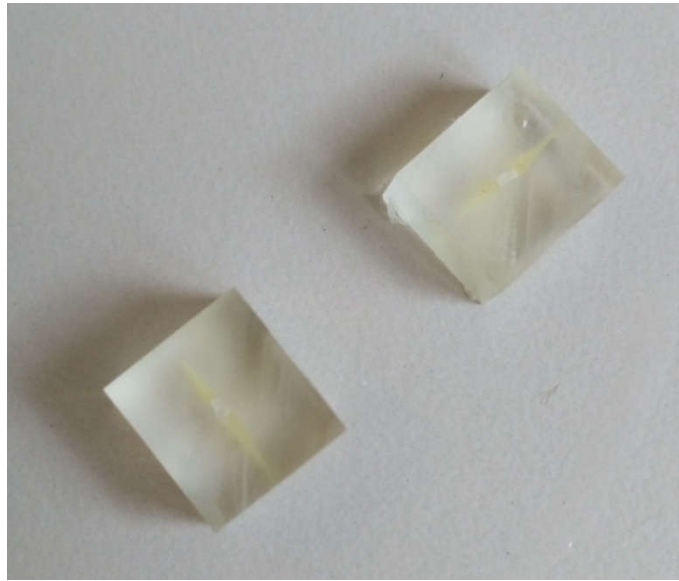


Fig.3.53. Photo des deux coupes obtenues pour chaque bloc

La surface de la coupe est ensuite polie afin de l'homogénéiser ce qui permettra d'obtenir des images plus nettes et claires lors des observations.

VII.3.3.c. Réalisation des mesures

Les coupes transversales sont photographiées à l'aide d'une caméra liée à un stéréo-microscope sous une lumière diffuse et un grossissement de X50.

Au cas où le périmètre n'est pas visible ou peu clair, son contour est d'abord mis en évidence à l'aide de l'outil de sélection rapide sous Photoshop tout en accentuant le contraste. En plus, l'arrière plan est assombri ce qui rend le contraste plus évident et le périmètre plus apparent (fig.3.54).

Le périmètre du dard (fig.3.55) ainsi que la longueur des lames (la plus petite = longueur 1, la plus longue = longueur 2; fig.3.55) de sa section transversale sont enfin mesurés sous le logiciel de traitement d'images ImageJ (Abramoff *et al.* 2004).

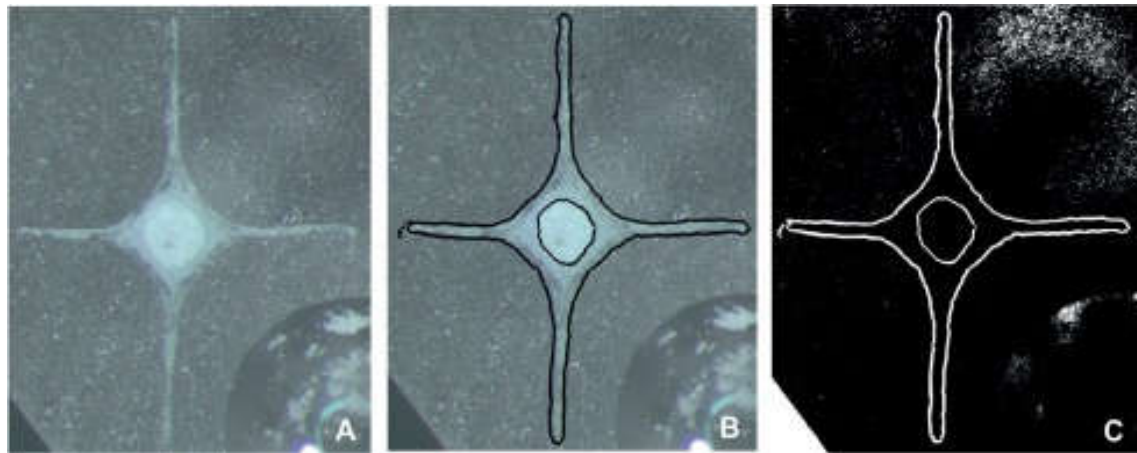


Fig.3.54. Photos de sections transversales du dard de l'espèce *Cornu aspersum* avant et après les retouches. (A) est la photo prise par la caméra liée au microscope, (B) montre l'accentuation du périmètre réalisée sous Photoshop, (C) montre le changement de l'arrière plan réalisé avec ImageJ pour obtenir un périmètre plus apparent (Lodi *et al.* 2017).

Mesure	Organe
Longueur moyenne des glandes multifides et Nombre total des branches	
Longueur du dard	
Périmètre du dard et longueur des lames	

Fig.3.55. Visualisation des mesures des dards et glandes multifides réalisées. Notez que sur la troisième ligne, les pointillées représente l'emplacement de coupe du dard pour l'obtention des sections transversales. Sur la dernière ligne, les pointillés indiquent le périmètre de la section transversale (Lodi *et al.* 2017).

VIII. Manipulation du logiciel de traitement d'images ImageJ

VIII.1. Calibrage du programme

Avant son utilisation, le programme doit d'abord être calibré.

Dans le cas où la caméra utilisée pour photographier les échantillons est montée sur un microscope (comme c'est le cas dans cette étude), il est important de considérer la calibration du grossissement utilisé plus tard.

Au moment de la prise des photos pour les échantillons, en prendre aussi quelques unes pour quelques graduations d'une règle (fig.3.56) avec le même grossissement, pour servir plus tard d'échelle.

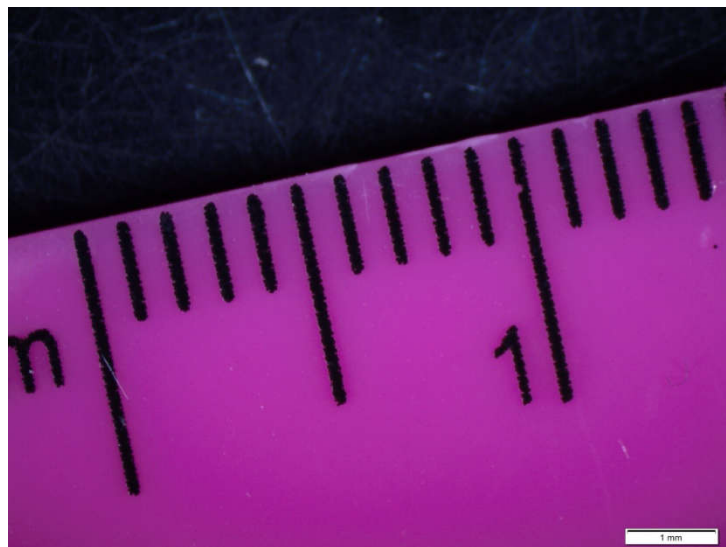


Fig.3.56. Graduations d'une règle photographiées avec une caméra liée à un stéréo-microscope sous le même grossissement utilisé pour les échantillons.

Il est préférable de prendre plusieurs photos de l'échantillon et l'échelle (5 au minimum) afin d'augmenter la précision par la suite.

Une fois que toutes les photos sont prises, démarrer le logiciel ImageJ et ouvrir les photos de l'échelle soit avec CTRL+O ou directement via l'onglet File/Open.

Le bouton indiqué avec la flèche (fig.3.57) est activé afin de mesurer l'échelle (pas nécessaire de mesurer toute la règle mais juste un ou quelques millimètres). Ceci est réalisé en maintenant le bouton gauche de la souris du début de l'échelle jusqu'à sa fin (fig.3.58). La mesure sera plus précise si la ligne est absolument droite d'où l'utilité de l'utilisation d'une règle à cet effet.

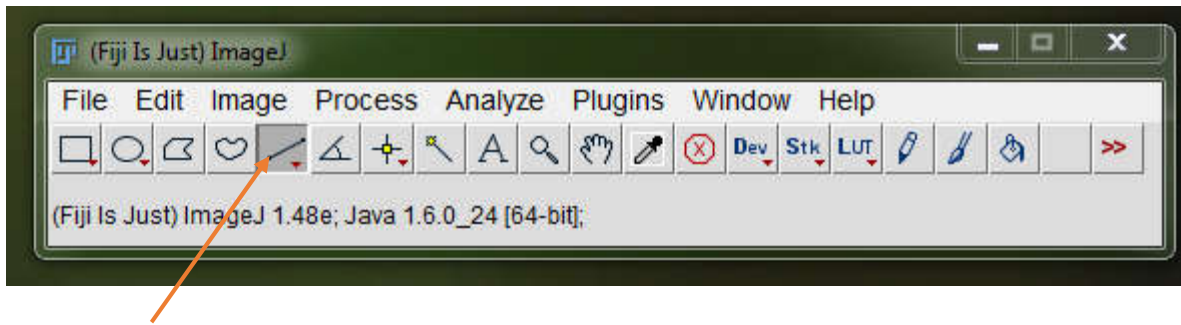


Fig.3.57. Capture d'écran du logiciel ImageJ montrant le bouton utilisé pour mesurer les différentes structures.

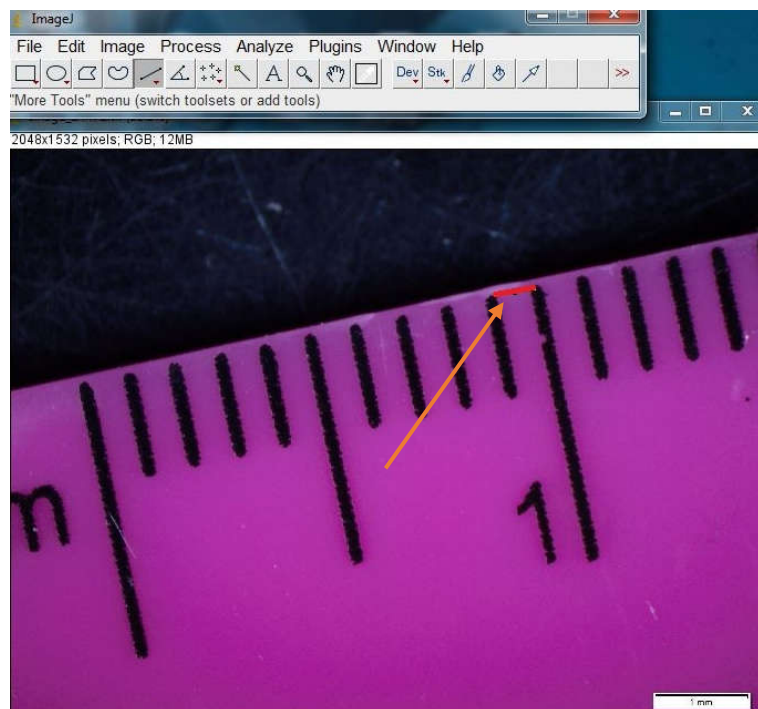


Fig.3.58. Capture d'écran du logiciel ImageJ montrant la mesure de l'échelle, utilisée pour la calibration du programme.

Par la suite, cliquer sur le bouton Analyze/Mesure et une fenêtre de résultats apparaît (fig.3.59).

Dans cette dernière sont affichées plusieurs données relatives à l'échelle mesurée.

La longueur (Length, voir flèche sur fig.3.59) réfère au nombre de pixels du début jusqu'à la fin de l'échelle.

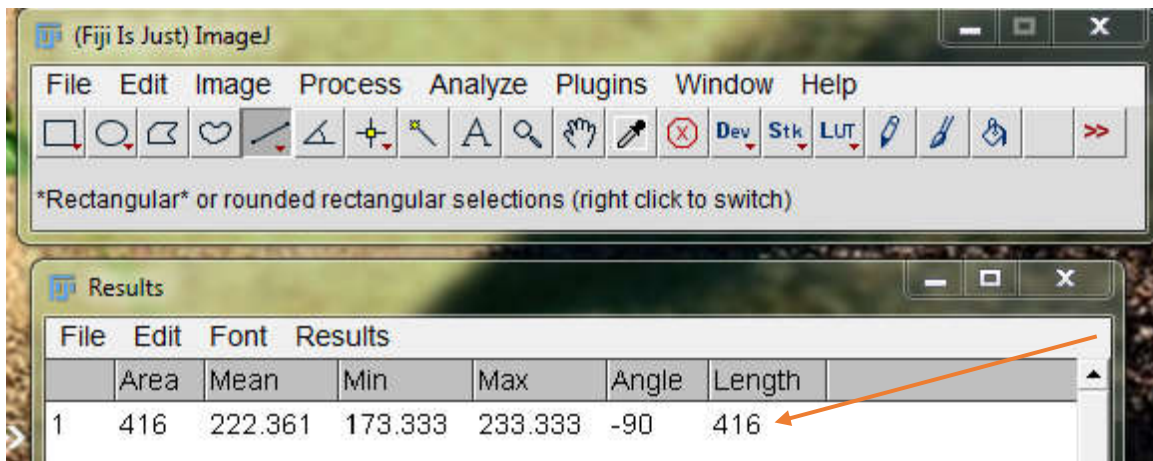


Fig.3.59. Capture d’écran du logiciel ImageJ montrant les données obtenues pour l’échelle mesurée

La même procédure est suivie pour toutes les autres photos prises pour l’échelle, puis les données obtenues sont enregistrées sous l’onglet Results/Options (fig.3.60).

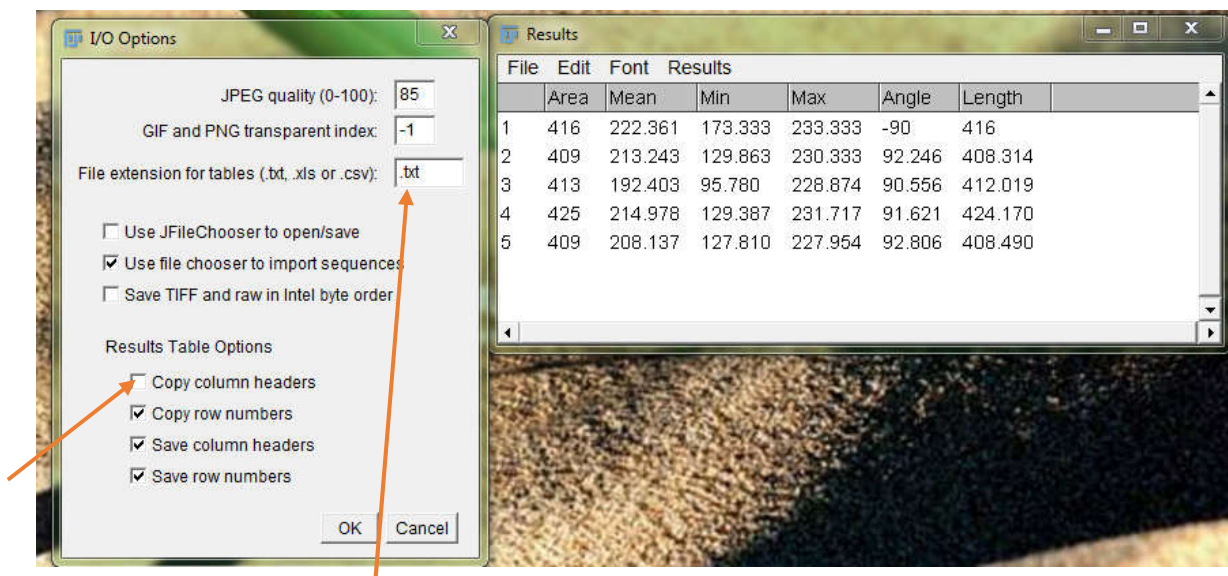


Fig.3.60. Capture d’écran du logiciel ImageJ montrant la méthode d’enregistrement de toutes les mesures obtenues pour l’échelle.

Il faut d’abords choisir le format idéal pour l’enregistrement à savoir le format .xls qui semble être le plus convenable (fig.3.60).

Il est aussi important de cocher « copy column headers » (fig.3.60).

Après avoir obtenu ce fichier, la valeur moyenne de la longueur est nécessaire dans le cas de l'utilisation de plus d'une photo de l'échelle (qui est préférable). Cette valeur moyenne en

pixels indique simplement la longueur de l'échelle dans l'environnement virtuel. Il est cependant important de noter que cette valeur est uniquement appropriée pour le même grossissement utilisé lors de la prise des photos. Si ce dernier est modifié, un nouveau calibrage sera donc nécessaire.

VIII.2. Réglage des paramètres du programme

Une fois en disposition de toutes les images à analyser, l'échelle interne du programme ImageJ doit être d'abords définie.

Pour ce faire, ouvrir une image dans le programme sur File/Open puis cliquer sur Analyse/Set scale (voir les captures d'écran précédentes).

La fenêtre suivante (fig.3.61) s'affiche, sur laquelle est introduite la valeur moyenne en pixels précédemment obtenue pour l'échelle.

La longueur réelle de l'échelle en millimètre est également introduite dans la case Known distance cell (fig.3.61). Finalement la vérification Global (fig.3.61) est cochée pour permettre à l'analyse de fonctionner.

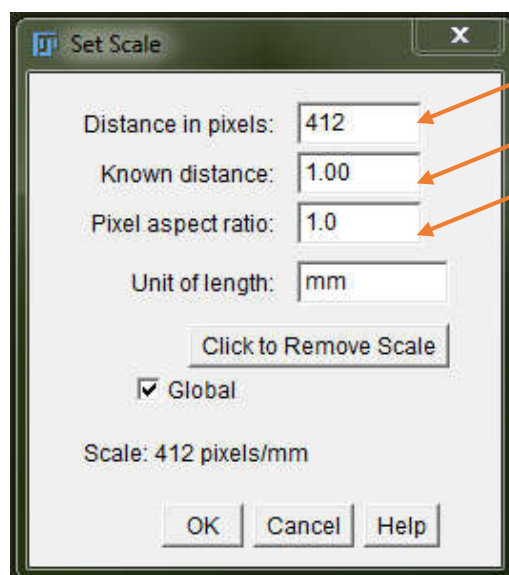


Fig.3.61. Capture d'écran d'une fenêtre du logiciel ImageJ montrant l'introduction des données relatives à l'échelle pour la calibration du programme.

Après ces étapes, le programme est prêt pour effectuer les analyses. Cependant, il est important de redéfinir l'échelle à chaque redémarrage du programme.

VIII.3. Réalisation des mesures des échantillons

Après le calibrage, l'image à analyser est d'abord ouverte et visualisée sur le programme. Sélectionner ensuite Segmented line, qui sera utilisé pour la mesure des structures (fig.3.62).

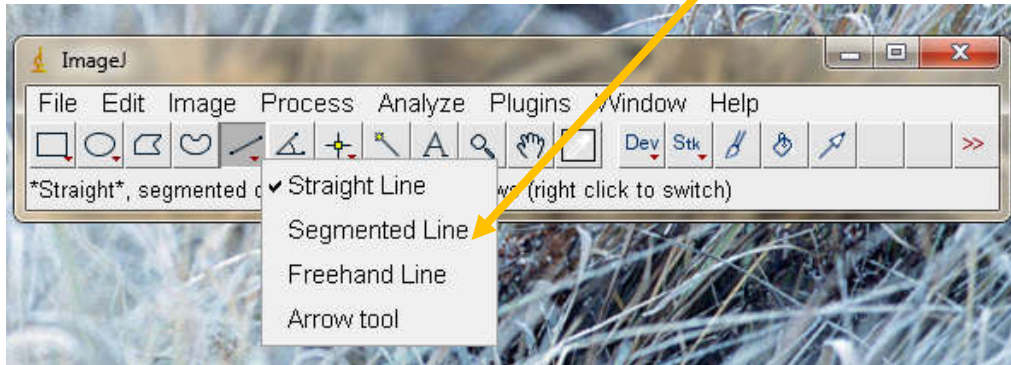


Fig.3.62. Capture d'écran du logiciel ImageJ montrant l'option utilisée pour la mesure des structures.

La ligne segmentée sélectionnée est ensuite positionnée sur toute la longueur à mesurer (fig.3.63).

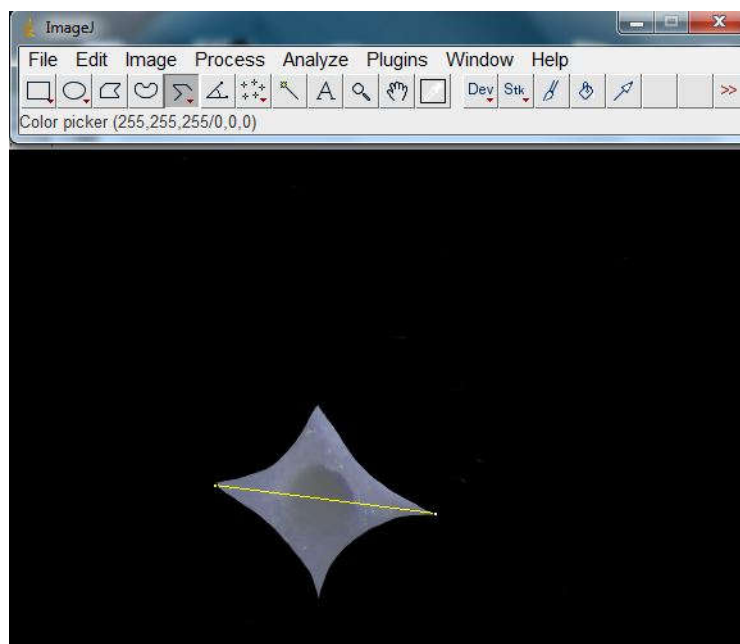


Fig.3.63. Capture d'écran du logiciel ImageJ montrant la méthode de mesure des structures

En cliquant ensuite sur l'onglet Analyse/Mesure (voir les captures d'écran précédentes), la longueur de la structure mesurée est automatiquement affichée.

IX. Analyses statistiques des résultats

La version 5.0.1 du logiciel J.M.P ainsi que le programme Xlstat 2009 sont utilisés pour la réalisation des tests statistiques.

Toutes les données obtenues sont d'abords soumises au test Shapiro-Wilk de normalité afin de déterminer les tests statistiques à appliquer à savoir; des tests paramétriques ou non-paramétriques.

IX.1. Tailles des coquilles

Afin de détecter de potentielles variations de la taille de la coquille (diamètre et hauteur) entre les quatre populations étudiées, une analyse de la variance ANOVA à un facteur a été appliquée; aux cas où les distributions suivent une loi normale et un test Kruskal-Wallis quand celles-ci ne suivent pas une loi normale.

L'éventuelle relation entre le diamètre et la hauteur de la coquille est testée en appliquant le test de corrélation Pearson, pour les variables à distributions normales, et Spearman quand les variables ne répondent pas aux lois normales.

Au cas où la corrélation entre les deux est significativement positive, le diamètre seul peut représenter la taille de la coquille dans le reste des analyses vu que celui-ci est le plus largement considéré chez les pulmonés (voir Baminger & Haase 2000).

L'effet de la densité sur la taille de la coquille a été investigué en l'application des tests de corrélations Pearson ou Spearman.

IX.2. Poches de fertilisation, spermathèques et organes reproducteurs mâles et femelles

Les tests ANOVA à un facteur ou Kruskal-Wallis sont aussi appliqués pour comparer les différentes populations en termes de la longueur des différentes structures de la poche de fertilisation à savoir; la chambre de fertilisation, le tubule principal, les tubules latéraux ainsi que le nombre des tubules spermathécaux.

Les mêmes tests sont aussi utilisés pour tester la variation de la longueur des organes reproducteurs considérés dans cette étude à savoir; les organes mâles: L'épiphallus, le

flagellum, le sac à dard et les glandes multifides; et les organes femelles: Le diverticulum et le canal de la bourse copulatrice.

Des tests de corrélation, Pearson ou Spearman, sont appliqués pour détecter d'éventuelles relations entre les différentes structures de la poche de fertilisation elles mêmes, entre les différents organes reproducteurs mâles et femelles, et entre les structures de la poche de fertilisation et les organes reproducteurs mâles et femelles considérés.

Les tests de corrélation, Pearson ou Spearman, sont également utilisés pour détecter l'effet potentiel de la taille de la coquille et/ou la densité sur la longueur des organes reproducteurs mâles et femelles considérés dans l'étude.

Finalement, afin d'étudier l'effet de la densité, de la taille de la coquille et l'interaction des deux sur les différentes structures de la poche de fertilisation; deux modèles statistiques sont utilisés: un modèle de régression linéaire simple, pour les variables qui suivent une distribution normale, et un modèle linéaire généralisé, pour les variables qui ne suivent pas une distribution normale.

Pour les deux modèles, la densité locale et le diamètre de la coquille sont considérés comme facteurs fixes ou variables explicatives, alors que les structures de la poche de fertilisation ainsi que les organes reproducteurs comme variables dépendantes ou de réponse.

IX.3. Dards et glandes multifides

La variation, entre les quatre populations, des différents traits concernant les dards et les glandes multifides est exploré à travers les tests d'ANOVA à un facteur ou Kruskal-Wallis.

Ces traits concernent: La longueur des dards, le périmètre des sections transversales réalisées, les longueurs des deux lames constituant ces sections, la longueur des glandes multifides ainsi que le nombre de leurs branches.

L'effet potentiel de la taille de la coquille (diamètre) et de la densité locale sur les traits des dards et glandes multifides est testé en appliquant les tests de corrélations Pearson ou Spearman.

Les mêmes tests sont également appliqués pour détecter d'éventuelles relations entre les différents traits des dards et ceux des glandes multifides.

Chapitre IV : Résultats

I. Densités des populations

Les quatre populations d'escargots étudiées diffèrent clairement en termes de densité qui est exprimée dans cette étude en nombre d'individus adultes par mètre carré (Tableau 4.1).

Tableau 4.1. Densités enregistrées chez les quatre populations d'escargots étudiées.

Populations	Densités (individus adultes/m ²)
Baccaro	22.4
Tala Hamza	18
Place du Stade	3.6
Sidi Ahmed	7.2

La population présentant la densité la plus élevée étant celle provenant de Baccaro (monoculture située près de la mer), alors que la plus faible densité est enregistrée chez la population provenant de la Place de stade (jardin abandonné situé dans un milieu urbain).

II. Taille des escargots

II.1. Variation de la taille de la coquille

Les analyses de variance ont révélé des différences significatives de la hauteur ($F = 9.581$, $P = 0.0001$, ddl. = 3, 48) et diamètre ($F = 5.715$, $P = 0.002$, ddl. = 3, 48) de la coquille entre les quatre populations d'escargots étudiées (Tableau 4.2).

Tableau 4.2. Hauteur et diamètre des coquilles de quatre populations d'escargots *Helix aperta* (valeurs moyennes en mm \pm écart type). Les valeurs F et P proviennent des tests de comparaisons ANOVA à un facteur ou Kruskal-Wallis. N désigne le nombre d'individus (taille de chaque population). Populations: Ba, Baccaro; SA, Sidi Ahmed; St, place de Stade; TH, Tala Hamza.

	Population				F	P
	Ba	SA	St	TH		
N	11	15	08	18		
Taille coquille (mm)						
Hauteur	22.65 \pm 0.57	26.93 \pm 0.63	25.02 \pm 0.5	23.90 \pm 0.53	9.58	<0.0001
Diamètre	18.75 \pm 0.54	21.87 \pm 0.62	21.12 \pm 0.42	20.25 \pm 0.44	5.71	0.002

Les escargots présentant une taille de coquille plus importante appartiennent à la population provenant de Sidi Ahmed (prairie exposée située pas loin d'un milieu urbain) avec une moyenne de 26.92 mm pour la hauteur et 21.87 mm pour le diamètre (Tableau 4.2).

A l'opposé, la population provenant de la Place du Stade comprend des escargots ayant la plus faible taille de coquille en comparaison aux trois autres populations (Tableau 4.2).

D'un autre côté, la hauteur moyenne de la coquille pour les quatre populations est positivement corrélée avec le diamètre moyen (corrélation de Pearson, $r = 0.653$, $N = 52$, $P < 0.0001$). Donc, il suffit dans le reste de l'étude de considérer uniquement le diamètre comme la mesure représentante de la taille de la coquille vu que qu'il soit le trait le plus largement utilisé chez les pulmonés (voir Baminger & Haase 2000).

II.2. Relation densité-taille de la coquille

En testant les quatre populations simultanément, on détecte une corrélation significative négative entre la taille de la coquille (diamètre) et la densité locale des escargots adultes des populations étudiées (corrélation Spearman: $r = -0.467$, $N = 52$, $P = 0.001$).

Une diminution de la taille de la coquille avec l'augmentation de la densité a été rapporté chez plusieurs espèces d'escargots (Baur 1988a, b, Williamson *et al.* 1976, Oosterhoff 1977).

Dans la présente étude et en analysant les populations séparément, cette tendance est détectée spécialement entre les trois populations qui proviennent de la Place du stade, Tala Hamza et Baccaro. En effet, en considérant ces trois populations, une relation inverse est détectée entre la taille de la coquille et la densité des escargots.

Néanmoins, les escargots ayant une taille de coquille plus importante appartiennent à la population provenant de Tala Hamza, tel est indiqué plus haut, bien qu'elle ne soit pas celle qui présente la densité la plus élevée.

III. Organes reproducteurs mâle et femelle

III.1. Variation de la longueur des organes reproducteurs

Les organes de reproduction mâles et femelles considérés dans cette étude, sont théoriquement supposés être impliqués dans les mécanismes de la sélection et conflit sexuels (voir la section matériel et méthodes). Ils sont également supposés pouvoir influencer le processus de stockage du sperme ; conduisant ainsi à l'évolution de contre-adaptations par la fonction femelle. Subséquemment, le développement d'organes de stockage de sperme plus performants et sophistiqués davantage est probablement attendu.

Dans la présente étude, aucune différence significative n'est détectée entre les quatre populations étudiées concernant la longueur de ces organes (Tableau 4.3), à savoir les organes Mâles (épiphallus, flagellum, sac à dard et glandes multifides) et femelles (diverticulum et canal de la bourse copulatrice).

Tableau 4.3. Comparaison des longueurs des organes reproducteurs entre les quatre populations *Helix aperta* en appliquant les tests ANOVA à un facteur ou Kruskal-Wallis. Les moyennes en mm \pm écart type sont indiquées. N réfère au nombre d'individus dans les populations (taille des échantillons). Les populations: Ba, Baccaro; SA, Sidi Ahmed; St, Stade; TH, Tala Hamza.

	Population				F	P
	Ba	SA	St	TH		
N	11	15	08	18		
Organes reproducteurs (mm)						
Diverticulum	34.36 \pm 2.91	44.00 \pm 3.11	38.14 \pm 4.63	37.11 \pm 2.67	1.70	0.19
Canal bourse copulatrice	15.50 \pm 0.89	16.85 \pm 0.95	16.46 \pm 1.88	15.18 \pm 0.72	0.68	0.57
Sac à dard	8.93 \pm 0.24	9.78 \pm 0.41	9.27 \pm 0.65	9.62 \pm 0.29	0.93	0.43
Epiphallus	11.51 \pm 0.98	12.32 \pm 0.80	11.73 \pm 1.44	13.80 \pm 0.59	1.60	0.20
Flagelle	18.24 \pm 1.29	21.35 \pm 0.91	17.95 \pm 1.16	19.82 \pm 0.76	2.33	0.09
Glandes multifides	6.49 \pm 0.53	6.27 \pm 0.53	5.68 \pm 0.97	6.57 \pm 0.32	0.44	0.73

III.2. Relation entre les organes de reproduction mâles et femelles

Des corrélations positives significatives sont détectées entre la pluparts des organes de reproduction considérés dans cette étude (Tableau 4.4).

Remarquablement, la longueur du sac à dard est positivement corrélée avec la longueur de tous les autres organes à savoir ; le diverticulum, le canal de la bourse copulatrice, l'épiphallus, le flagellum ainsi que les glandes multifides (Tableau 4.4).

Tableau 4.4. Coefficients de corrélation et valeurs P des différents organes reproducteurs considérés. Les valeurs en gras désignent les corrélations significatives. Abréviations: canal copul., canal de la bourse copulatrice; glandes m., glandes multifides.

		Diverticulum	Canal copul.	Sac à dard	Epiphallus	Flagelle	Glandes m.
Diverticulum	r	1	0,637	0,633	0,182	0,264	0,390
	P	0	< 0,0001	< 0,0001	0.196	0.059	0.004
Canal copul.	r	0,637	1	0,483	0,212	0,200	0,302
	P	< 0,0001	0	0.000	0.132	0.155	0.029
Sac à dard	r	0,633	0,483	1	0,298	0,302	0,582
	P	< 0,0001	0.000	0	0.032	0.030	< 0,0001
Epiphallus	r	0,182	0,212	0,298	1	0,518	0,287
	P	0.196	0.132	0.032	0	< 0,0001	0.039
Flagelle	r	0,264	0,200	0,302	0,518	1	0,199
	P	0.059	0.155	0.030	< 0,0001	0	0.157
Glandes m.	r	0,390	0,302	0,582	0,287	0,199	1
	P	0.004	0.029	< 0,0001	0.039	0.157	0

III.3. Effet de la taille de la coquille sur la longueur des organes reproducteurs

La taille de la coquille n'a eu aucun effet sur la longueur d'aucun des organes reproducteurs considérés dans cette étude.

En effet, aucune corrélation significative n'a été détectée entre le diamètre de la coquille, qui représente sa taille, et la longueur d'aucun des organes de reproduction mâles et femelles (Tableau 4.5).

Tableau 4.5. Coefficients de corrélation et valeurs P de la taille de la coquille et les longueurs des organes reproducteurs. Abréviations: Canal copul., canal de la bourse copulatrice; Glandes m., glandes multifides.

		Diverticulum	Canal copul.	Sac à dard	Epiphallus	Flagelle	Glandes m.
Diamètre de la coquille	r	0,116	0,147	0,165	0,075	0,149	-0,111
	P	0.414	0.298	0.244	0.596	0.293	0.432

III.4. Effet de la densité sur la longueur des organes reproducteurs

Aucune corrélation significative n'a été détectée entre la densité locale et la longueur d'aucun des organes reproducteurs mâles et femelles considérés dans cette étude (Tableau 4.6).

Tableau 4.6. Coefficients de corrélation et valeurs P de la densité locale et les longueurs des organes reproducteurs. Abréviations: Canal copul., canal de la bourse copulatrice; Glandes m., glandes multifides.

		Diverticulum	Canal copul.	Sac à dard	Epiphallus	Flagelle	Glandes m.
Densité locale	r	-0,235	-0,176	-0,107	0,074	-0,111	0,135
	P	0.093	0.211	0.452	0.602	0.434	0.340

IV. Investigation des poches de fertilisation et spermathèques

IV.1. Morphologie de la poche de fertilisation et de la spermathèque

Les observations histologiques entreprises dans cette étude révèlent que la poche de fertilisation, encore appelée poche de fertilisation-complexe de la spermathèque, de l'espèce *Helix aperta* est un organe complexe situé dans la partie distale de l'appareil reproducteur et est totalement enfoncé (intégré) dans la glande à albumen, au même titre que chez d'autres gastéropodes (fig.4.1).

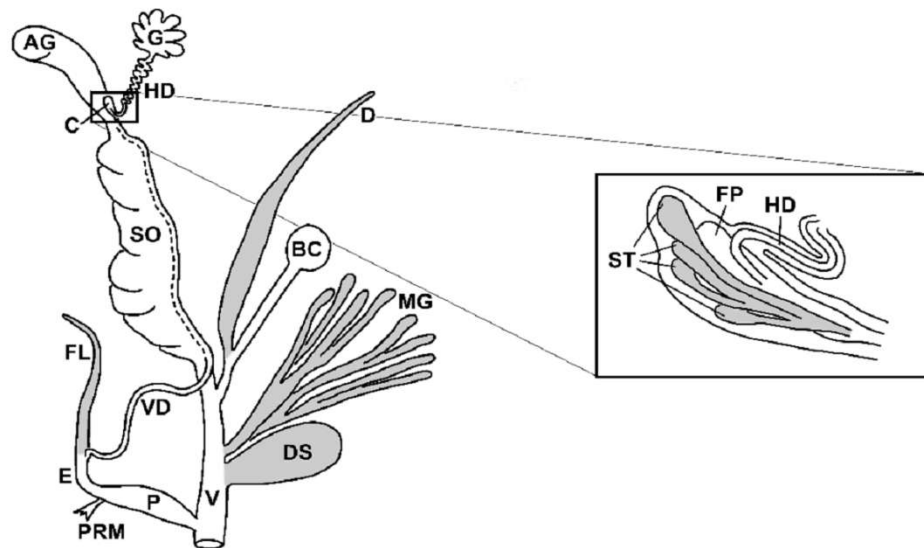


Fig.4.1. Représentation schématique de l'appareil reproducteur d'un gastéropode stylomatophore. Le schéma indique l'emplacement exact de la poche de fertilisation-complexe de la spermathèque ainsi que les différentes structures les constituant à savoir; HD=canal hermaphrodite, FP=chambre de fertilisation, ST=tubules de la spermathèque (Beese *et al.* 2008).

La poche de fertilisation consiste en une "chambre de fertilisation" dans laquelle s'ouvrent la spermathèque et le canal hermaphrodite (fig.4.2).

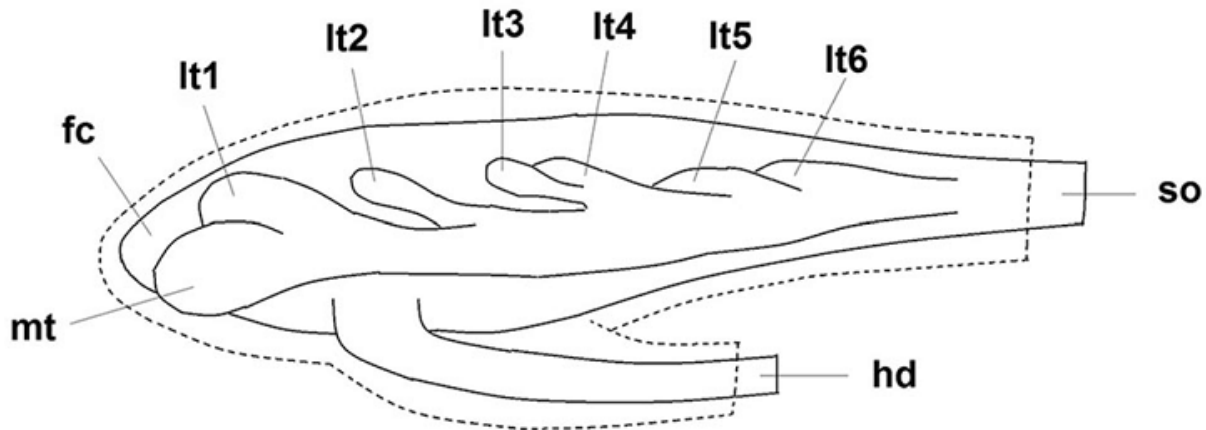


Fig.4.2. Dessin schématisique représentant la reconstitution de la poche de fertilisation d'*Helix aperta*: fc, chambre de fertilisation; hd, canal hermaphrodite; so, spermoïdite; mt, tubule principal; lt, tubules latéraux (numérotés de 1-6). On note que la chambre de fertilisation est clairement la plus longue structure de toute la poche de fertilisation.

La chambre de fertilisation est la plus longue structure de la poche de fertilisation chez tous les individus des quatre populations analysées (Fig.4.2) et apparaît plus ou moins en forme de C dans les sections transversales (fig.4.3).

Selon Haase & Baur (1995) il s'agit du site au sein duquel les ovules sont fécondés avec le sperme stocké dans la spermathèque.

Cette dernière, quant à elle, se compose d'un nombre variable de tubules ayant tous une entrée commune (fig.4.3).

Le plus long tubule est considéré comme "tubule principal" conformément aux descriptions antérieures de Baminger & Haase (1999) pour *Arianta arbustorum* et Koemtzopoulos & Staikou (2007) pour *Cornu aspersum*. Celui-ci est se ramifie toujours de la chambre de fertilisation chez tous les individus des quatre populations analysées.

Tous les autres tubules sont considérés comme "tubules latéraux" (voir aussi Baminger & Haase 1999, Koentzopoulos & Staikou 2007). Ils se ramifient soit du tubule principal; ou parfois quand un tubule latéral apparaît, un autre se ramifie directement de ce dernier.

Cependant, dans environ 14% des spermathèques analysées, quelques tubules latéraux se détachent directement de la chambre de fertilisation au même point de ramification du tubule principal.

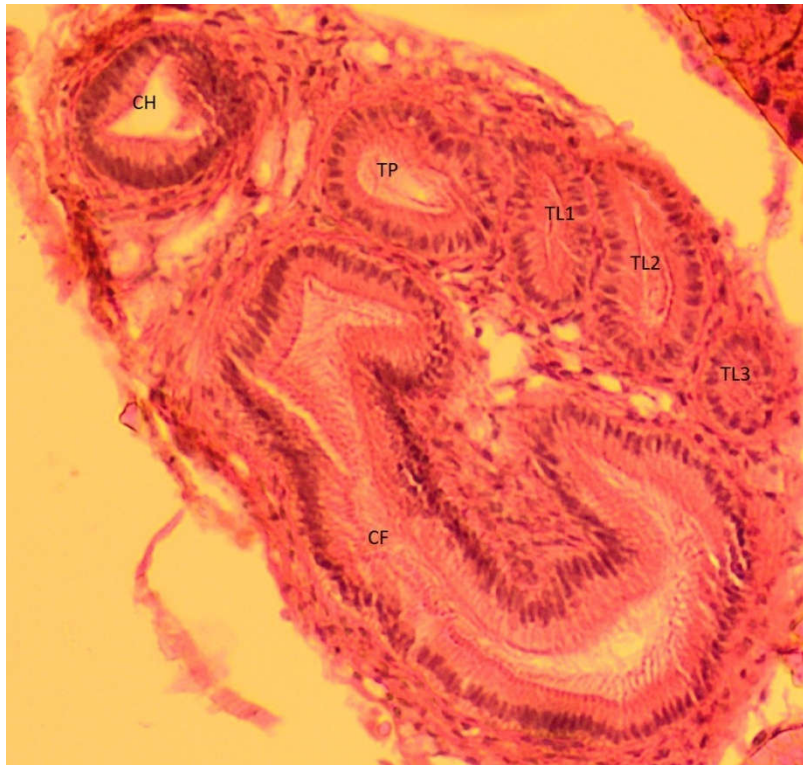

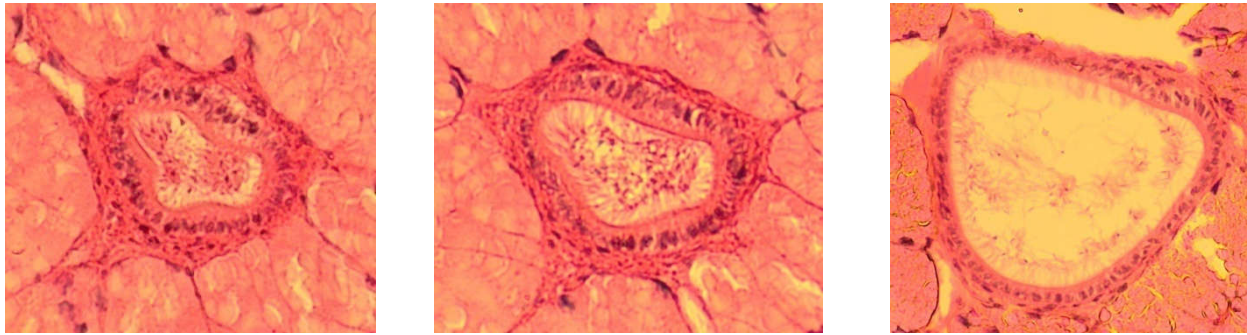


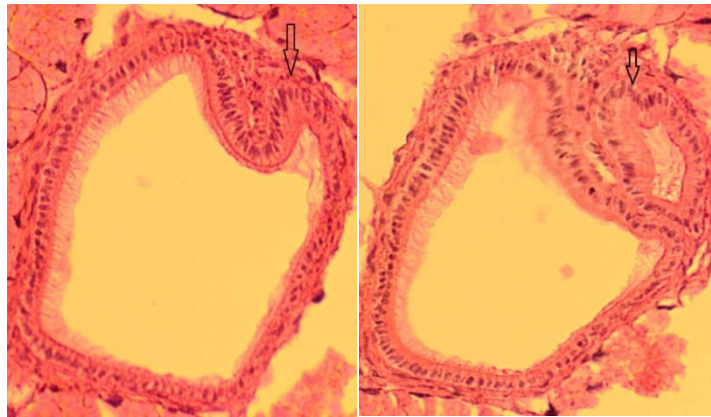
Fig.4.3. Photo d'une coupe transversale de la poche de fertilisation d'*Helix aperta*. La chambre de fertilisation (CF) apparaît en forme d'un C. Echelle: 100 µm 

La longueur des tubules latéraux varie considérablement entre les différents individus des quatre populations de même que leur nombre. En effet, un nombre allant de 3 à 9 tubules sont trouvés dans les différentes populations. On note que les tubules latéraux de la spermathèque n'apparaissent pas tous au même temps et sur la même section histologique, ce qui explique d'ailleurs le choix d'utilisation des coupes histologiques en série pour l'investigation de la spermathèque et non pas la technique d'histologie standard.

Les images suivantes représentent quelques sections transversales d'une poche de fertilisation, illustrant le mode de branchement et d'apparition des tubules spermathécaux. Elles montrent également un aperçu sur la méthode utilisée pour le dénombrement de ces tubules lors des observations microscopiques (expliquée dans la partie matériel et méthodes) (Fig.4.4).

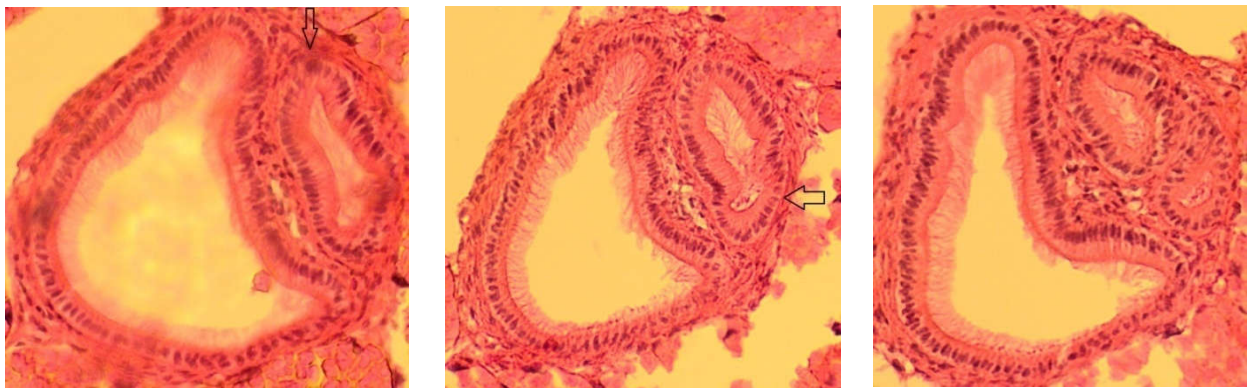


-A-



-B-

-C-



-D-

-E-

-F-

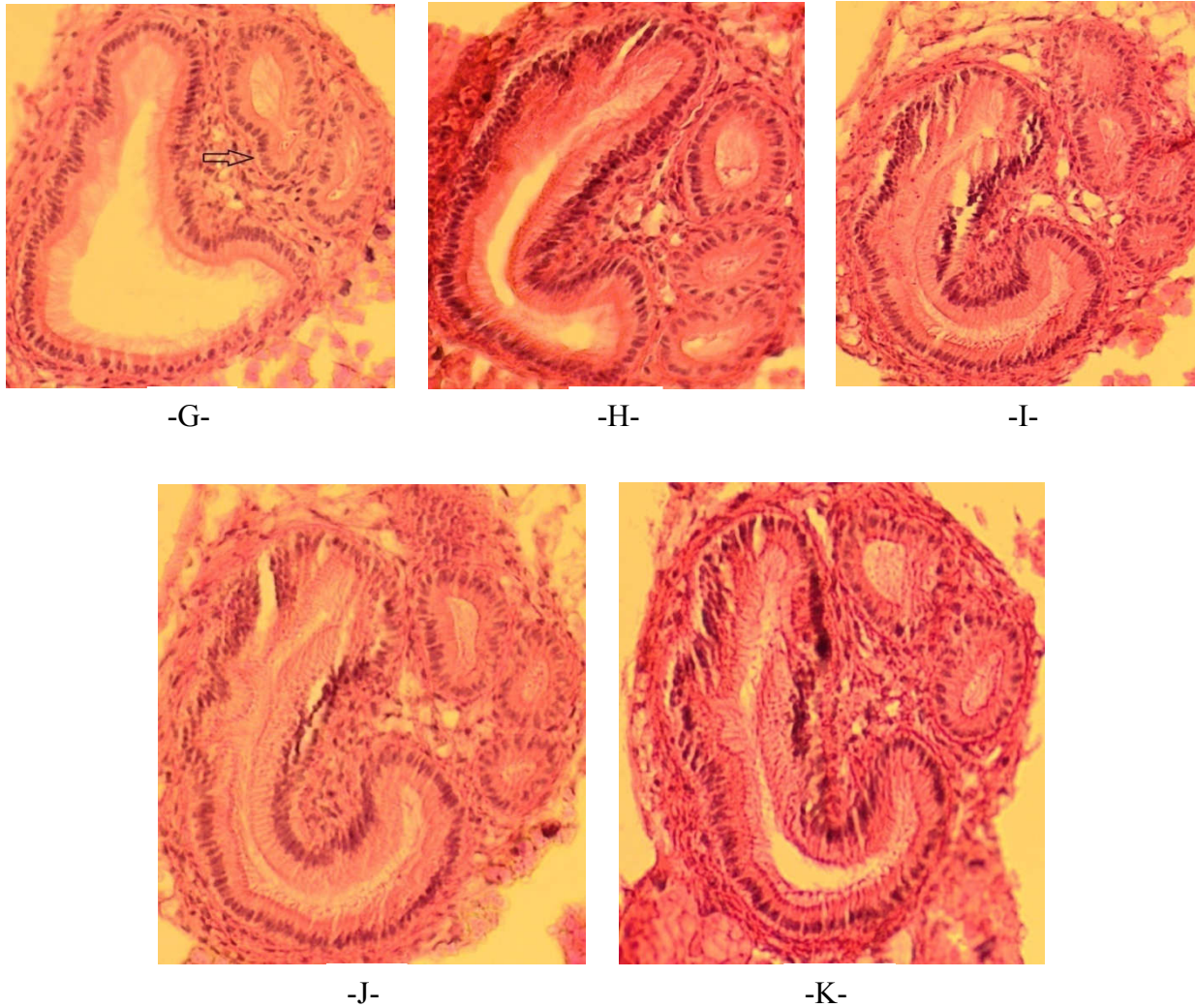



Fig.4.4. Photos de quelques coupes transversales d'une poche de fertilisation d'*Helix aperta* montrant l'apparition de ses différentes structures. (A), début d'apparition de la chambre de fertilisation; (B), début de bifurcation du tubule principal indiqué par une flèche; (C), bifurcation du tubule principal à partir de la chambre de fertilisation; (D), apparition nette du tubule principal de la spermathèque; (E), début de bifurcation d'un premier tubule latéral de la spermathèque (indiqué par une flèche) directement à partir du tubule principal; (F), apparition nette du tubule latéral à coté du tubule principal; (G), début de bifurcation d'un deuxième tubule latéral à partir du tubule principal; (H), apparition nette du deuxième tubule latéral à coté du tubule principal et premier tubule latéral; (I), apparition d'un troisième tubule latéral; (J), disparition du premier tubule latéral; (K), disparition du deuxième tubule latéral. Echelle: 100 μm 

IV.2. Variation des structures de la poche de fertilisation

IV.2.1. Nombre de tubules spermathécaux

Comme prévu, le nombre des tubules spermathécaux est divergent entre les différentes populations étudiées et même au sein des individus appartenant à une même population (fig.4.5). Le nombre varie de 3 à 9 tubules avec une moyenne de 6 tubules approximativement. Cependant, contrairement à l'hypothèse émise, la variation du nombre des tubules spermathécaux n'est pas significative lors de l'application du test non paramétrique de comparaison Kruskal-Wallis ($H=7.815$, $P=0.668$ voir Tableau 4.7).

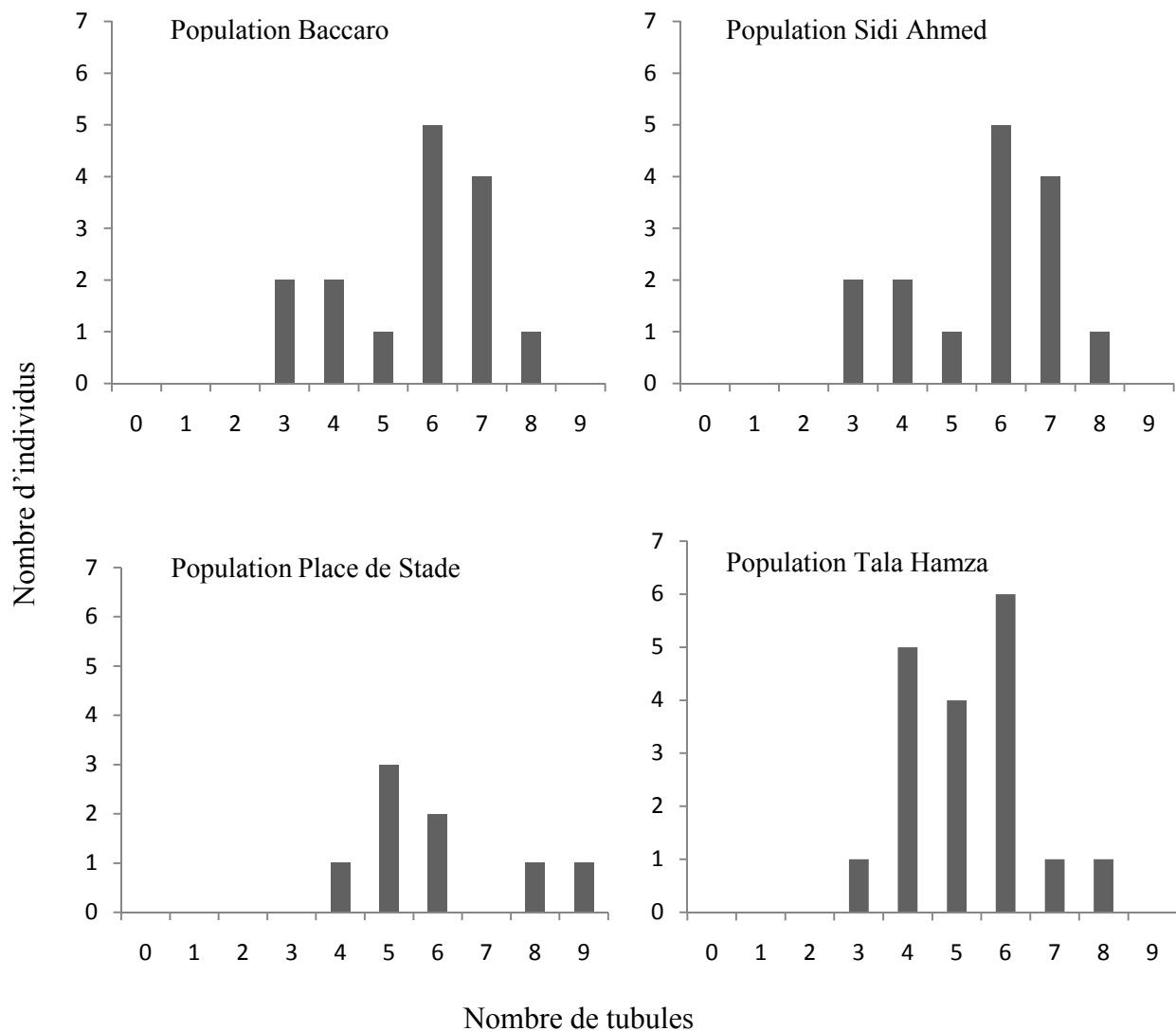


Fig.4.5. Distribution des fréquences du nombre de tubules spermathécaux (principal et latéraux) dans les quatre populations d'escargots *Helix aperta* analysées.

IV.2.2. Longueur des structures de la poche de fertilisation (chambre de fertilisation, tubule principal et tubules latéraux)

Dans cette étude, la longueur de la chambre de fertilisation (Kruskal-Wallis, $H=8.25$, $N=52$, $P=0.041$), la longueur du tubule principal (ANOVA, $F=4.73$, $P=0.006$, d.d.l.=3, 48), ainsi que la longueur moyenne des tubules latéraux (Kruskal-Wallis, $H=38.63$, $N=52$, $P<0.0001$), varient significativement entre les quatre populations investiguées (voir Tableau 4.7 et Fig.4.6).

Hypothétiquement, cette variation peut être due soit à l'effet de la densité ou à la taille de la coquille qui, tous les deux, diffèrent entre les quatre populations étudiées (voir plus haut).

Tableau 4.7. Nombre de tubules spermathécaux, leur longueurs (principal et latéraux) et longueur de la chambre de fertilisation chez quatre populations *Helix aperta*. Les populations sont comparées en appliquant les tests ANOVA à un facteur ou Kruskal-Wallis. Abréviations des noms des populations: Ba, Baccaro; SA, Sidi Ahmed; St, place de Stade; TH, Tala Hamza.

	Population				P	
	Ba	SA	St	TH		
Nombre de tubules	6 (3-9)	6 (3-8)	5.5 (4-9)	5 (3-8)	$H=1.56$	0.668
Longueur chambre de fertilisation	2.22 ± 0.11	1.92 ± 0.05	1.86 ± 0.11	2.19 ± 0.10	$H=8.25$	0.041
Longueur tubule principal	1.80 ± 0.14	1.53 ± 0.09	1.48 ± 0.09	1.95 ± 0.09	$F=4.73$	0.006
Longueur moyenne tubules latéraux	0.73 ± 0.16	0.57 ± 0.05	0.46 ± 0.14	1.02 ± 0.19	$H=8.63$	<0.0001

IV.3. Relation entre les différentes structures de la poche de fertilisation

Des corrélations significatives positives ou négatives sont détectées entre la pluparts des structures de la poche de fertilisation (Tableau 4.8).

Cependant, les seules corrélations non significatives trouvées sont celles entre le nombre de tubules spermathécaux et la longueur de la chambre de fertilisation (Spearman: $r = 0.070$, $N = 52$, $P = 0.621$) et la longueur du tubule principal (Spearman: $r = 0.033$, $N = 52$, $P = 0.817$).

Tableau 4.8. Coefficients de corrélation et valeurs P des différentes structures de la poche de fertilisation. Les valeurs en gras indiquent des corrélations significatives. Abréviations: CF, longueur de la chambre de fertilisation; TP, longueur du tubule principal; LMTL, longueur moyenne des tubules latéraux; NT, nombre des tubules spermathécaux.

		CF (mm)	TP (mm)	LMTL (mm)	NT
CF (mm)	r	1	0.884	0.287	0.070
	P	0	<0.0001	0.040	0.621
TP (mm)	r	0.884	1	0.413	0.033
	P	<0.0001	0	0.003	0.817
LMTL (mm)	r	0.287	0.413	1	-0.407
	P	0.040	0.003	0	0.003
NT	R	0.070	0.033	-0.407	1
	P	0.621	0.817	0.003	0

IV.4. Relation entre les structures de la poche de fertilisation et les organes reproducteurs

Aucune corrélation significative n'a été établie entre la longueur et le nombre d'aucune des structures de la poche de fertilisation et la longueur d'aucun organe de reproduction, mâle ou femelle, considéré dans la présente étude (Tableau 4.9).

Tableau 4.9. Coefficients de corrélation et valeurs P des structures de la poche de fertilisation et les organes reproducteurs mâles et femelles. Abréviations: CF, longueur de la chambre de fertilisation; TP, longueur du tubule principal; LMTL, longueur moyenne des tubules latéraux; NT, nombre des tubules spermathécaux; Canal copul., canal de la bourse copulatrice; Glandes m., glandes multifides.

		CF	TP	LMTL	NT
Diverticulum	r	-0,032	-0,055	-0,233	0,266
	P	0.821	0.699	0.096	0.057
Canal copul.	r	0,111	-0,031	-0,112	0,079
	P	0.432	0.826	0.429	0.577
Sac à dard	r	-0,025	-0,09	-0,06	0,042
	P	0.858	0.525	0.672	0.766
Epiphallus	r	0,006	0,028	0,207	-0,031
	P	0.968	0.841	0.141	0.827
Flagelle	r	-0,091	-0,062	-0,035	0,069
	P	0.519	0.663	0.803	0.626
Glandes m.	r	0,027	0,171	0,213	-0,111
	P	0.850	0.224	0.130	0.431

IV.5. Effet de la densité, de la taille de la coquille (diamètre) et de leur combinaison sur les structures de la poche de fertilisation

Les résultats des modèles de régression linéaire, simple et généralisé, utilisés pour examiner la dépendance probable du développement des structures de la poche de fertilisation de la taille de la coquille et la densité locale, sont résumés dans le Tableau 4.10.

Tableau 4.10. Résultats des modèles utilisés pour tester l'effet des facteurs fixes, densité de chaque population et diamètre de la coquille des individus, sur les mesures des structures de la poche de fertilisation (variables de réponse).

	Densité			Diamètre coquille			Densité x diamètre		
	ddl	F ou χ^2	P	ddl	F ou χ^2	P	ddl	F ou χ^2	P
Nombre de tubules	3, 44	0.910	0.823	1,44	0.001	1.000	3, 44	1.058	0.78
Longueur chambre de fertilisation	3, 44	14.799	0.0020	1,44	0.190	0.662	3, 44	0.975	0.80
Longueur tubule principal	3, 44	5.452	0.0028	1,44	1.587	0.214	3, 44	0.223	0.88
Longueur moyenne tubules latéraux	3, 44	101.41	0.0001	1,44	1.021	0.312	3, 44	1.898	0.59

D'après les résultats, seulement la densité locale a eu un effet significatif sur la longueur de la chambre de fertilisation, celle du tubule principal ainsi que sur la longueur moyenne des tubules latéraux (Tableau 4.10). En effet, la longueur des trois, a tendance à augmenter avec l'augmentation de la densité locale (fig.4.6).

Cependant, ni la densité, ni la taille de la coquille n'a eu un effet sur le nombre des tubules spermathécaux.

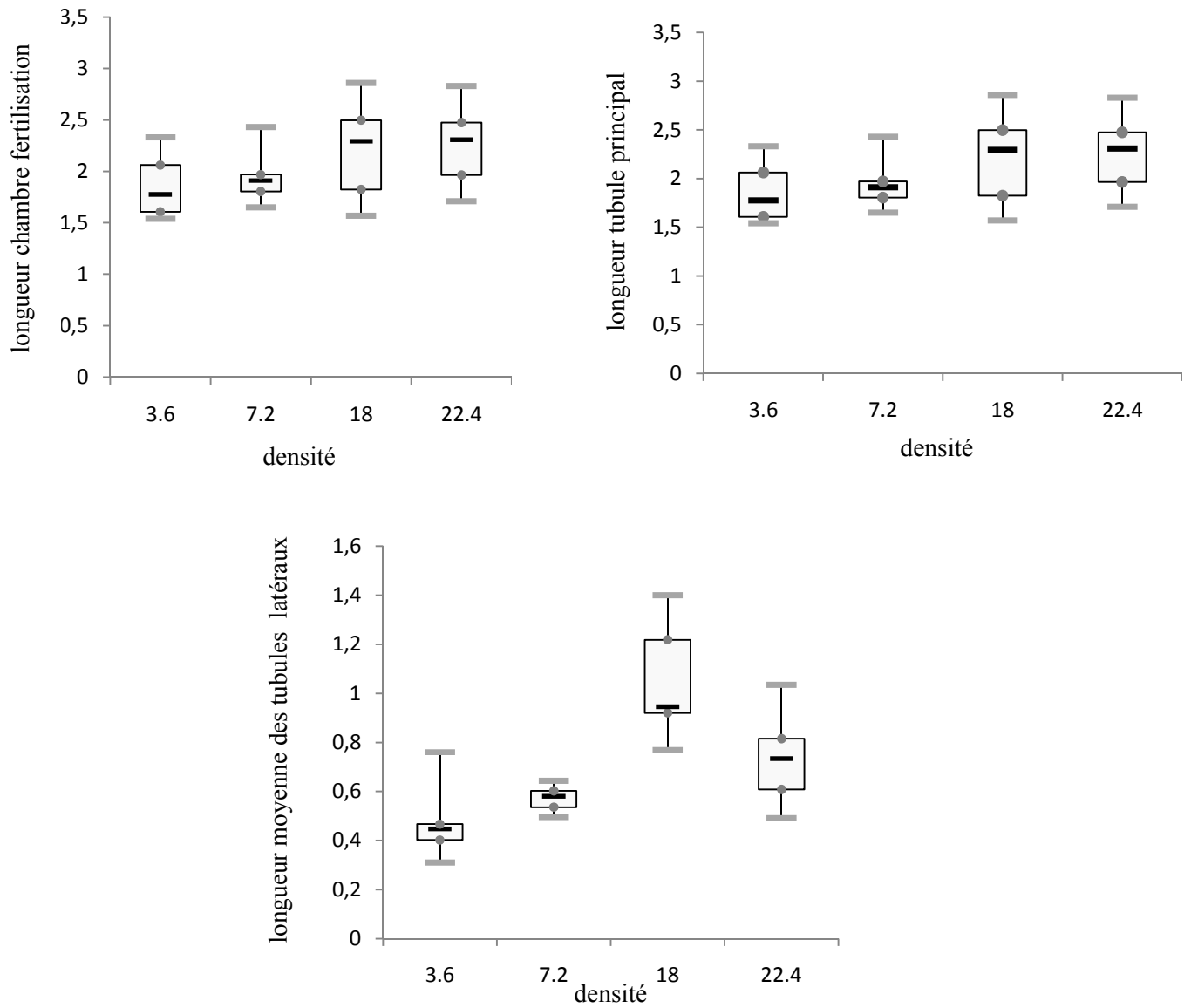


Fig.4.6. Comparaison des longueurs de la chambre de fertilisation, tubule principal et tubules latéraux entre les quatre populations d'*Helix aperta* analysées présentant différentes densités. Les box-plot montrent la médiane, le 1^{er} et 3^{ème} quartiles et le rang.

V. Investigation des dards et des glandes multifides

V.1. Morphologie des dards et des glandes multifides de l'espèce *Helix aperta*

L'espèce *Helix aperta* possède un seul dard, contenu dans un sac à dard, qui se présente sous forme d'un simple stylet conique, tranchant et légèrement courbé (fig.4.7).

Il est de nature calcaire avec une surface lisse et une longueur moyenne de 7,26 mm.



Fig.4.7. Photo montrant une vue latérale d'un dard d'amour de l'espèce *Helix aperta* prise avec un stéréo-microscope liée à une caméra.

La coupe transversale réalisée sur le dard de l'espèce *Helix aperta* a révélé que cette dernière est composée de lames (fig.4.8) dont les longueurs divergent considérablement entre les différents individus appartenant aux quatre populations étudiées.

L'espèce *Helix aperta* possède une paire de glandes multifides attachée au sac à dard.

Elles sont de longueur moyenne de 6,33 mm et constituées principalement de branches d'un nombre variant de 29 à 130.

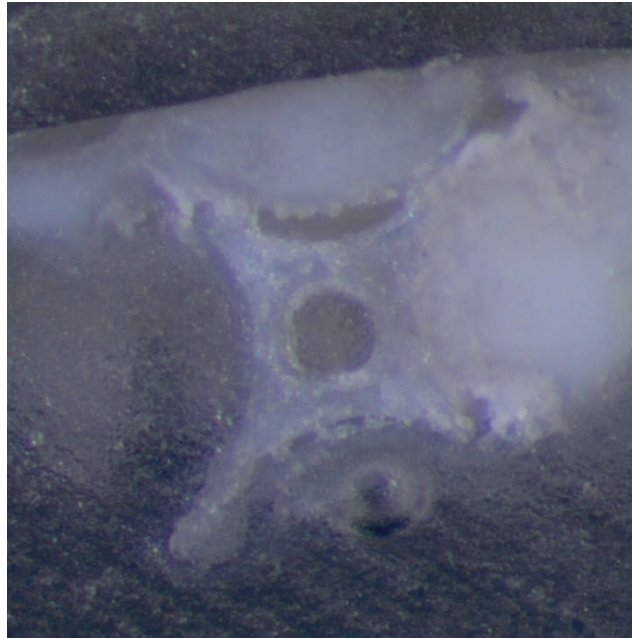


Fig.4.8. Photo d'une coupe transversale d'un dard de l'espèce *Helix aperta* prise avec un stéréomicroscope liée à une caméra.

V.2. Effet de la taille de la coquille sur les traits des dards et des glandes multifides

D'après les tests de corrélation réalisés, la taille de la coquille (diamètre) n'a aucun effet significatif sur aucun des traits des dards et ceux des glandes multifides dans toutes les populations étudiées (Tableau 4.11).

Tableau 4.11. Coefficients de corrélation de la taille de la coquille (diamètre) et les différents traits des dards et des glandes multifides. Abréviations: L., longueur; Périm., périmètre du dard; Nbre. Branch., nombre de branches des glandes multifides.

		Dards				Glandes multifides	
		L. dard	Lame 1	Lame 2	Périm.	L. glandes	Nbre. Branch.
Diamètre coquille	r	-0,142	-0,006	0,039	-0,075	-0,111	0,047
	p	0,317	0,967	0,780	0,595	0,432	0,741

V.3. Variation des traits des dards et des glandes multifides entre les quatre populations

Les tests de comparaison appliqués, ANOVA et Kruskal-Wallis, ont révélé une différence significative de la longueur du dard entre les quatre populations investiguées (voir Tableau 4.12).

Cependant, aucune différence significative n'a été détectée d'aucun des autres traits du dard; à savoir les longueurs des lames et le périmètre, ni des traits des glandes multifides; à savoir leur longueur et le nombre de branches les constituant (voir Tableau 4.12).

Tableau 4.12. Comparaison des différents traits des dards et glandes multifides entre les quatre populations *Helix aperta* en appliquant les tests ANOVA à un facteur ou Kruskal-Wallis. Les moyennes en mm \pm écart type sont indiquées. N réfère au nombre d'individus dans les populations (taille des échantillons). Les populations: Ba, Baccaro; SA, Sidi Ahmed; St, Stade; TH, Tala Hamza. Les valeurs significatives sont marquées par *.

	Populations					P
	Ba	SA	St	TH		
L. dard	7.69 \pm 0.1	7.2 \pm 1.39	6.3 \pm 1.15	7.47 \pm 0.74	F=2.929	0.043*
Lame 1	0.73 \pm 0.13	0.70 \pm 0.11	0.69 \pm 0.10	0.64 \pm 0.06	H=5.358	0.147
Lame 2	0.79 \pm 0.17	0.74 \pm 0.10	0.75 \pm 0.11	0.69 \pm 0.06	H=3.871	0.276
Périm.	2.35 \pm 0.51	2.16 \pm 0.34	2.02 \pm 0.73	2.04 \pm 0.18	H=2.059	0.560
L. glandes	6.49 \pm 1.75	6.27 \pm 2.06	5.68 \pm 2.75	6.57 \pm 1.34	F=0.437	0.728
Nbr. branch.	49.47 \pm 12.3	60.66 \pm 17.5	50.75 \pm 15.3	57.94 \pm 24.6	H=2.880	0.05

V.4. Effet de la densité locale sur les traits des dards et des glandes multifides

Les résultats des tests de corrélation, Pearson et Spearman, appliqués afin de détecter l'effet potentiel de la densité locale sur le développement des différents traits des dards et des glandes multifides sont résumés dans le Tableau 4.13.

Seulement la longueur du dard semble être influencée par la densité locale. En effet, une corrélation positive significative est établie entre ce trait et la densité des escargots.

Cependant, les autres traits du dard (périmètre et longueurs des lames) ainsi que tous les traits des glandes multifides (longueur et nombre total des branches) ne semblent pas dépendre de la densité (voir Tableau 4.13).

Tableau 4.13. Coefficients de corrélation et valeurs P de la densité locale et les différents traits des dards et glandes multifides. Les valeurs en gras désignent les corrélations significatives.

		Dards				Glandes multifides	
		L. dard	Lame 1	Lame 2	Périm.	L. glandes	Nbre. Branch.
Densité locale	r	0,371	-0,009	-0,030	0,089	0,116	-0,108
	p	0,004	0,947	0,831	0,528	0,412	0,443

V.5. Relations entre les traits des dards et des glandes multifides

Les résultats des tests de corrélation, Pearson et Spearman, effectués pour détecter d'éventuelles relations entre les différents traits des dards et glandes multifides sont résumés dans le Tableau 4.14.

Les seules relations significatives sont établies entre les longueurs des deux lames du dard, les longueurs des lames et le périmètre du dard (corrélations positives), ainsi qu'entre la longueur des glandes multifides et le nombre de leurs branches (corrélations négatives) (voir Tableau 4.14).

Tableau 4.14. Coefficients de corrélation et valeurs P entre les différents traits des dards et glandes multifides. Les valeurs en gras indiquent les corrélations significatives. Abréviations: L. dard, longueur du dard; Périm., périmètre du dard; L. glandes, longueur des glandes multifides; Nbre. Branch., nombre de branches des glandes mutifides.

		L. dard	Lame 1	Lame 2	Périm.	L. glandes	Nbre.branch.
L. dard	r	1	0,142	0,098	0,263	0,191	-0,064
	P	0	0,314	0,486	0,059	0,174	0,652
Lame 1	r	0,142	1	0,937	0,782	0,112	-0,061
	P	0,314	0	< 0,0001	< 0,0001	0,429	0,664
Lame 2	r	0,098	0,937	1	0,801	0,053	-0,100
	P	0,486	< 0,0001	0	< 0,0001	0,707	0,478
Périm.	r	0,263	0,782	0,801	1	0,085	-0,129
	P	0,059	< 0,0001	< 0,0001	0	0,547	0,361
L. glandes	r	0,191	0,112	0,053	0,085	1	-0,410
	P	0,174	0,429	0,707	0,547	0	0,003
Nbre.branch.	r	-0,0064	-0,061	-0,100	-0,129	-0,410	1
	P	0,652	0,664	0,478	0,361	0,003	0

Chapitre V : Discussion

I. Densités des populations

Les densités d'escargots sont remarquablement différentes entre les quatre populations étudiées. Ceci semble évident vue la localisation géographique des sites d'échantillonnage ainsi que les microclimats très divergents auxquels sont confrontés les escargots dans ces derniers.

En effet, la population provenant de Baccaro fait face au microclimat le plus humide par rapport aux autres. Le haut degré d'humidité dans ce site, en plus de sa localisation géographique près de la mer, provient essentiellement de l'arrosage régulier de la monoculture. Ces deux facteurs sont donc probablement responsables de la création d'un tel microclimat très favorable à l'activité de l'espèce d'intérêt et des escargots terrestres en général.

Cependant, la population provenant de la Place du stade est confrontée à un microclimat très critique à l'activité des escargots. En effet, le site est situé dans une région urbaine où l'activité de l'espèce reste limitée aux périodes de précipitations qui s'étalent sur de courtes durées dans l'année d'où la faible densité des escargots enregistrée dans ce dernier.

II. Taille des escargots

II.1. Variation de la taille de la coquille

La variation de la taille de la coquille entre les quatre populations d'escargots étudiées, peut être due aux différences de densités, de microclimats ou l'interaction des deux.

La corrélation positive significative détectée entre la hauteur et le diamètre de la coquille indique probablement un développement parallèle des deux paramètres.

II.2. Relation densité-taille de la coquille

La corrélation inverse détectée entre la taille de la coquille et la densité locale, confirme les résultats obtenus lors de quelques études antérieures sur d'autres espèces d'escargots investiguées sur le terrain ou en laboratoire (Williamson *et al.* 1976, Oosterhoff 1977, Tattersfield 1981, Baur 1988, Perry & Arthur 1991).

Afin d'expliquer une telle relation, Baur (1988) a proposé que ce soit probablement due à la dégradation de la qualité des aliments suite aux dépôts de mucus dont les quantités augmentent avec l'augmentation de la densité des escargots. Il en résulte donc un ralentissement de la croissance des juvéniles, menant à des adultes de tailles réduites et même à une réduction potentielle subséquente de la fécondité.

En revanche, Baminger & Haase (1999) n'ont trouvé aucune forme de dépendance entre la taille de la coquille et la densité locale chez des populations d'escargots *Arianta arbustorum*, obtenues de six localités différentes aux Alpes orientales en Autriche. La cause la plus probable de tels résultats, est l'influence des facteurs environnementaux notamment l'humidité (voir Goodfriend 1986 pour une revue) pouvant se superposer avec les effets potentiels de la densité sur la taille de la coquille (tel expliqué par Baminger & Haase 1999).

De même, Koentzopoulos and Staikou (2007) n'ont pas parvenu à établir une telle relation chez certaines populations *Cornu aspersum* provenant de sites à hauts degrés d'humidité ; ce qui confirme en partie l'interprétation de Baminger & Haase (1999).

III. Organes reproducteurs mâles et femelles

III.1. Variation de la longueur des organes reproducteurs mâles et femelles et leur relation avec la densité locale

Les organes de reproduction considérés dans cette étude à savoir; les organes mâles (sac à dard, glandes multifides, épiphallus et flagellum) et les organes femelles (canal de la bourse copulatrice et diverticulum), supposés être impliqués dans les mécanismes de la sélection sexuelle, notamment la compétition spermatique, et interagir avec le processus de stockage de sperme, n'ont montré aucune variabilité significative de longueur entre les quatre populations étudiées. De plus, aucune corrélation significative n'a été établie avec la longueur d'aucun de ces organes et la densité locale; ce qui contredit l'hypothèse émise.

En revanche, les longueurs des mêmes organes étaient inversement liées à la densité locale chez des populations d'escargots *Arianta arbustorum* provenant de six localités différentes aux Alpes orientales en Autriche investiguées par Baminger & Haase (2000).

Ces auteurs ont attribué l'occurrence d'une telle relation à l'effet inhibiteur potentiel des dépôts importants du mucus, tel expliqué plus haut pour la relation entre la densité et la taille de la coquille. Par conséquent, il ne leur a pas été possible de déterminer, sans ambiguïté, l'effet possible de la compétition spermatique sur la variation des organes d'intérêt, qui était en fait l'objectif prioritaire de leur étude.

III.2. Effet de la taille de la coquille sur la longueur des organes reproducteurs

Dans cette étude, aucune corrélation significative n'a été établie entre la taille de la coquille et la longueur d'aucun des organes reproducteurs, mâles et femelles, considérés. Ce résultat indique probablement le développement de ces organes indépendamment de la taille des escargots.

IV. Poches de fertilisation et spermathèques

IV.1. Morphologie de la poche de fertilisation et de la spermathèque

Cette étude est la première à fournir la description de la poche de fertilisation-complexe de la spermathèque de l'escargot terrestre hermaphrodite simultané *Helix aperta*.

La structure morphologique globale de la poche de fertilisation de cette espèce s'avère assez similaire à celle de quelques autres espèces d'escargots hermaphrodites à savoir ; *Arianta arbustorum* (Haase & Baur 1995, Baminger & Haase 1999) et *Cornu aspersum* (Evanno & Madec 2007, Koemtzopoulos & Staikou 2007). De plus, le même profil morphologique est conservé chez toutes les quatre populations étudiées, ce qui concorde avec les résultats antérieurs rapportés pour l'espèce *Cornu aspersum*. Celle-ci présente une structure de la poche de fertilisation qui reste inchangée même au cours de deux générations consécutives (Koemtzopoulos & Staikou 2007) ce qui peut probablement indiquer l'existence d'une base génétique pour ce trait (Koemtzopoulos & Staikou 2007).

A l'instar de l'étude de Baminger & Haase (1999) sur l'espèce *Arianta arbustorum* et celle de Koemtzopoulos & Staikou (2007) sur *Cornu aspersum*, la spermathèque de l'espèce *Helix aperta* consiste en un tubule principal et un nombre de tubules latéraux.

Le tubule principal, défini comme le plus long des tubules de la spermathèque, est toujours plus court que la chambre de fertilisation qui elle, est la plus longue structure de toute la poche de

fertilisation. Cette tendance est également rapportée pour l'espèce *Cornu aspersum* (Koemtzopoulos & Staikou 2007), mais pas pour *Arianta arbustorum* chez laquelle la longueur du tubule principal dépassait celle de la chambre de fertilisation dans la plupart des cas étudiés (Baminger & Haase 1999).

Dans la majorité des spermathèques analysées, les tubules latéraux se ramifient du tubule principal ou à partir d'autres tubules latéraux. Cependant, des exceptions sont survenues dans environ 14% des spermathèques ; dans lesquelles certains tubules latéraux bifurquent directement de la chambre de fertilisation.

Bien que la même tendance soit aussi observée chez l'espèce *Cornu aspersum* (Koemtzopoulos & Staikou 2007), aucune explication biologique significative n'a été et ne peut être proposée à cet effet.

IV.2. Variation des structures de la poche de fertilisation entre les quatre populations et leur relation avec la densité locale

IV.2.1. Nombre de tubules spermathécaux

Comme prévu, le nombre de tubules spermathécaux est variable (3-9 tubules) et correspond approximativement au nombre de tubules de la spermathèque de l'espèce *Arianta arbustorum* qui variait de 2 à 9 lors d'une étude entreprise par Baminger & Haase (1999).

Une telle variabilité intra-spécifique, a déjà été rapportée chez de nombreuses autres espèces. En effet, 3-5 tubules sont trouvés chez *Helix pomatia* (Lind 1973), 4-6 chez *Cryptomphalus asperses* (Brisson, Régondaud & Collin 1977), 2-8 chez des populations *Arianta arbustorum* étudiées par Haase & Baur (1995) et 2-9 chez d'autres étudiées par Baminger & Haase (1999). De son côté, Staikou (2001) a compté 1-8 tubules chez l'espèce *Cepaea vindobonensis* et 5-16 chez *Helix lucorum*. Tandis que chez quelques populations *Cornu aspersum* obtenues de deux régions différentes du sud de la Grèce, un nombre de 4-19 tubules sont enregistrés par Koemtzopoulos & Staikou (2007) alors qu'Evanno & Madec (2007) ont compté un nombre de 3-13 tubules chez d'autres populations de la même espèce.

Cependant, contrairement à l'hypothèse émise, la variation du nombre des tubules spermathécaux n'est pas significative. De plus, aucune corrélation significative n'est établie entre le nombre de ces tubules et la densité locale ou la taille de la coquille.

Ces résultats sont consistants avec ceux de deux autres études similaires entreprises antérieurement sur six populations d'escargots de l'espèce *Arianta arbustorum*, échantillonnés dans les Alpes orientales en Autriche (Baminger and Haase 1999), et cinq populations d'escargots *Cornu aspersum* obtenues de Grèce (Koemtzopoulos and Staikou 2007).

Selon les mêmes auteurs, l'absence d'une variation significative peut probablement être due à la grande diversité du nombre de tubules spermathécaux se produisant au sein d'une même population, comme indiqué plus haut.

En outre, au moment où la quantité du sperme stockée dans les différents tubules spermathécaux n'est pas quantifiée dans cette étude; chez l'espèce *Arianta arbustorum* celle-ci n'a pas également été significativement divergente entre les différentes populations étudiées par Baminger & Haase (1999).

Ces résultats peuvent probablement indiquer que le nombre des tubules de la spermathèque ne dépend pas de l'intensité de la compétition spermatique et n'est donc pas sujet aux mécanismes de la sélection sexuelle ; notamment la compétition spermatique.

Dans deux autres propositions respectivement par Koemtzopoulos & Staikou (2007) et Baminger & Haase (1999), le nombre des tubules de la spermathèque est probablement génétiquement contrôlé et/ou dépend de l'âge ou la maturité de l'individu. Si c'est le cas pour l'espèce investiguée dans cette étude, ça peut en quelques sortes expliquer l'absence de différence significative concernant le nombre de tubules entre les quatre populations qui présentent des densités différentes. De plus, ça peut également expliquer l'absence de corrélation significative entre la densité locale et le nombre de tubules spermathécaux.

Néanmoins, une étude de l'ontogenèse de la spermathèque de l'espèce *Arianta arbustorum*, a révélé que le développement des tubules spermathécaux ne se fait pas simultanément ; mais bifurquent successivement du tubule principal qui se développe en premier (Baminger & Haase 2002). De plus, la même étude a révélé que le nombre final des tubules spermathécaux est atteint

chez les individus sub-adultes (Baminger & Haase 2002), ce qui indique que ce dernier reste inchangé après la maturité.

Enfin, le nombre de tubules constituant la spermathèque, bien qu'il soit divergent chez beaucoup d'espèces, comme indiqué plus haut, il peut également être un caractère stable chez d'autres (voir Koemtzopoulos & Staikou 2007). De plus, les spermathèques très complexes et sophistiquée retrouvées chez les espèces *Cornu aspersum* et *Helix lucorum* par exemple, peuvent simplement être due à leur besoin de stockage du sperme pour de longues périodes. Ces espèces (ou du moins les spécimens étudiés), ont une répartition plus méridionale/méditerranéenne et sont donc confrontées à des conditions plus sèches ; ce qui les oblige à estiver durant tous les longs mois d'été. De plus, les premiers accouplements s'effectuent généralement à la fin du printemps (Staikou *et al.* 1988), suivis d'une période d'estivation de Juin ou Aout jusqu'au mois de Septembre, au cours de laquelle les escargots stockent les spermatozoïdes dans leurs spermathèques.

La période de reproduction principale s'effectue à la fin de l'été (pour certaines populations nordiques d'*Helix lucorum*, Staikou *et al.* 1988) et en automne (pour *Cornu aspersum*). Un tel comportement reproducteur peut donc justifier la demande d'un plus grand espace de stockage de sperme (Staikou *et al.* 1988).

IV.2.2. Longueurs des structures de la poche de fertilisation

Les résultats révèlent une relation positive significative entre la densité locale et la longueur de la chambre de fertilisation, la longueur du tubule principal de la spermathèque, ainsi que la longueur moyenne des tubules latéraux.

Ces résultats contredisent ceux des deux autres études antérieures similaires sur les deux espèces *Arianta arbustorum* (Baminger & Haase 1999) et *Cornu aspersum* (Koemtzopoulos & Staikou 2007). En effet, chez ces deux espèces, la densité locale n'a eu aucun effet sur la longueur d'aucune structure de la poche de fertilisation.

Dans ce contexte, il est nécessaire de noter que les densités des populations, dans ces deux études et la présente, sont clairement différentes (Baminger & Haase 1999: 0.9-39.8 adultes/m²; Koemtzopoulos & Staikou 2007: 11.4-42.3 adultes/m²). Cependant, ce n'est probablement pas

suffisant pour expliquer cette différence entre ces espèces. Bien sur, il n'est pas également à exclure que cela peut être simplement due à des différences entre les espèces comme a rapporté Lodi *et al.* (2017) sur d'autres caractères reproducteurs chez les escargots terrestres.

En outre, dans la présente étude et même dans les deux précédentes, la densité locale est utilisée comme indicateur de l'intensité de la compétition spermatique. En effet, une relation positive significative a été détectée entre la densité et l'intensité de la compétition spermatique chez de nombreux groupes animaux tels que ; les gastéropodes prosobranches (Oppliger *et al.* 1998), les insectes (Gage 1995), les oiseaux (Birkhead & Møller 1992), les mammifères (Møller & Birkhead 1989), les annélides Hirudinea (Tan *et al.* 2004), et les amphibiens anoures (Buzatto *et al.* 2015). Toutefois, la seule évidence pour une telle relation chez les escargots terrestres, provient des différences observées dans la fréquence d'accouplement parmi des populations d'escargots *Cornu aspersum* de densités contrastées et qui persistent même chez la génération F1 (Koentzopoulos & Staikou 2007).

Par conséquent, différentes densités peuvent vraisemblablement refléter différentes intensités de compétition spermatique chez l'espèce étudiée, mais cela nécessite vraiment une confirmation par des analyses de paternité. De plus, afin de valider cette hypothèse, il est nécessaire d'en disposer d'informations détaillées sur les accouplements multiples de cette espèce et si la fréquence de ces derniers a tendance à augmenter avec l'augmentation de la densité de la population (comme l'ont également souligné Baminger & Haase, 2000 pour *Arianta arbustorum*).

Un autre point important à tenir en compte, est le fait que la densité locale ne soit probablement pas une entité stable et fixe dans le temps chez les populations étudiées ; et sa fluctuation entrainerait certainement une fluctuation de l'intensité de la compétition spermatique comme l'a indiqué également Baminger & Haase (2000).

L'une des explications les plus probables d'avoir des organes de stockage d'une longueur importante, serait une amélioration de la capacité de stockage du sperme (Pitnick *et al.* 1999, Miller & Pitnick 2003). En effet, lors de leur tentative d'expliquer le mode d'utilisation du sperme chez les escargots *Cornu aspersum*, Rogers & Chase (2002) ont proposé un mécanisme basé sur le mouvement du sperme reçu dans la spermathèque.

Ces auteurs ont suggéré que les mouvements unifiés et simultanés des flagelles des spermatozoïdes stockés dans la spermathèque, génèrent une résistance qui empêchent les spermatozoïdes d'autres mâles d'y accéder et d'être stockés. Hypothétiquement, il paraît que cette résistance devient plus puissante en la présence d'un nombre plus élevé de spermatozoïdes dans les organes de stockage (Beese *et al.* 2006a). En contrepartie, ceci peut résulter probablement en l'augmentation de la longueur des tubules spermathécaux (Beese *et al.* 2008). En effet, ça peut expliquer l'association entre la longueur des spermatozoïdes et la longueur des organes de stockage de sperme femelles observée chez certains escargots terrestres et également chez d'autres taxons animales (Dybas & Dybas 1981, Briskie & Montgomerie 1992, Pitnick *et al.* 1999, Presgraves *et al.* 1999, Morrow and Gage 2000).

Comme résultats d'une éventuelle augmentation de la longueur des tubules spermathécaux, un plus grand nombre de spermatozoïdes peuvent être stockés, possiblement aussi de plus de partenaires sexuels (voir Baminger & Haase 1999, Pitnick *et al.* 1999, Miller & Pitnick 2003).

En effet, chez les escargots terrestres, les spermatozoïdes sont stockés avec leurs têtes en contact direct avec l'épithélium des tubules spermathécaux (*Arianta arbustorum*: Bojat *et al.* 2001b, *Cornu aspersum*: Rogers & Chase 2002, *Bradybaena fruticum*: Bojat *et al.* 2002). Evidemment, en partant de ce principe, des tubules spermathécaux de longueurs plus importantes peuvent fournir une plus grande surface pour l'ancrage et le stockage d'un plus grand nombre de spermatozoïdes (Bojat *et al.* 2001b).

Chez les espèces à sexes séparés (=gonochoriques), suite à une amélioration de la qualité de stockage de sperme, les femelles peuvent bénéficier d'une capacité plus importante de contrôle des processus de fécondation (Pitnick *et al.* 1999, Miller & Pitnick 2003) et éventuellement l'exercice du choix cryptique de la femelle (Simmons 2001).

Lors des études antérieures entreprises dans le même contexte sur l'espèce *Arianta arbustorum*, le seul changement signalé concernant la taille de la spermathèque, est l'expansion du volume de cette dernière qui se produit après réception du sperme (voir Beese & Baur 2006). Cependant, d'après ces auteurs, il s'agissait d'une expansion du diamètre des tubules et non de leur longueur. Néanmoins, dans la présente étude, le diamètre des tubules n'est pas pris en considération.

De plus, la quantité du sperme stockée n'est pas connue ou quantifiée spécialement parce que l'étude a porté sur des escargots à histoire d'accouplements inconnue.

Finalement, les causes de variabilité des organes de stockage de sperme, en termes de complexité et sophistication, et leur éventuel effet sur le succès reproducteur restent à explorer d'avantage et à confirmer chez les escargots terrestres (voir aussi Baminger & Haase 1999).

Chez ces derniers, une variation considérable est rapportée lors de l'exploration des modes d'utilisation du sperme chez des escargots ayant accouplés deux ou trois fois (Murray 1964, Baur 1994, Evanno *et al.* 2005, Garefalaki *et al.* 2010) d'une part. D'une autre part, selon les études entreprises jusqu'à présent, l'augmentation du taux de paternité (=succès reproducteur) semble être principalement lié à certains traits comportementaux et anatomiques (Landolfa *et al.* 2001, Rogers & Chase 2002, Garefalaki *et al.* 2010) qui agissent probablement sur la quantité du sperme transférée et stockée. Hypothétiquement, cela peut suggérer que la résolution de la compétition spermatique peut être déterminée par la représentation proportionnelle des spermatozoïdes dans l'organe de stockage de sperme, aux cas où ces derniers sont sélectionnés au hasard tel ont proposé Landolfa *et al.* (2001). Cependant, ça reste également à démontrer.

IV.3. Effet de la taille de la coquille sur les structures de la poche de fertilisation

L'absence de corrélation significative entre la taille de la coquille et la longueur des différentes structures de la poche de fertilisation ou encore le nombre de tubules spermathécaux, peut probablement indiquer un développement indépendant de ces structures chez l'espèce *Helix aperta*. Ce résultat correspond parfaitement à ceux de la pluparts des études antérieures dans ce contexte (Haase & Baur 1995, Baminger & Haase 1999, 2002, Bojat & Haase 2002, Koemtzopoulos & Staikou 2007).

Cependant, une exception s'est produite dans l'étude de Beese *et al.* (2006a) sur l'espèce *Arianta arbustorum* ; où la taille de la coquille a été positivement corrélée avec la longueur de la spermathèque et son volume. Pour expliquer une telle association, les auteurs l'ont assimilé à l'association positive également détectée entre le volume de la spermathèque et le nombre de spermatozoïdes stockés. Selon eux, cette dernière liaison est fortement liée à la fertilité ; de sorte qu'une augmentation du nombre d'ovules produits par la femelle, requiert toujours l'augmentation de la quantité du sperme nécessaire pour la fécondation. Par conséquent, une

augmentation du volume des organes de stockage de sperme ; peut exercer une sélection sur les mâles les poussant à produire des masses plus importantes d'éjaculats pour remplir les organes de stockage (Minder *et al.* 2005).

IV.4. Relation entre les organes reproducteurs et les structures de la poche de fertilisation

Contrairement à l'hypothèse lancée, aucune corrélation significative n'a été détectée entre aucun des organes de reproduction, considérés dans cette étude, et la longueur d'aucune structure de la poche de fertilisation, ni le nombre de tubules spermathécaux de l'espèce *Helix aperta*.

Ce résultat peut probablement indiquer une absence de la coévolution prédite entre ces organes.

En revanche, les preuves de l'existence d'une évolution corrélée et répétée ; spécialement entre les deux traits mâles à savoir, la morphologie du dard et la complexité des glandes multifides ; avec les organes femelles receveurs du spermatophore (diverticulum et canal de la bourse copulatrice) ont été trouvées chez le groupe des Helicoidea (Koene and Schulenburg 2005). Similairement, une étude phylogénique antérieure portant sur 47 espèces de Gastéropodes Stylommatophores, a pu établir une association positive entre la structure complexe de la spermathèque et l'occurrence de dards, de longs flagelles ainsi que d'autres structures copulatrices auxiliaires (Beese *et al.* 2008). Selon ces auteurs, en raison de la possibilité d'un contrôle de la paternité par les femelles en la présence de la spermathèque, il est fort probable que la coexistence de cette dernière avec les structures auxiliaires mâles notamment le dard, résulte de la sélection sexuelle post-copulatoire y compris le conflit sexuel.

Bien que ces résultats puissent indiquer une association évolutive entre ces différentes structures reproductrices entre les espèces, une telle relation n'est pas retrouvée dans la présente étude dont l'investigation s'est portée sur une seule espèce.

V. Dards et glandes multifides

V.1. Morphologie des dards et des glandes multifides

Parmi les espèces possédant un dard, la forme de ce dernier est très variable d'une espèce à une autre (voir fig.5.1). Ils peuvent différer essentiellement dans la courbure ; allant de droit comme

celui de l'espèce *Trichia hispida*, incurvé comme celui de *Hygromia cinctella* à incurvé et tordu comme celui de *Leptaxis erubescens* (voir fig.5.1).

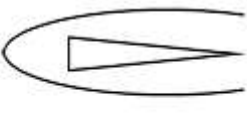
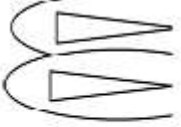
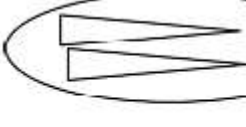






Nombre de dards	 <i>Helix lucorum</i> (Helicidae) Un seul dard (dans le sac à dard)	 <i>Trichia hispida</i> (Hygromiidae) Plusieurs dards (chacun dans un sac à dard)	 <i>Nesiohelix solida</i> (Bradybaenidae) Plusieurs (dans un seul sac à dard)
Degré de courbure	 <i>Chilostoma glaciale</i> (Helicidae) Droit	 <i>Hygromia cinctella</i> (Hygromiidae) Incurvé	 <i>Leptaxis erubescens</i> (Hygromiidae) Incurvé et tordu
Coupe transversale	 <i>Fruticicola fruticum</i> (Bradybaenidae) Sans lames	 <i>Helix lucorum</i> (Helicidae) Avec lames	 <i>Cepaea hortensis</i> (Helicidae) Avec d'autres lames sur les lames

Fig.5.1. Principales caractéristiques du dard. La première ligne indique q’un ou plusieurs dards peuvent être présents et contenus dans un ou plusieurs sacs à dard. La deuxième ligne illustre les différentes formes des dards. La dernière ligne montre des sections transversales de dards et indique que la surface de ces derniers peut être lisse, élargie avec des lames ou même avec des lames perpendiculaires supplémentaires. Des exemples d’espèces avec le nom de leur famille (entre parenthèse) sont indiqués. Notez que, en principe, toutes les combinaisons de lignes sont possibles (Lodi & Koene 2016).

Egalement, le nombre des dards qu’une espèce peut posséder peut être variable allant généralement de un à huit ; avec la pluparts ne possédant qu’un seul.

Les escargots *Helix aperta* des quatre populations investiguées dans cette thèse ; possèdent tous un seul dard contenu dans un seul sac à dard. Il est d'une longueur moyenne et d'une forme légèrement incurvée.

Chaque escargot possède une seule paire de glandes multifides, attachée au sac à dard, constituées d'un nombre variable de branches.

La forme des dards et glandes de l'espèce *Helix aperta* s'avère très similaires à celle de plusieurs autres espèces d'escargots terrestres à savoir; *Cornu aspersum*, *Helix lucorum* et *Cepaea nemoralis* (voir Lodi *et al.* 2017).

V.2. Effet de la taille de la coquille (diamètre) sur les traits des dards et des glandes multifides

Comme indiqué dans la partie résultats, la taille de la coquille représentée par son diamètre, ne semble avoir aucun effet significatif sur aucun des traits relatifs aux dards et glandes multifides.

Ces résultats sont consistants avec ceux d'une étude récente entreprise par Lodi *et al.* (2017). Ces auteurs ont investigué la variation intra-spécifique des traits des dards et des glandes multifides et leur relation avec la taille du corps chez quatre populations différentes de chacune des espèces d'escargots terrestres suivantes; *Cornu aspersum*, *Helix lucorum*, *Cepaea nemoralis* et *Arianta arbustorum*. La taille corporelle dans cette étude est représentée par le volume de la coquille, obtenu à partir des mesures de sa hauteur, largeur et longueur.

Similairement à notre étude, la taille du corps n'a été corrélée avec aucun des traits relatifs aux dards et glandes multifides et ce, chez toutes les populations des quatre espèces étudiées. Cela peut signifier que le développement de ces traits se fait, probablement, indépendamment de la taille corporelle.

V.3. Variation des traits des dards et des glandes multifides entre les quatre populations, et leur relation avec la densité locale

Une variation significative de la longueur des dards est détectée entre les quatre populations investiguées. De plus, une corrélation significative positive est établie entre ce trait et la densité locale des escargots. Néanmoins, tous les autres traits des dards (périmètre et longueurs des

lames) et des glandes multifides (longueur et nombre des branches) ; n'ont montré aucune variabilité apparente entre les quatre populations, ni de corrélation significative avec la densité des escargots.

Lors de l'étude portant sur les dards et les glandes multifides chez quatre espèces d'escargots terrestres, précédemment citée, Lodi *et al.* (2017) sont parvenus à trouver des variations significatives relatives à ces traits. En comparant les populations aux densités élevées avec celles aux faibles densités, traduisant probablement différentes intensités de compétition spermatique, plusieurs combinaisons des traits des dards et des glandes multifides par espèce sont détectées ; ce qui peut probablement résulter en l'augmentation de la quantité du mucus transférée (Lodi *et al.* 2017). En effet, chez l'espèce *Cornu aspersum* par exemple, les populations aux plus grands nombre de branches et les dards aux plus longues lames peuvent refléter une plus grande capacité de production et transfert du mucus (Lodi *et al.* 2017). Chez *Helix lucorum*, la divergence de la longueur et d'élaboration des glandes, détectée entre les populations, sans néanmoins aucune différence de la longueur des dards, peut refléter une production différentielle de mucus. Finalement, chez l'espèce *Cepaea nemoralis*, le nombre de branches et la longueur des dards restent inchangés entre les populations étudiées, mais la longueur des glandes est divergent ; ce qui peut traduire une plus grande quantité de mucus produite quand cette longueur est plus importante (Lodi *et al.* 2017).

En suivant de telles interprétations, la corrélation positive entre la densité locale et la longueur des dards, détectée dans la présente thèse, peut donc signifier que la capacité de transport du mucus est en quelque sorte dépendante de l'intensité de la compétition spermatique.

Néanmoins, tous les autres traits des dards et glandes multifides semblent ne pas être affectés par l'intensité de la compétition spermatique. Similairement, aucune différence de ces traits, ni d'ailleurs de la longueur des dards, n'a été détectée chez les quatre populations de l'espèce *Arianta arbustorum* investiguées par Lodi *et al.* (2017). Il est cependant à noter, que cette espèce utilise son dard facultativement dans environ 30% uniquement des accouplements (Baminger *et al.* 2000). Par conséquent, la sélection sexuelle chez cette espèce peut être faible ou cible probablement d'autres caractères que ceux relatifs aux dards et glandes multifides (Beese *et al.* 2006b).

En général, la capacité de transfert d'une plus grande quantité de mucus peut probablement être avantageuse pour le donneur du sperme ; spécialement dans des situations de compétition spermatique intenses. Cependant, pour le moment, il n'existe aucune évidence empirique de l'augmentation des chances de fécondation avec le transfert de plus de mucus. De plus, il n'est pas également connu si des glandes plus élaborées; à savoir d'une longueur plus importante et/ou possédant un plus grand nombre de branches; produit plus de mucus pouvant assurer une manipulation plus importante du partenaire.

V.4. Relation entre les traits des dards et des glandes multifides

Comme indiqué dans la partie résultats, des corrélations significatives positives sont détectées entre la longueur des deux lames du dard et entre la longueur de ces dernières et le périmètre ; alors qu'une corrélation significative négative est établie entre la longueur des glandes multifides et le nombre de leurs branches.

De tels résultats signifient probablement un développement connexe des différents traits des dards et des glandes multifides. Une tendance similaire est détectée également chez les populations des quatre espèces d'escargots terrestres investiguées par Lodi *et al.* (2017). En effet, une corrélation significative est détectée entre le nombre des branches, le périmètre et la longueur des lames des dards des espèces *Cornu aspersum* et *Helix locurum* (Lodi *et al.* 2017).

Conclusion générale et perspectives

Conclusions générale

La sélection sexuelle post-copulatoire est théoriquement supposée être responsable de l'évolution de la grande diversité de traits reproducteurs ; retrouvés chez de nombreux taxons de même que chez les espèces hermaphrodites simultanées, qui expriment les deux fonctions mâle et femelle à la fois (Schilthuisen 2005).

L'objectif prioritaire de la présente thèse était d'établir, empiriquement, une relation entre le mécanisme le plus largement étudié de la sélection sexuelle post-copulatoire; à savoir la compétition spermatique ; et l'évolution de certains traits reproducteurs extravagants et hautement sophistiqués chez une espèce hermaphrodite simultanée appartenant au groupe de gastéropodes stylommatophores.

Chez ces derniers, les accouplements multiples au cours de la même saison reproductrice, suivie d'un stockage du sperme reçu dans leurs appareils génitaux, semblent avoir contribué à l'évolution d'adaptations visant essentiellement à augmenter le succès reproducteur du donneur de sperme (Parker 1970, Andersson 1994). En contrepartie, la présence d'organes de stockage de sperme complexes et sophistiqués, semble améliorer le contrôle des processus de fécondation par la fonction femelle, ce qui conduit à des conflits entre les deux fonctions, mâle et femelle.

Ce projet est le premier à s'intéresser aux aspects reproducteurs de l'espèce méditerranéenne *Helix aperta*, notamment d'un point de vue évolutif. L'organe de stockage de sperme ainsi que le dard de cette espèce sont étudiés pour la première fois ; tout en essayant d'établir des liens probables entre leur développement et le mécanisme de la compétition spermatique, qui est théoriquement suggéré être une force évolutive majeure même chez les espèces hermaphrodites simultanées.

Les résultats obtenus, indiquent que l'organe de stockage de sperme « spermathèque » de l'espèce *Helix aperta* est d'une morphologie complexe et sophistiquée. Il est principalement constitué de tubules dont la longueur varie, non seulement entre les quatre populations étudiées, mais même entre les individus appartenant à une même population.

La spermathèque fait partie d'un organe entier appelé poche de fertilisation, pour former un complexe connu sous le nom de « poche de fertilisation-complexe de la spermathèque ».

Conclusion générale et perspectives

La poche de fertilisation, en plus d'une spermathèque, est constituée d'une chambre de fertilisation ; qui est probablement le site de fertilisation des ovules en l'utilisation du sperme stocké dans les tubules spermathécaux.

Bien que la variabilité remarquable du nombre des tubules spermathécaux, retrouvée même chez d'autres espèces d'escargots terrestres, soit théoriquement connectée à différentes intensités de compétition spermatique, nous n'avons néanmoins parvenu à établir aucun lien dans ce sens. En effet, le nombre des tubules spermathécaux dans cette étude n'était pas significativement corrélé à la densité locale des escargots, qui est considérée comme estimation directe de l'intensité de la compétition spermatique.

Ce résultat peut probablement indiquer que soit; la complexité de la spermathèque n'est pas influencée par l'intensité de la compétition spermatique, ou que l'humidité du microclimat et/ou la densité locale ne sont pas des mesures fiables de l'intensité de la compétition spermatique.

Cependant, nous avons pu établir un lien entre la densité locale et la longueur des tubules spermathécaux qui s'avère être un résultat très intéressant; puisque, non seulement la complexité, mais même la taille des organes de stockage de sperme est supposée être soumise aux pressions de la sélection sexuelle. En effet, l'évolution d'organes plus larges pour le stockage de sperme, pourrait permettre à la fonction femelle de recevoir plus de sperme et/ou de sélectionner les spermatozoïdes en fonction de leur qualité ; bénéficiant ainsi des accouplements multiples et d'un meilleur contrôle du processus de fécondation (voir Eberhard 1996, Pitnick *et al.* 1999, Miller & Pitnick 2002).

En somme, nos résultats sur l'espèce *Helix aperta*, suggèrent que la sélection sexuelle peut effectivement agir sur la structure de la spermathèque de cette dernière. Cette étude contribue donc à une meilleure compréhension de l'évolution de la diversité et de la complexité des organes de stockage de sperme observées chez les escargots terrestres et même chez beaucoup d'autres espèces animales.

Clairement, des études ultérieures sur d'autres organismes tout en incluant d'autres aspects, tels que les caractères comportementaux par exemple (voir Garefalaki *et al.* 2017 pour l'espèce *Cornu aspersum*) peuvent encore élargir notre compréhension des mécanismes de stockage de sperme chez les animaux en général.

Conclusion générale et perspectives

La deuxième partie du projet consistait en l'investigation des dards et des glandes multifides de l'espèce *Helix aperta*. En général, chez les espèces possédant un dard, la forme de ce dernier, ainsi que celle des glandes multifides, présente une grande variabilité qui peut être expliquée par des différences d'intensité de la compétition spermatique auxquelles elles sont confrontées (voir Lodi *et al.* 2017). En effet, au sein des populations présentant des densités importantes, les escargots font face à de nombreux compétiteurs pouvant ainsi bénéficier du transfert, vers le partenaire sexuel, de plus grandes quantités de mucus vu que l'effet de ce dernier semble être lié à la dose transmise (voir Koene & Chase 1998b).

Les résultats obtenus indiquent une différence significative dans, uniquement, la longueur des dards entre les quatre populations étudiées. Vu que ces dernières présentent des densités différentes, traduisant probablement différentes intensités de compétition spermatique, on peut conclure que la longueur des dards est positivement liée à cette dernière. L'intérêt d'avoir des dards d'une longueur plus importante, réside probablement dans l'amélioration de leur capacité de transport de mucus. Ceci peut s'avérer d'une grande utilité notamment dans des situations de compétition spermatique intenses.

Finalement, la conclusion la plus importante à tirer de la présente thèse, est que la sélection sexuelle sous forme de compétition spermatique peut également affecter les espèces hermaphrodites simultanées de même que les gonochoriques, malgré l'union des deux fonctions mâle et femelle dans le même individu. Par conséquent, les adaptations pouvant s'en engendrer, semblent permettre aux individus de faire face à la compétition sur la paternité de la descendance et de favoriser les uns par rapport aux d'autres. Cependant, il est difficile de confirmer que la compétition spermatique seule, soit responsable de toutes ces adaptations vu que le rôle du choix cryptique de la femelle n'est pas également à négliger (voir Eberhard 1996, Birkhead & Pizzari 2002, Snook 2005, Anthes *et al.* 2008, Orr & Brennan 2015). Il est donc important de ne pas considérer la compétition spermatique et le choix cryptique de la femelle comme deux mécanismes antinomiques et pouvant s'exclure mutuellement, mais qu'ils sont difficile à séparer l'un de l'autre.

Perspectives

En se basant sur les résultats obtenus dans la présente thèse, beaucoup de suggestions de travaux ultérieurs peuvent être proposées.

Conclusion générale et perspectives

Par exemple, la coévolution probable entre les adaptations de la fonction femelle avec celles de la fonction mâles serait un sujet intéressant à explorer. En effet, la morphologie complexe de la spermathèque chez ces espèces, peut vraisemblablement être liée à des dards et des glandes multifides plus élaborés. L'établissement d'une telle relation peut donc témoigner de l'existence d'une coévolution antagoniste entre ces traits chez cette espèce.

Une autre question d'une grande importance, concerne le mode de stockage et d'utilisation du sperme reçu de plusieurs partenaires chez ces espèces. Bien qu'un nombre d'hypothèses existent, néanmoins, aucune étude empirique n'a pu clarifier ce point.

Le mode de stockage et d'utilisation du sperme reçu, pourra être révélé, pour cette espèce, en réalisant des croisements ou des inséminations artificielles diverses, puis le suivi du sperme transféré afin de détecter son mode de distribution à travers les différents tubules de la spermathèque. Une fois la descendance engendrée, des analyses de paternité seront réalisées à l'aide de marqueurs microsatellites afin de déterminer le mode d'utilisation du sperme.

Enfin une question énigmatique, est la capacité de ces espèces à stocker le sperme dans un état viable pour de longues périodes. L'hypothèse théorique propose un rôle important de l'épithélium de la spermathèque, qui assure probablement la nutrition et la protection aux spermatozoïdes stockés (Bojat *et al.* 2001b). La révélation de la technique utilisée par ces animaux pour la maintenance du sperme, est prometteuse pour le développement de nouvelles techniques de conservation de cellules, tissus et sperme à part celles se basant sur la cryoconservation.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adamo S.A. & Chase R. (1990) The "Love Dart" of the snail *Helix aspersa* injects a pheromone that decreases courtship duration. *J. Exp. Zool.* 255: 80-87.
- Adiyodi K.G. (1988) Annelida. In *Reproductive Biology of Invertebrates. III. Accessory Sex Glands*. KG. Adiyodi & RG. Adiyodi (eds), pp. 189-250. Wiley, Chichester.
- Allen T.E. & Grigg G.W. (1957) Sperm transport in the fowl. *Aust. J. agric. Res.* 8(6): 788-789.
- Alvarino A. (1990) Chaetognatha. In *Reproductive Biology of Invertebrates. IV (Part B) Fertilization, Development, and Parental Care*. KG. Adiyodi & RG. Adiyodi (eds), pp. 255-282. Wiley, Chichester.
- Andersson M.B. (1994) *Sexual Selection*, Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Anthes N. (2010) Mate choice and reproductive conflict in simultaneous hermaphrodites. In *Animal behaviour: Evolution and mechanisms*. P. Kappeler (eds.), pp. 329–357. Heidelberg, Springer.
- Anthes N., Schulenburg H. & Michiels N.K. (2008) Evolutionary links between reproductive morphology, ecology and mating behavior in opisthobranch gastropods. *Evolution* 62: 900-916.
- Arnold S.J. (1994) Bateman principles and the measurement of sexual selection in plants and animals. *Am. Nat.* 144: 126-149.
- Arnqvist G. & Nilsson T. (2000) The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Anim. Behav.* 60: 145-164.
- Arnqvist G. & Rowe E.L. (2002) Antagonistic coevolution between the sexes in a group of insects. *Nature* 415: 787–789
- Arnqvist G. & Rowe L. (2005) *Sexual Conflict* Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Baer B. & Schmid-Hempel P. (2003) Effects of selective episodes in the field on life history traits in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Oikos* 101: 563–568.
- Bairati A. (1968) Structure and ultrastructure of the male reproductive system of *Drosophila melanogaster* Meig. 2. The genital duct and accessory glands. *Monit. Zool. Ital.* 2: 105-182.
- Bakst M.R. & Richards M.P. (1985) Concentrations of selected cations in turkey serum and oviductal mucosae. *Poult. Sci.* 64: 555–563.
- Bakst M.R. (1985) Zinc reduces turkey sperm oxygen uptake *in vitro*. *Poult. Sci.* 64: 564–566.

Références bibliographiques

- Bakst M.R. (2011) Role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. *J. Anim. Sci.* 89: 1323–1329.
- Bakst M.R., Wishart G. & Brullard J.P. (1994) Oviductal sperm selection, transport, and storage in poultry. *Poult. Sci. Rev.* 5: 117–143.
- Baminger H. & Haase M. (1999) Variation in spermathecal morphology and amount of sperm stored in populations of the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. *J. Zool. Lond.* 249: 165–171.
- Baminger H. & Haase M. (2000) Variation of distal genitalia in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum* (Pulmonata, Stylommatophora) caused by sexual selection? *Biol. J. Linn. Soc.* 71: 599–613.
- Baminger H. & Haase M. (2002) Development of the sperm storage organ in *Arianta arbustorum* (Stylommatophora: Helicidae). *J. Moll. Stud.* 68: 192–194.
- Baminger H., Locher R. & Baur B. (2000) Incidence of dart shooting, sperm delivery and sperm storage in natural populations of the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. *Can. J. Zool.* 78: 1767–1774.
- Barrett S.C.H. (2002) The evolution of plant sexual diversity. *Nat. Rev. Genet.* 3: 274–284.
- Bateman A.J. (1948) Intra-sexual Selection in *Drosophila*. *Heredity* 2: 349–368.
- Baur B. (1988) Population regulation in the land snail *Arianta arbustorum*: density effects on adult size, clutch size and incidence of egg cannibalism. *Oecologia* 77: 390–394.
- Baur B. (1994) Multiple paternity and individual variation in sperm precedence in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 35: 413–421.
- Baur B. (1998a) Repeated mating and female fecundity in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. *Invert. Reprod. Dev.* 14: 197–204.
- Baur B. (1998b) Sperm competition in molluscs. In *Sperm competition and sexual selection*. TR. Birkhead & AP. Møller (eds.), pp. 255–305. London, Academic Press.
- Baur B. (2010). Stylommatophoran gastropods. In *The Evolution of Primary Sexual Characters in Animals*. JL. Leonard & A. Cordoba-Aguilar (eds), pp. 197–217. Oxford, Oxford University Press.
- Baur B., Locher R. & Baur A. (1998) Sperm allocation in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. *Anim. Behav.* 56(4): 839–845.
- Beese K. & Baur B. (2006a) Expandable spermatheca influences sperm storage in the simultaneously hermaphroditic snail *Arianta arbustorum*. *Invert. Reprod. Dev.* 49: 93–101.

Références bibliographiques

- Beese K., Armbruster G.F.J., Beier K. & Baur B. (2008) Evolution of female sperm-storage organs in the carrefour of stylommatophoran gastropods. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 47: 49–60.
- Beese K., Beier K. & Baur B. (2006b). Coevolution of male and female reproductive traits in a simultaneously hermaphroditic land snail. *J. Evol. Biol.* 19: 410–418.
- Benbellil- Tafoughalt S., Sahnoune M., de Vaufleury A. & Moali A. (2009) Effects of temperature and photoperiod on growth and reproduction of the land snail *Helix aperta* Born (Gastropoda, Pulmonata). *Rev. Ecol. (Terre et Vie)* 64: 207–219
- Benbellil-Tafoughalt S. & Koene MJ. (2015) Influence of season, temperature, and photoperiod on growth of the land snail *Helix aperta*. *Invert. Reprod. Dev.* 59: 37–43.
- Benbellil-Tafoughalt S., Sahnoune M., de Vaufleury A. & Moali A. (2011) Influence of sampling date on reproduction in the land snail *Helix aperta* kept under controlled conditions of temperature and photoperiod. *Rev. Ecol. (Terre Vie)* 66: 43–54.
- Berglund A., Widemo M.S. & Rosenqvist G. (2005) Sex-role reversal revisited: choosy females and ornamented, competitive males in a pipefish. *Behav. Ecol.* 16(3): 649-655.
- Bernard R.T. & Cumming G.S. (1997) African bats: evolution of reproductive patterns and delays. *Q. Rev. Biol.* 72 (3): 253-74.
- Bertram M.J., Neubaum D.M. & Wolfner M.F. (1996) Localization of the *Drosophila* male accessory gland protein Acp36DE in the mated female suggests a role in sperm storage. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 26: 971-980.
- Birkhead T.R. & Møller A.P. (1992) number and size of sperm storage tubules and the duration of sperm storage in birds: a comparative study. *Biol. J. Linn. Soc.* 45: 363–372.
- Birkhead T.R. & Møller A.P. (1993) Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. *Biol. J. Linn. Soc.* 50: 295–3.
- Birkhead T.R. & Møller A.P. (1998) Sperm competition and sexual selection. Academic Press, San Diego.
- Birkhead T.R. & Pizzari T. (2002) Postcopulatory sexual selection. *Nat. Rev. Genet.* 3(4): 262-73.
- Birkhead T.R. (1998a) Cryptic female choice: Criteria of establishing female sperm choice. *Evolution* 52: 1212-1218.
- Birkhead T.R. (1998b) Sperm competition in birds. *Reviews of Reproduction* 3: 123-129.
- Birkhead T.R., Martinez J.G., Burke T. & Froman D.P. (1999) Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 266: 1759-1764.

Références bibliographiques

- Bobr L.W., Ogasawara F.X. & Lorenz F.W. (1964) Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds II. Transport of spermatozoa in the fowl oviduct. *J. Reprod. Fertil.* 8: 49–58.
- Bojat N.C. & Haase M. (2002) Sperm storage in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. *Journal of Zoology* 258: 497–503.
- Bojat N.C., Dürrenberger M. & Haase M. (2001a) The spermatheca in the land snail, *Arianta arbustorum* (Pulmonata: stylommatophora): Muscle system and potential role in sexual selection. *Invert. Biol.* 120: 217–226.
- Bojat N.C., Sauder U. & Haase M. (2001b) The spermathecal epithelium, sperm and their interactions in the hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum* (Pulmonata, Stylommatophora). *Zoomorphology* 120: 149–157.
- Bojat N.C., Sauder U. & Haase M. (2002) Functional anatomy of the sperm storage organs in Pulmonata: the simple spermatheca of *Bradybaena fructicum* (Gastropoda, Stylommatophora). *Zoomorphology* 121: 243–255.
- Bouléreau-merle J. (1977) Rôle des spermathèques dans l'utilisation du sperme et la stimulation de l'ovogénèse chez *Drosophila melanogaster*. *J. Insect. Physiol.* 23: 1099-1104.
- Brillard J.P. & Antoine H. (1990) Storage of sperm in uterovaginal junction and its incidence on the numbers of spermatozoa present in the perivitelline layer of hen's eggs. *Br. Poultry Sci.* 31: 635-644.
- Brillard J.P. (1993) Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. *Poult. Sci.* 72: 923–928.
- Briskie J.V. & Montgomerie R. (1992) Sperm size and sperm competition in birds. *Proc. R. soc. Lond. B* 247: 89-95.
- Briskie J.V. (1996) Spatiotemporal patterns of sperm storage and last male sperm precedence in birds. *Funct. Ecol.* 10: 375–383.
- Brisson P., Régondaud J., Collin J.P. & Françoise Chevalier (1977) systèmes aminergiques des gastéropodes pulmonés. II. Mise en évidence au carrefour des voies génitales par la méthode FIF. *Ann. Biol. Anim. Bioch. biophys.* 17(6): 1077-1086.
- Burke W.H. & Ogasawara F.X. (1969) Presence of spermatozoa in uterovaginal fluids of the hen at various stages of the ovulatory cycle. *Poult. Sci.* 48: 408–413.
- Buzatto B., Roberts D. & Simmons L. (2015) Sperm competition and the evolution of precopulatory weapons: increasing male density promotes sperm competition and reduces selection on arm strength in a chorusing frog. *Evolution* 69: 2613–2624.
- Cameron R.A.D. (1973) Some woodland mollusc faunas from Southern England. *Malacologia* 14: 355-371.

Références bibliographiques

- Cesari P. (1978) La malacofauna del territorio italiano. 1° contributo : il genere *Helix*. *Conchiglie* 14: 35-89.
- Chapman T. (2006) Evolutionary conflicts of interest between males and females. *Curr. Biol.* 16: R744-R754.
- Chapman T., Arnqvist G., Bangham J. & Rowe L. (2003) Sexual conflict. *Trends Ecol. Evol.* 18: 41–47.
- Charlesworth D. & Charlesworth B. (1981) Allocation of resources to male and female functions in hermaphrodites. *Biol. f. Linn. Soc.* 15: 57-74.
- Charnov E.L. (1979b) Simultaneous hermaphroditism and sexual selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 2480-2484.
- Charnov E.L. (1979a) The genetical evolution of patterns of sexuality: Darwinian fitness. *Am. Nat.* 113: 465–480.
- Charnov E.L. (1982) *The Theory of Sex Allocation*. Princeton University Press, Princeton, NJ
- Charnov E.L. (1996) Sperm competition and sex allocation in simultaneous hermaphrodites. *Evol. Ecol.* 10: 457-462.
- Charnov E.L., Maynard Smith J. & Bull J.J. (1976) Why be an hermaphrodite? *Nature* 263: 125-126.
- Chase R. & Blanchard K.C. (2006) The snail's love-dart delivers mucus to increase paternity. *Proc. R. Soc. B* 273: 1471-1475.
- Chase R. & Darbyson E. (2008) Differential survival of allosperm by location within the female storage organ of the snail *Cornu aspersum* (Müller, 1774). *Can. J. Zool.* 86: 1244–1251.
- Chase R. & Vaga K. (2006) Independence, not conflict, characterizes dart-shooting and sperm exchange in a hermaphroditic snail. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 59: 732–739.
- Chase R. (2007) The function of dart shooting in helcid snails. *Am. Malacol. Bull.* 23: 183-189.
- Chase R., Darbyson E., Horn K.E. & Samarova E. (2010) A mechanism aiding simultaneously reciprocal mating in snails. *Can. J. Zool.* 88: 99-107.
- Chase R., Pryer K., Baker R. & Madison D. (1978) Responses to conspecific chemical stimuli in the terrestrial snail *Achatina fulica* (Pulmonata: Sigmurethra)1. *Behav. Biol.* 22(3): 302-315.
- Chung D.J.D. (1986) Stimulation of genital eversion in the land snail *Helix aspersa* by extracts of the glands of the dart apparatus. *J. Exp. Zool.* 238: 129-139.

Références bibliographiques

- Chung D.J.D. (1987) Courtship and dart shooting behavior of the land snail *Helix aspersa*. *Veliger* 30: 24–39.
- Clark J. (2001) Evidence of a neural loop involved in controlling spermathecal contractions in *Locusta migratoria*. *J. Insect. Physiol.* 47 (6): 607–616.
- Clausen C.P. (1939) The effect of host size upon the sex ratio of hymenopterous parasites and its relation to methods of rearing and colonization. *J. N. Y. Entomol. Soc.* 47: 1–9.
- Cordeo-Rivera A. (2017) Sexual conflict and the evolution of genitalia: male damselflies remove more sperm when mating with a heterospecific female. *Sci. Rep.* 7: 7844.
- Cox LR. (1960) General characteristics of Gastropoda. In *Treatise on Invertebrate Paleontology, Part I, Mollusca 1*. RC. Moore (eds), pp. 184–1169, Geological Society of America and University of Kansas Press, Lawrence.
- Crudginton H.S. & Siva-Jothy M.T. (2000) Genital damage, kicking and early death. *Nature* 407: 855-856.
- Darwin C. (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*. John Murray, London.
- Darwin C. (1871) *The descent of man, and selection in relation to sex*. John Murray, London, UK.
- Davey K.G. & Webster G.F. (1967) The structure and secretion of the spermatheca of *Rhodnius Prolixus* Stal: A histochemical study. *Can. J. Zool.* 45: 653-657.
- Davey K.G. (1965) *Reproduction in the Insects*. Oliver and Boyd, UK.
- Davis N.T. (1965) Studies of the reproductive physiology of Cimicidae (Hemiptera)-II. Artificial insemination and the function of the seminal fluid. *J. Insect. Physiol.* 11: 355-366.
- Davison A., Wade C.M., Mordan P.B. & Chiba S. (2005) Sex and darts in slugs and snails (Mollusca: Gastropoda: Stylommatophora). *J. Zool. Lond.* 267: 329–338.
- Davison A., Wade C.M., Mordan P.B. & Chiba S. (2006) Sex and darts in slugs and snails (Mollusca: Gastropoda: Stylommatophora). *J. Zool.* 267: 329-338.
- de Vaufléury A. & Gimbert F. (2009) Obtention du cycle de vie complet d'*Helix aperta* Born de sites tunisiens en conditions contrôlées : influence de la photopériode. *C. R. Biologie* 332: 795–805.
- Diesel R. (1989) Structure and function of the reproductive system of the symbiotic spider crab *Inachus Phalangium* (Decapoda: Majidae): Observations on Sperm Transfer, Sperm Storage, and Spawning. *J. Crust. Biol.* 9: 266-277.

Références bibliographiques

- Dillen L., Jordaens K. & Backeljau T. (2009) Sperm transfer, sperm storage, and sperm digestion in the hermaphroditic land snail *Succinea putris* (Gastropoda, Pulmonata). *Invert. Biol.* 128: 97-106.
- Diver C. (1940) The problem of closely related species living in the same area. *New Systematics* 303: 328.
- Drobnis E.Z. & Overstreet J.W. (1992) Natural history of mammalian spermatozoa in the female reproductive tract. In *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. SR. Milligan (eds), pp. 1-45. Oxford University Press, New York.
- Dybas L.K. & Dybas H.S. (1981) Coadaptation and taxonomic differentiation of sperm and spermathecae in featherwing beetles. *Evolution* 35(1): 168-174.
- Dziminski M.A., Roberts J.D., Beveridge M. & Simmons L.W. (2010) Among-population covariation between sperm competition and ejaculate expenditure in frogs. *Behav. Ecol.* 21: 322- 328.
- Eady P. (1994) Sperm transfer and storage in relation to sperm competition in *Callosobruchus maculatus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 35: 123-129.
- Eberhard W.G. (1985) *Sexual Selection and Animal Genitalia*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Eberhard W.G. (1991) Copulatory courtship and cryptic female choice in insects. *Biological review* 66: 1-31.
- Eberhard W.G. (1996) *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Eberhard W.G. (2000) Criteria for demonstrating postcopulatory female choice. *Evolution* 54: 1047-1050.
- Edvardsson M. & Arnqvist G. (2000) Copulatory courtship and cryptic female choice in red flour beetles *Tribolium castaneum*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267: 1-5.
- Edward D.A., Stockley P. & Hosken D.J. (2015) Sexual conflict and sperm competition. *Cold Spring. Harb. Perspect. Biol.* 7: a017707.
- Elliot J.M. (1971) Some methods for the statistical analysis of samples of benthic invertebrates. *Freshwater Biol. Assoc. Sci. Publ.* 25: 1-144.
- Evanno G. & Madec L. (2007) Variation morphologique de la spermathèque chez l'escargot terrestre *Cantareus aspersus*. *C. R. Biologies* 330(10): 722-727.
- Evanno G., Madec L. & Arnaud J.F. (2005) Multiple paternity and postcopulatory sexual selection in a hermaphrodite: what influences sperm precedence in the garden snail *Helix aspersa*. *Mol. Ecol.* 14: 805-812.

Références bibliographiques

- Filosi M. & Perotti M. (1975) Fine structure of the spermatheca of *Drosophila melanogaster* Meig. *J. Submicrosc. Cytol.* 7: 259–270
- Fischlschweiger W. (1991) Ultrastructure of the seminal receptacle, ovovitelline duct, and yolk-funnel cell of *Dugesia tigrina* (Platyhelminthes: Tricladida). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 110: 300-314.
- Fischlschweiger W. (1994) Ultrastructure of the reproductive system of *Cura foremanii* (Platyhelminthes, Tricladida). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 113: 1-14.
- Gack C. & Peschke K. (1994) Spermathecal morphology, sperm transfer and a novel mechanism of sperm displacement in the rove beetle *Aleochara curtula* (Coleoptera, Staphylinidae). *Zoomorphology* 114: 227-237.
- Gage M.J.G (1995) Continuous variation in reproductive strategy as an adaptive response to population density in the moth *Plodia interpunctella*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 261: 25–30.
- Gardner A. & Ross L. (2011) The evolution of hermaphroditism by an Infectious Male-Derived Cell Lineage: An Inclusive-Fitness Analysis. *Am. Nat.* 178: 191-201.
- Garefalaki M.E., Kalyva S., Janicke T. & Staikou A. (2017) Intraspecific variation in reproductive characters is associated with the strength of sexual selection in the hermaphroditic land snail *Cornu aspersum*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 71(10): 150.
- Garefalaki M.E., Triantafyllidis A., Abatzopoulos T.J. & Staikou A. (2010) The outcome of sperm competition is affected by behavioural and anatomical reproductive traits in a simultaneously hermaphroditic land snail. *J. Evol. Biol.* 23: 966–976.
- Gavrilets S. (2000) Rapid evolution of reproductive barriers driven by sexual conflict. *Nature* 403: 886-889.
- Germain L. (1930) Mollusques terrestres et fluviatiles (1ère partie). In *Faune de France, Paris*. P. Lechevalier (eds), 21: 1–477.
- Germain L. (1931) Mollusques terrestres et fluviatiles (2e partie), 26 planches. In *Faune de France, Paris*. P. Lechevalier (eds), 22: 478–897.
- Ghiselin M.T. (1969) The evolution of hermaphroditism among animals. *Quart. Rev. Biol.* 44: 189-208.
- Gillott C. (2003) Male accessory gland secretions: Modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annul. Rev. Entomol.* 48: 163-184.
- Gist D.H. & Jones J.M. (1989) Sperm storage within the oviduct of turtles. *Journal of Morphology* 199 (3): 379-384.

Références bibliographiques

- Giusti F. & Andreini S. (1988) Morphological and ethological aspects of mating in two species of the family Helicidae (Gastropoda Pulmonata): *Theba pisana* (Müller) and *Helix aperta* (Born). *Ital. J. Zool.* 22: 331–363
- Giusti F., Manganelli G. & Schembri P.J. (1995) The non-marine molluscs of the Maltese Islands. *Museo Regionale di Scienze Naturali Torino Monographie* 15: 486-497.
- Gleason H.A. (1920) Some applications of the quadrat method. *Bull. Torrey Bot. Club* 47(1): 21-33.
- Gomendio M., Harcourt A.H. & Roldan E.R.S. (1998) Sperm competition in mammals. In *Sperm Competition and Sexual Selection*. TR. Birkhead & AP. Møller (eds), pp. 667–751, Academic Press, London,
- Goodfriend G.A. (1986) Variation in land-snail shell form and size and its causes: A review. *Syst. Zool.* 35(2): 204-223.
- Greeff J.M. & Michiels N.K. (1999) Sperm digestion and reciprocal sperm transfer can drive hermaphrodite sex allocation to equality. *Am. Nat.* 153: 421–430.
- Haase M. & Baur B. (1995) Variation in spermathecal morphology and storage of spermatozoa in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. *Invert Reprod Dev* 28: 33–41.
- Hallberg E. (1984) The spermathecal complex in *Ips typographus* (L.): Differentiation of the spermathecal gland related to age and reproductive state. *J. Insect. Physiol.* 30: 197-202.
- Heath D.J. (1977) Simultaneous hermaphroditism: cost and benefit. *J. Theor. Biol.* 64: 363 373.
- Heath D.J. (1979) Brooding and the evolution of hermaphroditism. *J. Theor. Biol.* 81: 151–155.
- Hellriegel B. & Ward P.I. (1998) Complex female reproductive tract morphology: its possible use in postcopulatory female choice. *J. Theor. Biol.* 190: 179-186.
- Henderson P. A. (2003) Practical methods in ecology. Oxford, Blackwell Publishing.
- Hoffer J.N.A., Schwegler D., Ellers J. & Koene J.M. (2012) Mating rate influences female reproductive investment in a simultaneous hermaphrodite, *Lymnaea stagnalis*. *Anim. Behav.* 84: 523–529.
- Holt W.V. & Lloyd R.E. (2010) Sperm storage in the vertebrate female reproductive tract: How does it work so well? *Theriogenology.* 73: 713–722.
- Holt W.V. (2011) Mechanisms of sperm storage in the female reproductive tract: an interspecies comparison. *Reprod. Domest. Anim.* 46: 68–74.

Références bibliographiques

- Hotzy C. & Arnqvist G. (2009) Sperm competition favors harmful males in seed beetles. *Curr. Biol.* 19: 404-407.
- Houston A.I., Székely T. & McNamara J.M. (2005) Conflict over parental care. *Trends Ecol. Evol.* 20: 33–38.
- Hunter R.H. & Léglise P.C. (1971) Tubal surgery in the rabbit: fertilization and polyspermy after resection of the isthmus. *Am. J. Anat.* 132 (1): 45-52.
- Hunter R.H.F. (1973) Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 183 (1): 57-64.
- Hunter R.H.F. (1988) *The Fallopian Tubes: Their Role in Fertility and Infertility*. Berlin, Heidelberg & New York, Springer-Verlag.
- Hunter R.H.F. (1995) Ovarian endocrine control of sperm progression in the Fallopian tubes. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 17: 85–125.
- Ito T., Yoshizaki N., Tokumoto T., Ono H., Yoshimura T., Tsukada A., Kansaku N. & Sasanami T. (2011) Progesterone is a sperm-releasing factor from the sperm storage tubules in birds. *Endocrinology* 152: 3952–3962.
- Janicke T. & Schärer L. (2009) Determinants of mating and sperm-transfer success in a simultaneous hermaphrodite. *J. Evol. Biol.* 22: 405–415.
- Jarne P. & Auld J.R. (2006) Animals mix it up too: The distribution of self-fertilization among hermaphroditic animals. *Evolution* 60: 1816–1824.
- Jarne P. & Charlesworth D. (1993) The evolution of the selfing rate in functionally hermaphroditic plants and animals. *Annu. Rev. Ecol. System.* 24: 441-466.
- Jarne P., Vianey-Liaud M. & Delay B. (1993) Selfing and outcrossing in hermaphroditic freshwater gastropods (Basommatophora): where, when and why. *Biol. J. Linn. Soc.* 49: 99-125.
- Jennions M.D. & Petrie M. (2000) Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biolo. Rev.* 75: 21-64.
- Jeppesen L.L. (1976) The control of mating behaviour in *Helix pomatia* L. (Gastropoda: Pulmonata). *Anim. Behav.* 24(2): 275-290.
- John G. (1933) Habits, structure and development of *Spadella oephaloptera*. *Quart J. Microsc. Sci.* 75: 625-696.
- Jordaens K., Pinceel J. & Backeljau T. (2005) Mate choice in the hermaphroditic land snail *Succinea putris* (Stylommatophora, Succineidae). *Anim. Behav.* 70: 329-337.

Références bibliographiques

Joyeux C. & Baer J. (1961) Classe des Cestodes. In *Traite de Zoologie, Vol. IV, Platyhelminthes, Mésozoaires, Acanthocephales, Nemertélls*. PP. Grasse (eds), pp 347- 560, Masson et Cie, Paris.

Jungnickel M.K., Molinia F.C., Harman A.J. & Rodger J.C. (2000) Sperm transport in the female reproductive tract of the brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*, following super ovulation and artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 59: 213–228.

Kempnaers B., Foerster K., Questiau S., Robertson B.C. & Vermeirssen E.L.M. (2000) Distinguishing between female sperm choice versus male sperm competition: A comment on Birkhead. *Evolution* 54: 1050-1052.

Kerney M.P. & Cameron R.A.D. (1979) A field guide to the land snails of Britain and NW Europe. *William Collins Sons & Co Ltd, London*, p 288.

Kimura K. & Chiba S. (2013) Delayed spermatophore removal in the land snail *Euhadra peliomphala*. *Biol. J. Linn. Soc.* 108: 806–811.

Koentzopoulos E. & Staikou A. (2007) Variation in spermathecal morphology is independent of sperm competition intensity in populations of the simultaneously hermaphroditic land snail *Cornu aspersum*. *Zoology* 110: 139-146.

Koene J.M. (1999) Behavioural and neurobiological aspects of dart shooting in the garden snail *Helix aspersa*. PhD thesis. Department of biology, McGill University, Montréal. 126 pp.

Koene J.M. & Chase R. (1998a) Changes in the reproductive system of the snail *Helix aspersa* caused by mucus from the love dart. *J. Exp. Biol.* 201: 2313–2319.

Koene J.M. & Chase R. (1998b) The love dart of *Helix aspersa* Müller is not a gift of calcium. *J. Moll. Stud.* 64: 75-80.

Koene J.M. & Chiba S. (2006) The way of the samurai snail. *Am. Nat.* 168: 553-555.

Koene J.M. & Schulenburg H. (2005) Shooting darts: co-evolution and counter-adaptation in hermaphroditic snails. *BMC Evol. Biol.* 5:25.

Koene J.M. & ter Maat A. (2001) “Allohormones”: A class of bioactive substances favoured by sexual selection. *J. Comp. Physiol. A* 187: 323–326.

Koene J.M., Brouwer A. & Hoffer J.N.A. (2009) Reduced egg laying caused by a male accessory gland product opens possibility for sexual conflict in a simultaneous hermaphrodite. *Anim. Biol.* 59: 435–448.

Koene J.M., Sloot W., Montagne-Wajer K., Cummins S.F. Degnan B.M., Smith J.S., Nagle G.T. & Ter Maat A. (2010) Male accessory gland protein reduced egg laying in a simultaneous hermaphrodites. *PLoS One* 5: e10117.

Koene J.M., Sundermann G. & Michiels N.K. (2002) On the function of body piercing during copulation in earthworms. *Invert. Reprod. Dev.* 41: 35–40.

Références bibliographiques

- Koene J.M., Montagne-Wajer K. & Ter Maat A. (2006) Effects of frequent mating on sex allocation in the simultaneously hermaphroditic great pond snail. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 60: 332-338.
- Koene J.M., Pfortner T. & Michiels N.K. (2005) Piercing the partner's skin influences sperm storage in earthworms. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 59: 243-9.
- Kothbauer H. (1988) Über Liebespfeile, Schnecken und Weltbilder. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien* 90B: 163-169.
- Krebs C.J. (1999) *Ecological methodology*. New York: Addison-Welsey Educational Publishing.
- Kress A. & Morson G. (2007) Changes in the oviducal epithelium during the estrous cycle in the marsupial *Monodelphis domestica*. *J. Anat.* 211(4): 503-17.
- Krutzsch P.H. & Crichton E.G. (1991) Fertilization in Bats. In *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*. BS. Dunbar & M. O'Rand (eds), pp. 137-149, Plenum Press, New York.
- Ktari M.H. & Rezig M. (1976) La faune malacologique de la Tunisie septentrionale. *Bull. Soc. Sc. Nat. Tunisie* 11: 31-74.
- Kuwamura T., Nakashima Y. & Yago Y. (1994) Sex change in either direction by growth-rate advantage in the monogamous coral goby, *Paragobiodon echinocephalus*. *Behav. Beal.* 5: 434-438.
- Kvarnemo C. & Simmons L.W. (2013) Polyandry as a mediator of sexual selection before and after mating. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368(1613): 20120042.
- Landolfi M.A., Green D.M. & Chase R. (2001) Dart shooting influences paternal reproductive success in the snail *Helix aspersa* (Pulmonata, Stylommatophora). *Behav. Ecol.* 12: 773-777.
- Lange R., Reinhardt K., Michiels N.K., & Anthes N. (2013) Functions, diversity, and evolution of traumatic mating. *Biol. Rev.* 88: 585-601.
- Leonard J.L. (1991) Sexual conflict and the mating systems of simultaneously hermaphroditic gastropods. *Am. Malacol. Bull.* 9: 45-58.
- Leonard J.L. (1992) The "love-dart" in Helicid snails: a gift of calcium or a firm commitment? *J. Theor. Biol.* 159: 513-21.
- Leonard J.L., Pearse J.S. & Harper A.B. (2002) Comparative reproductive biology of *Ariolimax californicus* and *A. dolichophallus* (Gastropoda: Stylommatophora). *Invertebr. Reprod. Dev.* 41: 83-93.

Références bibliographiques

- Lind H. (1973) The functional significance of the spermatophore and the fate of spermatozoa in the genital tract of *Helix pomatia* (Gastropoda: Stylommatophora). *J. Zool. Lond.* 169: 39–64.
- Lind H. (1976) Causal and functional organization of the mating behaviour sequence in *Helix pomatia* (Pulmonata, Gastropoda). *Behaviour* 59: 162–201.
- Lodi M. & Koene J.M. (2016) The love-darts of land snails: Integrating physiology, morphology and behaviour. *J. Molluscan Stud.* 82: 1–10.
- Lodi M., Staikou A., Janssen R. & Koene J.M. (2017) High level of sperm competition may increase transfer of accessory gland products carried by the love-dart of land snails. *Ecol. Evol.* 7(24): 11148-11156.
- Longo F.J. (1997) “fertilization”, 2nd ed. Chapman and Hall, London.
- Madec L., Coutellec-Vreto M.A. & Desbuquois C. (1998) Size- fecundity relationships in the land snail *Helix aspersa*: preliminary results on a form outside the norm. *Invert. Repr. Dev.* 34: 83-90.
- Martin O.Y. & Hosken D.J. (2003) The evolution of reproductive isolation through sexual conflict. *Nature* 423: 979-982.
- Martoja R. (1977) Organes génitaux femelles: Voies génitales et glandes annexes. In *Traite de Zoologie, Anatomie, Systematique, Biologie: Insectes: Gametogeneses, Fecondation, Metamorphoses*, 8. PP. Grasse & VA. Fascicule (eds), pp. 1–123. Masson, Paris.
- Michiels N.K. & Koene J.M. (2006) Sexual selection favors harmful mating in hermaphrodites more than in gonochorists. *Integr. Comp. Biol.* 46: 473–480.
- Michiels N.K. & Newman L.J. (1998) Sex and violence in hermaphrodites. *Nature* 391: 647.
- Michiels N.K. (1998) Mating conflicts and sperm competition in simultaneous hermaphrodites. In *Sperm competition and sexual selection*. TR. Birkhead & AP. Møller (eds), pp 219–254, Academic Press, London.
- Michiels N.K., Beukeboom L.W., Greeff J.M. & Pemberton A.J. (1999) Individual control over reproduction: an underestimated element in the maintenance of sex? *J. Evol. Biol.* 12: 1036-1039.
- Miller C.W. (2013) Sexual selection: male-male competition. In *The Princeton guide to evolution*. JB. Losos (eds), pp. 641-646. Princeton University Press, Princeton.
- Miller G.T. & Pitnick S. (2002) Sperm-female coevolution in *Drosophila*. *Science* 298(5596): 1230-3.
- Miller G.T. & Pitnick S. (2003) Functional significance of seminal receptacle length in *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 16: 114–126

Références bibliographiques

- Minder A.M., Hosken D.J. & Ward P.I. (2005) Co-evolution of male and female reproductive characters across the Scathophagidae (Diptera). *J. Evol. Biol.* 18: 60-69.
- Minoretti N., Schmera D., Kupfernagel S., Zschokke S., Armbruster G.F.J, Beese K., Baur A. & Baur B. (2011) Determinants of female and male reproductive success in a simultaneous hermaphrodite land snail. *Anim. Behav.* 82: 707–715
- Møller A.P. & Birkhead T.R. (1989) Copulation behaviour of mammals: evidence that sperm competition is widespread. *Biol. J. Linn. Soc.* 38: 119–131.
- Moore H.D.M. (1981) Glycoprotein secretions of the epididymis in the rabbit and hamster: Localization on epididymal spermatozoa and the effect of specific antibodies on fertilization *in vivo*. *J. Exp. Zool.* 215: 77-85.
- Morgan M.T. (1994) Models of sexual selection in hermaphrodites, especially plants. *American Naturalist* 144: 100–125.
- Morris D.W. & MacEachern J.T. (2010) Sexual conflict over habitat selection: the game and a test with small mammals. *Evol. Ecol. Res.* 12: 507-522.
- Morris S.A., Howarth B. Jr., Crim J.W., Rodriguez de Cordoba A., Esponda P. & Bedford J.M. (1987) Specificity of sperm-binding Woffian duct proteins in the rooster and their persistence on spermatozoa in female host glands. *J. Exp. Zool.* 242: 189-198.
- Morrow E. & Gage M. (2000) The evolution of sperm length in moths. *Proc. R. Soc. Biol. Sci.* 267(1440): 307-13.
- Murray J. (1964) Multiple mating and effective population size in *Cepaea nemoralis*. *Evolution* 18: 283–291.
- Nakadera Y. & Koene J.M. (2013) Reproductive strategies in hermaphroditic gastropods: conceptual and empirical approaches 1. *Can. J. Zool.* 91: 367-381.
- Nakadera Y., Swart E.M., Hoffer J.N.A., den Boon O., Ellers J. & Koene J.M. (2014) Receipt of seminal fluid proteins causes reduction of male investment in a simultaneous hermaphrodite. *Curr. Biol.* 24: 859–862.
- Nakashima Y., Kuwamura T. & Yoga Y. (1995) Why be a both-ways sex changer. *Ethology* 101: 301-307.
- Needham A.E. (1990) Annelida-Clitellata. In *Reproductive Biology of Invertebrates. IV (Part B) Fertilization, Development and Parental Care*. KG. Adiyodi & RG. Adiyodi (eds), pp. 1-36. Wiley, Chichester.
- Neubaum D.M. and Wolfner M.F. (1999) Wise, winsome, or weird? Mechanisms of sperm storage in female animals. *Curr. Top. Dev. Biol.* 41: 67–97.

Références bibliographiques

- Normark B.B. (2009) Unusual gametic and genetic systems. *In Sperm biology: an evolutionary perspective*. DJ. Hosken & T. Birkhead (eds), pp. 507–538, Academic Press, Amsterdam.
- Novo M., Riesgo A., Roldán R., Giribet G. & Díaz Cosín D.J. (2012) A place for nourishment or a slaughterhouse? Elucidating the role of spermathecae in the terrestrial annelid *Hormogaster elisae* (Clitellata: Opisthopora: Hormogastridae). *Zoomorphology* 131: 171-184.
- Olsson M., Schwartz T., Uller T. & Healey M. (2007) Sons are made from old stores: sperm storage effects on sex ratio in a lizard. *Biol. Lett.* 3: 491–493.
- Oosterhoff L.M. (1977) Variation in growth rate as an ecological factor in the land snail *Cepaea nemoralis* (L.). *Neth. J. Zool.* 27: 1–132.
- Oppliger A., Hosken D. & Ribi G. (1998) Snail sperm production characteristics vary with sperm competition risk. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265: 1527–1534.
- Orr T.J. & Brennan P.L. (2015) Sperm storage: distinguishing selective processes and evaluating criteria. *Trends Ecol. Evol.* 30: 261-272.
- Pamilo P. (1991) Lifespan of queens in the ant *Formica exsecta*. *Ins. Soc.* 38: 111–119.
- Parker G.A. & Partridge L. (1998) Sexual conflict and speciation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353: 261-274.
- Parker G.A. & Pizzari T. (2010) Sperm competition and ejaculate economics. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 85(4): 897-934.
- Parker G.A. (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 45: 525-567.
- Parker G.A. (1979) Sexual selection and sexual conflict. In *Sexual selection and reproductive competition in insects*. MS. Blum & NA. Blum (eds), pp. 123-166, Acad. Press, New York.
- Parker G.A. (1984) Sperm competition and the evolution of animal mating systems. In *Sperm competition and the evolution of mating systems*. RL. Smith (eds), pp. 223-249, Academic Press, New York.
- Parker G.A. (1998) Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. In *Sperm competition and sexual selection*. TR. Birkhead & AP. Møller (eds), pp. 3–54, London, Academic Press.
- Parker G.A. (2006) Sexual conflict over mating and fertilization: an overview. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* 361: 235-259.
- Parker G.A., Smith V.G.F. & Baker R.R. (1972) Origin and evolution of gamete dimorphism and male-female phenomenon. *J. Theor. Biol.* 36: 529–553.

Références bibliographiques

- Pechenik J.A. (2010) *Biology of the Invertebrates*. New York, McGraw Hill, pp 322.
- Pen I. & Weissing F.J. (1999) Sperm competition and sex allocation in simultaneous hermaphrodites: a new look at Charnov's invariance principle. *Evol. Ecol. Res.* 1: 517-525.
- Pennell T.M. & Morrow E.H. (2013) Two sexes, one genome: the evolutionary dynamics of intralocus sexual conflict. *Ecol. Evol.* 3(6): 1819-34.
- Perry R. & Arthur W. (1991) Environmental effects on adult shell size in *Cepaea hortensis*. *Biol. J. Linn. Soc.* 43: 273–279.
- Peters A., Streng A. & Michiels N.K. (1996) Mating behaviour in a hermaphroditic flatworm with reciprocal insemination: do they assess their mates during copulation? *Ethology* 102: 236-251.
- Pitnick S. & Brown W.D. (2000) Criteria for demonstrating female sperm choice. *Evolution* 54: 1052-1056.
- Pitnick S., Markow T.A. & Spicer G.S. (1999) Evolution of multiple kinds of female sperm storage in *Drosophila*. *Evolution* 53: 1804–1822.
- Pitnick S., Wolfner M. F., Suarez S. S. (2009) Ejaculate– and sperm–female interactions. In *Sperm biology, an evolutionary perspective*. TR. Birkhead, DJ. Hosken & S. Pitnick (eds), pp. 245–302. London, UK, Academic Press.
- Pizzari T. & Birkhead T.R. (2000) Female feral fowl eject sperm of subdominant males. *Nature* 405: 787-789.
- Polge C., Salamon S. & Wilmut I. (1970) Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Rec.* 87: 424-428
- Presgraves D.C., Baker R.H. & Wilkinson G.S. (1999) Coevolution of sperm and female reproductive tract morphology in stalk-eyed flies. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 266: 1041-1047.
- Puurtinen M. & Kaitala V. (2002) Mate-search efficiency can determine the evolution of separate sexes and the stability of hermaphroditism in animals. *Am. Nat.* 160: 645–660.
- Racey P.A., Uchida T.A., Mori T., Avery M.I. & Fenton M.B. (1987) Sperm-epithelium relationships in relation to the time of insemination in little brown bats (*Myotis lucifugus*). *J. Reprod. Fertil.* 80: 445–454.
- Reeve M.R. & Walter M.A. (1972) Observations and experiments on methods of fertilization in the chaetognath *Sagitta hispida*. *Biol. Bull.* 143: 207-214.
- Reyes-Tur B. & Koene J.M. (2007) Use of the dart apparatus by the hermaphroditic land snail *Polymita muscarum* (Lea, 1834). *Anim. Biol.* 57: 261-266.

Références bibliographiques

- Reyes-Tur B., Allen J.A., Cuellar-Araujo N., Hernández N., Lodi M., Méndez-Hernández A.A. & Koene J.M. (2015) Mating behaviour, dart shape and spermatophore morphology of the Cuban tree snail *Polymita picta* (Born, 1780). *J. Mollus. Stud.* 81: 187-195.
- Rezig M. (1979) Les escargots comestibles en Tunisie. *Echanges, Tunis*, 1: 387-396.
- Ribou A.C. & Reinhardt K. (2012) Reduced metabolic rate and oxygen radicals production in stored insect sperm. *Proc. Biol. Sci.* 279: 2196-2203.
- Rice W.R. & Holland B. (1997) The enemies within: intergenomic conflict, interlocus contest evolution (ICE), and the intraspecific Red Queen. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 41: 1-10.
- Rice W.R. (1996) Sexually antagonistic male adaptation triggered by experimental arrest of female evolution. *Nature* 381: 232-234.
- Rice, W. R. 1998 Intergenomic conflict, interlocus antagonistic coevolution, and the evolution of reproductive isolation. In *Endless forms: species and speciation*. DJ. Howard & SH. Berlocher (eds) pp. 261–270. Oxford, Oxford University Press.
- Rodriguez-Martinez & Barth A.D. (2007) In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 64: 39-54.
- Rogers D.W. & Chase R. (2001) Dart receipt promotes sperm storage in the garden snail *Helix aspersa*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 50: 122–127.
- Rogers D.W. & Chase R. (2002) Determinants of paternity in the garden snail *Helix aspersa*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 52: 289-295.
- Rönn J., Katvala M. & Arnqvist G. (2007) Coevolution between harmful male genitalia and female resistance in seed beetles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 10921-10925.
- Rowe L. & Arnqvist G. (2002) Sexually antagonistic coevolution in a mating system: Combining experimental and comparative approaches to address evolutionary processes. *Evolution* 56: 754–767.
- Ruttner F. & Koeniger G. (1971) Die Füllung der Spermatheka der Bienenkönigin Active Wanderung oder passiver Transport der Spermatozoen? *Z.vergl. Physiologie* 72: 411–422.
- Sarkar S., Sarkar N.K. & Maiti B.R. (2003) Oviductal sperm storage structure and their changes during the seasonal (dissociated) reproductive cycle in the soft-shelled turtle *Lissemys punctata punctata*. *J. Exp. Zool.* 295A: 83–91.
- Sasanami T., Matsuzaki M., Mizushima S. & Hiyama G. (2013) Sperm storage in the female reproductive tract in Birds. *J. Reprod. Dev.* 59: 334–338.
- Schärer L. & Janicke T. (2009) Sex allocation and sexual conflict in simultaneously hermaphroditic animals. *Biol. Lett.* 5: 705-708.

Références bibliographiques

- Schärer L. (2009) Tests of sex allocation theory in simultaneously hermaphroditic animals. *Evolution* 63: 1377–1405.
- Schärer L. (2014) Evolution: Don't be so butch, dear! *Curr. Biol.* 24: R311–R313.
- Schärer L., Janicke T. & Ramm S.A. (2014) Sexual conflict in hermaphrodites. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 7: a017673.
- Schärer L., Janicke T. & Ramm S.A. (2015) Sexual conflict in hermaphrodites. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 7: a017673
- Schileyko A.A. (1989) Taxonomic status, phylogenetic relations and system of the Helicoidea sensu lato: (Pulmonata). *Archiv für Molluskenkunde der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft* 120: 187–236.
- Schilthuizen M. 2005. The darting game in snails and slugs. *Trends Ecol. Evol.* 20: 581-58
- Schupp G.T., Van Krey H.P., Denbow D.M., Bakst M.R. & Meyer G.B. (1984) Ultrastructural analysis of uterovaginal sperm storage glands in fertile and infertile turkey breeder hens. *Poult. Sci.* 63: 1872–1882.
- Schütt H. (2001) Die Türkische Land schnecken: 1758–2000. *Acta Biologica Benrodis.* 4: 1–549.
- Sekizawa A., Seki S., Tokuzato M., Shiga S. & Nakashima Y. (2013) Disposable penis and its replenishment in a simultaneous hermaphrodite. *Biol. Lett.* 9: 20121150.
- Simmons L.W. & Siva-Jothy M. (1998) Sperm competition in insects: Mechanisms and the potential for selection. In *Sperm Competition and Sexual Selection*. TR. Birkhead & AP. Møller (eds), pp. 341-434. London, Academic Press.
- Simmons L.W. (2001) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton University Press, Princeton.
- Sirot L.K., Wong A., Chapman T. & Wolfner M.F. (2015) Sexual conflict and seminal fluid proteins: A dynamic landscape of sexual interactions. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 7: a017533
- Smith T.T. & Yanagimachi R. (1990) The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: The importance of sperm-epithelial contact for sperm survival. *Biol. Reprod.* 45: 450-457.
- Snook R. (2005) Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends Ecol. Evol.* 20: 46-53.
- Solem A. (1978) Classification of the Land Mollusca. In *Pulmonates, Vol 2A*. V. Fretter & J. Peake (eds), pp. 49-98, Academic Press, London.

Références bibliographiques

- Staikou A. (2001) Spermathecal morphology and variation of spermathecal sperm content in two populations of the land snails *Helix lucorum* and *Cepaea vindobonensis*, differing in timing and duration of reproductive period. Abstracts, World Congress of Malacology, Vienna.
- Staikou A., Lazaridou-Dimitriadou M. & Farmakis N. (1988) Aspects of the life cycle, population dynamics, growth and secondary production of the edible snail *Helix lucorum*, Linnaeus 1758 (Gastropoda: Pulmonata) in Greece. *J. Mollus. Stud.* 54: 139–155.
- Suarez S., Drost M., Redfern K. & Gottlieb W. (1990) sperm motility in the oviduct. In “fertilization in mammals”. BD. Bavister, J. Cummins & ERS. Roldan (eds), pp. 111-124, Sereno Symposia, Norwell, MA.
- Suarez S.S. & Pacey A.A. (2006) Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Update* 12: 23–37.
- Suarez S.S. (2008) Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int. J. Dev. Biol.* 52: 455–462.
- Tan G.N., Govedich F.R. & Burd M. (2004) Social group size, potential sperm competition and reproductive investment in a hermaphroditic leech, *Helobdella papillornata* (Euhirudinea: Glossiphoniidae). *J. Evol. Biol.* 17: 574–580.
- Tattersfield P. (1981) Density and environmental effects on shell size in some sand dune snail populations. *Biol. J. Linn. Soc.* 16: 71–81.
- Taylor P.W., Kaspi R.O.Y. & Yuval B.O.A.Z. (2000) Copula duration and sperm storage in the Mediterranean fruit flies from a wild population. *Physiol. Entomol.* 25(1): 94-99.
- Teuchert G. (1968) Zur Fortpflanzung und Entwicklung der Macrodasyoidea (Gastrotricha). *Zeitschr. Morphol. Tiere* 63: 343-418.
- Thompson F.G. & Brewer G.P. (2000) Landsnails of the genus *Humboldtiana* from northern Mexico (Gastropoda, Pulmonata, Helicoidea, Humboldtianidae). *Bulletin of the Florida Museum of Natural History* 43: 49–77.
- Thornhill R. (1983) Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *Am. Nat.* 122: 765-788.
- Tompa A.S. (1975) Embryonic use of egg shell calcium in a gastropod. *Nature* 255: 232-233.
- Tompa A.S. (1980) Studies on the reproductive biology of gastropods: part 3. Calcium provision and the evolution of terrestrial eggs among gastropods. *J. Conchol.* 30: 145-154.
- Tompa A.S. (1981) X-ray radiographic examination of dart formation in *Helix aspersa*. *Neth. J. Zool.* 32: 63–71.
- Tompa A.S. (1984) Land snails (Stylommatophora). In *The Mollusca, Vol. 7: Reproduction*. AS. Tompa & NH. Verdonk (eds), pp. 47–140, Academic Press, London.

Références bibliographiques

- Trivers R.L. (1972) Sexual selection and the descent of man, 1871-1971. Heinemann Educational, London.
- Van Duivenboden Y.A., Pieneman A.W. & ter Maat A. (1985) Multiple mating suppresses fecundity in the hermaphrodite freshwater snail *Lymnaea stagnalis*: A laboratory study. *Anim. Behav.* 33: 1184–1191.
- Van Krey H.P., Ogasawara F.X. & Pangborn J. (1967) Light and electron microscope studies of possible sperm gland emptying mechanisms. *Poult. Sci.* 46: 69–78.
- Van Osselaer C. & Tursch B. (2000) Variability of the genital system of *Helix pomatia* L., 1758 and *H. lucorum* L., 1758 (Gastropoda: Stylommatophora). *J. Moll. Stud.* 66, 499–515
- Velando A., Eiroa J. & Dominguez J. (2008) Brainless but not clueless: Earthworms boost their ejaculates when they detect fecund non-virgin partners. *Proc. R. Soc. B.* 275: 1067–1072.
- Verma O.P & Chermis F.L. (1966) Recovery of spermatozoa from the reproductive tract of turkey hens. *Poult. Sci.* 45: 604-607.
- Vianey-Liaud M. (1995) Bias in the production of heterozygous pigmented embryos from successively mated *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) albino snails. *Malacological Review* 28: 97–106.
- Vianey-Liaud M., Nassi H., Lancastre F. & Dupouy J. (1989) Duration of pairing and use of allosperm in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84: 41–45.
- Vila S., Sabat M., Hernandez M.R. & Munoz M. (2007) Intra-ovarian sperm storage in *Helicolenus dactylopterus dactylopterus*: fertilization, crypt formation and maintenance of stored sperm. *Raffles B. Zool. Suppl.* 14: 21–27.
- Villavaso E.J. (1975) Functions of the spermathecal muscles of the boll weevil, *Anthonomus grandis*. *J. Insect. Physiol.* 21: 1275-1278.
- Vincent A., Ahnesjö I., Berglund A. & Rosenqvist G. (1992) Pipefishes and seahorses: are they all sex-role reversed. *Trends Ecol. Evol.* 7: 237-241.
- Weaver J.E. (1918) The quadrat method in teaching ecology. *The plant world* 21(11): 267-283.
- Webb G.R. (1980) The sexology of a Texan Humboldtiana (Pulmonata). *Gastropodia* 2:2–7.
- Whelan N.W. & Strong E.E. (2014) Seasonal reproductive anatomy and sperm storage in pleurocerid gastropods (Cerithioidea: Pleuroceridae). *Can. J. Zool.* 92: 989-995.
- Williamson P., Cameron R.A.D. & Carter M.A. (1976) Population density affecting adult shell size of snail *Cepaea nemoralis* L. *Nature* 263: 496–497.

Références bibliographiques

Wood W.B. (1988) The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Wynn H. & Vahed K. (2004) Male *Gryllus bimaculatus* guard females to delay them from mating with rival males and to obtain repeated copulations. *J. Insect Behav.* 17: 53-66.

Yildirim M.Z. (2004) Edible snails (Terrestrial) of Turkey. *Turk. J. Zool.* 28: 329–335.

Zizzari Z.V., Smolders I. & Koene J.M. (2014) Alternative delivery of male accessory gland products. *Front. Zool.* 11: 32.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Données relatives à l'estimation de la densité dans les quatre sites d'échantillonnage

Le tableau montre le nombre de quadras utilisés pour chaque site d'échantillonnage ainsi que le nombre d'individus capturés par chaque quadra.

	Baccaro	Sidi Ahmed	Stade	Tala Hamza
Quadra 1	7	3	2	6
Quadra 2	6	2	1	5
Quadra 3	9	1	0	7
Quadra 4	8	0	1	3
Quadra 5	7	2	0	7
Quadra 6	4	3	1	3
Quadra 7	6	1	1	5
Quadra 8	2	3	2	2
Quadra 9	4	1	0	4
Quadra 10	3	2	2	3
Quadra 11			1	
Quadra 12			0	
Quadra 13			2	
Quadra 14			0	
Quadra 15			1	
Quadra 16			0	
Quadra 17			2	
Quadra 18			1	
Quadra 19			0	
Quadra 20			1	

Annexes

Annexe 2 : Taille de la coquille des individus des quatre populations

1- Hauteur de la coquille

	Baccaro	Tala Hamza	Sidi Ahmed	Place de Stade
Individu 1	23,15	23,12	25,21	24,54
Individu 2	19,93	28,6	25,34	25,6
Individu 3	21,13	21,33	26,38	23,17
Individu 4	24,24	24,95	24,17	26,9
Individu 5	25,56	21,03	32,43	25,65
Individu 6	24,06	22,85	29,15	26,39
Individu 7	22,7	22,14	22,89	24,93
Individu 8	21,97	24,42	25,25	22,97
Individu 9		24,94	26,17	
Individu 10		23,43	29	
Individu 11		20,67	26,54	
Individu 12		26,66	25,82	
Individu 13		24,08	27,08	
Individu 14		24,33		
Individu 15		28,52		
Individu 16		22,83		
Individu 17		23,82		
Individu 18		22,44		

2- Diamètre de la coquille

	Baccaro	Tala Hamza	Sidi Ahmed	Place de Stade
Individu 1	20,15	18,01	18,87	21,7
Individu 2	16,87	24	20,5	20,01
Individu 3	18,94	18,32	20,06	20,91
Individu 4	20,79	18,28	20	20,43
Individu 5	21,22	18,49	24,74	21,93
Individu 6	17,96	19,09	26,44	21,6
Individu 7	18,8	19,11	18,13	23,08
Individu 8	19,76	19,73	23,1	19,34
Individu 9	16,15	20,37	20,23	
Individu 10		20,56	22,48	
Individu 11		18,27	22,23	
Individu 12		23,11	21,1	
Individu 13		21,48	23,74	
Individu 14		21,29		
Individu 15		23,44		
Individu 16		20		
Individu 17		21,5		
Individu 18		19,55		

Annexes

Annexe 3 : Longueurs des organes reproducteurs mâles et femelles des individus des quatre populations.

Pop.	Individus	Diverticulum	Canal copulateur	Sac à dard	Epiphallus	Flagellum	Glandes multifides
Baccaro	ind. 1	14,11	16,55	8,29	10,46	14,43	7,8
	ind. 2	37,33	12,87	9,04	7,99	13,19	8,35
	ind. 3	40,13	18,81	8,6	14,2	20,55	6,89
	ind. 4	44,79	19,34	10,12	11,93	18,6	6,03
	ind. 5	25,95	14,81	8,99	12,07	13,72	9,09
	ind. 6	35,05	18,62	9,21	17,09	24,71	7,45
	ind. 7	45,73	15,13	9,44	10,48	20,62	5,59
	ind. 8	38,83	15,46	9,18	11,07	22,18	6,07
	ind. 9	34,77	16,53	9,59	9,14	13,44	4,74
	ind. 10	22,75	12,81	7,05	15,92	23,33	2,84
	ind. 11	38,58	9,53	8,8	6,22	15,93	6,52
Sidi Ahmed	ind. 1	49,27	15,7	10,68	11,74	27,21	8,17
	ind. 2	49	15,77	10,88	10,01	20,5	10,73
	ind. 3	44,15	12,27	8,8	8,43	16,62	4,48
	ind. 4	31,32	13,19	9,24	9,86	20,44	6,41
	ind. 5	28,17	13,79	10,48	11,86	21,11	4,66
	ind. 6	49,03	15,65	9,27	15,26	26,54	6,97
	ind. 7	68,72	20,3	9,83	15,97	19,32	7,86
	ind. 8	47,58	21,96	11,23	13,85	19,88	6,34
	ind. 9	42,53	17,93	10,1	17,68	21,81	4,86
	ind. 10	58	21,16	11,6	9,19	20,77	5,88
	ind. 11	49,81	16,19	10,23	12,93	27,73	8
	ind. 12	39,62	17,51	10,95	9,62	19,7	6,45
	ind. 13	50,18	24,43	10,69	17,57	23,32	7,18
	ind. 14	25,59	12,19	6,89	11,42	19,57	3,12
	ind. 15	26,97	14,78	5,89	9,41	15,77	2,9
Place Stade	ind. 1	38,1	15,39	11,61	20,61	22,85	10,34
	ind. 2	44,86	25,94	9,41	8,57	19,01	8,25
	ind. 3	38,91	15,91	9,75	9,4	13,75	6,45
	ind. 4	24,68	11,67	7,34	11,69	20,34	3,3
	ind. 5	26,22	12,81	7,45	9,65	15,05	2,85
	ind. 6	22,42	12,59	6,9	8,02	14,35	2,57
	ind. 7	51,85	13,88	11,23	12,11	20,41	6,47
	ind. 8	58,1	23,49	10,5	13,83	17,88	5,21
Tala Hamza	ind. 1	40,08	17,78	10,18	18,09	26,85	6,56
	ind. 2	39,21	18,1	10,94	7,84	21,38	3,96
	ind. 3	36,3	13,36	8,62	12,93	23,53	6,39
	ind. 4	33,14	11,85	9,69	16,14	20	6,07
	ind. 5	34,5	16,03	8,44	12,47	18,11	6,6
	ind. 6	23,31	12,14	9,02	14,69	23,85	6,12
	ind. 7	26,98	12,99	9,81	13,25	19,2	6,14

Annexes

Tala Hamza (suite)	ind. 8	49,79	21,08	11,2	16,46	22,75	6,85
	ind. 9	34,54	14,08	10,29	14,46	18,81	7,82
	ind. 10	33,24	14,23	6,3	11,46	18,07	4,14
	ind. 11	34,37	12,17	9,09	14,26	15,72	5,27
	ind. 12	39,66	12,56	9,69	15,97	17,43	6,26
	ind. 13	43,74	16,62	9,45	13,23	15,42	7,27
	ind. 14	33,45	14,78	9,5	10,33	15,32	6,09
	ind. 15	74,6	22,17	11,98	15,88	19,5	9,32
	ind. 16	25,55	12,86	9,53	15,88	21,5	7,9
	ind. 17	29,36	13,63	10,6	13,46	17,12	7,05
	ind. 18	36,24	16,9	8,93	11,68	22,3	8,44

*Suite de l'annexe 2

Annexes

Annexe 4 : Données relatives à l'investigation des poches de fertilisation et des spermathèques des individus des quatre populations

Les données concernent les longueurs en mm pour chaque individu de ; la chambre de fertilisation (FC), le tubule principal (TP) et les tubules latéraux (T1, T2, T3,...etc.) ; ainsi que le nombre total des tubules spermathécaux (#T).

Population de Sidi Ahmed

	FC	TP	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	#T
Ind.1	1.65	1.39	0.61	0.55	0.52						4
Ind.2	2.04	1.96	0.84	0.47	0.59	0.32	0.35				6
Ind.3	1.78	1.48	0.91	0.74	0.36	0.3	0.44	0.78			7
Ind.4	1.77	1.43	0.61	0.55							3
Ind.5	1.94	1.62	0.43	0.63	0.44	0.48					5
Ind.6	1.96	1.64	0.68	0.58							3
Ind.7	2.13	1.79	0.73	0.45	0.84	0.53	0.45				6
Ind.8	1.98	1.61	0.63	0.66	0.29						4
Ind.9	1.92	0.51	0.46	0.73	0.49	0.56	0.49				6
Ind.10	1.87	1.53	0.51	0.62	0.78	0.63	0.68	0.64			7
Ind.11	1.83	1.51	0.99	0.45	0.41	0.87	0.48	0.59			7
Ind.12	1.91	1.54	1.08	0.86	0.43	0.44	0.42	0.43	0.48		8
Ind.13	1.73	1.42	0.52	0.68	0.55	0.4	0.41				6
Ind.14	2.43	2.01	0.95	0.47	0.43	0.74	0.5	0.54			7
Ind.15	1.87	1.46	0.88	0.74	0.37	0.45	0.28				6

Population de Baccaro

	FC	MT	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	#T
Ind.1	1.97	1.68	1.12	0.8	0.56						4
Ind.2	2.31	2.03	1.16	0.78	0.78						4
Ind.3	2.62	2.41	0.37	0.37	0.78	0.74	0.76				6
Ind.4	1.96	1.15	0.47	0.86	0.69	0.49	0.39	0.29	0.35	0.39	9
Ind.5	2.83	2.37	0.53	0.42	0.82	0.83	1.07				6
Ind.6	1.74	1.34	1.14	0.93							3
Ind.7	2.32	1.97	1.02	0.92	0.49	0.36	0.33	0.3			7
Ind.8	2.47	2.19	0.9	0.46	0.89	0.78	0.7				6
Ind.9	1.99	1.13	0.79	0.81	0.81						4
Ind.10	2.48	2.01	0.96	0.73	0.65	0.68	0.49				6
Ind.11	1.71	1.51	0.55	0.99	0.48	0.55	0.61	0.49			7

Annexes

Population de Tala Hamza

	FC	MT	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	#T
Ind.1	2.25	1.96	0.59	1.21	1.03	0.67	0.49				6
Ind.2	2.49	1.99	1	1.17	0.79	0.79					5
Ind.3	2.76	2.49	1.34	1.05	0.44	0.61	0.85	0.43	0.66		8
Ind.4	1.96	1.78	0.97	0.95	0.84	0.7	1.02				6
Ind.5	1.8	1.69	0.82	0.87	0.86	1.22					5
Ind.6	1.6	1.26	1.03	0.73	1.03	0.89					5
Ind.7	2.34	2.11	1.11	0.84	1.34	0.74	0.71				6
Ind.8	2.64	2.36	1.6	0.95	0.61	0.68					5
Ind.9	2.54	2.16	1.38	1.42	0.8						4
Ind.10	2.34	2.27	0.71	0.94	1.01	0.84	1.15				6
Ind.11	1.61	1.37	1.16	1.39	1.12						4
Ind.12	1.9	1.66	1.06	0.89	1.23	0.8	0.8				6
Ind.13	2.15	1.98	0.69	1.25	0.78	0.79	0.8	0.66			7
Ind.14	2.86	2.65	1.3	1.67	0.83						4
Ind.15	2.35	2.14	1.14	1.4	0.73	0.58	0.75				6
Ind.16	2.5	2.27	1.11	1.4	1.47						4
Ind.17	1.76	1.55	1.27	1.12	1.31						4
Ind.18	1.57	1.4	1.41	1.39							3

Population de Place du Stade

	FC	MT	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	#T
Ind.1	1.61	1.22	0.55	0.32	0.65	0.24	0.53	0.44	0.35	0.35	9
Ind.2	1.98	1.63	0.38	0.38	0.05	0.62	0.37	0.48	0.83		8
Ind.3	2.31	1.83	0.79	1.18	0.31						4
Ind.4	1.54	1.22	0.24	0.48	0.65	0.64	0.34				6
Ind.5	2.33	1.77	0.36	0.57	0.24	0.07					5
Ind.6	1.6	1.23	0.43	0.13	0.43	0.29					5
Ind.7	1.86	1.56	0.41	0.71	0.43	0.25					5
Ind.8	1.69	1.36	1.15	0.69	0.08	0.29	0.12				6

Intra-specific morphological variation of the spermatheca in the simultaneously hermaphroditic land snail Helix aperta

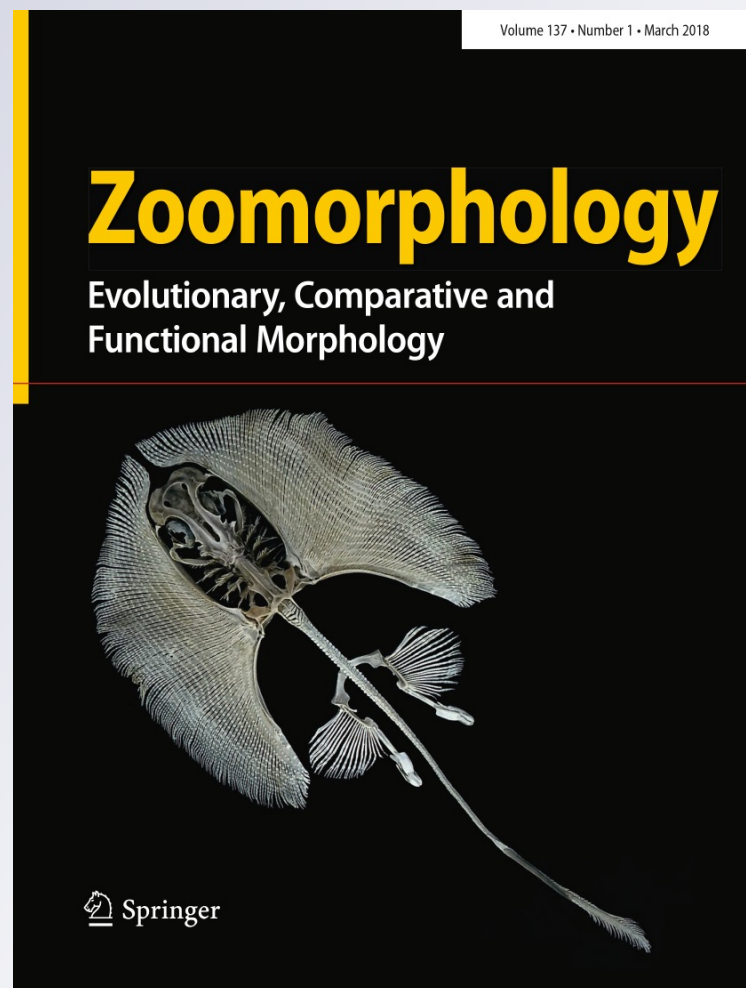
Meriem Abdelli, Saida Benbellil-Tafoughalt & Joris M. Koene

Zoomorphology

Evolutionary, Comparative and Functional Morphology

ISSN 0720-213X
Volume 137
Number 1

Zoomorphology (2018) 137:51-61
DOI 10.1007/s00435-017-0379-2



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag GmbH Germany. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Intra-specific morphological variation of the spermatheca in the simultaneously hermaphroditic land snail *Helix aperta*

Meriem Abdelli^{1,2}  · Saida Benbellil-Tafoughalt¹ · Joris M. Koene²

Received: 21 June 2017 / Revised: 27 September 2017 / Accepted: 4 October 2017 / Published online: 16 October 2017
 © Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract In the majority of internally fertilizing animals, females are equipped with sperm storage organs where they store the sperm received during copulation. In many simultaneously hermaphroditic pulmonates, these organs consist of complex spermathecae that show inter- and intra-specific variation in their structure. This variability is theoretically predicted by postcopulatory sexual selection in the context of sperm competition and cryptic female choice. In this study, the variation in the structure of the spermatheca was investigated in the land snail *Helix aperta* from four natural populations near Bejaia in northern Algeria. The populations were different in local snail density, probably also reflecting the intensity of sperm competition. We tested whether the spermatheca showed differences that are predicted by sperm competition theory. In addition, we tested whether the spermathecal structure depends on the shell size and/or is correlated with other reproductive organs that are thought to be affected by sexual selection. We found that the fertilization pouch of *H. aperta* consists of a simple fertilization chamber and 3–9 spermathecal tubules. The four populations did not differ significantly in the mean number of these tubules.

However, significant differences were found in the length of the main tubule, the length of the fertilization chamber, and the average length of lateral tubules. In addition, strong associations were detected between the lengths of these structures and the local snail density, while no effect of shell size or reproductive organs was found. Our results indicate that the intensity of sperm competition may not affect the total number of spermathecal tubules, but may increase their lengths. This increase in spermathecal length may reflect an improved sperm storage capacity that is probably beneficial in situations of high sperm competitions intensity.

Keywords *Helix aperta* · Fertilization pouch · Spermatheca · Reproductive organs · Sperm competition

Introduction

Sperm storage is a common phenomenon in many animals including earthworms, molluscs, arthropods, birds, reptiles, amphibians, fish, and mammals (Birkhead and Møller 1993; Holt 2011; Orr and Zuk 2012). It is generally defined as the retention and preservation of the sperm received during copulation inside the female reproductive tract for an extended period of time (Orr and Zuk 2012, 2014) that can range from weeks to months and even years before being used for fertilization (e.g., Parker 1970; Pamilo 1991; Sever et al. 2001, 2003; for reviews, see also Neubaum and Wolfner 1999; Suarez 2008). This process seems to be the result of the timing of insemination and ovulation no longer being synchronized in females of some animals (reviewed in Sasanami et al. 2013), the diversity of their life histories, scarcity of mating opportunities, or simply the need to avoid repeated and possibly unsafe matings that can

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00435-017-0379-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Meriem Abdelli
 nylsa2010@hotmail.fr

- ¹ Laboratoire d'Ecologie et Environnement, Département des Sciences Biologiques de l'environnement, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Béjaïa, Béjaïa, Algérie
- ² Department of Ecological Science, Faculty of Earth and Life Sciences, Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

experience many animals (reviewed in Holt 2011). As a result, in many species, sperm storage constitutes an integral part of their reproductive strategy.

Sperm storage clearly provides several advantages. For example, the prolonged storage of received sperm allows for assurance of reproductive success and a lengthening of the breeding season (see Conner and Crews 1980; Sever and Brizzi 1998). In addition, it can help in minimizing the number of matings, and thus any costs associated with that, and can also facilitate colonization (reviewed in: Neubaum and Wolfner 1999; Eckstut et al. 2009; see also: Kalb et al. 1993; Tram and Wolfner 1999; Liu and Kubli 2003; Peng et al. 2005). Furthermore, sperm storage implies protection for the sperm, thus sustaining their viability for long periods (e.g., Ribou and Reinhardt 2012). Besides the summary above, more details about female sperm storage advantages have been reviewed previously by many authors (e.g., see Neubaum and Wolfner 1999; Bloch Qazi et al. 2003).

To store sperm, many species have developed dedicated structures in their reproductive tract. These structures range from more or less complex tubules (e.g., in birds: Bakst 1987; Birkhead and Møller 1992; Brillard 1993; Sasanami et al. 2013; Holt and Fazeli 2016 and some reptiles: Pearse and Avise 2001; Han et al. 2008) to highly sophisticated organs containing multiple compartments (Eberhard 1985, 1996; e.g., the spermathecae of amphibians: Sever 1991, 1997, 2002; insects: Bloch Qazi et al. 1998; Baer et al. 2006; Córdoba-Aguilar et al. 2003 and gastropods: Baminge and Haase 1999; Koemtzopoulos and Staikou 2007; Whelan and Strong 2014; annelids: Novo et al. 2013). Interestingly, large interspecific divergence in morphology, size, complexity, and even number of these organs have been reported. Hypothetically, these differences may be explained by the large variation in sperm size and shape (e.g. Walker 1980; Keller and Reeve 1994; Pitnick et al. 1995; Minoretti and Baur 2006) and the differences in life history traits and/or habitat specificity occurring among such species (reviewed in Pitnick et al. 1999; Beese et al. 2008).

Another widely supported explanation supposes that the sperm-storage organs' morphology and/or number evolve in response to postcopulatory sexual selection (e.g. Hellriegel and Ward 1998; Pitnick et al. 1999). In such cases, multiple matings take place and multiple ejaculates overlap within the female tract prior to egg production, thus enhancing sperm competition (i.e., establishment of the conditions outlined by Parker 1970, 1984). Clearly, the latter introduces variation in male reproductive success and leads to postcopulatory intra-sexual selection, thus promoting morphological, physiological, and behavioural traits that may increase the fertilization success of an ejaculate under competitive conditions (Pizzari and Parker 2009). In contrast, given that females are generally the sex

that invests more in reproduction (Parker 1984), they are also expected to try to control the outcome of sperm competition in favor of the sperm of certain males they copulated with. They can potentially do this by selectively using sperm, a mechanism known as cryptic female choice (Eberhard 1996). In the light of this hypothesis, the evolution of sperm-storage organs can also be explained as a female adaptation that allows for greater control over offspring paternity (Eberhard 1996).

In the context of sperm storage, the pulmonate land snails (Stylommatophora) are an interesting group to study, as they are known to mate promiscuously and are hermaphroditic. Moreover, they are known to store sperm for long periods of time (Baur 1998) and some possess rather sophisticated spermatheca (see Tompa 1984, Beese et al. 2008). In these species, the spermatheca forms part of a more or less complex system of tubules of an organ often referred to as fertilization pouch or fertilization pouch–spermatheca complex (Tompa 1984). The structure of the fertilization pouch has been studied in many gastropods (Tompa 1984; Beese et al. 2008) with less attention paid to land snails (reviewed in Koemtzopoulos and Staikou 2007), except of two species: *A. arbustorum* (Haase and Baur 1995; Baminge and Haase 1999; Beese et al. 2006) and *C. aspersum* (Koemtzopoulos and Staikou 2007).

In general, a land snail's fertilization pouch consists of a fertilization chamber and a spermatheca, which can be made up of a variable number of tubules (e.g., one tubule in *Bradybaena fructicum*, Schileyko and Schileyko 1992; Bojat et al. 2002; two in *Succinea putris*, Rigby 1965: 34 in *Drymaeus papyraceus*, van Mol 1971). The number of spermathecal tubules also varies within species (e.g., 3–5 tubules in *H. pomatia*, Lind 1973; 2–9 in *A. arbustorum*, Baminge and Haase 1999; 1–8 in *Cepaea vindobonensis*, Staikou 2001; and 5–16 in *Helix lucorum* Staikou 2001). The tubular structure of the spermatheca has been suggested to allow for spatial segregation of the sperm from different partners, thus offering the opportunity for cryptic female choice (Haase and Baur 1995). The only suggestive evidence for such an ability, however, comes from ultrastructural investigations of the epithelium and the surrounding musculature of the spermatheca of *A. arbustorum* (Bojat et al. 2001a, b). Since postcopulatory sexual selection, in the form of sperm competition and cryptic female choice, seems to be a strong evolutionary force, it is likely to be accompanied by a male–female coevolution of other behavioural and anatomical traits related to reproduction (Arnqvist and Rowe 2002; Pitnick et al. 2003). Indeed, the presence and complexity of sperm-storage organs has been shown to co-evolve with other reproductive organs in snails (see Beese et al. 2008).

The variation in spermathecae cited above has been predicted to be mainly influenced by the level of sperm competition and is thus expected to result in increased

complexity of the spermatheca, for example in terms of number of tubules, under more intense sperm competition (reviewed in Baminger and Haase 1999; Koemtzopoulos and Staikou 2007). However, the empirical studies undertaken by the same authors investigating the relation between the complexity of the spermatheca and density, as a proxy for sperm competition intensity, among different populations of *A. arbustorum* and *C. aspersum* did not reveal any correlation. Given that this was only tested in two species so far, in the present study, we decided to focus on the simultaneously hermaphroditic land snail *H. aperta*.

We started out by examining and describing, for the first time, the fertilization pouch and spermatheca of this species. Subsequently, we investigated the morphological variation in the spermatheca of this species in four different populations that differed in snail densities, using the latter as a proxy for sperm competition intensity. While this is not a direct measure of sperm competition, in many hermaphroditic animals, increases in density result in more frequent multiple matings (Michiels 1998), so we assume here that a higher population density also represents more frequent mating. Finally, we tested for correlations between the morphology of the spermatheca with other male (epiphallus, flagellum, dart sac, and digitiform glands) and female (diverticulum and bursa stalk) reproductive organs. We chose to focus on these particular organs, because they are thought to be implicated in postcopulatory sexual selection and could thus be expected to interact with the morphology of the sperm-storage organ (Baminger and Haase 2000; Davison et al. 2005; Koene and Schulenburg 2005).

Materials and methods

Study organism

Helix aperta, sometimes also referred to as *Cantareus apertus* (Born 1778) or *Helix naticoides* (Draparnaud 1801), is a circum-mediterranean hermaphroditic land snail species, generally distributed in the south of France, Turkey, Cyprus, and North Africa (Kerney and Cameron 1979; Schütt 2001). In Algeria, it is frequently encountered in the coastal part of the country, especially in the region of Kabylia (Benbellil-Tafoughalt et al. 2009). This species is also introduced in America (California and Louisiana), New Zealand, and Australia (Kerney and Cameron 1979; Schütt 2001). The shell of this species is spherical, of a moderate adult size (on average 27 ± 4 mm) and without any banding (Yildirim 2004). The body color of these snails varies from greenish yellow to dark green or black according to the lifestage of the animal (Benbellil-Tafoughalt et al. 2009). In its Mediterranean and coastal

habitats, it is adapted to live on the soil, among grasses and with a preference for vineyards and olive orchards (Giusti and Andreini 1988). In general, it does not occur above altitudes of 900 m a.s.l. (Germain 1930, 1931). The activity of this species is very much dependent on environmental conditions such as temperature, photoperiod, and humidity (Benbellil-Tafoughalt et al. 2009, 2011; Benbellil-Tafoughalt and Koene 2015). Hence, it can spend long periods of aestivation or hibernation underground when conditions are not right. Under such circumstances, it burrows 7–15 cm deep, closes off its shell with a thick whitish epiphragm, and enters into a state of metabolic slowdown. As a result of this habit, it is known as the “burrowing snail”. Morphologically and phylogenetically, this species is closely related to *Cornu aspersum* (Germain 1930, 1931; Ktari and Rezig 1976; Koene and Schulenburg 2005). *H. aperta* from Italy and northern Algeria were reported to preferably mate in autumn, which in its investigated habitats means from the beginning of October up to the second half of December, with temperatures around 20 °C and long days (16 h L: 8 h D) (Giusti and Andreini 1988; Benbellil-Tafoughalt et al. 2011). However, in Tunisia, they were found to mate at the end of summer under short-day conditions (6 h L: 18 h D; de Vaufléury and Gimbert 2009). Benbellil-Tafoughalt et al. 2009 (see also Benbellil-Tafoughalt and Koene 2015) also revealed that reproduction and growth are strongly affected by the length of the photoperiod as well as temperature.

Population sampling

Samples of 10–18 adult *Helix aperta* were randomly collected during rainy weather conditions at four different localities (referred to as populations) from the region of Bejaia in northern Algeria. The sampling was done at the beginning of February 2016 within 2 days to avoid any influence of seasonal variation. Two populations came from irrigated agricultural monocultures, situated in a rural coastal region at Baccaro (36°39'6.10"N, 5°12'5.09"E) and an exposed rural region at Tala Hamza (36°41'43.49"N, 4°59'17.49"E). The third population came from an abandoned garden in an urban area at “place du Stade” (36°45'1.36"N, 5°2'42.97"E) that was covered with ferns, bushes, and clovers, while the fourth population came from an exposed natural meadow in front of an urban area at Sidi Ahmed (36°45'26.10"N, 5°3'53.40"E) and was densely covered with grasses, clovers, and sparse shrubs.

The density of each population was expressed as the number of adult snails/m² and estimated by means of random quadrat sampling (0.25 × 0.25 m). The estimation was performed once at the end of autumn during the selection of suitable populations for the study (early December 2015). At that time, *H. aperta* emerges from

aestivation and is active above ground. To obtain a reliable measure, we adopted the Elliot's method (1971) to determine the necessary number of sampling units per site for an error lower than 20%.

Measurements and histology

The collected snails were transported to the laboratory on the same day and their shell's maximum diameter and height were measured using Vernier calipers with an accuracy of 0.1 mm. After subsequent anesthesia by injection of 50 mM MgCl₂ via the dorsal side of back of the foot and fixation in 70% ethanol, we removed the shell of each snail and dissected out the distal parts of its genitalia (excluding two dissections where some organs were ruptured). For each individual, the following anatomical reproductive traits were measured to the nearest 0.1 mm using Vernier calipers: "male tract organs" (dart sac, digitiform glands, epiphallus, and flagellum) and "female tract organs" (bursa copulatrix tract/bursa stalk and diverticulum). Before measuring, each structure was extended straight without any convolutions in a petri dish with distilled water and its length was then measured three times. The mean (for digitiform glands, the mean of the mean of both glands) was then calculated and used for statistical analyses. Although the presence of these organs has been established for *H. aperta* (Giusti and Andreini 1988), no quantitative measurements of their size are available so far, while their function is assumed to be similar to those in related species.

The fertilization pouches, sometimes together with small parts of spermoviduct and hermaphroditic duct, were dissected out and fixed in Davidson's Fixative (AFA fixative) for 24 h. Because the fertilization pouch of *H. aperta* turned out to be relatively deeply embedded in the albumen gland, some remains of this gland were also always dissected along. Fertilization pouches were embedded in paraffin, serially sectioned at 7 µm and stained with Hematoxylin–eosin. The sections were always made along the cross-sectional plan of the organ. The structure of each spermatheca was examined by counting the number of spermathecal tubules and observing their branching pattern. The length of each tubule was approximated by counting the number of cross sections in which it appeared, starting from the section in which the tubule was clearly separated from the tubule from which it branched off, and multiplying it by the section thickness (7 µm). The length of the fertilization chamber was estimated for each individual in the same way.

Statistical analyses

We used one-way ANOVAs or Kruskal–Wallis tests to test for possible differences in shell size (height and diameter)

and spermathecal structures (length and number) among the populations.

To study the effects of population density and shell size (diameter) and their interaction on spermathecal structures and the reproductive organs considered, we used a linear regression model for response variables that were normally distributed. In this model, density and diameter were considered as fixed factors, while the spermathecal structures and reproductive organs were used as response variables. For non-normally distributed response variables, we used a generalized linear model with the same fixed factors. Note that we chose to use diameter as the representative measure of body size, which is widely used in pulmonates (reviewed in Baminger and Haase 2000), but the same models were also run with shell height as a fixed factor instead.

Finally, possible relationships between spermathecal structures and the reproductive organs, as well as between the spermathecal structures themselves, were investigated through Pearson or Spearman correlations.

Statistical analyses were performed using Xlstat 2009 and JMP 9. All variables were initially tested for normality and non-parametric tests were used when needed. Means and standard deviations (\pm SD) are reported unless otherwise stated.

Results

Our histological observations revealed that the fertilization pouch of *H. aperta* is a complex organ located in the distal part of the reproductive tract. We found that it consists of a blind-ended fertilization chamber into which the hermaphroditic duct and the spermatheca open (see Fig. 1). The fertilization chamber is the longest structure of the fertilization pouch and appears more or less c-shaped in the cross sections. According to Haase and Baur (1995), this is the site where the eggs are fertilized by the sperm stored in the spermatheca. We found that the spermatheca consists of several tubules with one common entrance (Fig. 1). The longest tubule, which always branched off the fertilization chamber, was considered as the "main tubule"

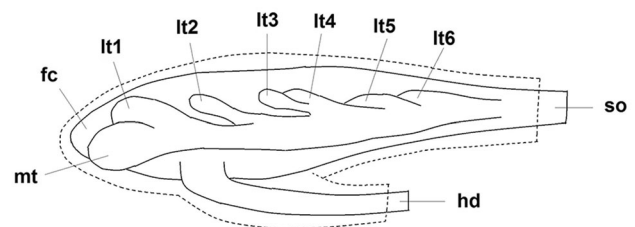


Fig. 1 Schematic drawing of the fertilization pouch of *H. aperta*: *fc* fertilization chamber, *mt* main spermathecal tubule, *lt* lateral spermathecal tubules (numbered 1–6); *hd* hermaphroditic duct, *so* spermoviduct

(conforming to earlier descriptions in *A. arbustorum* Baminger and Haase 1999 and *C. aspersum* Koemt-zopoulos and Staikou 2007). All other tubules were considered as “lateral tubules” (see Baminger and Haase 1999; Koemt-zopoulos and Staikou 2007). The latter either branched off from the main tubule or from other lateral tubules. In 14% of the spermathecae, some lateral tubules were seen to branch off from the fertilization chamber directly at the same point where the main tubule branched off. This pattern was observed in all four populations. The lengths of tubules were found to vary considerably within individuals. The main tubule was always shorter than the fertilization chamber. The number of spermathecal tubules also varied, ranging from 3 to 9 across the different populations studied. The four populations did not differ significantly in the number of spermathecal tubules (Kruskal–Wallis, $H = 7.815$, $P = 0.668$ see Table 1).

Interestingly, the length of the fertilization chamber (Kruskal–Wallis, $H = 8.25$, $N = 52$, $P = 0.041$), the length of the main tubule (ANOVA, $F = 4.73$, $P = 0.006$, $df = 3, 48$), and the average length of lateral tubules (Kruskal–Wallis, $H = 38.63$, $N = 52$, $P < 0.0001$) were seen to vary significantly among the four populations (see Table 1 and Fig. 2 for post hoc test results). Moreover,

ANOVAs revealed significant differences in shell height ($F = 9.581$, $P = 0.0001$, $df = 3, 48$) and diameter ($F = 5.715$, $P = 0.002$, $df = 3, 48$) between the populations (see Table 1). The mean shell height was significantly correlated with the mean shell diameter (Pearson correlation, $r = 0.653$, $N = 52$, $P < 0.0001$) over the four populations. In addition, no significant differences were detected in the length of any of the reproductive organs considered (see ANOVA results in Table 1).

The populations’ local snail density ranged from 3.6 to 22.4 adult individuals/m² and was inversely correlated with shell diameter (Spearman rank correlation, $r = -0.467$, $N = 52$, $P = 0.001$). However, it was not correlated with any of the reproductive organs studied (Spearman rank correlation, all $P > 0.05$, see Supplementary Table 1).

The linear regression models investigating the dependence of the spermathecal structures on shell size and population density are summarized in Table 2. Only the populations’ local density had a significant effect on the length of the fertilization chamber, the length of the main tubule, and the average length of lateral tubules (see Table 2). All three increased with increasing population density. In addition, neither the density nor the shell size (diameter) affected the number of spermathecal tubules.

Table 1 Comparison of shell size, reproductive organs, fertilization chamber length, and both number and length of spermathecal tubules of four populations of *H. aperta* using either ANOVA or Kruskal–Wallis tests (respectively, *H*- and *F*-values indicated)

	Population				<i>F</i> or <i>H</i>	<i>P</i>
	Stade	Sidi Ahmed	Tala Hamza	Baccaro		
<i>N</i>	8	15	18	11		
Density	3.6	7.2	18	22.4		
Shell size (mm)						
Height	25.02 ± 0.5	26.93 ± 0.63	23.90 ± 0.53	22.65 ± 0.57	9.58	< 0.0001
Diameter	21.12 ± 0.42	21.87 ± 0.62	20.25 ± 0.44	18.75 ± 0.54	5.71	0.002
Male tract organs (mm)						
Dart sac	9.27 ± 0.65	9.78 ± 0.41	9.62 ± 0.29	8.93 ± 0.24	0.93	0.432
Epiphallus	11.73 ± 1.44	12.32 ± 0.80	13.80 ± 0.59	11.51 ± 0.98	1.60	0.202
Flagellum	17.95 ± 1.16	21.35 ± 0.91	19.82 ± 0.76	18.24 ± 1.29	2.33	0.086
Digitiform glands	5.68 ± 0.97	6.27 ± 0.53	6.57 ± 0.32	6.49 ± 0.53	0.44	0.728
Female tract organs (mm)						
Diverticulum	38.14 ± 4.63	44.00 ± 3.11	37.11 ± 2.67	34.36 ± 2.91	1.70	0.179
Bursa stalk	16.46 ± 1.88	16.85 ± 0.95	15.18 ± 0.72	15.50 ± 0.89	0.68	0.567
Fertilization chamber length (mm)	1.86 ± 0.11	1.92 ± 0.05	2.19 ± 0.10	2.22 ± 0.11	8.25	0.041
Spermathecal structures						
Number of tubules	5.5 (4–9)	6 (3–8)	5 (3–8)	6 (3–9)	1.56	0.668
Length of main tubule	1.48 ± 0.09	1.53 ± 0.09	1.95 ± 0.09	1.80 ± 0.14	4.73	0.006
Average length of lateral tubules	0.46 ± 0.14	0.57 ± 0.05	1.02 ± 0.19	0.73 ± 0.16	8.63	< 0.0001

Descriptive statistics (mean ± SE) are presented for each population. Information about the sampling sites is mentioned in the “Materials and methods”

H values are indicated in italic

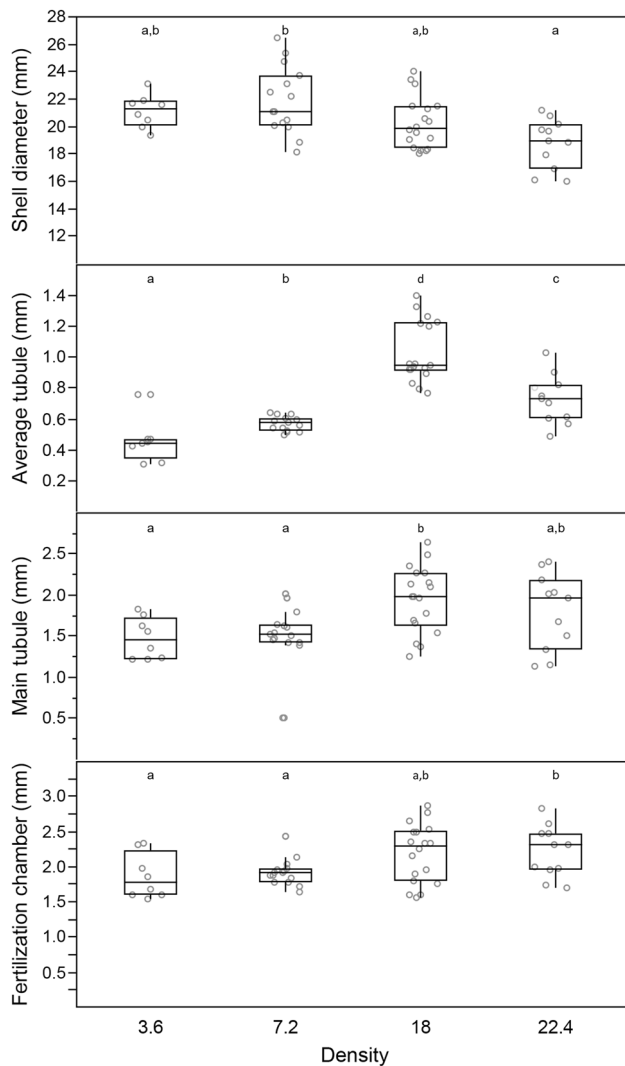


Fig. 2 Comparison of shell diameter and the lengths of the fertilization chamber, main tubule, and average lateral tubules between the four populations of *H. aperta* with different local densities. Boxplots show the median, the 1st and 3rd quartiles, and the range. The small circles indicate the individual data points. The letters indicate significant differences between the densities based on parametric Tukey or non-parametric Wilcoxon multiple comparison post hoc testing ($P < 0.05$; see “Results”)

Similarly, no significant correlations were found between any of the reproductive organs considered in this study and the length or number of the spermathecal structures (all $P > 0.06$, see Supplementary Table 1).

Significant correlations were found between the lengths of most spermathecal structures (all $P < 0.040$, see Supplementary Table 1). The only non-significant correlations were the ones between the number of spermathecal tubules and both the length of the fertilization chamber (Spearman: $r = 0.070$, $N = 52$, $P = 0.621$) and the length of the main tubule (Spearman rank correlation: $r = 0.033$, $N = 52$, $P = 0.817$), while a negative correlation was found

between the average length of the lateral tubules and the number of spermathecal tubules (Spearman rank correlation: $r = -0.407$, $N = 52$, $P = 0.03$).

Discussion

This study provides the first description of the fertilization pouch–spermatheca complex of the simultaneously hermaphroditic land snail *H. aperta*. The overall morphological structure of these organs turns out to be fairly similar to those of other Stylommatophora land snails (e.g., *A. arbustorum*: Haase and Baur 1995; Baminger and Haase 1999; *C. aspersum*: Evanno and Madec 2007; Koemtzopoulos and Staikou 2007). We also found same morphological pattern among the four populations, which agrees with the previous findings on *C. aspersum* that reported a consistent spermatheca structure even over consecutive generations, indicating that this has a genetic basis (Koemtzopoulos and Staikou 2007). Similar to the studies of Baminger and Haase (1999) and Koemtzopoulos and Staikou (2007), we could distinguish a main tubule and a number of lateral tubules. The main tubule, defined as the longest tubule in the spermatheca, was always shorter than the fertilization chamber. This was also reported for *C. aspersum* (Koemtzopoulos and Staikou 2007), but not for *A. arbustorum* where the main tubule was longer than the fertilization chamber in most cases (Baminger and Haase 1999). In the majority of the analyzed spermathecae, the lateral tubules either branched off from the main tubule or from other lateral tubules; however, exceptions to this occurred in 14% of spermathecae where some lateral tubules branched off directly from the fertilization chamber. Although we have no biologically meaningful explanation for this, a similar pattern was reported for *C. aspersum* (Koemtzopoulos and Staikou 2007).

As expected, the total number of tubules in the spermatheca of *H. aperta* was variable (3–9 tubules) and was almost similar to that of *A. arbustorum* (2–9 tubules, Baminger and Haase 1999). Such an intra-specific variability has been previously reported in many other species (see “Introduction”). This large variation within each population may explain why we did not find the hypothesized difference in tubule numbers between the four populations, and thus densities, that we studied (see also Baminger and Haase 1999). This is consistent with earlier, similar studies on six populations of *A. arbustorum* from the Eastern Alps in Austria (Baminger and Haase 1999) and five populations of *C. aspersum* from Greece (Koemtzopoulos and Staikou 2007). While we did not evaluate the amount of sperm stored, in *A. arbustorum*, this was also found not to differ or to correlate with density (Baminger and Haase 1999). This may suggest that the

Table 2 Summary of the models used to test the effect of the fixed factors: density of each population and diameter of the shell of individuals on the measurements of the spermathecal structures and the reproductive organs (response variables)

	Density			Shell diameter			Density × shell diameter		
	<i>df</i>	<i>F</i> or χ^2	<i>P</i>	<i>df</i>	<i>F</i> or χ^2	<i>P</i>	<i>df</i>	<i>F</i> or χ^2	<i>P</i>
Spermathecal structures									
Number of tubules	3, 44	0.910	0.823	1, 44	≈ 0.001	≈ 1.000	3, 44	<i>1.058</i>	0.787
Length of fertilization chamber	3, 44	<i>14.799</i>	0.0020	1, 44	<i>0.190</i>	0.6629	3, 44	<i>0.975</i>	0.8072
Length of main tubule	3, 44	5.452	0.0028	1, 44	1.587	0.2144	3, 44	0.223	0.8803
Average length of lateral tubules	3, 44	<i>101.41</i>	< .0001	1, 44	<i>1.0215</i>	0.3122	3, 44	<i>1.898</i>	0.5938
Reproductive organs									
Diverticulum	3, 44	2.327	0.0877	1, 44	0.466	0.4983	3, 44	2.115	0.1119
Bursa stalk	3, 44	<i>0.137</i>	0.9871	1, 44	<i>0.338</i>	0.5611	3, 44	<i>0.477</i>	0.9240
Dart sac	3, 44	0.856	0.4713	1, 44	0.111	0.7410	3, 44	0.781	0.5108
Epiphallus	3, 44	1.030	0.3885	1, 44	0.077	0.7833	3, 44	1.306	0.2844
Flagellum	3, 44	1.023	0.3918	1, 44	0.024	0.8772	3, 44	0.995	0.4039
Digitiform glands	3, 44	0.393	0.7584	1, 44	0.0001	0.9911	3, 44	0.371	0.7741

The × in the last column indicates the tested interaction between the fixed factors

χ^2 values are indicated in italic

actual number of spermathecal tubules does not reflect the outcome of sperm competition and may not be subject to sexual selection (cf. Baminger and Haase 1999; Koemt-zopoulos and Staikou 2007). Moreover, if the number of spermathecal tubules is genetically controlled or depends on an individual's age or maturity (as proposed by Koemt-zopoulos and Staikou 2007 and Baminger and Haase 1999, respectively), this could also explain the absence of a correlation between population density and the number of spermathecal tubules. However, a study of the spermathecal ontogeny of individuals of *A. arbustorum* revealed that the development of lateral tubules is not simultaneous, but that these branch off successively from the main tubule, which develops first (Baminger and Haase 2002). Furthermore, and importantly, that study revealed that the final number of spermathecal tubules is already reached in sub-adult individuals (Baminger and Haase 2002). The latter indicates that the number of spermathecal tubules probably does not change after maturity is reached.

Interestingly, our data reveal a significant positive relationship between the average length of the fertilization chamber, main tubule, and lateral tubules with population density. This contradicts the findings of the previous studies on both *A. arbustorum* and *C. aspersum* (Baminger and Haase 1999; Koemt-zopoulos and Staikou 2007) in which density was found not to have any effect on the length of spermathecal structures. In this context, it is noteworthy that the populations' densities in the two previous studies and the present one are clearly different (Baminger and Haase 1999: 0.9–39.8 adults/m²; Koemt-zopoulos and Staikou 2007: 11.4–42.3 adults/m²), although this is probably not enough to explain the difference between the species. Of course, this

could also simply be due to differences between the species, as Lodi et al. (2017/in press) also reported for other reproductive traits in land snails.

Moreover, it should be noted that in the previous studies and in the present one, snail density was used as a proxy for sperm competition intensity. Although there generally seems to be a positive relation between density or group size and sperm competition in many animals (prosobranch gastropods: Oppliger et al. 1998; insects: Gage 1995; birds: Birkhead and Møller 1992; mammals: Møller and Birkhead 1989; Hirudinea annelids: Tan et al. 2004; anuran amphibians: Buzatto et al. 2015), the only evidence that we have for land snails is the difference observed in mating frequencies among populations of *C. aspersum* from contrasting local densities, which also persisted in the F1 generation snails (Koemt-zopoulos and Staikou 2007). However, density and the minimum number of estimated fathers do seem to be positively correlated in egg clutches of other snails (e.g., *Lymnaea stagnalis*: Nakadera et al. 2017). Therefore, density may reflect different sperm competition intensities in the species studied here, but this really needs to be confirmed by a paternity study. So far, we have no detailed information about multiple matings in *H. aperta* and whether mating frequency tends to increase with increasing population density (as also pointed out for *A. arbustorum*, see Baminger and Haase 2000). Moreover, it should also be taken into account that population density may not be stable over time in the populations, which would result in fluctuating sperm competition intensity (as also argued by Baminger and Haase 2000).

One likely explanation for having longer sperm storage organs would be a higher sperm storage capacity (Pitnick

et al. 1999; Miller and Pitnick 2003). When attempting to explain the patterns of sperm utilization in *C. aspersum* snails, Rogers and Chase (2002) proposed a mechanism based on the activity of the allosperm in the spermatheca. The authors suggested that the unified beating of the flagella of the resident sperm would generate resistance to incoming sperm from subsequent mates (Rogers and Chase 2002), with this resistance becoming stronger when the sperm numbers are higher (Beese et al. 2006). In turn, this may have favored the increase in the length of spermathecal tubules (Beese et al. 2008), which would predict that more sperm can be stored, possibly also from more mating partners (see Baminger and Haase 1999; Pitnick et al. 1999; Miller and Pitnick 2003). Indeed, in land snails, sperm has been reported to be stored with their heads in tight contact with the epithelium of the spermathecal tubules (*A. arbustorum*: Bojat et al. 2001b; *C. aspersum*: Rogers and Chase 2002; *Bradybaena fruticum*: Bojat et al. 2002). Hence, longer spermathecal tubules may provide a larger surface area for sperm anchoring (Bojat et al. 2001b). In separate-sex species, as a result of an enhanced sperm storage capacity, females may benefit from a greater control over the fertilization process (Pitnick et al. 1999; Miller and Pitnick 2003) and possibly enhance cryptic female choice (Simmons 2001). In the previous studies, the only reported change was the volume expansion in the spermatheca of *A. arbustorum* snails occurring after sperm uptake. However, it was an expansion in the diameter of tubules and not their length (see Beese and Baur 2006). In our case, we did not consider the diameter of the tubules and we did not quantify the amount of sperm stored, since we sampled snails with an unknown mating history.

Ultimately, the actual effect of such complex spermathecae, and their variability, on paternity success remains to be demonstrated in land snail species (see also Baminger and Haase 1999). On one hand, considerable variation in sperm utilization patterns has been reported in investigations of double or triple mated snails (Murray 1964; Baur 1994; Evanno et al. 2005; Garefalaki et al. 2010). On the other hand, so far, increase in paternity success seems to be mostly linked to behavioural and some anatomical traits (Landolfa et al. 2001; Rogers and Chase 2002; Garefalaki et al. 2010) which act mainly on the number of sperm transferred and stored. This could suggest that the outcome of sperm competition may be determined by the proportional representation of sperm in the sperm-storage organ if sperm are randomly selected for use, as proposed by Landolfa et al. (2001), but this also remains to be demonstrated.

The inverse correlation that we found between shell size and population density confirms the findings on other snail species investigated either in the field or laboratory (Williamson et al. 1976; Oosterhoff 1977; Tattersfield 1981;

Baur 1988; Perry and Arthur 1991). Baur (1988) hypothesized that food unpalatability caused by mucus deposition slows down juvenile growth rate in high density populations, resulting in small adults and even reduced fecundity in subsequent years. In contrast, Baminger and Haase (1999) did not find any density dependence of shell breadth in their study on *A. arbustorum*, probably because of the influence of environmental factors. Similarly, Koemtzopoulos and Staikou (2007) did not find such a relation in their populations of *C. aspersum* from the highest humidity sites, which may partly confirm the interpretation of Baminger and Haase (1999).

The lengths of the reproductive organs considered in this study (dart sac, digitiform glands, epiphallus, flagellum, bursa copulatrix tract/bursa stalk, and diverticulum), which were expected to interact with the sperm-storage organs morphology (see “Materials and methods”), were not seen to vary significantly among the different populations investigated. Furthermore, they were not correlated with snail density. On the contrary, in *A. arbustorum*, the size of the same organs was found to be inversely related to local snail density in six natural populations (Baminger and Haase 2000). As mentioned above, these authors also attributed such a relation to the potential inhibitory effect of the presence of lots of snail mucus. As a consequence, they could not unambiguously determine the possible effect of sperm competition on the variation of these organs, which was the main goal of their study.

Given that we found no effect of shell size, this seems to indicate that the sperm storage organ is developmentally independent from body size in *H. aperta*, which is in agreement with most previous studies (Haase and Baur 1995; Baminger and Haase 1999, 2002; Bojat and Haase 2002; Koemtzopoulos and Staikou 2007; but see Beese et al. 2006). In addition, contrary to our expectations, no correlation was detected between any of the reproductive organs considered and the spermathecal structures of *H. aperta*. In contrast, phylogenetic study on the presence and complexity of the spermatheca in 47 Stylommatophora gastropods found that the complexity of this organ was associated with the occurrence of love darts and long flagella Beese et al. (2008). While this indicates an evolutionary association between these reproductive structures across species, we do not find this same relationship back when comparing within a single species.

Overall, our findings in *H. aperta* are suggestive of sexual selection acting on the structure of the spermatheca. Hence, these results contribute to a better understanding of the evolution of the diverse and complex sperm-storage organs seen in land snail species and even in other animal groups. Clearly, studies on these aspects in more organisms, with the inclusion of other factors such as behavioural traits as was done very recently in *C. aspersum*

(Garefalaki et al. 2017), can still further expand our understanding of sperm storage.

Acknowledgements We thank K. Montagne-Wajer from the Vrije Universiteit and the team of the laboratory “Anatomie Pathologique” of the University of Bejaia/Algeria for the assistance and help in histological work. We also thank A. Staikou for sharing her density estimation method and V. Zizzari for the valuable comments on the manuscript.

References

- Arnqvist G, Rowe L (2002) Antagonistic coevolution between the sexes in a group of insects. *Nature* 415:787–789
- Baer B, Armitage SAO, Boomsma JJ (2006) Sperm storage induces an immunity cost in ants. *Nature* 441:872–887. doi:10.1038/nature04698
- Bakst MR, Bird DM (1987) Location of oviductal sperm-storage tubules in the American kestrel. *Auk* 104:321–324
- Baminger H, Haase M (1999) Variation in spermathecal morphology and amount of sperm stored in populations of the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. *J Zool Lond* 249:165–171. doi:10.1111/j.1469-7998.1999.tb00754.x
- Baminger H, Haase M (2000) Variation of distal genitalia in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum* (Pulmonata, Stylommatophora) caused by sexual selection? *Biol J Linn Soc* 71:599–613. doi:10.1006/bjil.2000.0453
- Baminger H, Haase M (2002) Development of the sperm storage organ in *Arianta arbustorum* (Stylommatophora: Helicidae). *J Moll Stud* 68:192–194. doi:10.1093/mollus/68.2.192
- Baur B (1988) Population regulation in the land snail *Arianta arbustorum*: density effects on adult size, clutch size and incidence of egg cannibalism. *Oecologia* 77:390–394. doi:10.1007/BF00378049
- Baur B (1994) Multiple paternity and individual variation in sperm precedence in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. *Behav Ecol Sociobiol* 35:413–421. doi:10.1007/BF00165844
- Baur B (1998) Sperm competition in molluscs. In: Birkhead TR, Møller AP (eds) *Sperm competition and sexual selection*. Academic Press, San Diego, pp 255–305. doi:10.1016/B978-012100543-6/50033-7
- Beese K, Baur B (2006) Expandable spermatheca influences sperm storage in the simultaneously hermaphroditic snail *Arianta arbustorum*. *Invert Reprod Dev* 49:93–101. doi:10.1080/07924259.2006.9652198
- Beese K, Beier K, Baur B (2006) Coevolution of male and female reproductive traits in a simultaneously hermaphroditic land snail. *J Evol Biol* 19:410–418. doi:10.1111/j.14209101.2005.01022.x
- Beese K, Armbruster GFJ, Beier K, Baur B (2008) Evolution of female sperm-storage organs in the c arrefour of stylommatophoran gastropods. *J Zool Syst Evol Res* 47:49–60. doi:10.1111/j.1439-0469.2008.00491.x
- Benbellil-Tafoughalt S, Sahnoune M, de Vaufléury A, Moali A (2009) Effects of temperature and photoperiod on growth and reproduction of the land snail *Helix aperta* Born (Gastropoda, Pulmonata). *Rev Ecol (Terre et Vie)* 64:207–219
- Benbellil-Tafoughalt S, Koene MJ (2015) Influence of season, temperature, and photoperiod on growth of the land snail *Helix aperta*. *Invert Reprod Dev* 59:37–43. doi:10.1080/07924259.2014.996300
- Benbellil-Tafoughalt S, Sahnoune M, de Vaufléury A, Moali A (2011) Influence of sampling date on reproduction in the land snail *Helix aperta* kept under controlled conditions of temperature and photoperiod. *Rev Écol (Terre Vie)* 66:43–54
- Birkhead TR, Møller AP (1992) number and size of sperm storage tubules and the duration of sperm storage in birds: a comparative study. *Biol J Linn Soc* 45:363–372. doi:10.1111/j.1095-8312.1992.tb00649.x
- Birkhead TR, Møller AP (1993) Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptile, birds and mammals. *Biol J Linn Soc* 50:295–311. doi:10.1111/j.1095-8312.1993.tb00933.x
- Bloch Qazi MC, Aprille JR, Lewis SM (1998) Female role in sperm storage in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Comp Biochem Phys A* 120:641–647. doi:10.1016/S1095-6433(98)10081-8
- Bloch Qazi MC, Heifetz Y, Wolfner MF (2003) The developments between gametogenesis and fertilization: ovulation and female sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 256:195–211. doi:10.1016/S0012-1606(02)00125-2
- Bojat NC, Haase M (2002) Sperm storage in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. *J Zool Lond* 258:497–503. doi:10.1017/S0952836902001656
- Bojat NC, Dürrenberger M, Haase M (2001a) The spermatheca in the land snail, *Arianta arbustorum* (Pulmonata: stylommatophora): Muscle system and potential role in sexual selection. *Invertebr Biol* 120:217–226. doi:10.1111/j.1744-7410.2001.tb00032.x
- Bojat NC, Sauder U, Haase M (2001b) The spermathecal epithelium, sperm and their interactions in the hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum* (Pulmonata, Stylommatophora). *Zoomorphology* 120:149–157. doi:10.1007/s004350000031
- Bojat NC, Sauder U, Haase M (2002) Functional anatomy of the sperm storage organs in Pulmonata: the simple spermatheca of *Bradybaena fructicum* (Gastropoda, Stylommatophora). *Zoomorphology* 121:243–255. doi:10.1007/s00435-002-0062-z
- Brillard JP (1993) Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. *Poult Sci* 72:923–928. doi:10.3382/ps.0720923
- Buzatto B, Roberts D, Simmons L (2015) Sperm competition and the evolution of precopulatory weapons: increasing male density promotes sperm competition and reduces selection on arm strength in a chorusing frog. *Evolution* 69:2613–2624. doi:10.1111/evo.12766
- Conner J, Crews D (1980) Sperm transfer and storage in the lizard, *Anolis carolinensis*. *J Morphol* 163:331–348. doi:10.1002/jmor.1051630307
- Córdoba-Aguilar A, Uhía E, Cordero Rivera A (2003) Sperm competition in Odonata (Insecta): the evolution of female sperm storage and rivals' sperm displacement. *J Zool* 261:381–398. doi:10.1017/S0952836903004357
- Davison A, Wade CM, Mordan PB, Chiba S (2005) Sex and darts in slugs and snails (Mollusca: Gastropoda: Stylommatophora). *J Zool Lond* 267:329–338. doi:10.1017/S0952836905007648
- de Vaufléury A, Gimbert F (2009) Obtention du cycle de vie complet d'*Helix aperta* Born de sites tunisiens en conditions contrôlées: influence de la photopériode. *C. R. Biologie* 332:795–805. doi:10.1016/j.crvi.2009.04.004
- Eberhard WG (1985) *Sexual selection and animal genitalia*. Harvard University Press, Cambridge, pp 1–265
- Eberhard WG (1996) *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press, Princeton, pp 1–501
- Eckstut ME, Sever DM, White ME, Crother BI (2009) Phylogenetic analysis of sperm storage in female squamates. In: Dahnof LT (ed) *Animal reproduction: new research developments*. Nova Science Publishers Inc, New York, pp 185–218
- Elliot JM (1971) Some methods for the statistical analysis of samples of benthic invertebrates. *Freshwater Biol Assoc Sci Publ* 25:1–144

- Evanno G, Madec L (2007) Variation morphologique de la spermathèque chez l'escargot terrestre *Cantareus aspersus*. C R Biologies 330:722–727. doi:10.1016/j.crv.2007.07.005
- Evanno G, Madec L, Arnaud JF (2005) Multiple paternity and postcopulatory sexual selection in a hermaphrodite: what influences sperm precedence in the garden snail *Helix aspersa*. Mol Ecol 14:805–812. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02449.x
- Gage MJG (1995) Continuous variation in reproductive strategy as an adaptive response to population density in the moth *Plodia interpunctella*. Proc R Soc Lond B 261:25–30. doi:10.1098/rspb.1995.0112
- Garefalaki ME, Triantafyllidis A, Abatzopoulos TJ, Staikou A (2010) The outcome of sperm competition is affected by behavioural and anatomical reproductive traits in a simultaneously hermaphroditic land snail. J Evol Biol 23:966–976. doi:10.1111/j.14209101.2010.01964.x
- Garefalaki ME, Kalyva S, Janicke T, Staikou A (2017) Intraspecific variation in reproductive characters is associated with the strength of sexual selection in the hermaphroditic land snail *Cornu aspersum*. Behav Ecol Sociobiol 71(10):150
- Germain L (1930) Mollusques terrestres et fluviatiles (1ère partie). In: Lechevalier P (ed) Faune de France, Paris 21:1–477
- Germain L (1931) Mollusques terrestres et fluviatiles (2e partie), 26 planches. In: Lechevalier P (ed) Faune de France, Paris 22:478–897
- Giusti F, Andreini S (1988) Morphological and ethological aspects of mating in two species of the family Helicidae (Gastropoda Pulmonata) *Theba pisana* (Müller) and *Helix aperta* (Born). Monit Zool Ital (NS) 22:331–363
- Haase M, Baur B (1995) Variation in spermathecal morphology and storage of spermatozoa in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. Invert Reprod Dev 28:33–41. doi:10.1080/07924259.1995.9672461
- Han XK, Zhang L, Li MY, Bao HJ, Hei NN, Chen QS (2008) Seasonal changes of sperm storage and correlative structures in male and female soft-shelled turtles, *Trionyx sinensis*. Anim Reprod Sci 108:435–445. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.09.011
- Hellriegel B, Ward PI (1998) Complex female reproductive tract morphology: its possible use in postcopulatory female choice. J Theor Biol 190:179–186. doi:10.1006/jtbi.1997.0546
- Holt WV (2011) Mechanisms of sperm storage in the female reproductive tract: an interspecies comparison. Reprod Domest Anim 46:68–74. doi:10.1111/j.14390531.2011.01862.x
- Holt WV, Fazeli A (2016) Sperm storage in the female reproductive tract. Annu Rev Anim Biosci 4:291–310. doi:10.1146/annurev-animal-021815-111350
- Kalb J, DiBenedetto AJ, Wolfner MF (1993) Probing the function of *Drosophila melanogaster* accessory glands by directed cell ablation. Proc Natl Acad Sci USA 90:8093–8097. doi:10.1073/pnas.90.17.8093
- Keller L, Reeve HK (1994) Why do females mate with multiple males? The sexually selected sperm hypothesis. Adv Study Behav 24:291–315
- Kerney MP, Cameron RAD (1979) A field guide to the land snails of Britain and NW Europe. William Collins Sons & Co Ltd, London, p 288
- Koentzopoulos E, Staikou A (2007) Variation in spermathecal morphology is independent of sperm competition intensity in populations of the simultaneously hermaphroditic land snail *Cornu aspersum*. Zoology 110:139–146. doi:10.1016/j.zool.2006.10.001
- Koene JM, Schulenburg M (2005) Shooting darts: co-evolution and counter-adaptation in hermaphroditic snails. BMC Evol Biol 5:25. doi:10.1186/1471-2148-5-25
- Ktari MH, Rezig M (1976) La faune malacologique de la Tunisie septentrionale. Bull Soc Sc Nat Tunisie 11:31–74
- Landolfi MA, Green DM, Chase R (2001) Dart shooting influences paternal reproductive success in the snail *Helix aspersa* (Pulmonata, Stylommatophora). Behav Ecol 12:773–777. doi:10.1093/beheco/12.6.773
- Lind H (1973) The functional significance of the spermatophore and the fate of spermatozoa in the genital tract of *Helix pomatia* (Gastropoda: Stylommatophora). J Zool Lond 169:39–64. doi:10.1111/j.1469-7998.1973.tb04652.x
- Liu H, Kubli E (2003) Sex-peptide is the molecular basis of the sperm effect in *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA 100:9929–9933. doi:10.1073/pnas.1631700100
- Lodi M, Staikou A, Janssen R, Koene JM (2017) High level of sperm competition may increase transfer of accessory gland products carried by the love-dart of land snails. Ecol Evol
- Michiels NK (1998) Mating conflicts and sperm competition in simultaneous hermaphrodites. In: Birkhead TR, Møller AP (eds) Sperm Competition and Sexual Selection. Academic Press, London, pp 219–248
- Miller GT, Pitnick S (2003) Functional significance of seminal receptacle length in *Drosophila melanogaster*. J Evol Biol 16:114–126
- Minoretti N, Baur B (2006) Among- and within-population variation in sperm quality in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. Behav Ecol Sociobiol 60:270–280. doi:10.1007/s00265-006-0165-5
- Møller AP, Birkhead TR (1989) Copulation behaviour of mammals: evidence that sperm competition is widespread. Biol J Linn Soc 38:119–131. doi:10.1111/j.1095-8312.1989.tb01569.x
- Murray J (1964) Multiple mating and effective population size in *Cepaea nemoralis*. Evolution 18:283–291. doi:10.1111/j.1558-5646.1964.tb01601.x
- Nakadera Y, Mariën J, Van Straalen NM, Koene MJ (2017) Multiple mating in natural populations of a simultaneous hermaphrodite, *Lymnaea stagnalis*. J Moll Stud 83:56–62. doi:10.1093/mollus/eyw043
- Neubaum DM, Wolfner MF (1999) Wise, winsome or weird: mechanisms of sperm storage in female animals. Curr Top Dev Biol 41:67–97. doi:10.1016/S0070-2153(08)60270-7
- Novo M, Fernández R, Granado-Yela C, Gutiérrez López M, DíazCosín DJ (2013) Does the order of copulation matter? Experimental paternity analyses in the earthworm *Hormogasterelisiae* (Annelida: Hormogastridae). Pedobiologia 56:97–104. doi:10.1016/j.pedobi.2013.01.002
- Oosterhoff LM (1977) Variation in growth rate as an ecological factor in the land snail *Cepaea nemoralis* (L.). Neth J Zool 27:1–132. doi:10.1163/002829677X00072
- Oppliger A, Hosken D, Ribi G (1998) Snail sperm production characteristics vary with sperm competition risk. Proc R Soc Lond B265:1527–1534. doi:10.1098/rspb.1998.0468
- Orr TJ, Zuk M (2012) Sperm storage quick guide. Curr Biol 22:R8–R10. doi:10.1016/j.cub.2011.11.003
- Orr TJ, Zuk M (2014) Reproductive delays in mammals: an unexplored avenue for post-copulatory sexual selection. Biol Rev 89:889–912. doi:10.1111/brv.12085
- Pamilo P (1991) Lifespan of queens in the ant *Formica exsecta*. Ins Soc 38:111–119. doi:10.1007/BF01240961
- Parker GA (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Biol Rev Cambridge Philos Soc 45:525–567. doi:10.1111/j.1469-185X.1970.tb01176.x
- Parker GA (1984) Sperm competition and the evolution of animal mating systems. In: Smith RL (ed) Sperm competition and the evolution of mating systems. Academic Press, New York. doi:10.1016/B978-0-12-652570-0.50008-7
- Pearse DE, Avise JC (2001) Turtle mating systems: behavior, sperm storage, and genetic paternity. J Hered 92:206–211. doi:10.1093/jhered/92.2.206

- Peng J, Chen S, Büsler S, Liu H, Honegger T, Kubli E (2005) Gradual release of sperm bound sex-peptide controls female postmating behavior in *Drosophila*. *Curr Biol* 15:207–215. doi:10.1016/j.cub.2005.01.034
- Perry R, Arthur W (1991) Environmental effects on adult shell size in *Cepaea hortensis*. *Biol J Linn Soc* 43:273–279. doi:10.1111/j.1095-8312.1991.tb00599.x
- Pitnick S, Markow TA, Spicer GS (1995) Delayed male maturity is a cost of producing large sperm in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10614–10618. doi:10.1073/pnas.92.23.10614
- Pitnick S, Markow TA, Spicer GS (1999) Evolution of multiple kinds of female sperm storage in *Drosophila*. *Evolution* 53:1804–1822. doi:10.1111/j.1558-5646.1999.tb04564.x
- Pitnick S, Miller GT, Schneider K, Markow TA (2003) Ejaculate–female coevolution in *Drosophila mojavensis*. *Proc R Soc B* 270:1507–1512
- Pizzari T, Parker GA (2009) Sperm competition and sperm phenotype. In: Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S (eds) *Sperm biology: an evolutionary perspective*. Academic Press, London, pp 207–245
- Ribou AC, Reinhardt K (2012) Reduced metabolic rate and oxygen radicals production in stored insect sperm. *Proc R Soc B* 279:2196–2203. doi:10.1098/rspb.2011.2422
- Rigby JE (1965) *Succinea putris*, a terrestrial opisthobranch mollusc. *Proc R Soc Lond B* 144:445–487. doi:10.1111/j.1469-7998.1965.tb05194.x
- Rogers DW, Chase R (2002) Determinants of paternity in the garden snail *Helix aspersa*. *Behav Ecol Sociobiol* 52:289–295. doi:10.1007/s00265-002-0519-6
- Sasanami T, Matsuzaki M, Mizushima S, Hiyama G (2013) Sperm storage in the female reproductive tract in Birds. *J Reprod Dev* 59:334–338. doi:10.1262/jrd.2013-038
- Schileyko LV, Schileyko AA (1992) Additional findings of the morphology of the proximal part of the reproductive system of the Stylommatophora (Gastropoda, Pulmonata). *Harvard Univ Mus Comp Zool Spec Occ Publ* 9:1–13
- Schütt H (2001) Die Türkische Land schnecken: 1758–2000. *Acta Biologica Benrodis*. 4:1–549
- Sever DM (1991) Sperm storage and degradation in the spermathecae of the salamander *Eurycea cirrigera*. *J Morphol* 210:71–84. doi:10.1002/jmor.1052100107
- Sever DM (1997) Sperm storage in the spermatheca of the red-back salamander, *Plethodon cinereus* (Amphibia: Plethodontidae). *J Morphol* 234:131–146. doi:10.1002/(SICI)1097-4687(199711)234:2<131::AID-JMOR2>3.0.CO;2-F
- Sever DM (2002) Female sperm storage in amphibians. *J Exp Zool* 292:165–179. doi:10.1002/jez.1152
- Sever DM, Brizzi R (1998) Comparative Biology of Sperm Storage in Female Salamanders. *J Exp Zool* 282:460–476. doi:10.1002/(SICI)1097-010X(199811/12)282:4/5<460::AID-JEZ5>3.0
- Sever DM, Moriarty EC, Raina LC, Hamlet WC (2001) Sperm storage in the oviduct of the internal fertilizing frog *Ascaphus truei*. *J Morphol* 248:1–21. doi:10.1002/jmor.1017
- Sever DM, Hamlet WC, Slabach R, Stephenson B, Verrell PA (2003) Internal fertilization in the *Anura* with special reference to mating and female sperm storage in *Ascaphus*. In: Jamieson BGM (ed) *Reproductive Biology and Phylogeny of Anura*. Science Publishers Inc, Enfield, pp 319–341
- Simmons LW (2001) *Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects*. Princeton University Press, Princeton
- Staikou A (2001) Spermathecal morphology and variation of spermathecal sperm content in two populations of the land snails *Helix lucorum* and *Cepaea vindobonensis*, differing in timing and duration of reproductive period. Abstracts, World Congress of Malacology, Vienna
- Suarez SS (2008) Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 52:455–462. doi:10.1387/ijdb.072527ss
- Tan GN, Govedich FR, Burd M (2004) Social group size, potential sperm competition and reproductive investment in a hermaphroditic leech, *Helobdella papillornata* (Euhirudinea: Glossiphoniidae). *J Evol Biol* 17:574–580. doi:10.1111/j.1420-9101.2004.00692.x
- Tattersfield P (1981) Density and environmental effects on shell size in some sand dune snail populations. *Biol J Linn Soc* 16:71–81. doi:10.1111/j.1095-8312.1981.tb01845.x
- Tomba AS (1984) Land snails (Stylommatophora). In: Tompa AS, Verdonk NH, van den Biggelaar JAM (eds) *The Mollusca, vol VII. Reproduction*. Academic Press, London, pp 47–140
- Tram U, Wolfner MF (1999) Male seminal fluid proteins are essential for sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 153:837–844
- van Mol JJ (1971) Notes anatomiques sur les Bulimulidae (Mollusques, Gastéropodes, Pulmonés). *Annales Société Royale Zoologique de Belgique* 101:183–226
- Walker WF (1980) Sperm utilization strategies in nonsocial insects. *Am Nat* 115:780–799. doi:10.1086/283600
- Whelan NW, Strong EE (2014) Seasonal reproductive anatomy and sperm storage in pleurocerid gastropods (Cerithioidea: Pleuroceridae). *Can J Zool* 92:989–995. doi:10.1139/cjz-2014-0165
- Williamson P, Cameron RAD, Carter MA (1976) Population density affecting adult shell size of snail *Cepaea nemoralis* L. *Nature* 263:496–497. doi:10.1038/263496b0
- Yildirim MZ (2004) Edible snails (Terrestrial) of Turkey. *Turk J Zool* 28:329–335

Résumé. Les résultats de la présente thèse sont suggestifs que la sélection sexuelle ; sous forme de compétition spermatique ; peut agir sur les traits reproducteurs des espèces hermaphrodites simultanées et résulte en l'évolution d'adaptations par les deux fonctions mâle et femelle. La variation morphologique de la poche de fertilisation est étudiée chez 4 populations de l'escargot terrestre hermaphrodite *Helix aperta* provenant de Bejaia/Algérie. Les populations étudiées diffèrent en termes de densité d'escargots (3,6-18 individus/m²) et microclimat, donc probablement en l'intensité de la compétition spermatique. Le nombre de tubules spermathécaux varie de 3 à 9. Cependant, les 4 populations ne diffèrent pas significativement dans le nombre moyen de ces tubules. Des différences significatives sont détectées dans la longueur du tubule principal, la longueur de la chambre de fertilisation et la longueur moyenne des tubules latéraux. De plus, des associations significatives sont établies entre la longueur de ces structures et la densité locale des escargots. Nos résultats indiquent que l'intensité de la compétition spermatique peut ne pas affecter le nombre total de tubules spermathécaux, mais peut augmenter leurs longueurs. Une telle augmentation de la longueur de la spermathèque peut refléter une meilleure capacité de stockage de sperme qui est probablement bénéfique dans les situations où l'intensité de compétitions spermatiques est élevée.

Mots clés : *Helix aperta*, poche de fertilisation, spermathèque, compétition spermatique.

Abstract. The results of this thesis are suggestive of sexual selection; in the form of sperm competition; being able to act on the reproductive morphologies of simultaneous hermaphroditic species, resulting in the evolution of adaptations by both male and female functions. The morphological variation of the fertilization pouch was studied in four populations of the simultaneously hermaphroditic land snail *Helix aperta* from Bejaia in northern Algeria. The populations studied differed in snail density (range: 3.6–18 individuals/ m²) and habitat humidity regimes, thus in sperm competition intensity. The number of spermathecal tubules ranged from 3 to 9. However, the four populations did not differ significantly in the mean number of spermathecal tubules. Significant differences were found in the length of the main tubule, the length of the fertilization chamber, and the average length of lateral tubules. In addition, strong associations were detected between the lengths of these structures and the local snail density. Our results indicate that the intensity of sperm competition may not affect the total number of spermathecal tubules, but may increase their lengths. Such an increase in spermathecal length may reflect an improved sperm storage capacity that is probably beneficial in situations of high sperm competitions intensity.

Key words: *Helix aperta*, fertilization pouch, spermatheca, sperm competition.

ملخص. نظرياً، يُعتقد أن مورفولوجيا عضو تخزين الحيوانات المنوية « spermathèque » تلعب دوراً هاماً في عملية الانتقاء الجنسي ما بعد التلقيح عند اللاقاريات. يتكون عضو تخزين الحيوانات المنوية من أنابيب ذو عدد يختلف بين الفصائل الحيوانية و بين أفراد الفصيلة الواحدة. تمت دراسة الاختلاف المورفولوجي لعضو التخصيب، المتضمن لعضو تخزين الحيوانات المنوية، عند 4 مجموعات حلزوين أرضية من نوع *Helix aperta* من منطقة بجاية/شمال الجزائر. هذه المجموعات تختلف من حيث الكثافة (٦،٣-١٨ فرد/م²) والمناخ الموضعي، و من المحتمل في شدة المنافسة المنوية. عدد الأنابيب يتراوح من ٣ إلى ٩. مع ذلك، فإن المجموعات الأربعة لا تختلف بشكل ملحوظ في متوسط عدد هذه الأنابيب. بينما وجدت اختلافات كبيرة في طول الأنابيب الرئيسي، طول حجرة التلقيح و متوسط طول الأنابيب الثانوية. بالإضافة، فقد وجدت ارتباطات إيجابية بين هذه الصفات و الكثافة المحلية. تشير نتائج هذه الدراسة إلى أن شدة المنافسة المنوية قد لا تؤثر على إجمالي عدد أنابيب تخزين الحيوانات المنوية، ولكنها قد تزيد من أطوالها. هذه الزيادة في طول عضو تخزين الحيوانات المنوية قد تعكس قدرة أفضل على التخزين ما قد يكون مفيداً في حالات المنافسة المنوية الشديدة.

كلمات البحث. عضو تخزين الحيوانات المنوية، شدة المنافسة المنوية، عضو التخصيب، *Helix aperta*