THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Agrosystèmes, Écosystèmes et Environnement

Présentée et soutenue par :

M. PIOTR BURSZTYKA

le jeudi 10 décembre 2015

Titre :

ETUDE DU ROLE DES SEMIOCHIMIQUES DANS LES STRATEGIES D'EVITEMENT DES PREDATEURS CHEZ DEUX GASTEROPODES TERRESTRES: DEROCERAS RETICULATUM (MULLER, 1774) ET XEROPICTA DERBENTINA (KRYNICKI, 1836)

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Laboratoire Dynamique Forestière dans l'Espace Rural (DYNAFOR)

Directeur(s) de Thèse :

M. PATRICK PAGEAT

M. ANTOINE BRIN

Rapporteurs :

M. CLAUDIO LAZZARI, UNIVERSITE DE TOURS

M. PIERRE ZAGATTI, INRA VERSAILLES GRIGNON

Membre(s) du jury :

M. FRANÇOIS ROMAN, UNIVERSITES D'AIX-MARSEILLE ET DE TOULON, Président

M. ANTOINE BRIN, EI PURPAN, Membre

M. FERNANDO GUERRIERI, UNIVERSITE DE TOURS, Membre

Mme PATRIZIA D'ETTORRE, UNIVERSITE PARIS 13, Membre

M. PATRICK PAGEAT, IRSEA, Membre

RESUME

Malgré des inconvénients rédhibitoires, l'utilisation de molluscicides reste prédominante dans les stratégies de lutte contre les gastéropodes terrestres, une situation qui appelle au développement d'alternatives. Bien que les gastéropodes terrestres reposent essentiellement sur la chémodétection pour la réalisation d'un grand nombre d'interactions capitales avec leur environnement, leur perception de la prédation reste largement méconnue malgré son importance écologique. Nous avons donc étudié l'altération de comportements de maintenance chez deux espèces de gastéropodes terrestres nuisibles, la limace *Deroceras reticulatum* et l'escargot *Xeropicta derbentina*, en présence de composés chimiques issus de différentes espèces de carabes, une catégorie importante de prédateurs mallacophages. Les résultats obtenus indiquent que les caractéristiques écologiques des prédateurs sont cruciales dans la perception de la pertinence de la menace par ces gastéropodes.

Mots-clés : carabes ; comportements de maintenance ; gastéropodes terrestres ; relations proie-prédateur ; sémiochimiques

ABSTRACT

Despite crippling drawbacks, molluscicides remain predominant in strategies employed against terrestrial gastropods pests, a situation that call for the development of alternatives. Although chemodetection drive many crucial interactions in terrestrial gastropods, their perception of predation remains largely unknown despite its ecological importance. We investigated the alteration of self-maintenance behaviours of two harmful land gastropods, the slug *Derocers reticulatum* and the snail *Xeropicta derbentina*, exposed to chemical compounds from different ground beetle species, an important category of gastropod predators. The results obtained indicate that the ecological features of the predators are crucial for the perception of the relevance of the predation threat by these gastropods.

Keywords: ground beetles; predator-prey relationships; terrestrial gastropods; self-maintenance behaviour; semiochemicals

REMERCIEMENTS

Un travail de thèse n'est pas l'œuvre d'un simple individu isolé mais est au contraire le fruit du concours d'un ensemble de personnes, c'est pourquoi je souhaite, dans les quelques lignes qui suivent, remercier celles qui ont contribuées, scientifiquement et/ou moralement, à la réalisation de ce travail de doctorat.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude envers mes directeurs de thèse, Patrick Pageat et Antoine Brin, pour la confiance qu'ils m'ont accordée en me laissant une grande autonomie dans la conduite de cette thèse tout en me faisant bénéficier de leurs qualités scientifiques et humaines, en particulier dans les moments clés de celle-ci. De même, je remercie vivement Hughes Lucas de Leyssac, directeur financier de l'IRSEA, qui a montré une confiance inébranlable en ces recherches en acceptant de les financer intégralement.

Je souhaite remercier chaleureusement Claudio Lazzari et Pierre Zagatti pour avoir consacré de leur temps à lire, juger et apporter des critiques constructives à ce travail de thèse, ainsi que François Roman, Patrizia d'Ettorre et Fernando Guerrieri pour avoir accepté de participer au jury et pour avoir apporté leurs opinions éclairées.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à l'ensemble de l'équipe de l'IRSEA, en particulier Caroline, Benjamin et Myriam qui, en tant qu'amis et « colocataires » de bureau, ont bien souvent été en première ligne pour supporter mes moments de détresse mais qui ont su les faire oublier par leur bonne humeur sans cesse renouvelée. De même, Céline, Cécile et Alessandro ont été de précieux soutiens par leurs conseils avisés, que ce soit sur la rédaction des articles, du mémoire ou pour la compréhension des arcanes des statistiques.

La réalisation des expérimentations a été possible grâce à la contribution d'entomologistes chevronnés. Je remercie ainsi très vivement Hervé Brustel, Enseignant-chercheur à l'EI Purpan, pour m'avoir fait partager ses connaissances des Carabidae. Sans lui je n'aurais pas eu l'honneur et le plaisir de rencontrer Alain Camard – expert, entres autres, de l'étude des phénomènes d'hybridations chez les carabes – qui m'a fait partager sa passion des carabes et qui m'a donné de précieux conseils sur leur élevage tout en me permettant d'admirer sa collection proprement hallucinante de carabidés et lépidoptères. De même, je

remercie Julien Delnatte et Julie Fourrier pour leur aide précieuse dans la capture respectivement de carabes et de limaces, et d'avantage encore pour leur compagnie plus que sympathique. Je remercie Eve Landen pour sa disponibilité, ses relectures assidues et ses corrections de l'anglais qui ont contribué à la publication des articles.

Une grande part du succès de cette thèse provient du soutien moral des proches, à commencer par mes parents et mes frères qui ont toujours été à mes côtés, malgré la distance géographique, et d'une écoute toujours très attentive. Je remercie Alexandra, Pierre, Guillaume, Régis et Olivier, mes amis de longue date qui m'ont insufflé du courage tout au long de ces années de doctorat, de même que les « italo-goultois », Elisa, Stefano et Pietro, qui ont ponctués cette thèse de soirées gastronomiques, arrosées et (très) décontractées.

Sommaire

RESUME/ABSTRACT ---------- i

REMERCIEMENTS----------ii

LISTE DES FIGURES ----------x

LISTE DES PHOTOGRAPHIES ----------xi

INTRODUCTION ---------- 1

I Taxonomie, biologie et écologie des gastéropodes terrestres ---------- 2

I. 1 Les gastéropodes terrestres ----------2

I. 1. a Place des gastéropodes terrestres au sein des mollusques ----------2

I. 1. b Caractéristiques morphologiques des gastéropodes terrestres----------7

Les formes de types « limaces » et « escargots » ----------9

Principales caractéristiques anatomiques de la forme de type « limace »----------10

I. 1. c La perception sensorielle chez les gastéropodes terrestres ---------- 11

Vision ---------- 11

Olfaction ----------

13

I. 2 Importance agricole et sanitaire des gastéropodes terrestres---------- 18

I. 2. a Importance des gastéropodes terrestres en agriculture---------- 19

I. 3 Caractéristiques spécifiques de *Deroceras reticulatum* et de *Xeropicta derbentina* ---------- 23

I. 3. a Deroceras reticulatum (Müller, 1774) ---------- 23

Taxonomie et caractéristiques morphologiques ---------- 23

Ecologie et cycle de développement ---------- 24

Régulation de l'activité ---------- 26

I. 3. b Xeropicta derbentina (Krynicki, 1836) ---------- 28

Taxonomie et caractéristiques morphologiques ---------- 28

Ecologie, cycle de développement et importance agronomique ---------- 30

I. 4 Méthodes de contrôle des gastropodes terrestres ---------- 34

I. 4. a Contrôle chimique---------- 35

Métaldéhyde et carbamates ---------- 35

Phosphate de fer ---------- 38

I. 4. b Méthodes alternatives ---------- 38

Pratiques agricoles ---------- 39

Contrôle biologique par les prédateurs et les parasites ---------- 40

Phasmarhabditis hermaphrodita ---------- 41

Les Carabidae ---------- 41

I. 5 Objectifs de la thèse ---------- 46

RESULTATS ---------- 49

Première partie

Comportement d'évitement de *Deroceras reticulatum* en réponse à des extraits cuticulaires de différentes espèces de carabes prédateurs ---------- 50

I Préambule ---------- 51

Espèces de carabes employées ---------- 54

Dispositif expérimental ---------- 55

ARTICLE (PLoS ONE) ---------- 56

Chemical compounds related to the predation risk posed by malacophagous ground beetles alter self-maintenance behaviour of naïve slugs (*Deroceras reticulatum*)

Deuxième Partie

La réponse d'évitement de l'escargot invasif *Xeropicta derbentina* à des sécrétions de carabes est liée aux caractéristiques de leurs traits écologiques ---------- 67

II Préambule ---------- 68

Espèces de carabes employées ---------- 70

Détermination de l'espèce d'escargot ---------- 71

Dispositif expérimental ---------- 72

The behavioral response of an invasive land snail to chemical cues from native and a non-native ground beetle predators

Abstract ---------- **73**

Keywords ---------- **73**

II. 1 Introduction ---------- 74

II. 2 Material and Methods ---------- 77

II. 2. a Studied species ---------- *77*

Snails ---------- *77*

Slugs ---------- *78*

Ground beetles ---------- *78*

II. 2. b Stimuli preparation ---------- *78*

II. 2. c Experimental design ---------- *79*

Climbing choice ---------- *79*

Shelter choice trial ---------- *80*

II. 2. d Statistical analysis ---------- *81*

II. 3 Results ---------- 82

II. 3. a Experiment 1 ---------- *82*

II. 3. b Experiment 2 ---------- *82*

II. 4 Discussion ---------- 83

References ---------- 87

Troisième partie

Evaluation de la capacité dissuasive de la présence de sémiochimiques d'un carabe prédateur sur la prise alimentaire de *Deroceras reticulatum* ---------- 93

III Préambule ---------- 94

Espèces de carabes employées ---------- 95

Dispositif experimental ---------- 95

ARTICLE (Journal of Molluscan Studies) ---------- 96

The foraging behaviour of the slug *Deroceras reticulatum* (Müller, 1774) is modified in the presence of cuticular scents from a carabid beetle

DISCUSSION GENERALE ---------- 102

I Objectifs, stratégie d'organisation du programme de recherche et principaux résultats ---------- 103

II Critique méthodologique et mise en perspective des résultats avec la littérature ---------- 106

II. 1 Choix des espèces étudiées----------106

II. 2 Pertinence des comportements étudiés ----------108

II. 3 Les stimuli odorants utilisés----------111

III Interprétation des résultats relatifs à la détection chimique du prédateur ---------- 113

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES---------- 119

BIBLIOGRAPHIE ---------- 124

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : les deux principaux modelés généraux de classification phylogénétique des mollusques.

Figure 2 : relations phylogénétiques entre les groupes constituant les gastéropodes.

Figure 3 : relations phylogénétiques au sein des hétérobranches, établies à partir de données morphologiques.

Figure 4 : classification du clade euthyneura.

Figure 5 : représentation schématique du phénomène de torsion de la masse viscérale chez les gastéropodes et de ses effets sur l'agencement de divers organes.

Figure 6 : morphologie externe des formes « limaces » et « escargots ».

Figure 7 : schémas simplifiés des principaux circuits neuronaux des systèmes olfactifs des mammifères, des gastéropodes et des insectes présentant les similitudes observées entre ces différents systèmes.

Figure 8 : schéma du système olfactif des stylommatophores, basé sur des observations réalisées sur *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Achatinidae), *Cantareus aspersus* (Müller, 1774) (Helicidae) et *Limax maximus* Linnaeus (Limacidae).

Figure 9 : principales espèces de limaces rencontrées en agriculture.

Figure 10 : cycle de développement de *D. reticulatum* en région tempérée.

Figure 11 : répartition de *Xeropicta derbentina*.

Figure 12 : répartition actuelle de *X. derbentina* en Provence.

Figure 13 : cycle de vie de *X. derbentina*.

Figure 14 : cycle de développement de *Protostrongylus stilesi*.

Figure 15 : évolution des surfaces traites et des quantités de principe actifs de molluscicides déployés au Royaume-Uni, de la fin des années 70 a la moitié des années 90.

Figure 16 : tactiques disponibles en lutte intégrée des espèces nuisibles.

Figure 17 : mandibules de carabes cychrisées (*Carabus cychroides* et *C. intricatus*) et macrocephalisées (*C. auriculatus* et *C. irregularis*).

Figure 18 : illustration de la tête cychrisée, d'un carabe du genre *Cychrus* et photographie macro de l'archétype de la tête licinisée trouvée chez le genre *Licinus*.

Figure 19 : schéma comparatif des systèmes reproducteur de *X. derbentina*, de *T. pisana* et de *Cernuella virgata*.

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photo 1 : sections longitudinales en microscopie optique d'yeux de différentes espèces de gastéropodes pulmonés.

Photo 2 : *Deroceras reticulatum* adulte.

Photo 3 : aspect de la coquille de *X. derbentina* dans son aire de répartition d'origine et chez un individu issu d'une population invasive du sud-est de la France.

Photo 4 : aspect de la coquille de *Theba pisana* et de *Cernuella virgata*.

Photo 5 : infestation de *X. derbentina* de différentes classes d'âges.

Photo 6 : micrographie électronique à balayage montrant le détail de l'extrémité d'un palpe maxillaire du prédateur généraliste *Pterostichus melanarius* en forme de patère portant un éventail de récepteur et celui, élargi et portant un grand nombre de récepteurs, trouvé chez le prédateur spécialiste *Scaphinotus marginatus* Fischer 1822.

Photo 7 : principaux éléments du dispositif d'élevage de *D. reticulatum*.

Photo 8 : habitus de *Carabus auratus* ; *Carabus coriaceus* ; *Carabus nemoralis* et de *Carabus hispanus*.

Photo 9 : disposition des dispositifs employés pour évaluer l'influence d'extraits cuticulaires de carabes sur le comportement de maintenance de recherche d'abris par la limace *D. reticulatum*.

Photo 10 : habitus de *Carabus auronitens* et de *Carabus morbillosus*.

Photo 11 : système reproducteur de *X. derbentina*.

Photo 12 : dispositifs destinés à évaluer l'influence de la présence d'extrait cuticulaire de différentes espèces de carabes sur le choix de la surface verticale réalisé par *X. derbentina*.

Photo 13 : ensemble des dispositifs, et détail de l'un d'entre eux, destinés à évaluer la capacité de l'extrait cuticulaire du carabe *C. nemoralis* à prévenir la consommation de jeunes pousses de colza par *D. reticulatum* au cours d'un test à 2 choix.

INTRODUCTION

I Taxonomie, biologie et écologie des gastéropodes terrestres

I. 1 Les gastéropodes terrestres

I. 1. a *Place des gastéropodes terrestres au sein des mollusques*

Avec environ 81000 espèces décrites sur un total estimé entre 150000 et 200000 espèces vivantes (Bouchet 2007; Haszprunar et al. 2008), les Mollusques constituent le second plus grand phylum animal après celui des Arthropodes (Lydeard et al. 2004). C'est une lignée d'invertébrés monophylétique très ancienne, dont la présence dans les enregistrements fossiles remonte au début du Cambrien, il y a 543 Ma, mais des éléments paléontologiques suggèrent une apparition antérieure, au Précambrien (Fedonkin and Waggoner 1997). Il s'agit d'un groupe d'animaux très diversifiés réparti sur 7 à 8 taxons supérieurs, ou « classes », selon les auteurs (Ponder and Lindberg 2008): Solenogastres (ou Neomeniomorpha) et Caudofoveata (ou Chaetodermomorpha), parfois considérés comme des rangs inférieurs appartenant aux aplacophores, Polyplacophora, Monoplacophora, Bivalvia, Scaphopoda, Cephalopoda et Gastropoda (fig. 1 p. 3). Les mollusques présentent une grande variété d'organisations morphologiques allant de petits organismes vermiformes vivants dans les anfractuosités du sol aux calamars géants. Les mollusques occupent pratiquement tous les habitats, depuis les fosses maritimes aux zones montagneuses en passant par la toundra (Cuttelod et al. 2011) et sont présents sur tous les continents, jusqu'à la périphérie de l'Antarctique (Linse et al. 2006).

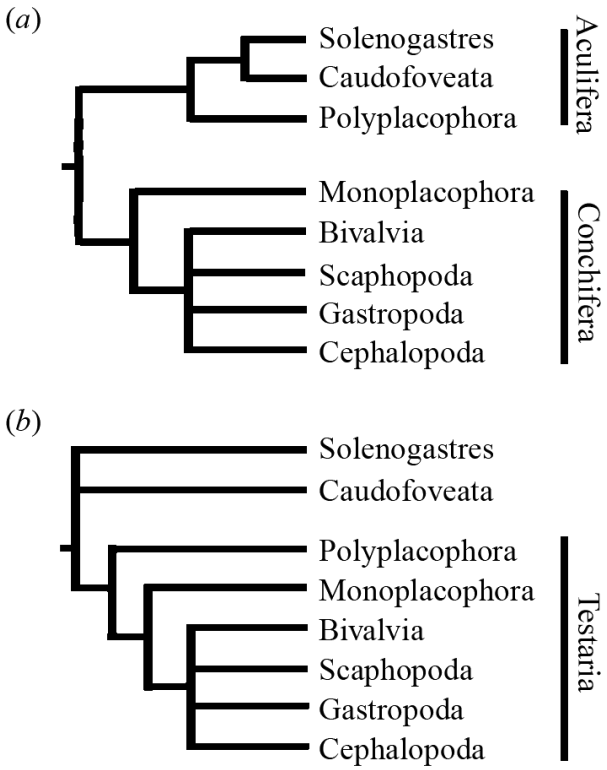


Figure 1 : Les deux principaux modèles généraux de classification phylogénétique des mollusques : modèle Aculifera *(a)* et Testaria *(b)*. Le premier modèle divise l'embranchement des mollusques en deux sous-embranchements : Aculifera (« mollusques épineux ») et Conchifera (« mollusques à coquille »). Dans ce modèle, les aplacophores (Solenogastres et Caudofoveata) forment un groupe frère des polyplacophores. Dans le second modèle, les aplacophores forment la base du clade Testaria, dans lequel les polyplacophores sont un groupe frère des conchifères. D'après Sigwart and Sutton (2007).

Les mollusques non-marins (c'est-à-dire terrestres et d'eau douce) sont trouvés dans les classes Bivalvia et Gastropoda, mais ce dernier est le seul groupe de mollusques à avoir colonisé les milieux terrestres (Haszprunar et al. 2008). Les gastéropodes sont de loin la classe la plus vaste des mollusques (rassemblant environ 80% des espèces) et, avec 40000 à 150000 espèces, elle est la seconde classe la plus importante du règne animal par sa richesse spécifique (Haszprunar et al. 2008). Sa longue histoire évolutive (cette classe est apparue au cours du Cambrien supérieur (Harasewych 2002; Frýda et al. 2008), il y a environ 488 Ma) a souvent été accompagnée de radiations adaptatives rapides ayant conduit des espèces de mêmes lignées évolutives à occuper des niches écologiques très variées. Cependant, on observe aussi l'adaptation à des habitats similaires à ceux de lignées plus éloignées qui aboutit à de très nombreuses homoplasies par convergences évolutives et complique considérablement la structure phylogénétique de cette classe (Bieler 1992; Ponder and

Lindberg 1997; Wade et al. 2006; Dinapoli 2009). Les gastéropodes ont traditionnellement été divisés en trois sous-classes (Prosobranchia, Opisthobranchia et Pulmonata), mais les techniques d'analyses anatomiques et moléculaires développées durant ces trente dernières années ont permis de préciser l'organisation taxonomique des gastéropodes, aujourd'hui répartis en 6 groupes (Ponder and Lindberg 1997; Aktipis et al. 2008; Grande et al. 2008; Strong et al. 2008): Patellogastropoda, Cocculiniformia, Neritopsina, Vetigastropoda, Caenogastropoda et Heterobranchia (fig. 2 p. 5). C'est au sein de ce dernier taxon que se trouvent les gastéropodes terrestres (fig. 3 p. 6), parmi le clade des Euthyneura (fig. 4 p. 6), un groupe incluant les anciens taxons Opistobranchia et Pulmonata (Strong et al. 2008; Dinapoli and Klussmann-Kolb 2010), mais dont le caractère monophylétique est remis en question (Jörger et al. 2010). La colonisation des milieux terrestres depuis le milieu aquatique s'est produite indépendamment dans au moins 10 lignées des gastéropodes terrestres (Barker 2001a), principalement au sein des stylommatophores (fig. 4 p. 6). Cet ordre inclut plus de 95% des gastéropodes pulmonés répartis dans environ 90 familles (Mordan and Wade 2008) et regroupe à lui seul plus de 20000 espèces de gastéropodes terrestres (Heller 2001) sur les 24000 décrites (Bouchet 2007). Il s'agit donc de l'un des groupes d'animaux les plus diversifiés et performant rencontrés au sein des écosystèmes terrestres, où il assure des fonctions écologiques essentielles (Barker 2001b).

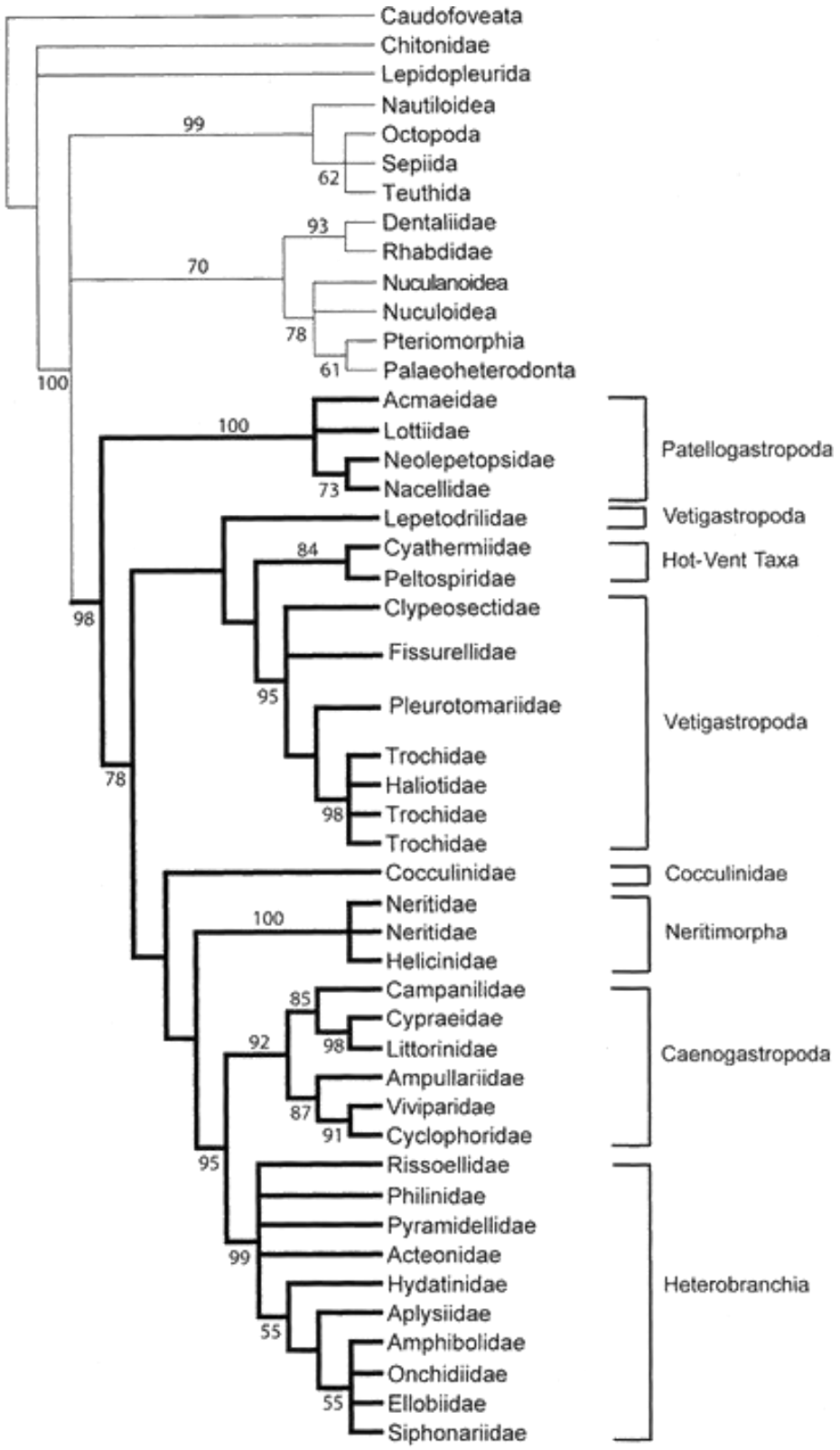


Figure 2 : relations phylogénétiques entre les groupes constituant les gastéropodes, d'après Aktipis et al. (2008).

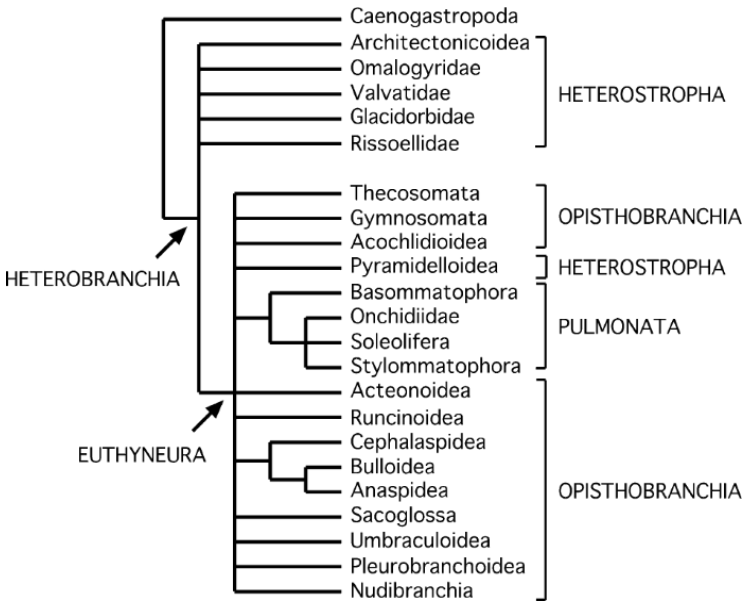


Figure 3 : Relations phylogénétiques au sein des hétérobranches, établies à partir de données morphologiques (d'après Dayrat and Tillier (2002)).

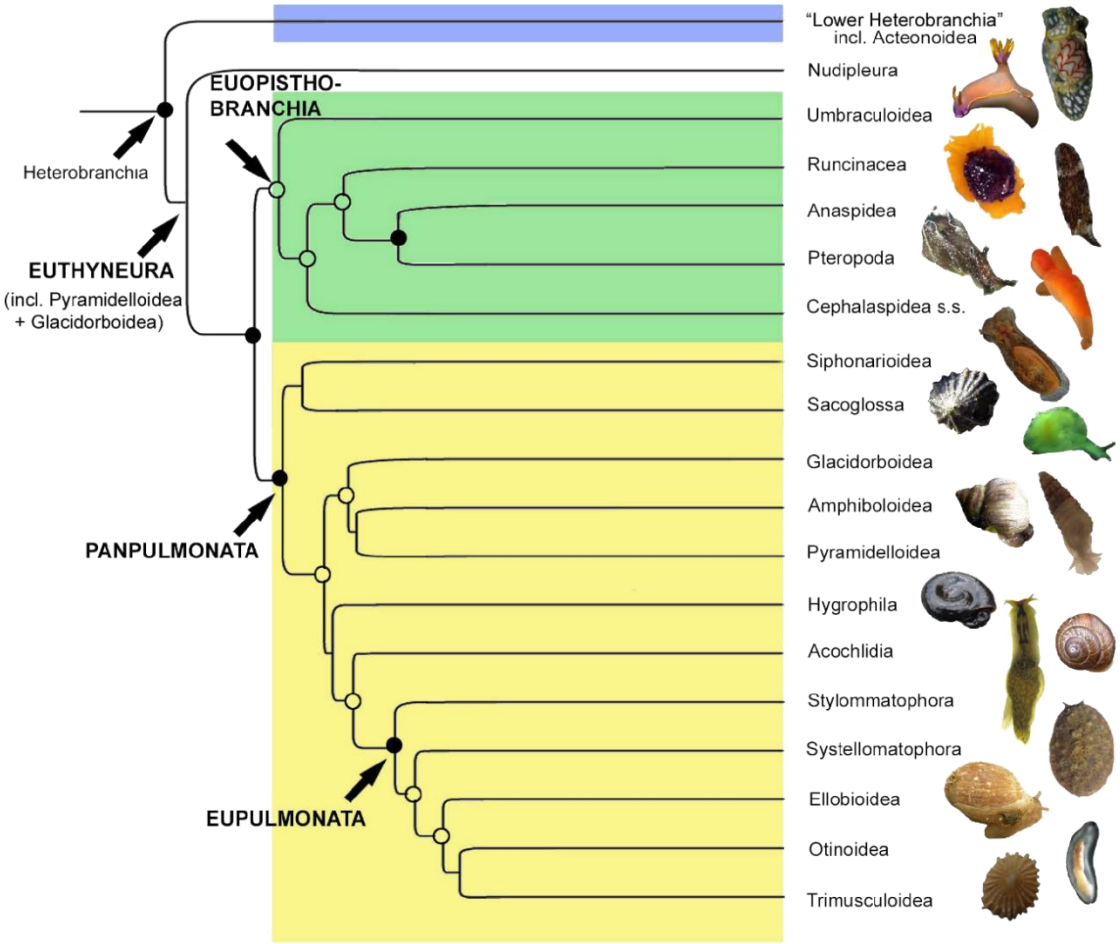


Figure 4 : classification du clade Euthyneura, d'après Jörger et al. (2010).

I. 1. b *Caractéristiques morphologiques des gastéropodes terrestres*

La morphologie des gastéropodes est très variée, cependant il est possible de définir quelques caractéristiques communes à cette classe, dont certaines sont également rencontrées dans d'autres groupes de mollusques. Ils possèdent une coquille sécrétée par le manteau, un système circulatoire ouvert servant de squelette hydrostatique, une radula servant à la prise alimentaire, un pied pour la locomotion, une tête portant une paire d'yeux et les gastéropodes sont aussi les seuls à porter une paire de tentacules céphaliques (Aktipis et al. 2008).

Cependant, la caractéristique propre aux gastéropodes et sans doute la plus marquante, est la torsion de 180° (ou de 90° chez certains opisthobranches) subie par leur masse viscérale au cours de leur développement (fig. 5 p. 8). Cependant une détorsion secondaire post-larvaire est observée dans plusieurs groupes, aboutissant à des adultes partiellement ou complètement détorsadés. La torsion ne concerne que le corps des gastéropodes et n'a aucun rapport avec la forme spiralée asymétrique des coquilles rencontrés chez de nombreuses espèces et qui a évolué à plusieurs reprises dans cette classe (Haszprunar 1988). En effet, les gastéropodes primitifs chez lesquels la torsion est absente, présentaient déjà des coquilles spiralées, tandis que certains gastéropodes contemporains ne présentent pas de coquille spiralée voire ne possède pas de coquille du tout (comme dans certaines formes d'organisation morphologique du type « limace »).

L'anatomie interne des gastéropodes a été profondément modifiée par cette torsion. La plus caractéristique de ces modifications réside dans le positionnement antéro-dorsal de la cavité du manteau (cavité palléale), considéré comme un élément majeur du succès évolutif de cette classe (Haszprunar 1988). Bien que les avantages évolutifs apportés par la torsion de la masse viscérale soient sujets à controverse, certains auteurs considèrent qu'elle apporterait de meilleures capacités défensives face aux prédateurs, en permettant à la tête de l'animal de se retirer en premier à l'intérieur de la coquille en cas d'agression. Il a aussi été avancé que la torsion améliorerait l'accès des branchies à l'écoulement d'eau chez les espèces aquatiques.

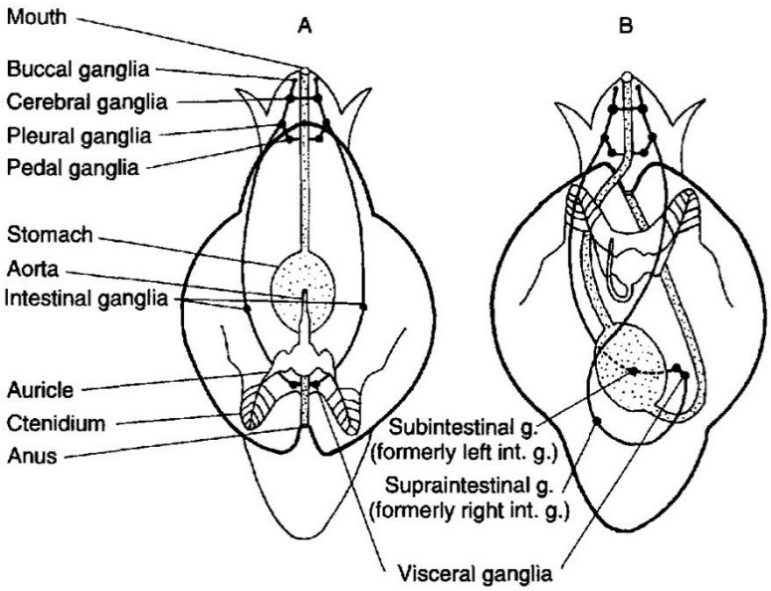


Figure 5 : représentation schématique du phénomène de torsion de la masse viscérale chez les gastéropodes et de ses effets sur l'agencement de divers organes. (A) Hypothétique mollusque ancêtre des gastéropodes, avant torsion. (B) Hypothétique gastéropode primitif après torsion. D'après l'observation du développement des gastéropodes, on sait que la torsion s'opère dans le sens antihoraire, ce qui explique l'apparence torsadée du tractus alimentaire et du système nerveux. Certains gastéropodes, notamment les opistobranches, ont subi une détorsion secondaire au cours de l'évolution, de sorte qu'ils ont une apparence plus proche du modèle A que B. (d'après Chase (2002)).

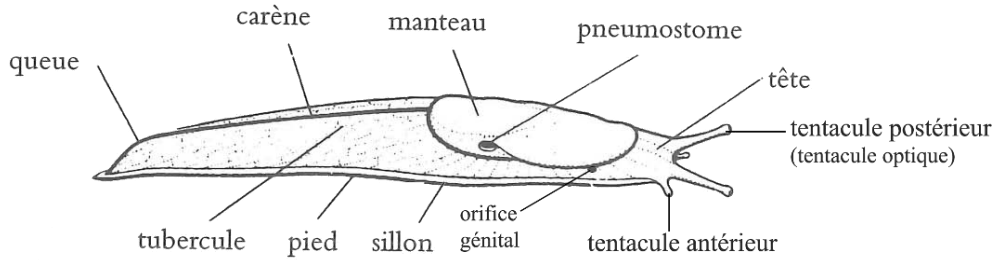
A l'origine, les gastéropodes sont des organismes marins mais plusieurs groupes de cette classe ont opéré un virage adaptatif permettant le passage d'une vie aquatique à une vie terrestre. Ils sont issus de clades de mollusques dotés de coquilles spiralées qui, associés à un plan d'organisation asymétrique du corps, ont conduit à la réduction, voire à la perte, des organes situés sur le côté interne droit de la spirale (Haszprunar 1988; Ponder and Lindberg 1997; Barker 2001a). La caractéristique adaptative majeure responsable de la conquête des milieux non-marins (milieu terrestre et d'eau douce) par les gastéropodes pulmonés, est la présence d'une cavité pulmonaire, similaire à la cavité palléale des mollusques marins (Ruthensteiner 1997), fermée et richement vascularisée. L'air est échangé avec le milieu extérieur à travers un ostium contractile, le pneumostome, qui est considéré comme une apomorphie de ce groupe. En plus de sa fonction dans les échanges gazeux, la cavité pulmonaire peut servir de réserve d'eau, bien que les adaptations permettant aux gastéropodes terrestres de survivre en milieu aérien soient surtout d'ordre physiologique et comportemental.

La quasi-totalité des gastéropodes terrestres est retrouvée dans l'ordre des stylommatophores, qui est caractérisé par trois synapomorphies Dayrat & Tillier (2002) :

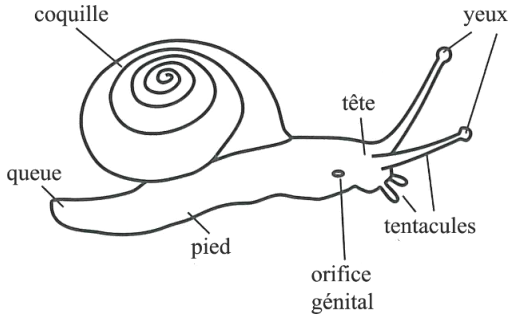
- la présence de deux paires de tentacules rétractiles constituées d'une grande paire de tentacules postérieurs et une paire, plus petite, de tentacules oraux.
- la présence d'une membrane séparant la glande pédale de la cavité viscérale
- la présence d'un uretère secondaire longeant le rectum

Les formes de type « limaces » et « escargots »

L'usage consiste à différencier les gastéropodes terrestres selon deux catégories : les escargots et les limaces. Cette terminologie repose sur la présence ou non d'une coquille externe développée permettant à l'animal de s'y abriter complètement (fig. 6 p. 10). Cependant cette distinction est impropre et n'a pas de signification taxonomique. En effet, la forme de type « limace » est apparue à différentes reprises chez les gastéropodes et de nombreux taxons d'origines diverses ont, par évolution parallèle, adoptés des morphologies remarquablement proches. Ainsi les limaces peuvent être vues comme des escargots avec une coquille réduite ou complètement absente, mais en aucun cas comme un groupe monophylétique (South 1992a; Barker 2002a).



(a)



(b)

Figure 6 : morphologie externe des formes « limaces » (a) et « escargots » (b), (d'après Kerney and Cameron (2006) et Welter-Schultes (2012)).

Les gastéropodes terrestres regroupés sous l'appellation « limaces » constituent un ensemble d'organismes parmi les plus performants rencontrés chez les mollusques. La réduction, voire la disparition, de la coquille s'est traduite par une diminution de la dépendance au calcium, permettant à ces animaux d'accéder à de la nourriture et des abris dans des espaces confinés, contribuant ainsi à leur capacité d'occuper une variété d'habitats plus importante que la plupart des escargots (South 1992a).

Principales caractéristiques anatomiques de la forme de type « limace »

Les limaces sont caractérisées par la présence d'un large pied (ou sole pédieuse) faisant généralement la longueur du corps. Chez la plupart des limaces, la surface du pied s'étend sur le côté du corps et est délimité par un sillon pédieux. La locomotion est assurée par des contractions musculaires du pied et est facilitée par la présence de mucus sécrétée par la

glande pédieuse, située sur la partie antérieure du pied et derrière la bouche de l'animal. La masse viscérale, constituée des organes de la digestion, de la circulation, de l'excrétion et de la reproduction, est située dans la cavité corporelle, formée par l'ensemble « tête-pied ». La masse viscérale est organisée selon un plan en torsion, comme chez de nombreux gastéropodes. Le manteau est une structure caractéristique bien visible, couvrant environ le tiers de la région antérieure dorsale du corps et qui renferme la coquille vestigiale lorsqu'elle existe. Dans la partie droite du manteau s'ouvre, via le pneumostome, la cavité pulmonaire, qui assure les échanges gazeux et l'excrétion. Le bord antérieur du manteau forme un rabat dans lequel la tête de l'animal peut se rétracter pour se protéger. La tête porte deux paires de tentacules rétractiles, les yeux étant situés à l'extrémité de la paire postérieure (fig. 6 p. 10).

I. 1. c *La perception sensorielle chez les gastéropodes terrestres*

Les gastéropodes terrestres sont dépourvus de perception acoustique et leur vision est très rudimentaire. Les principaux organes de la perception (vision et olfaction) chez les stylommatophores, sont portés sur leur double paire de tentacules céphaliques (fig. 6 p. 10). La grande paire de tentacules postérieures, aussi désignée tentacules optiques ou ommatophores, portent non seulement les organes de la vision mais aussi des chémorécepteurs impliqués dans la détections de composés chimiques volatiles distants (Gelperin 1974; Chase and Croll 1981; South 1992b), tandis que la courte paire de tentacules antérieures, les tentacules oraux, est impliquée dans la chémoréception par contact (Kittel 1956; South 1992b).

Vision

Les yeux sont placés en position dorsale, immédiatement derrière l'épithélium olfactif, à l'extrémité de chaque tentacule postérieur (fig. 8 p. 16). Ils sont situés sous un revêtement tégumentaire dont on suppose qu'il sert à prévenir les risques de déshydratation et de blessures mécaniques. Cette région du tégument est fine, en forme de dôme et non pigmentée (transparente) (Zieger and Meyer-Rochow 2008). Les yeux sont constitués d'une

cornée, d'une lentille et d'une rétine. Certaines espèces présentent des structures photoréceptives accessoires (rétine et/ou lentille additionnelle(s)) localisées près des yeux (Photo 1 p. 13). Bien qu'incapables de former une image, ces dernières sont suspectées de servir de capteur de lumière et semblent particulièrement utiles lorsque les tentacules optiques sont partiellement rétractés, ces organes accessoires sont alors les seuls encore capables de détecter la lumière (Tamamaki 1989).

Les travaux de Zieger et al. (2009), menés sur la perception visuelle et l'anatomie de l'œil d'*Arion rufus* (Linnaeus, 1758) et de *Deroceras agreste* (Linnaeus, 1758), ont établi que le système optique de ces espèces ne leur permet pas de percevoir une image nette de leur environnement. La structure des yeux étant adaptée aux besoins de leurs porteurs Nilsson & Pelger (1994), les photorécepteurs des gastéropodes terrestres – animaux avant tout nocturnes au phototactisme négatif prononcé – évaluent la luminosité de l'environnement, ce qui permet à ces espèces de s'orienter vers les lieux sombres. Ces observations rejoignent celles d'autres auteurs (Newell and Newell 1968; Chase and Croll 1981) qui, en s'appuyant sur l'organisation rudimentaire des yeux de différentes espèces d'escargots et de limaces et de leurs comportements, ont supposé que ces yeux ne leurs permettent de distinguer que les contrastes entre zones sombres et claires, ainsi que les changements d'intensité de la lumière, particulièrement durant la nuit. La vision semble aussi impliquée dans la régulation du rythme circadien et des fonctions reproductives (Sokolove et al. 1977; McCrone et al. 1981).

Deux formes de comportements typiques des gastéropodes sont liées à leur vision. Le plus évident s'exprime à travers le phototactisme positif ou négatif. Ainsi, les gastéropodes peuvent se servir de la lumière pour s'orienter soit vers les sources de forte intensité lumineuse soit, plus fréquemment, pour s'en éloigner (phototaxie). L'autre comportement est une réponse induite par à une chute soudaine de l'intensité lumineuse. L'animal réagit en se retirant dans sa coquille ou son manteau, tout en adhérant fortement au substrat. Cette réponse défensive permet notamment aux gastropodes de faire face à l'attaque de certains de leurs prédateurs, en réagissant à leur ombre projetée (Land 1968).

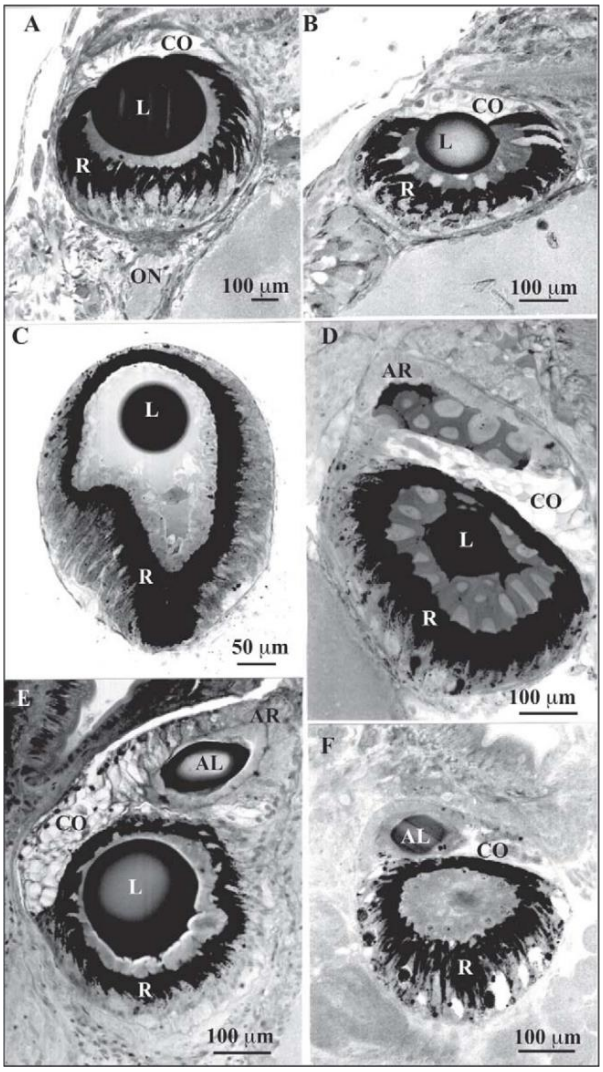


Photo 1 : sections longitudinales en microscopie optique d'yeux de différentes espèces de gastéropodes pulmonés. (A*) Cepaea nemoralis* (Linnaeus, 1758) (escargot terrestre), (B) *Trochulus hispidus* (Linnaeus, 1758) (escargot terrestre), (C) *Lymnea stagnalis* (Linnaeus, 1758) (escargot aquatique), (D) *Deroceras agreste* (Linnaeus, 1758) (limace), (E) *Achatina fulica* (Férussac, 1821) (escargot terrestre), (F) section longitudinale de l'œil additionnel de *Deroceras agreste*. AL : lentille additionnelle ; AR : rétine additionnelle ; CO : cornée ; L : lentille ; ON : nerf optique ; R : rétine. Photos (A), (B) et (C) d'après Bobkova et al. (2004a) ; photos (D) et (F) d'après Bobkova et al. (2004b).

Olfaction

Les gastéropodes possèdent deux voies olfactives (Ito et al. 2000). La voie principale, la plus largement étudiée, concerne la perception d'informations olfactives au cours de l'orientation à distance. Elle est assurée par les tentacules postérieurs. La seconde voie, assurée par les tentacules antérieurs semble essentiellement consacrée à la chémoréception de contact. Ces deux voies olfactives sont structurellement très similaires, les principales

différences se situant dans leur taille et la présence d'yeux dans les ommatophores. La structure du système olfactif des mollusques est très similaire à celle des arthropodes et des vertébrés (fig. 7 pp. 14-15) (Chase 1986; Eisthen 2002), ce qui participe à l'intérêt porté à ces organismes en tant que modèles d'étude pour la compréhension des mécanismes neuronaux impliqués dans la perception olfactive et des mécanismes d'apprentissage des odeurs (Croll 1983; Eisthen 2002). L'essentiel des connaissances sur l'olfaction des gastéropodes terrestres est issu de travaux réalisés sur quelques espèces de grande taille, principalement les escargots *Achatina fulica* Bowdich, 1822 et *Helix aspersa* Müller, 1774 et les limaces *Lehmannia marginata* (Müller, 1774) et *Limax maximus* Linnaeus, 1758 (Eisthen 2002).

Le système olfactif se compose d'un épithélium olfactif situé à l'extrémité des tentacules, d'un ganglion tentaculaire connecté au lobe procérébral du système nerveux central (ganglion cérébral ou « cerveau ») par le nerf tentaculaire (fig. 8 p. 16). Le lobe procérébral est directement connecté aux ganglions buccal et pédieux, respectivement centre de l'alimentation et de la locomotion, ce qui suggère que l'orientation et le déplacement sont intimement liés à la perception de stimuli olfactifs. Ces derniers activent de nombreuses connexions nerveuses dans la région cérébro-buccale (Gervais et al. 1996).

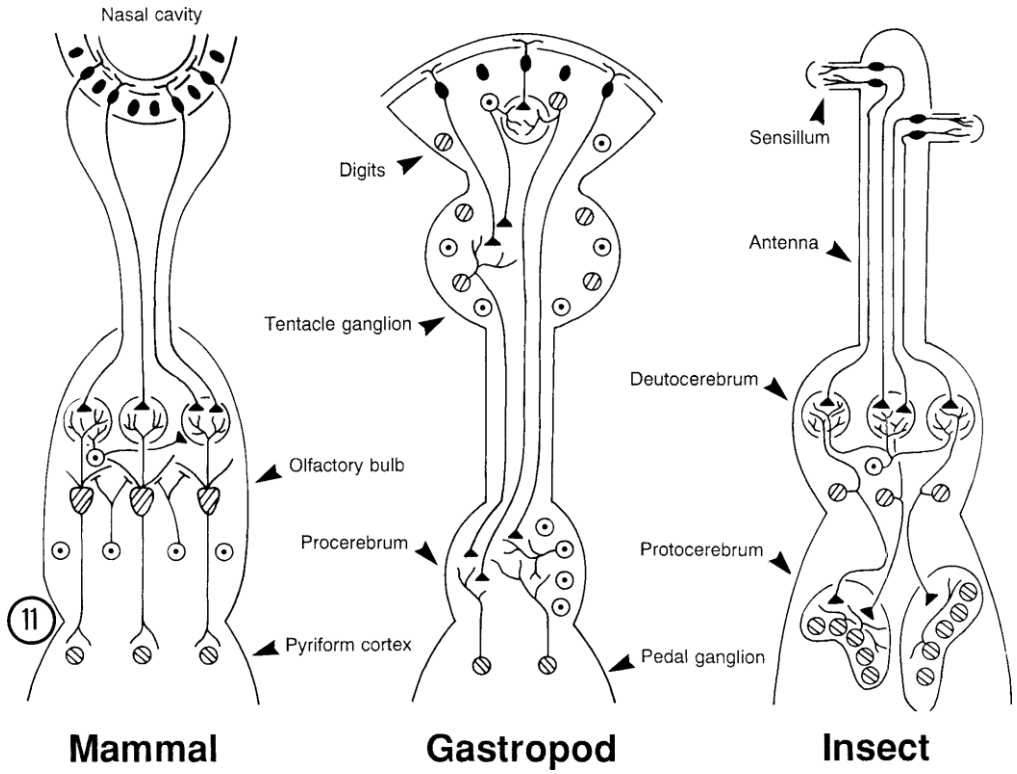


Figure 7 (page précédente) : schémas simplifiés des principaux circuits neuronaux des systèmes olfactifs des mammifères, des gastéropodes et des insectes présentant les similitudes observées entre ces différents systèmes. Les cercles avec les synapses symbolisées à l'intérieur représentent les glomérules. Les types cellulaires analogues sont représentés de la même manière : neurone sensitif ⊘; neurone de projection ⊘; neurone de second ordre ○; interneurone ●. D'après (Chase and Tolloczko 1993).

L'épithélium de l'organe olfactif est situé sur la face antéroventrale de l'extrémité des tentacules olfactifs, sous l'emplacement des yeux. Les structures olfactives (fig. 8 pp. 16-17) sont constituées de neurones sensoriels bipolaires dont les faisceaux de dendrites sont projetés au travers du muscle contractile de l'extrémité du tentacule et d'une couche de cellules épithéliales cylindriques. L'extrémité de ces neurones est surmontée de microvillosités, de cils ou des deux qui dépassent de la surface de l'épithélium olfactif (Chase and Tolloczko 1993). Cet épithélium possède deux types de glandes unicellulaires spécifiques : les glandes lipidiques et les glandes protéiques. La nature et l'emplacement de ces dernières suggèrent qu'elles sont impliquées dans la sécrétion de protéines de liaisons intervenant dans l'acheminement des molécules odorantes à leurs récepteurs membranaires, comme chez les mammifères et les insectes. Les axones aboutissent soient dans les glomérules situés dans des extensions en forme de doigts de chaque ganglion tentaculaires, soit dans le corps principal de ces mêmes ganglions (fig. 8 pp. 16-17). Chaque ganglion tentaculaire fait approximativement la moitié de la taille du ganglion cérébral et il est entièrement dédié au traitement des informations olfactives et, dans une moindre mesure, mécanosensorielles. Quatre types de neurones, directement reliés au système nerveux central, sont retrouvés à la fois dans les ganglions des tentacules postérieurs et inférieurs, dont la similarité de l'organisation des structures neurales indique qu'ils remplissent des fonctions analogues mais selon des modalités différentes (Chase and Croll 1981; Ito et al. 2000), comme semblent le montrer les études neurocomportementales (Chase 1986; Friedrich and Teyke 1998; Kimura et al. 1998). Il est par ailleurs probable que des cellules chémoréceptrices soient présentent sur l'ensemble du tégument mais en densité moindre (Chase 2002b).

Le système neuronal dédié à l'olfaction chez les gastéropodes possède plus de cellules nerveuses que le reste du système nerveux central, témoignant de l'importance de ce sens pour ces animaux (Chase 1986; Emery 1992). En effet, l'olfaction est leur principal mode de perception à distance.

L'orientation des gastéropodes terrestres vers une source d'odeurs fait appel à trois formes de réaction locomotrice (Farkas and Shorey 1976; Chase and Croll 1981). Le suivi de pistes (« trail following »), qui consiste pour un gastéropode à suivre à l'aide des tentacules antérieurs une trace de mucus laissée par lui-même, un congénère, voire une espèce différente. Il intervient dans les comportements de « homing » (retour à un site refuge « attitré »), de recherche d'un partenaire sexuel et, dans une moindre mesure, de nourriture (Cook 1994). L'anémotaxie intervient en présence d'un courant d'air et l'orientation, qui ne nécessite l'utilisation que d'un seul tentacule postérieur, consiste à un échantillonnage successif de l'environnement olfactif à différents moments au cours du déplacement (klinotaxie). Par contre, dans un milieu calme dépourvu de courant d'air, l'orientation s'effectue suivant un gradient de concentration et requiert l'emploie des deux tentacules postérieurs pour la comparaison bilatérale simultanée de l'environnement (tropotaxie).

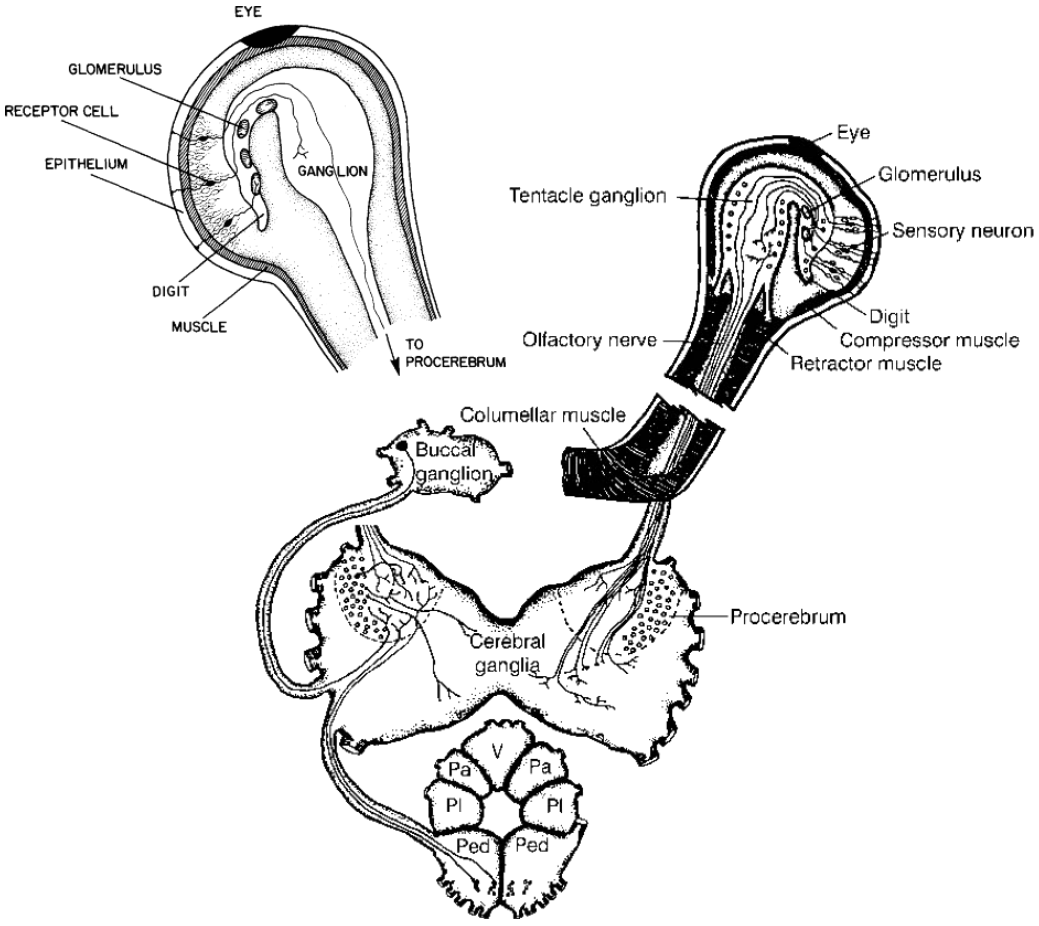


Figure 8 : schéma du système olfactif des stylommatophores, basé sur des observations réalisées sur *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Achatinidae), *Cantareus aspersus* (Müller, 1774) (Helicidae) et *Limax maximus* Linnaeus (Limacidae). Un seul tentacule oculaire et un seul ganglion buccal sont représentés. Toutes les autres structures sont représentées selon leur conformation bilatérale, mais différents aspects du circuit neuronal au sein du

procerebrum sont présentés dans les parties droites et gauches. Abréviation des ganglions : V : viscéral ; Pa : pariétal ; Pl : pleural ; Ped : pédieux. Au-dessus à gauche : détail de l'extrémité d'un tentacule chez *Achatina fulica*. L'œil et le nerf optique appartiennent à un système sensoriel séparé. D'après Chase (2001) et Chase and Tolloczko (1986).

L'olfaction est la principale source d'informations sensorielles à partir de laquelle les gastéropodes terrestres organisent la majeure partie de leur répertoire comportemental : recherche et discrimination de sources de nourriture, recherche de refuges et de lieu de repos (homing), interactions sociales (agrégation), recherche de partenaires sexuels et évitement des prédateurs (Kohn 1961; Croll 1983).

En effet, bien qu'étant largement polyphages, les gastéropodes terrestres sont sélectifs dans le choix de leur alimentation car beaucoup de plantes possèdent des métabolites secondaires qui altèrent leur palatabilité (Cates and Orians 1975). Cette capacité de discrimination entre les différentes sources de nourritures repose sur l'olfaction à distance et le goût. Les préférences alimentaires sont sous la dépendance de la reconnaissance innée de certains signaux chimiques issus des sources alimentaires et l'acquisition d'autres par l'expérience et l'apprentissage (Croll 1983). Ainsi, les gastéropodes peuvent ils se « spécialiser » sur certaines plantes, au détriment d'autres, au travers de signaux chimiques issus d'aliments qui se sont avérés particulièrement nourrissants, sains et abondants.

Les limaces et les escargots localisent leurs congénères que ce soit pour la reproduction, les comportements d'agrégation, de refuge et de lieux de repos, grâce à la présence de signaux chimiques contenus dans les traces de mucus, notamment lors du comportement de trail following (« pistage ») et de homing (retour à un abri déjà fréquenté) et/ou la perception de substances volatiles. De par la spécificité des réponses obtenues, les substances impliquées sont des phéromones. Bien qu'elles n'aient pas été formellement identifiées, elles semblent provenir, suivant l'espèce, soit d'une glande pédieuse soit d'une glande située au-dessus de la tête (Chase and Boulanger 1978).

La perception et l'évitement des prédateurs font partis des comportements vitaux des mollusques assurés par l'olfaction (Croll 1983). Bien que l'écrasante majorité des exemples sont issus d'études employant des mollusques aquatiques (Kats and Dill 1998), des recherches relativement récentes ont permis d'illustrer ce type d'interaction chez des gastéropodes terrestres (Armsworth et al. 2005; Lefcort et al. 2006). Dans tous les cas, les composés

impliqués proviennent soit directement de l'odeur propre des prédateurs (kairomones) soit, indirectement, de leurs activités prédatrices (métabolisme du prédateur, congénères blessés).

I. 2 *Importance agricole et sanitaire des gastéropodes terrestres*

La majeure partie des gastéropodes terrestres est constituée de détritivores qui remplissent un rôle prépondérant dans le cycle des éléments nutritifs en facilitant la décomposition de la matière organique morte et le retour de la litière végétale au sol (Wolters and Ekschmitt 1997). Les autres espèces se répartissent entre les phytophages qui s'alimentent sur des plantes vivantes, des champignons, des microorganismes du phylloplan et les prédateurs, dont les proies sont essentiellement d'autres gastéropodes ou des annélides (Barker 2004). Dans les sociétés humaines, les gastéropodes terrestres jouent ou ont joué, un rôle important comme source de nourriture, animaux de compagnie, sources de remèdes médicaux (Bonnemain 2005; Ajadi et al. 2013), outils, ornements, teinture voire comme monnaie dans les échanges commerciaux (Barker 2001b; Aktipis et al. 2008). Ils sont également très utilisés comme modèles de recherche, notamment en neurosciences, en écologie comportementale et en génétique des populations (Yamagishi et al. 2008; Greve et al. 2010).

Près de la moitié des espèces disparues au cours des 500 dernières années sont des mollusques : 258 espèces de gastéropodes et 31 bivalves figurent parmi les 693 espèces animales disparues. Les gastéropodes terrestres sont l'un des groupes d'animaux pour lequel les menaces d'extinction sont les plus préoccupantes (Lydeard et al. 2004; Cuttelod et al. 2011), alors même que l'immense majorité des espèces est totalement ignorée des populations humaines. En effet, près de la moitié des espèces considérées en danger dans le monde sont des mollusques et en très grande majorité des gastéropodes terrestres (Lydeard et al. 2004). Ils sont victimes des activités humaines (perte, fragmentation et dégradation des habitats, introduction d'espèces invasives). Près de 1300 espèces de gastéropodes terrestres sont enregistrées sur la liste rouge des espèces en danger établie par l'IUCN (International Union for the Conservation of Nature) (Lydeard et al. 2004; Strong et al. 2008).

Cependant, une petite fraction des espèces existantes (entre 100 et 300 espèces) s'est particulièrement bien adaptée aux changements environnementaux provoqués par l'Homme et s'est durablement établie dans les habitats modifiés à travers le monde. Ces espèces montrent souvent de très bonnes capacités de dispersion passive par l'intermédiaire des activités humaines ainsi qu'une forte capacité invasive lorsqu'ils sont introduits dans de nouveaux habitats, où ils peuvent évincer les espèces endémiques (Cowie 1992; Barker 2002b). Bien que cela ne concerne qu'une faible proportion des espèces, les gastéropodes terrestres sont ainsi surtout connus pour leur rôle préjudiciable pour la santé humaine et animale en tant qu'hôtes intermédiaires de nombreux helminthes parasites (Barker 2004; Aktipis et al. 2008) et pour les ravages qu'ils occasionnent dans les cultures.

I. 2. a *Importance des gastéropodes terrestres en agriculture*

Si on excepte quelques espèces d'escargots nuisibles rencontrées dans des cultures et des zones géographiques particulières, les dégâts provoqués par les gastéropodes terrestres en agriculture sont très majoritairement le fait de limaces (Barker 2002a).

Bien que seules une fraction des espèces de limaces provoquent des dégâts économiques considérables en agriculture et en horticulture (Port and Ester 2002), leurs déprédations sont connues depuis l'Antiquité (Henderson and Triebskorn 2002). Leur importance en tant que ravageurs de cultures est particulièrement marquée en Europe (en particulier au Royaume-Uni et au Pays-Bas), berceau d'espèces nuisibles parmi les plus préjudiciables, mais aussi dans de nombreuses autres régions humides et tempérées du globe, notamment aux Etats-Unis (Ross et al. 2009), Canada, Amérique Centrale, Australie (Nash et al. 2007) et Nouvelle Zélande (Wilson 2007). Les dégâts imputables aux limaces se sont accrus au cours ces trente dernières années du fait de la multiplication des cas d'introductions d'espèces invasives compétitrices adaptées à ces climats (Cowie et al. 2008). La mise en place de nouvelles pratiques agricoles a également favorisé leur pullulation (Henderson and Triebskorn 2002) : la diminution du labourage favorise le maintien de l'humidité du sol et fournit des abris aux limaces. On peut aussi citer l'expansion des monocultures créatrices de couvert végétal dense, le colza (*Brassica napus* Linnaeus, 1753) en constituant un exemple

emblématique. Aussi, les semis réalisés en automne plutôt qu'au printemps, contribuent au maintien et à la prolifération des populations de limaces nuisibles (Moens and Glen 2002).

De nombreuses cultures sont exposées aux ravages des limaces à travers le monde, les principales sont : le colza (Moens and Glen 2002), le blé d'hiver (Glen et al. 1993; Frank 1998), le maïs (Hammond et al. 1999), le soja (Hammond 1985; Hammond et al. 1999), la pomme de terre (Airey 1987; Keiser et al. 2012), la luzerne (Grant et al. 1982) et les fraises (Prystupa et al. 1987; Ellis et al. 2006). Les limaces provoquent, selon les espèces, des dégâts sur les parties aériennes et/ou souterraines des plantes. Les premiers stades de germination de nombreuses plantes cultivées, en particulier le colza, sont particulièrement sensibles (Glen et al. 1989), tandis que les cultures de céréales, notamment le blé d'hiver, peuvent être compromises du fait de l'évidement des semences observé lors de fortes pullulations de limaces. Certaines variétés semblent plus appétantes que d'autres, ce qui a été clairement démontré en ce qui concerne le colza. En effet, des variétés de colza dénommées « double-low », car moins riche en glucosinolates et en acide érucique, sont cultivées en Europe depuis les années 1980 pour leur qualité nutritives supérieures pour l'alimentation humaine. Les glucosinolates sont naturellement présents dans beaucoup d'espèces de brassicacées. Ce sont des substances soufrées qui interviennent dans la saveur amère et la production de substances toxiques pour les phytophages polyphages de ces plantes (Glen et al. 1990). Glen et al. (1990) ont observé que les variétés cultivées de colza à faible concentration en glucosinolates sont plus sensibles aux limaces que les variétés sauvages.

Les principales espèces de limaces responsables de destructions dans les cultures en régions tempérées appartiennent aux genres *Limax*, *Milax*, *Arion* et *Deroceras* (fig. 9 p. 21). L'espèce la plus communément rencontrée, et la plus préjudiciable en agriculture, est *Deroceras reticulatum* (Müller, 1774). Celle-ci est largement présente à travers toute l'Europe, mais a aussi été introduite dans d'autres parties du monde, dont l'Australie (Nash et al. 2007), la Nouvelle-Zélande (Barker 2002b) et l'Amérique du Nord (Crowell 1977).

Genera	*Key pest species*
Deroceras	*D. reticulatum* (Müller)
	D. panormitanum (Pollonera)
	D. laeve (Müller)
Milax	*T. budapestensis* (Hazay)
	M. gagates (Draparnaud)
	M. sowerbyi (Férussac)
Limax	*L. maximus* (L.)
	L. flavus (L.)
Arion	*A. ater* (L.)
	A. vulgaris (Moquin-Tandon)
	A. hortensis aggregate:
	A. distinctus (Mabille);
	A. owenii (Davies);
	A. hortensis (Férussac)
	A. subfuscus (Draparnaud)
	A. flagellu (Collinge)
Arion complex	*A. circumscriptus* (Johnston)
	A. silvaticus (Lohmander)
	A. fasciatus (Nilsson)

Figure 9 : Principales espèces de limaces rencontrées en agriculture. D'après Howlett (2012).

Le coût réel des dommages provoqués par les limaces dans les cultures est difficile à évaluer pour plusieurs raisons (Brooks and Cook 2003; Howlett 2012) . D'une part, en raison d'un défaut de signalement des dégâts imputables aux limaces et, d'autre part, les dégradations observées peuvent être confondues avec celles d'autres nuisibles (l'inverse est également vrai) (South 1992a). Enfin, les conséquences économiques varient aussi en fonction des cours des productions agricoles concernées. Ainsi, l'évaluation des dégâts engendrés par les limaces repose sur des données indirectes, essentiellement d'ordres économiques comme le coût et les quantités de molluscicides employés à un moment donnée. Pour autant il n'existe pas d'étude complète sur l'importance économique exacte de ces dégâts, seules des tentatives chiffrées ont été établies, qui ne concernent souvent que certaines cultures ou ne sont basées que sur quelques caractéristiques pertinentes (pertes de rendement, zones drainées, surfaces traitées à l'aide de molluscicides). Enfin, de nombreuses données sont anciennes ou peu fiables (Howlett 2005; Howlett 2012).

Parmi les données disponibles, beaucoup concernent le Royaume-Uni. Ainsi, on estime qu'environ 4 M£ (soit environ 5,4 M€) de dégâts sont provoqués rien que pour les cultures de blé chaque année au Royaume-Uni (Shirley et al. 2001). Ce pays dépense environ 10 M£ (plus de 13,6 M€) en molluscicides (Garthwaite and Thomas 1996) chaque année, pour un coût

global en tentatives de contrôle des populations de limaces estimé à près de 30 M£ (près de 41 M€) (Redbond 2003). La France est le plus gros marché des molluscicides, avec 45 M€ dépensés chaque année (Redbond 2003).

Si les dégâts observés en agriculture sont le plus souvent provoqués par consommation directe, d'autres peuvent être le fait d'agents pathogènes transmis par les limaces par l'intermédiaire de leur mucus ou de leur tractus digestif. C'est par exemple le cas pour les bactéries *Mycocentrospora acerina* (R. Hartig) Deighton, (1972) et *Pectobacterium carotovorum* (Jones 1901) Waldee 1945 responsables respectivement de la pourriture de la carotte (Dawkins et al. 1985) et de la pomme de terre (Dawkins et al. 1986). De même, les gastéropodes sont impliqués dans la transmission de champignons tels que *Alternaria brassiciola* (Schweinitz) Wiltshire, (1947), agent des « maladies nécrotiques » chez de nombreuses Brassicacea (Hasan and Vago 1966), ou encore du mildiou du haricot *Phaseolus lunatus* Linnaeus, 1753 (Wester 1964). Bien que la majeure partie des parasitoses transmises par les gastéropodes le soit par des escargots, certaines espèces de limaces ont aussi été reconnues comme des hôtes de parasites de diverses espèces animales. Par exemple, *Deroceras agreste* a été identifié comme un hôte intermédiaire du strongle pulmonaire d'ovins *Cystocaulus ocreatus* (Railliet & Henry 1907) (Stephenson 1964), *Mullerius capillaris* (Müller, 1889) a été détecté dans le pied de plusieurs espèces de limaces de régions tempérées dont *D. reticulatum* (Rose 1957; Anderson 2000a), tandis que Patel et al. (2014) ont mis en évidence le rôle de plusieurs espèces de limaces appartenant à trois familles différentes (Arionidae, Milacidae et Limacidae) dans la transmission du nématode parasite de divers canidés et du rat *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905.

I. 3 Caractéristiques spécifiques de *Deroceras reticulatum* et de *Xeropicta derbentina*.

I. 3. a *Deroceras reticulatum (Müller, 1774)*

Taxonomie et caractéristiques morphologiques

Le genre *Deroceras* (Stylommatophora : Agriolimacidae) compte le plus grand nombre d'espèces de limaces terrestres (une centaine environ) et constitue le principale représentant de la famille des agriolimacidés (Wiktor 2000). Parmi les espèces du genre, *D. reticulatum* (cf. photo 2 p. 24) (anciennement connue comme *Agriolimax reticulatus* (Müller, 1774)) est sans doute la plus connue pour les ravages qu'elle occasionne dans nombreuses cultures agricoles et horticoles, mais aussi parce qu'elle est très cosmopolite. En effet, bien qu'originaire d'Europe de l'ouest, elle a été introduite dans de nombreuses régions du globe (South 1992a) (Europe, Amérique du Nord et du Sud, Asie, Australie, Nouvelle-Zélande), où elle est considérée comme la principale espèce de limaces responsable des dégâts en agriculture et en cultures maraichères.

L'espèce ne dépasse pas les 5 cm lorsqu'elle est entièrement étendue. Sa couleur est très variable, allant du gris sombre au blanc crème. La surface du tégument est ponctuée de taches sombres plus ou moins denses et est parcourue de nodules lui donnant un aspect rugueux, tandis que la surface du manteau est couverte d'un motif rappelant une empreinte digitale. Une crête, la carène, parcours environ le dernière tiers de la face dorsale de la queue en son milieu. Le mucus sécrété par cette espèce est incolore, sauf lorsqu'elle est irritée ou agressée, où elle produit alors un mucus blanchâtre épais.



Photo 2 : *Deroceras reticulatum* adulte (photo P. Bursztyka, IRSEA ©)

Ecologie et cycle de développement

La distribution des populations de *D. reticulatum* dans un milieu dépend de la présence de nourriture, d'une humidité suffisante ainsi que de la disponibilité d'abris (Duval 1970; Rollo and Wellington 1977). Bien qu'essentiellement solitaire, des comportements grégaires peuvent être observés, notamment après l'éclosion des œufs (South 1965) ou lorsque les conditions sont défavorables (climat sec) : les individus se regroupent alors afin de limiter la déperdition d'eau (Waite 1988). En tant qu'espèce polyphage, elle s'est particulièrement bien adaptée aux milieux perturbés, comme les cultures en terres arables (South 1974). Alors que le cycle de vie de *D. reticulatum* était relativement méconnu il y a une cinquantaine d'années, les études se sont multipliées afin d'en combler les lacunes à partir des années 70 face à l'importance grandissante prise par cette espèce en tant que nuisible cosmopolite (South 1989).

D. reticulatum est une espèce hermaphrodite simultanée, avec la phase mâle précédant la phase femelle (développement protandrique). C'est une espèce sémelpare dont les générations peuvent se reproduire à tous moments de l'année pourvue que les conditions soient propices (Bett 1960). *D. reticulatum* est une espèce prolifique, capable de pondre jusqu'à 500 œufs par individu par paquet de 30 environ (Port and Port 1986) sous différents éléments, comme les pierres et les feuilles où dans les anfractuosités du sol. Les œufs étant sensibles à la déshydratation, l'oviposition se fait dans un milieu à forte teneur en humidité (dans un sol saturé d'eau à 75%). La température a une forte influence sur la durée d'incubation des œufs : les œufs pondus en automne mettent entre 5 et 6 mois à éclore, tandis que ceux pondus au printemps ont une durée d'incubation de 2 à 3 mois, mais celle-ci peut

être réduite à deux semaines à 20°C en laboratoire (South 1992c). La croissance des individus est très irrégulière, avec des écarts de masse pouvant atteindre 25 à 40 % entre individus issus d'une même ponte. Il semble que la taille des œufs soit responsable de ces différences de croissance, les plus gros œufs produisant des individus avec une croissance plus lente (South 1992c).

Le cycle de vie annuel est particulièrement influencé par la température (South 1982). Il n'existe qu'une seule génération par an lorsque le climat est froid (Dmitrieva 1969), mais deux générations par an sont produites en région tempérées (cf. fig. 10 ci-après). L'une paraît au printemps, de mai à juin, pour donner naissance à la génération d'automne, qui émerge de septembre à octobre (Bett 1960). Toutefois les générations ne sont pas pour autant distinctes car les adultes ayant une durée de vie comprise entre 7 et 9 mois, un chevauchement des générations est fréquent. Cependant, les conditions idéales à la croissance de l'espèce (nourriture, température, humidité) sont rarement rencontrées dans l'environnement, si bien que la réalisation intégrale des deux générations au cours d'une année n'est pas toujours possible (Hunter and Symonds 1971). En revanche, il est fréquent d'observer un chevauchement de plusieurs générations à certains moments de l'année. En effet, lorsque la croissance des limaces est ralentie, une génération peut apparaître en juillet qui donnera naissance à une génération en avril de l'année suivante.

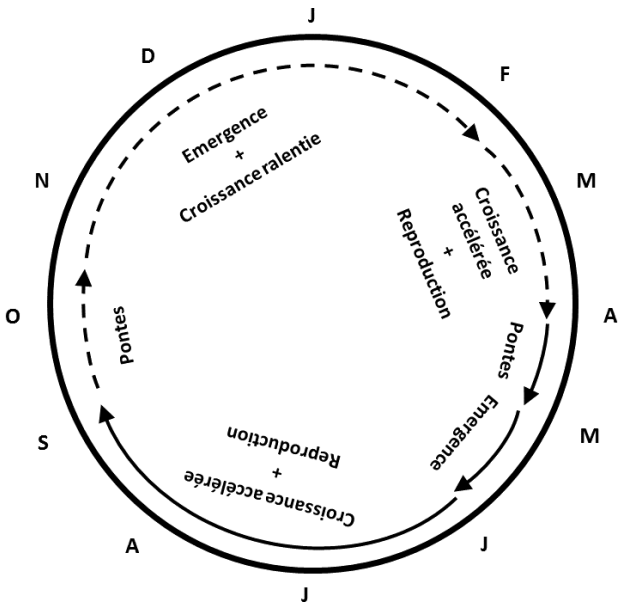


Figure 10 : cycle de développement de *D. reticulatum* en région tempérée, présentant deux générations dans l'année. Les flèches pleines correspondent au cycle de la 1ère génération, les flèches brisées décrivent le cycle de la seconde génération.

Régulation de l'activité

L'activité des limaces est dictée à la fois par des facteurs environnementaux et par des rythmes endogènes. L'un des facteurs critiques à cet égard est leur capacité à satisfaire le compromis existant entre la réalisation de leurs besoins vitaux (s'alimenter, boire, trouver un partenaire sexuel, un abri, un site de repos…) et la nécessité de préserver leur homéostasie hydrique (Howes and Wells 1934). Cette contrainte physiologique est particulièrement prégnante dans la mesure où les déplacements, indispensables à la réalisation des différents comportements de maintenance de l'animal, constituent aussi la première cause de perte hydrique. En effet, trois sources majeures de pertes d'eau sont liées au déplacement chez les gastéropodes terrestres : le mode de déplacement en lui-même, qui implique la sécrétion continue de mucus chargé d'eau (98% du mucus est constitué d'eau), l'exposition accrue à des conditions défavorables (atmosphère asséchante) et une hausse de la perte d'eau par échange gazeux au travers de la cavité pulmonaire (Cook 2001). Chez les espèces dépourvues de coquille bien développée, comme les limaces, la déperdition d'eau se fait en majorité à travers le tégument plutôt que par l'excrétion d'urine (Deyrup-Olsen and Martin 1982). Ainsi, en laboratoire, les limaces actives peuvent perdre par évaporation de 3 à 5 % de leur masse initiale par heure dans une atmosphère avec une humidité relative de 45% (Dainton 1954). Dainton (1954) a aussi montré que des *D. reticulatum* se déplaçant dans une atmosphère saturée en humidité et sur une surface humide peuvent perdre jusqu'à 17% de leur masse initiale simplement par production de mucus. Cependant, des *D. reticulatum* trouvées en plein champ montrent une capacité surprenante à maintenir une teneur en eau corporelle élevée constante (Lyth 1983). Il semble que les limaces se déplacent de manière à éviter les conditions les plus défavorables au maintien de leur homéostasie hydrique. *D. reticulatum*, comme toutes les limaces, régule son hydratation en sélectionnant les substrats appropriés lui permettant d'absorber activement de l'eau au travers du pied (Prior 1985). De fait, lorsque le sol s'assèche, son activité s'en retrouve drastiquement réduite (Young and Port 1991). A l'inverse, se déplacer permet aux limaces d'éliminer leur surplus d'eau lorsque cela est nécessaire (Kerkut and Taylor 1956).

Les activités physiologiques et comportementales de la plupart des animaux sont en partie sous la dépendance d'une rythmicité endogène, dont les périodes s'inscrivent généralement à différentes échelles temporelles (circannuelles, circadiennes…) (Bennet

1974). Ces cycles sont entraînés par des facteurs environnementaux prévisibles, ou « Zeitgebers », les plus prégnants étant la lumière et la température. Chez *D. reticulatum*, le facteur clé impliqué dans la régulation de ses activités est la photopériode (Sokolove et al. 1977), modulée par les cycles de températures (Wareing and Bailey 1985; Rollo 1991). Le rythme circadien limite l'activité aux périodes où le risque de déshydratation est moindre, c'est pourquoi *D. reticulatum* est essentiellement active la nuit (Newell 1966; Hommay et al. 1998). Plus précisément, *D. reticulatum* s'active peu après le coucher du soleil et se réfugie peu après l'aube (Newell 1965a; Hommay et al. 1998). Les principales activités entreprises par *D. reticulatum* concernent la recherche de nourriture pendant la nuit et la recherche d'un refuge au lever du jour (Rollo 1982; Rollo 1991; Hommay et al. 1998). Bien que *D. reticulatum* soit trouvée active à des températures proche de 0°C (Mellanby 1961) jusqu'à environ 30°C, les conditions thermiques optimales à son activité se situe dans un intervalle compris entre 9°C et 20°C (Wareing and Bailey 1985). Ces limaces peuvent alors parcourir entre 4 et 7m par nuit (Bailey 1989; Hommay et al. 1998). Dainton (1954) a observé qu'en période estivale (au Royaume-Uni), le déclenchement de l'activité de *D. reticulatum* est très prononcé lorsque la température chute en dessous de 21°C, tandis que l'inverse est observé lorsque la température dépasse ce même seuil. Cependant, le déclenchement de l'activité doit être associé à une diminution de l'intensité lumineuse pour qu'il atteigne son efficacité maximale. Les limaces s'abritent durant le jour, dans la litière ou des anfractuosités du sol, mais n'en sortiront pas si la luminosité est trop intense. Si les limaces réfugiées dans le sol ne peuvent percevoir la lumière elles sont activées par leur horloge biologique mais resteront à l'entrée de leur abri jusqu'à ce que les conditions leur permettent de sortir (Rollo 1991). Bien que l'activité des limaces soit négativement corrélée à l'intensité lumineuse qui peut avoir un effet inhibant voire répulsif sur les limaces (Newell 1965b; Rollo 1991), la lumière peut intervenir dans le comportement de homing (site de retraite spécifique). Etant donné que la majorité de ces données proviennent d'essais réalisés en laboratoire, il est probable qu'en plein champs d'autres facteurs interviennent dans la modulation de l'activité des limaces, comme l'humidité de l'air et du sol, les fluctuations de températures de l'air et les courants d'air (Lewis 1969; Wareing and Bailey 1985; Young and Port 1991).

Le comportement de homing a été décrit chez de nombreuses espèces de limaces, dont *D. reticulatum* (Rollo and Wellington 1981). Il est d'une grande importance pour les limaces

car un abri approprié permet de prévenir les risques de déshydratation. Il peut faire intervenir le suivie de traces de mucus de congénères chez *D. reticulatum* (Gelperin 1974; Rollo and Wellington 1981; Ng et al. 2013) et/ou de stimuli olfactifs (Gelperin 1974; Cook 1979). Il semble que le homing implique un duo de phéromones, l'une volatile et détectable à distance, provenant peut-être des fèces présents dans les abris (Farkas and Shorey 1976), l'autre seulement par contact des tentacules antérieurs avec le mucus lors du « trail following ». L'approche vers le site de retraite est directe par beau temps mais se trouve perturbée par temps de pluie et le vent (Rollo and Wellington 1981).

I. 3. b *Xeropicta derbentina (Krynicki, 1836)*

Taxonomie et caractéristiques morphologiques

Xeropicta derbentina est un escargot terrestre classé comme suit :

Xeropicta derbentina (Krynicki, 1836)	
Classe	Gastropoda
Ordre	Stylommatophora
Super-famille	Helicoidea
Famille	Hygromiidae
Sous-famille	Hygromiinae

Cette espèce aussi appelée « hélicelle des Balkans », est originaire de l'est du bassin méditerranéen (Croatie, Turquie, Crimée, Istrie, Bulgarie, Roumanie, Caucase) où elle occupe les milieux ouverts steppiques et semi-désertiques (cf. fig. 11 ci-dessous).

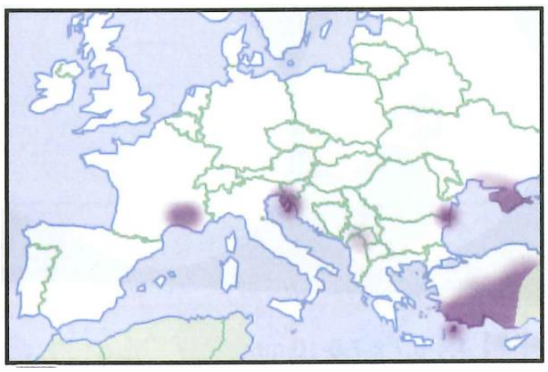


Figure 11 : répartition de *X. derbentina* (d'après Welter-Schultes (2012))

La coquille mesure entre 12 et 20 mm de diamètre pour une hauteur comprise entre 7 et 12 mm au stade adulte et elle est constituée de 4,5 à 5,5 tours. Elle est presque lisse avec de très légères stries et la sculpture de sa spirale est très fine. Elle présente un polymorphisme colorimétrique : elle est généralement d'un blanc pur chez les populations trouvées en France (Dieterich et al. 2012), mais peu présenter de légères lignes tachetées de points bruns rougeâtres sur sa surface dans les populations issues de son aire d'origine notamment (cf. photo 3 ci-dessous). L'animal est de couleur clair.



Photo 3 : aspect de la coquille de *X. derbentina* dans son aire de répartition d'origine (Turquie, d'après Welter-Schultes (2012)) et à l'extrême droite chez un individu issu d'une population invasive du sud-est de la France (Vaucluse, Saint-Saturnin-lès-Apt, 84220. P. Bursztyka ©).

Sa détermination peut être confondue, en France, avec *Theba pisana* (Müller, 1774), et *Cernuella virgata* (Da Costa, 1778) deux espèces originaire du Maroc (Greve et al. 2010; Irikov and Gerdzhikov 2013) devenues invasives dans de nombreuses régions du monde possédant un climat de type méditerranéen (Däumer et al. 2012). La coquille de ces espèces montre un important polymorphisme de formes et de coloris (photo 4 ci-après), si bien que certains spécimens peuvent être confondus avec *X. derbentina*.



Photo 4 : aspect de la coquille de : (a) *Theba pisana* (Grèce et Italie) et (b) *Cernuella virgata* (Albanie) (d'après Welter-Schultes (2012))

Cependant, *T. pisana* est inféodé aux plaines côtières du pourtour méditerranéen, où il affectionne les sols sableux et la végétation des dunes (Arad and Avivi 1998). Il est donc rarement trouvé à l'intérieur des terres. L'adulte de cette espèce est aussi légèrement plus gros que *X. derbentina* et possède un nombre de tour de coquille supérieur (6 contre 5,5 respectivement).

La présence de *X. derbentina* dans le sud-est de la France a été attestée pour la première fois en 1949. L'invasion par la sous-espèce *X. derbentina homoleuca* Brusina, 1870 originaire de Croatie et d'Istrie, aurait débutée dans les années 1940 (Regteren 1960), dans la région d'Aix-en-Provence. L'aire de répartition de l'espèce s'est ensuite étendue, à partir des années 70, dans le Vaucluse, le Var, les Bouches-du-Rhône, et les Alpes de Haute Provence (fig. 11 p. 28 et 12 ci-après).

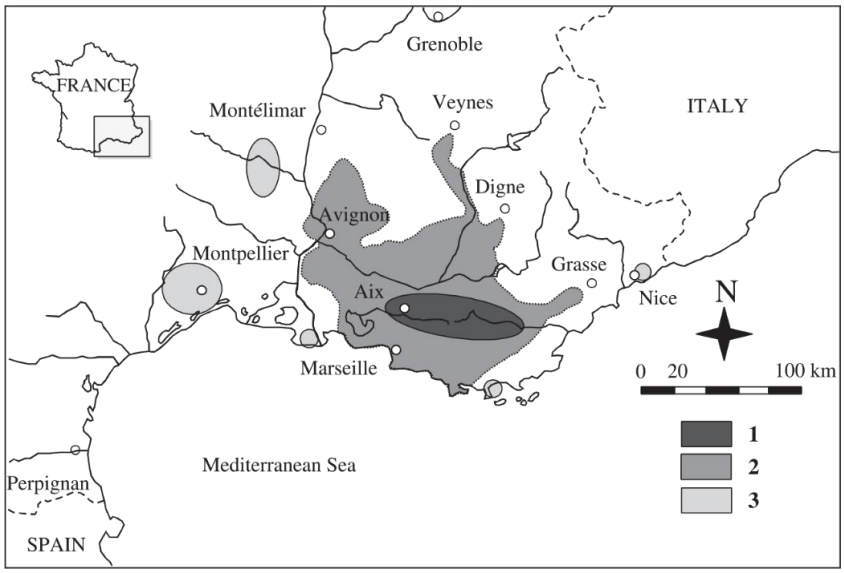


Figure 12 : répartition actuelle de *X. derbentina* en Provence : (1) répartition géographique supposée de 1949 à 1965 (2) répartition continue actuelle (3) populations discontinues et isolées (d'après Aubry et al. (2005)).

Ecologie, cycle de développement et importance agronomique

Les données concernant l'écologie de *X .derbentina* sont rares. Il s'agit d'une espèce xérophile qui peut former des populations de plusieurs centaines, voire milliers, d'individus

par m² dans les milieux ouverts méditerranéens comme les pelouses sèches, les friches, les pâturages, les terres agricoles et les milieux rudéraux. L'étendue de ces populations peut être facilement observée en été, période durant laquelle de larges groupes sont retrouvés sur la végétation ou sur d'autres sites de repos situés au-dessus du niveau du sol, en état d'estivation. Comme chez de nombreuses autres espèces xérophiles méditerranéennes de la superfamille des Helicoidea, ces escargots sont connus pour adopter un comportement adaptatif de « réflexe d'escalade » qui les amènent à sortir rapidement de leur état d'estivation lorsqu'ils tombent au sol, pour se percher sur l'objet vertical le plus proche, ce qui a pour effet de réduire leur exposition à la chaleur du sol (cf. photo 5 ci-dessous). Comme ils peuvent s'accrocher sur des animaux ou des véhicules, ce comportement est considéré comme l'un des facteurs les plus efficaces impliqués dans la dispersion passive de cette espèce (Aubry et al. 2006).



Photo 5 : infestation de *X. derbentina* de différentes classes d'âges dans (a) une prairie sèche et (b) sur une clôture grillagée (Vaucluse, Saint-Saturnin-lès-Apt, 84220. P. Bursztyka ©)

Le cycle de développement de *X. derbentina* est relativement mal connu et on relève de nombreuses divergences entre les auteurs (Labaune 2001). Les accouplements et les pontes ont lieu, comme chez la plupart des espèces xérophiles, pendant tout l'automne et peuvent se prolonger jusqu'au début de l'hiver. En laboratoire Kiss et al. (2005) ont observé que ces escargots peuvent s'accoupler jusqu'à 3 fois au cours d'une même saison de reproduction et déposent leurs œufs en plusieurs lots donnant naissance à des « portées » de 82 ± 28 nouveau-nés en moyenne après 15 à 20 jours d'incubation. Ces résultats sont similaires à ceux observés en conditions naturelles. Les juvéniles et les adultes passent l'hiver abrités enfouis dans le sol au pied des végétaux, tandis que les œufs pondus tardivement n'éclosent qu'entre mars et avril conduisant à un chevauchement des catégories d'âges pendant la période d'activité suivante.

Suivant les conditions climatiques, les individus peuvent vivre entre 12 et 30 mois, conduisant à la réalisation d'un cycle annuel ou bisannuel (cf. fig. 13 ci-dessous). Lorsque le cycle est annuel, les individus connaissent une première phase de croissance au printemps puis atteignent le stade adulte au cours d'une seconde phase de croissance qui a lieu à la fin de l'été, leur permettant de se reproduire au cours de l'automne. Dans le cas de la réalisation d'un cycle bisannuel, les individus nés en automne n'atteignent la maturité sexuelle qu'au cours du second printemps (Bonavita 1965).

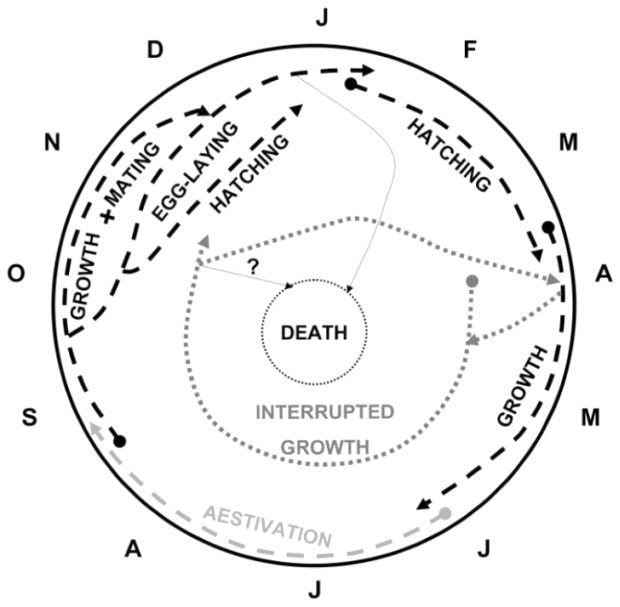


Figure 13 : cycle de vie de *X. derbentina* : le cycle annuel est représenté par les flèches noires tirées et le cycle bisannuel par les flèches grises pointillées (issu de Kiss et al. (2005)).

X. derbentina n'a qu'un faible impact sur les cultures étant donné qu'il s'alimente principalement de matière organique morte (Hatziioannou et al. 1994), mais l'accumulation d'individus sur les parties apicales de la végétation peut provoquer des dégâts, comme le chancre du bourgeon dans les vignes et les vergers (Kiss et al. 2005). En revanche, *X. derbentina*, à l'instar d'un grand nombre d'hygromiidae, apparaît comme un hôte et un vecteur efficace de strongles pulmonaires (Nematoda : Metastrongylidea : Protostrongylidea) d'ovins (*Muellerius*, *Cystocaulus*, *Protostrongylus*, *Neostrongylus*).

En effet, ces parasites nécessitent deux hôtes (cf. fig. 14 p. 34) : l'hôte intermédiaire obligatoire, un escargot, et l'hôte définitif, un ovin. L'escargot s'infeste de larves L1 lorsqu'il entre en contact avec des fèces contaminées. Les larves poursuivent leur développement jusqu'au stade L3, stade infestant pour les ovins. Ces derniers ingèrent, au cours du pâturage, soit directement des escargots contaminés, soit des larves libérées à la suite de la mort de leur hôte intermédiaire. Les larves migrent alors du tractus digestif vers les poumons, en empruntant le système circulatoire lymphatique et/ou sanguin, afin d'y compléter leur développement. Les femelles pondent leurs œufs qui éclosent rapidement pour donner des larves L1, résistantes au gel et à la dessiccation. Ces larves entrent dans les voies respiratoires de leur hôte puis rejoigne le tractus digestif où elles sont émises dans le milieu extérieur via les fèces de l'animal (Anderson 2000b), où elles peuvent recommencer le cycle d'infestation.

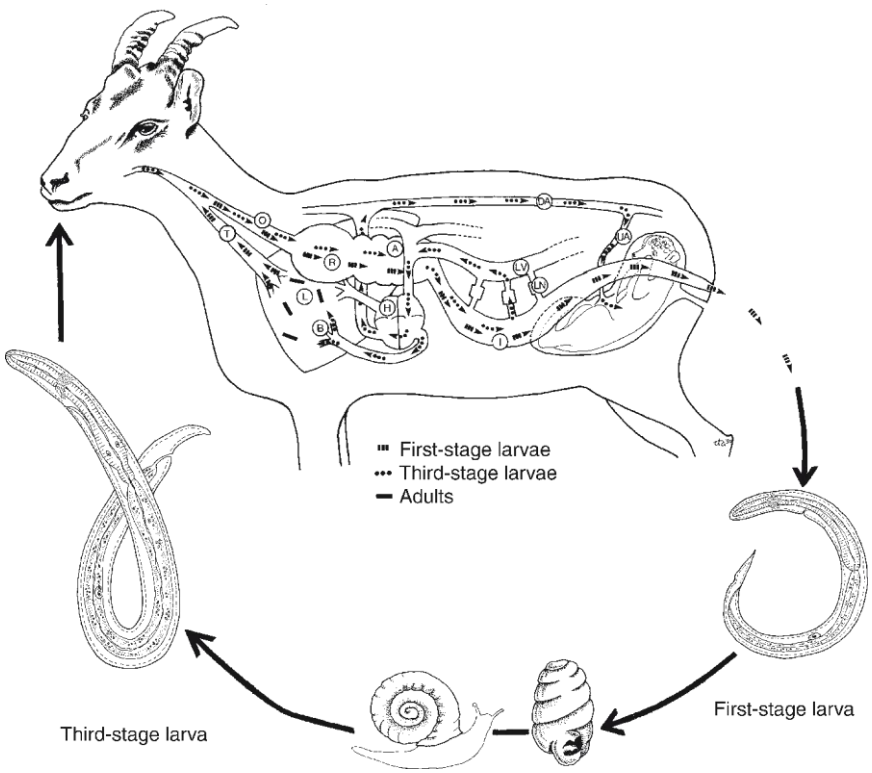


Figure 14 : cycle de développement de *Protostrongylus stilesi*. A = abomasum; B = bronches; DA aorte dorsale; H = cœur; I = intestin; L = poumons; LN = nœud lymphatique; LV =vaisseau lymphatique; O = œsophages; R = rumen; T = trachée; UA = artère ombilicale. (d'après Anderson (2000)).

Labaune (2001) a montré, à la fois expérimentalement et par des observations sur le terrain, une forte réceptivité de *X. derbentina* à l'infestation par *C. nigrescens* (Jerke, 1911), *N. linearis* (Marotel, 1913) et *M. capillaris* (Mueller, 1889), bien qu'à des degrés variable selon l'espèce de protostrongle considérée. Paraud et al. (2005) ont mis en évidence des infestations de *M. capillaris* chez *X. derbentina*. Les fortes infestations par ces parasites provoquent une surmortalité des brebis, un retard de croissance et une réduction du taux de survie des agneaux (Pandey et al. 1984).

I. 4 Méthodes de contrôle des gastropodes terrestres

Il existe trois principales approches du contrôle des populations de gastéropodes terrestres : le contrôle chimique, le contrôle au moyen de pratiques agricoles alternatives et le contrôle biologique. Aucune d'entre elles n'est suffisamment efficace pour prétendre

maintenir les dégâts sous le seuil susceptible d'affecter la rentabilité économique des cultures, une approche intégrée est donc nécessaire.

I. 4. a *Contrôle chimique*

Métaldéhyde et carbamates

Les premiers molluscicides étaient des composés inorganiques dessicants ou caustiques, comme le sulfate de cuivre, le cyanate de calcium, la chaux, le vert de Paris (acéto-arsénite de cuivre), les sels d'aluminium (Kelly and Martin 1989), particulièrement préjudiciables à la faune et la flore sauvage.

De nos jours, la plupart des principes actifs des molluscicides employés proviennent soit de découvertes fortuites, soit sont dérivés d'autres pesticides (insecticides, herbicides, fongicides…), comme le DDT dans les années 40, mais avec des résultats partagés (Henderson and Triebskorn 2002). Le métaldéhyde, un polymère d'acétaldéhyde initialement employé comme carburant solide pour réchaud de pique-nique, a été découvert par hasard en 1934 en Afrique du Sud (Gimingham and Newton 1937). A partir des années 40, le métaldéhyde a été le principal agent molluscicide employé (Gimingham 1940) jusqu'à l'introduction d'appâts à base de carbamates dont le méthiocarbe introduit à la fin des années 60 (Kelly and Martin 1989), originalement développé pour leur part par Bayer en tant qu'insecticide et acaricide (Unterstenhöfer 1962). Le thiodicarbe a été commercialisé plus tardivement, à la fin des années quatre-vingt (Bailey 2002).

Le mode d'application de ces produits, le plus fréquemment utilisé dans la lutte contre les gastéropodes terrestres ravageurs, consiste généralement à disposer des appâts composés de granulés contenant du métaldéhyde ou des carbamates ; quelques produits sont toutefois pulvérisés. Les trois principaux carbamates utilisés sont le méthiocarbe, le thiodicarbe et le cloethocarbe (Bailey 2002; Henderson and Triebskorn 2002). A titre d'exemple, au Royaume-Uni, l'utilisation de molluscicides (55% de métaldéhyde, 40% de méthiocarbe et 5% de thiodicarbe) a pratiquement triplé entre les années 70 et le milieu des années 90 (cf. fig. 15

p.36), avec 250 tonnes de principes actifs transformées (équivalent à 4800 tonnes de granulés anti-limaces), dont 99% sont utilisés pour la protection des cultures (Brooks and Cook 2003).

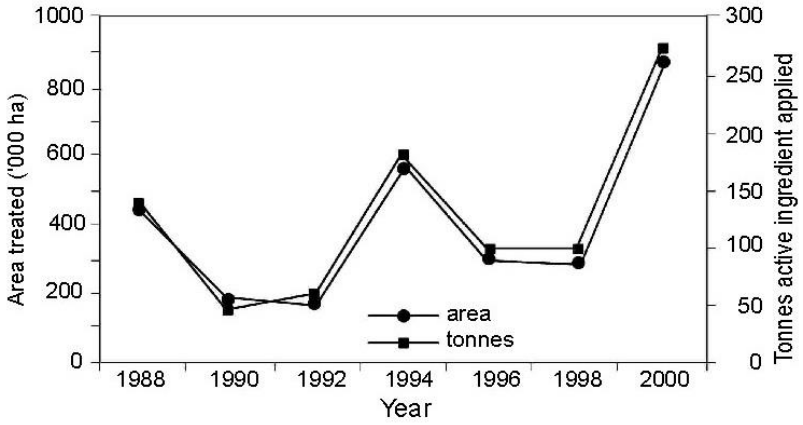


Figure 15 : évolution des surfaces traités et des quantités de principe actifs de molluscicides déployés au Royaume-Uni, de la fin des années 70 à la moitié des années 90 (Brooks and Cook 2003).

Du fait de leur mode d'application (émulsions mais plus communément sous forme d'appâts granulés), les molluscicides agissent soit par contact avec le tégument des gastéropodes, soit par ingestion. Les mécanismes d'action du métaldéhyde sont encore mal connus, mais une étude réalisée par Triebskorn et al. (1998) a montré qu'il cible les cellules sécrétrices du mucus et les cellules du système digestif, aussi bien par ingestion que par contact dermique. L'empoisonnement provoque des convulsions, suivies d'une paralysie généralisée ; la mort survient par déshydratation consécutive à une production excessive de mucus (Booze and Oehme 1986). Les carbamates sont des neurotoxiques inhibiteurs de la cholinestérase, conduisant à la paralysie et la chute du tonus musculaire des « victimes » (Henderson and Triebskorn 2002).

L'efficacité de ces différents traitements dépend beaucoup des conditions climatiques. Celles-ci conditionnent en grande partie l'activité des limaces (et donc leur exposition aux molluscicides), la rémanence et la létalité des principes actifs. En effet, les limaces sont surtout actives la nuit par temps humide et relativement frais ou en journée suite à des averses par temps nuageux. Cependant, si ces conditions sont idéales pour l'activité des limaces, elles le

sont moins pour la rémanence des molluscicides, qui se dégradent plus rapidement avec l'humidité (Bourne et al. 1988; Bailey and Wedgwood 1991; Hata et al. 1997). Ces phénomènes diminuent considérablement l'efficacité des produits et contraint les agriculteurs à multiplier les applications de traitement, ce qui peut s'avérer coûteux.

On a également constaté que les limaces peuvent récupérer de l'intoxication par les molluscicides, soit parce que la dose ingérée est inférieure à la dose létale (Wedgwood and Bailey 1988; Bourne et al. 1990), soit parce que les conditions climatiques favorisent leur rétablissement. En effet, lorsque les conditions météorologiques et l'humidité du sol le permettent, les limaces peuvent parvenir à se déplacer et à trouver un refuge qui maintiendra une humidité suffisante pour compenser la perte d'eau liée à l'hypersécrétion de mucus induite par les toxiques.

D'autres limitations d'efficacité liées aux propriétés intrinsèques des molluscicides ont été décrites. Ainsi, on a pu démontrer que le métaldéhyde et les carbamates sont des inhibiteurs de la prise alimentaire, empêchant d'établir des formulations susceptibles de délivrer la dose létale nécessaire en une seule prise (Bailey 2002). En effet, si la concentration est trop faible l'animal commence à ingérer l'appât puis cesse de s'alimenter lorsqu'il perçoit les premiers effets toxiques : ce pouvoir répulsif est responsable de l'ingestion de doses insuffisantes pour entraîner la mort du gastéropode. A l'inverse, si la concentration est trop importante, l'appât est tout simplement rejeté en raison de ses qualités organoleptiques. La concentration en principe actif dans les appâts est ainsi un compromis entre toxicité et palatabilité (effet de la formulation avec le principe actif sur la durée du repas une fois qu'il a commencé) et est typiquement comprise et limitée entre 2 et 8 % (Howling 1990). Par ailleurs, les appâts sont une source de nourriture qui entre en compétition avec les cultures qu'ils doivent protéger. Etant donné la faible appétence des appâts, leur efficacité est diminuée lorsqu'ils sont appliqués en présence de plantes cultivées qui sont, elles, fortement appétentes (Bailey 2002).

En raison de leur manque de spécificité, les molluscicides affectent bon nombre d'organismes non cibles. Si le métaldéhyde a peu d'effets sur les invertébrés, il est beaucoup plus dommageable envers les vertébrés, notamment les petits rongeurs (Tarrant and Westlake 1988; Shore et al. 1997; Kleinkauf et al. 1999; Mutze and Hubbard 2000), les animaux

de compagnies, dont les chiens en particulier chez qui il provoque des convulsions et des insuffisances respiratoires mortelles (Studdert 1985; Corfield et al. 2008; Berny et al. 2010) et les oiseaux (Greig-Smith 1991). Afin de limiter les risques sur les vertébrés, les appâts actuels sont de plus petites tailles et contiennent un aversif efficace contre les mammifères. En plus d'être toxique pour les vertébrés (Barnett et al. 2003), le méthiocarbe a aussi un effet insecticide pouvant être mortel pour certains invertébrés terrestres, notamment par empoisonnement secondaire (bioaccumulation). Cela concerne les vers de terre (Edwards et al. 2009), les isopodes, les staphylins et les carabes (Toor 2006). Pour ces derniers, les effets néfastes se limitent à la période suivant l'application et n'empêche pas le rétablissement rapide des populations (Purvis 1996).

Phosphate de fer

Un type de granulé à base de phosphate de fer ($Fe(PO_4)^3$ associé à des agents chélatants, a été introduit relativement récemment sur le marché (autorisé en France depuis 2003, (Lambion 2007)) sous les désignations de Ferramol®, Sluggo® et Ferro®. Bien que présentant une efficacité comparable au métaldéhyde (Kozłowski et al. 2006; Rae et al. 2009) et autorisé en agriculture biologique (Lambion 2007), il reste encore peu employé. Le phosphate de fer est utilisé comme complément alimentaire dans l'alimentation humaine et comme fertilisant en agriculture. Il est peu toxique pour les mammifères (Rae et al. 2009). Chez les gastéropodes, le phosphate de fer entraîne la destruction des cellules hépatopancréatiques (glandes digestives) (Rae et al. 2009) et la mort survient par inhibition de la prise alimentaire, 3 à 6 jours après ingestion (Amiri-Besheli 2009). Cependant, il semble que le phosphate de fer augmente la mortalité et réduit l'activité des vers de terre (Langan and Shaw 2006).

I. 4. b *Méthodes alternatives*

Le développement de l'agriculture intensive à partir de la fin des années 40 s'est accompagné d'une utilisation excessive de pesticides chimiques. Vus au départ comme une « solution miracle », de nouvelles contraintes sont apparues : sélection de souches de bioagresseurs résistants aux produits phytosanitaires, même à forte dose, apparition de

nouvelles espèces compétitrices et perte de la biodiversité dans les agrosystèmes (Emden 2002). La gestion, le ontrôle ou encore la protection intégré(e) des nuisibles (Integrated Pest Management or Integrated Control) s'est érigée, au cours des dernière décennies, comme l'alternative privilégiée du contrôle des populations des bioagresseurs. Elle est définie par Flint and Bosch (1981) comme étant « une stratégie de contrôle des nuisibles reposant sur des principes écologiques destinée à déterminer et exploiter les causes de mortalité naturelle des nuisibles (prédateurs parasites, pathogènes, conditions environnementales…) tout en perturbant le moins possible ces facteurs. Cette approche fait appel à un ensemble de modalités d'action (fig. 16 ci-après) dont l'application mutuelle vise à maintenir, dans un contexte environnemental et de dynamique des populations donné, l'incidence des populations de ravageurs à un niveau inférieur à celui à partir duquel des dégâts économiques deviennent supérieurs au seuil de rentabilité.

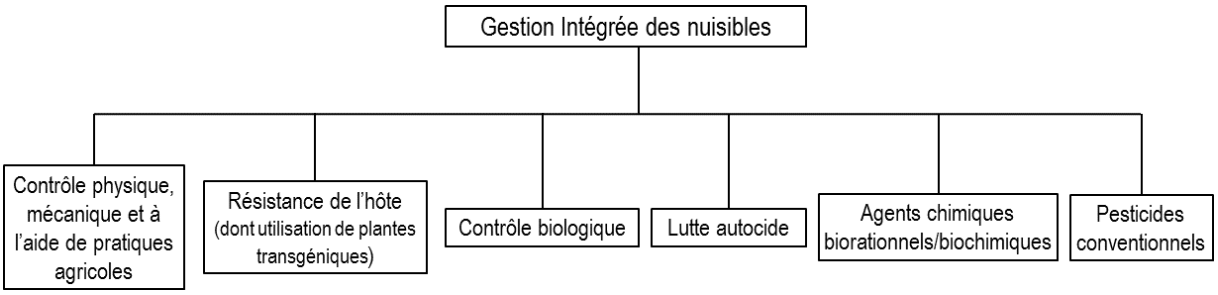


Figure 16 : tactiques disponibles en lutte intégrée des espèces nuisibles, adapté de Nordlund (1996).

Deux mesures issues des principes de l'IPM sont particulièrement employées dans la lutte contre les gastéropodes terrestres : la mise en œuvre de pratiques agricoles alternatives et le contrôle biologique.

Pratiques agricoles

Le contrôle des populations de nuisibles au moyen de pratiques agricoles adaptées, consiste à établir des conditions dysgénésiques pour les limaces dans les cultures (Howlett 2012). L'utilisation de ces méthodes à la base de la lutte intégrée a diminué avec l'emploi des

pesticides. En effet, elles sont plus coûteuses et contraignantes à mettre en œuvre (Glen 2000). Ainsi, le labour permet d'éliminer les sites de pontes et les résidus de cultures qui servent d'abris et de source de nourriture aux limaces, mais il a l'inconvénient d'augmenter l'érosion et le lessivage du sol et il est néfaste pour certains invertébrés bénéfiques (insectes prédateurs, vers de terre). De même, le travail partiel du sol apporte une meilleure protection que le semis direct (Christian et al. 1999) tandis que l'élimination des résidus de cultures par brûlis permet de priver les limaces d'une forme de ressource alimentaire et d'abris. Davis (1989) a montré que le compactage du sol est un moyen efficace pour réduire les dommages provoqués par trois espèces de limaces (*Deroceras reticulatum*, *Arion hortensis*, *Tandonia budapestensis*) sur des semis de blé. Il réduit l'accès à la nourriture et réduit la mobilité des limaces et la possibilité de s'abriter dans le sol par élimination des anfractuosités, surtout pour les espèces endogées (*Arion hortensis*, *Tandonia budapestensis*). En revanche, la protection apportée par le compactage est plus efficace après que les semis aient été réalisés sur sol meuble (les semis sont plantés plus profondément dans le sol) que lorsque la méthodes inverse est pratiquée (Glen et al. 1989). Brooks et al. (2006) ont mis en évidence la capacité de la présence d'une source de nourriture alternative (trèfle des prés, *Trifolium pratense* Linnaeus, 1753) à réduire les dommages occasionnés aux semences d'une céréale sensible, le blé d'hiver. L'utilisation de variétés moins sensibles peut-être utile mais peut se heurter à des contraintes qualitatives comme dans le cas de la variété « double-low » du colza, majoritairement employée pour ses qualité nutritives supérieures pour l'alimentation humaine, mais beaucoup plus sensibles aux attaques de limaces (Glen et al. 1990).

Contrôle biologique par les prédateurs et les parasites

Les populations de gastéropodes terrestres sont normalement régulées par un grand nombre d'espèces animales prédatrices où parasites (Barker 2004). Des espèces de tous les groupes de vertébrés se nourrissent de gastéropodes, mais aucune n'en consomme suffisamment pour avoir un impact significatif sur leurs populations (Port and Port 1986). Dans les milieux fortement perturbés que sont les systèmes agricoles, les principaux agents de contrôle biologiques rencontrés sont des invertébrés. En revanche, leurs populations sont généralement insuffisantes pour parvenir à contrôler efficacement celles des gastéropodes

terrestres (Moens and Glen 2002). Finalement, l'essentiel de la littérature se concentre sur l'utilisation du nématode parasite *Phasmarhabditis hermaphrodita* Schneider, 1859 et de certains carabes pour le contrôle biologique des gastéropodes terrestres.

Phasmarhabditis hermaphrodita

Phasmarhabditis hermaphrodita (Nematoda: Rhabditidae) est un nématode parasite létal de nombreuses espèces de gastéropodes terrestres. Il est commercialisé sous le nom commercial Nemaslug® depuis 1994 et est employé comme agent de contrôle biologique inondatif (Rae et al. 2007) : d'importantes concentrations de nématodes sont appliquées ponctuellement dans le but de parvenir à une réduction rapide des dommages (Eilenberg et al. 2001). Le cycle parasitaire de *P. hermaphrodita* est initié par des juvéniles infectieux de troisième stade qui pénètrent dans la cavité de la coquille située dans la région postérieure du manteau. Les juvéniles infectieux libèrent alors une bactérie symbiotiques, *Moraxella osloensis*, et se reproduisent par autofertilisation hermaphrodite. La mort de l'hôte survient après quelques jours, sous l'effet conjugué de la multiplication des nématodes et, surtout, de la production d'une endotoxine produite par la bactérie symbiotique (Tan and Grewal 2001). Les nématodes se dispersent sur l'ensemble du cadavre de l'hôte, s'y reproduisent et une nouvelle génération infectieuse est formée.

Bien qu'étant un outil biologique très intéressant, *P. hermaphrodita* peut affecter certains organismes non cibles, comme le carabe généraliste et auxiliaire de culture *Pterostichus melanarius* (Rae et al. 2007), il est sensible aux ultraviolets et à la dessiccation (Hass et al. 1999). De plus, son coût d'utilisation, notamment en raison de ses exigences de conditionnements contraignantes associées à une faible durée de stockage, n'est pas compatible avec une utilisation à grande échelle (Glen et al. 1996).

Les Carabidae

Avec près de 40 000 espèces décrites dans le monde, les Carabidae constituent l'une des familles de coléoptères les plus importantes. C'est aussi une des familles les plus étudiées en raison du caractère esthétique et spectaculaire de nombreuses espèces, mais aussi de leur intérêt comme indicateurs de l'état des biotopes qu'ils fréquentent (Kotze et al. 2011).

Les carabes sont également reconnus comme des prédateurs de premier plan dans les écosystèmes agricoles (Allen 1979). Le genre *Pterostichus*, et plus particulièrement *P. melanarius* (Illiger, 1798), a fait l'objet de très nombreuses études sur leur capacité de régulation des populations de limaces (Symondson 2004). En effet, cette espèce est abondante et ubiquiste dans les systèmes agricoles européens et nord-américains, où elle a été introduite (Kromp 1999). Sa polyphagie est considérée comme une caractéristique avantageuse pour un auxiliaire potentiel dans la protection des cultures. Ce type de régime est en effet favorable au maintien de populations de prédateurs suffisamment importantes pour prévenir la prolifération des populations de nuisibles d'espèces variées (Murdoch et al. 1985). Pourtant, si de nombreuses études ont souligné la capacité de *P. melanarius* à consommer *D. reticulatum* en laboratoire et en plein champ (Ayre 1995; Symondson et al. 2002), celles-ci soulignent aussi que cette espèce de taille moyenne n'est capable de ne tuer que des individus juvéniles de masse inférieure à 110 mg (Ayre 1995; Ayre 2001; McKemey et al. 2003). Une limitation qu'on observe également avec des espèces généralistes de taille comparable (Symondson 2004). En effet, bien que les limaces ne disposent pas de coquille comme celle des escargots pour se protéger de leurs prédateurs, elles utilisent diverses stratégies défensives dont les plus anecdotiques sont l'autotomie de la queue (Pakarinen 1994a) et la présence de substances toxiques dans le tégument chez certaines espèces (Symondson 1997). Cependant, la stratégie défensive la plus répandue et efficace pour contrer les carabes réside dans leur capacité à sécréter un épais mucus défensif en cas d'agression (Rollo and Wellington 1979). Cette sécrétion est particulièrement abondante et visqueuse chez les limaces de grande taille. Ainsi, les petits carabes comme *P. melanarius* sont facilement mis en échec par ce mucus défensif qui les englue et neutralise leurs pièces buccales.

Cependant, toutes les espèces ne sont pas démunies face à cette défense active. En effet, la capacité des espèces de carabes à surmonter cette stratégie semble reposer sur deux caractéristiques : leur taille (Tod 1973; Ayre 2001) et leur stratégie d'attaque (Pakarinen 1994b). D'après les observations de Tod (1973), on relève une corrélation entre la taille des carabes et leur capacité à consommer des limaces, qui résulterait d'une force globale plus importante ainsi que de la possession de pièces buccales plus imposantes et plus puissantes. Les espèces concernées sont principalement trouvées dans le genre *Carabus*, un taxon exclusivement holarctique, et même principalement paléarctique, comprenant un peu plus de

800 espèces (Březina 1999). Bien que la grande majorité de ces espèces soient polyphages, certaines d'entre elles se distinguent par une spécialisation plus marquée de leur régime alimentaire associée au développement de stratégies de capture et/ou de caractéristiques morphologiques permettant une plus grande efficacité dans la prédation de gastéropodes terrestres. Ainsi, Pakarinen (1994a) a montré que des carabes malacophages comme *Cychrus caraboides* (Linnaeus, 1758) et *Carabus violaceus* (Linnaeus, 1758) attaquent leurs proies en appliquant une morsure à la tête ou dans la région postérieure du manteau des limaces de manière à les paralyser et à les empêcher de libérer leur mucus défensif. On n'observe pas de phénomène de ce type chez un carabe généraliste tel que *Pterostichus niger* (Schaller, 1783). Ayre (1995) a aussi mis en évidence que les carabes malacophages, parmi lesquels on trouve aussi *C. nemoralis*, sont capables de tuer des limaces de plus grande taille que les carabes généralistes *P. niger* et *Abax parallelepipedus* (Piller & Mitterpacher, 1783), et qu'ils tuent également ces proies plus rapidement. Hatteland (2010) a montré que *C. nemoralis* est capable de dévorer non seulement des œufs de la limace *Arion lusitanicus* Mabille, 1868, mais aussi des limaces pesant jusqu'à 1 gramme.

C'est aussi dans la sous-famille des carabinae, et plus particulièrement chez le genre *Carabus*, qu'une grande partie des espèces héliciphages montrent des spécialisations pouvant se manifester, dans les cas les plus extrêmes, par des particularités macromorphologiques dont les plus remarquables sont la « cychrisation » et la « macrocéphalisation » (cf. fig. 17 p. 44). Celles-ci semblent s'accompagner de stratégies de capture d'escargots différentes (Assmann 2003). La cychrisation (cf. fig. 17 p.44 et 18 p.44) est caractérisée par un allongement et un rétrécissement de la partie antérieure du corps. Les espèces concernées possèdent des mandibules en forme de pince qui leur permettent de s'introduire en profondeur dans la coquille de leur proie afin de les saisir. En revanche, chez les espèces « macrocéphales », la tête est élargie – parfois de manière disproportionnée – et porte de courtes et puissantes mandibules. Le type morphologique le plus typique est observé chez des carabes du genre *Licinus* (cf. fig. 18 p. 44), dont les mandibules asymétriques permettent de briser efficacement la coquille des escargots (Brandmayr and Brandmayr 1986). C'est pourquoi certains auteurs parlent de « licinisation », terme qui peut se substituer à celui de « macrocéphalisation ». Cette évolution morphologique n'est pas systématique chez les espèces héliciphages « briseuses » de coquilles, comme en témoigne les mandibules plus

classiques de *Carabus coriaceus* Linnaeus, 1758, qui est cependant un prédateur d'escargots réputé.

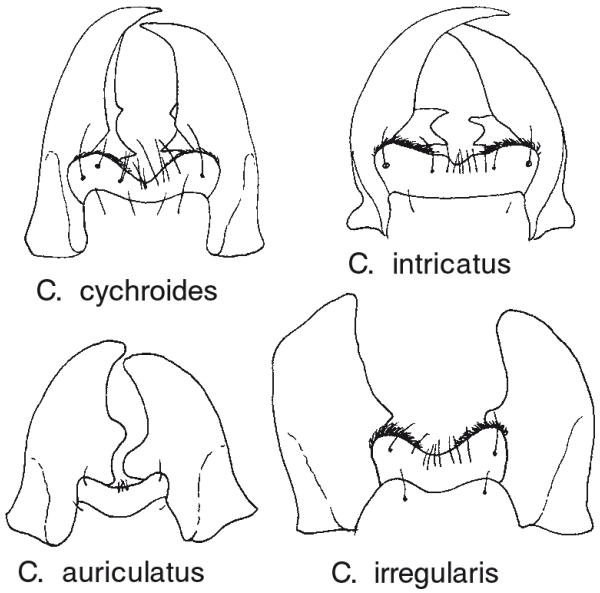


Figure 17 : mandibules de carabes cychrisées (*Carabus cychroides* et *C. intricatus*) et macrocéphalisées (*C. auriculatus* et *C. irregularis*). D'après Assmann (2003).

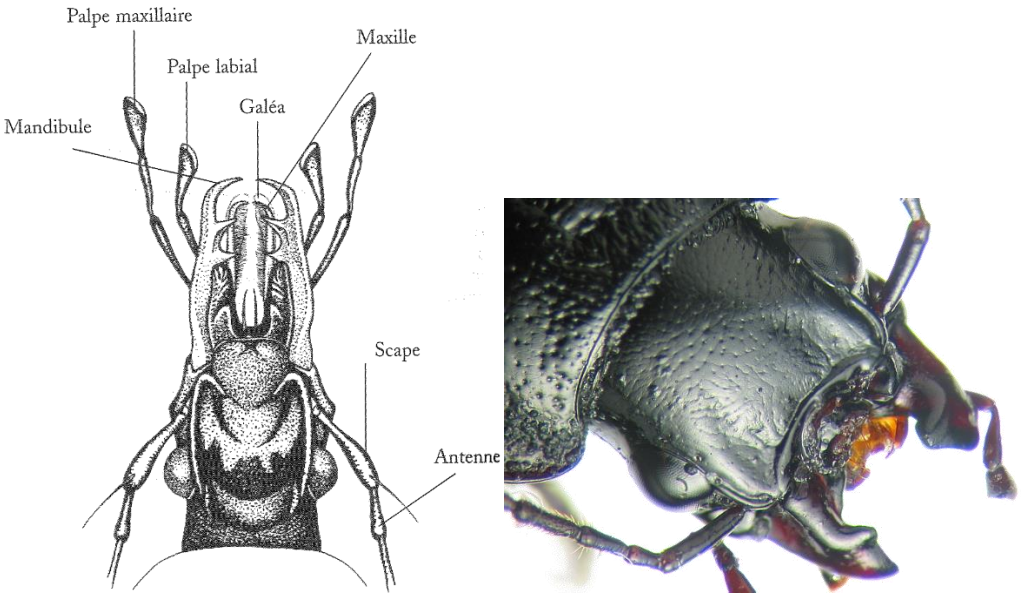


Figure 18 : à gauche, illustration de la tête cychrisée, vue de dessus, d'un carabe du genre *Cychrus* (d'après du Chatenet (2005)). A droite, photographie macro de l'archétype de la tête licinisée trouvée chez le genre *Licinus* (photographie réalisée par K.V. Makarov © de *Licinus granulatus*, http://www.zin.ru/Animalia/Coleoptera/images/licgrakm.jpg)

Wheater (1989) a montré que les espèces malacophages *Cychrus caraboides*, *Carabus problematicus* Herbst, 1786 et *C. violaceus* se servent des traces de mucus pour s'orienter vers leur proies, contrairement aux espèces généralistes *A. parallelepipedus*, *P. madidus* (Fabricius, 1775) et *P. melanarius* qui ne répondent pas à ce type de signal. De même, Digweed (1994) a observé que les femelles de *C. nemoralis* répondent à la présence de mucus de *D. reticulatum* mais pas les mâles. Cette caractéristique semble traduire une différence liée au cycle reproductif entre les deux sexes : les mâles deviennent beaucoup moins actifs passé le pique de reproduction qui se produit au printemps, tandis que les femelles gravides restent activent plus longtemps. Les palpes maxillaires des espèces de carabes généralistes *P. niger* et *P. melanarius* possèdent des structures réceptrices similaires à celles trouvées chez les espèces spécialistes du genre *Cychrus, Scaphinotus* et *Carabus*. Cependant, chez ces dernières l'extrémité des palpes est renflée et possèdent un nombre bien plus importants de récepteurs que chez les espèces généralistes (cf. photo 6 ci-dessous), suggérant que la spécialisation de ces prédateurs pourrait être associée à l'acquisition de moyens de détection des gastéropodes (Symondson 2004).

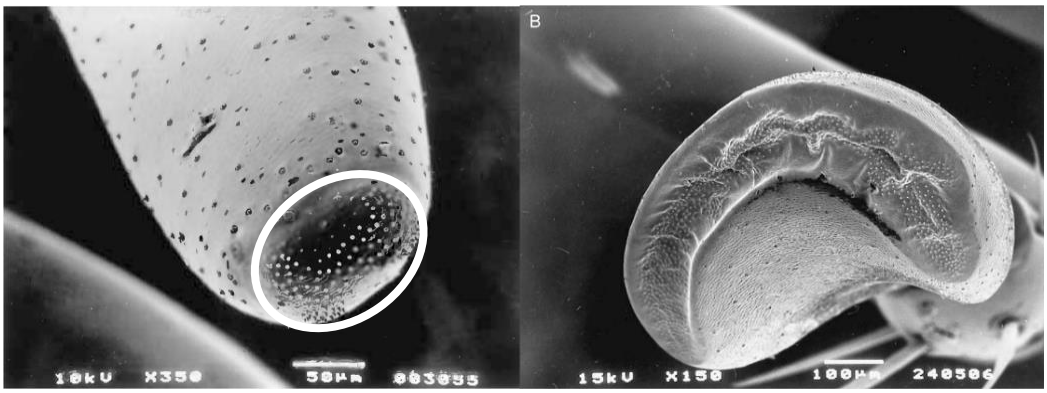


Photo 6 : micrographie électronique à balayage montrant le détail de l'extrémité d'un palpe maxillaire du prédateur généraliste *Pterostichus melanarius* (à gauche et cerclé de blanc) en forme de patère portant un éventail de récepteur et celui (à droite), élargi et portant un grand nombre de récepteurs, trouvé chez le prédateur spécialiste *Scaphinotus marginatus* Fischer 1822. D'après Symondson (2004).

I. 5 Objectifs de la thèse

Alors qu'il existe une demande croissante pour réduire l'usage des pesticides, l'utilisation des molluscicides conventionnels reste largement dominante dans le contrôle des populations de gastéropodes terrestres et ce, malgré le déploiement au cours des dernières décennies de nouvelles approches de lutte respectant l'esprit de la gestion intégrée. Dans le même temps, nous avons assisté à l'apparition de phénomènes de résistance aux molluscicides, et les études plus fines sur l'efficacité des principales molécules utilisées, ont montré que les espèces cibles tendaient à éviter de consommer ces produits. La réaction la plus couramment adoptée a consisté à augmenter les concentrations utilisées et à optimiser les méthodes d'épandage. Cette situation traduit la nécessité d'explorer de nouvelles stratégies.

L'importance prise par l'étude de l'écologie chimique à partir de 1970 a permis le développement de nouveaux outils de lutte reposant sur l'utilisation de sémiochimiques destinés à modifier le comportement d'organismes nuisibles (Agelopoulos et al. 1999). Cette approche, adaptée aux programmes de gestion intégrée, est largement utilisée contre les invertébrés nuisibles et plus particulièrement les insectes (Howse et al. 1998). En effet, ces derniers constituent des cibles idéales à l'application de cette forme de lutte car l'essentiel de leurs comportements (recherche de nourriture, de partenaires sexuels, de sites d'oviposition…) est influencé par des sémiochimiques (phéromones et allélochimiques).

A cet égard, l'importance occupée par la communication chimique et la chémodétection, dans les modalités de perception de l'environnement chez les gastéropodes terrestres, est comparable à celle observée chez les insectes. Cependant, hormis les travaux réalisés par Garraway (1992) sur l'identification de composés volatils attractifs et répulsifs issus de plantes susceptibles de modifier le comportement de *D. reticulatum*, très peu d'attention a été accordée à l'approche sémiochimique pour réduire les dommages occasionnés par ces espèces.

Différents travaux ont démontré que plusieurs comportements typiques des gastéropodes terrestres (« homing », « trail following », recherche de nourriture…) sont sous la dépendance de sémiochimiques. Les modalités de perception de la présence de leurs prédateurs, quant à elles, n'ont été que très peu abordées à ce jour. Pourtant, un prérequis

crucial afin d'éviter de devenir une proie, est la capacité, pour une espèce donnée, d'être en mesure d'anticiper le contact avec son prédateur (Ferrari et al. 2010b). Un grand nombre d'études ont illustré la capacité des proies à prévenir la rencontre avec leurs prédateurs grâce à la détection de composés chimiques spécifiques émis par ceux-ci (Kats and Dill 1998). Ce phénomène reste encore largement méconnu chez les gastéropodes terrestres, alors mêmes qu'ils sont en butte à de nombreux prédateurs, parmi lesquels les carabes tiennent une place de choix.

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier la réponse comportementale de gastéropodes terrestres en présence de composés chimiques provenant de différentes espèces de carabes prédateurs de mollusques appartenant au genre *Carabus*. Plus précisément, nous avons étudiés différents aspects de la perception de ces prédateurs par des gastéropodes terrestres. Le choix des espèces de gastéropodes terrestres s'est porté sur la limace nuisible et cosmopolite évoluant dans les milieux tempérés et humides, *Deroceras reticulatum* et l'escargot xérophile invasif *Xeropicta derbentina*. L'utilisation de ces deux espèces doit permettre d'apporter des éléments de réponse quant au caractère généraliste ou spécifique de la perception de la menace de prédation chez les gastéropodes terrestres. En effet, notre connaissance des réponses comportementales adoptées par les gastéropodes terrestres en présence de traces odorantes de carabes prédateurs reste très sommaire. Il est notamment nécessaire de déterminer, au moyen de tests de screening d'extraits cuticulaires de différentes espèces de carabe prédateurs, si les gastéropodes perçoivent tous les carabes prédateurs comme une menace existentielle ou si, au contraire, ils peuvent moduler leur réponse en fonction des caractéristiques écologiques de ces prédateurs (plus particulièrement de leur spécialisation dans la consommation de gastéropodes). Afin de nous assurer que les signaux chimiques testés avaient une signification réelle pour chacune des deux espèces de gastéropodes terrestres étudiées dans ce travail de thèse, nous nous sommes focalisés sur l'observation d'altérations de comportements de maintenance, en présence de composés cuticulaires provenant de différentes espèces de carabe prédateurs. On entend par « comportements de maintenance », tous les comportements dont l'exécution contribue à la satisfaction des besoins vitaux d'une espèce, ou à sa sécurité. Le coût biologique, pour la proie, de ce type de stratégie, est un bon indicateur de l'importance d'une information sensorielle intercurrente (Kats and Dill 1998; Lima and Bednekoff 1999; Sih et al. 2000). Seules des

informations associées à un risque vital immédiat sont susceptibles de bloquer ou de modifier l'exécution d'un comportement de maintenance (phénomène dit de « trade-off »). Les deux premières études présentées dans le chapitre « Résultats », abordent cette question chez *Deroceras* et *Xeropicta*, au moyen de l'étude des altérations du comportement de mise à l'abri, un comportement de protection contre la dessiccation et contre les prédateurs, en présence d'extraits cuticulaires de différentes espèces de carabes. Ces extraits proviennent d'espèces provenant de biotopes variés et présentant une spécialisation variable dans la capture de gastéropodes terrestres. La troisième étude, quant à elle, est consacrée aux effets de la perception d'extraits cuticulaires de *C. nemoralis*, sur le comportement d'exploitation d'une ressource alimentaire très appréciée de *D. reticulatum* : les plantules de colza.

RESULTATS

Première partie :

Comportement d'évitement de *Deroceras reticulatum* en réponse à des extraits cuticulaires de différentes espèces de carabes prédateurs

I Préambule

Alors que les comportements antiprédateurs déclenchés en réponse à la perception de composés chimiques relatifs à la prédation (congénères blessés, sécrétions de prédateurs…) ont été bien étudiés et décrits chez les gastéropodes aquatiques (Kats and Dill 1998; Jacobsen and Stabell 2004; Turner et al. 2006; Dalesman et al. 2007; Orr et al. 2007; Ferrari et al. 2010b), cet aspect n'a encore que très peu été abordé chez leurs homologues terrestres. Pourtant, deux éléments essentiels confortent la pertinence d'approfondir le sujet : l'importance de la chémoréception dans les interactions réalisées par les gastéropodes terrestres avec leur environnement (recherche de nourriture, de partenaires sexuels…) et les nombreuses espèces animales qui se nourrissent à leur dépend (Barker 2004), parmi lesquelles les carabes occupent une place prépondérante.

A ce jour, seules deux études attestent de la capacité de gastéropodes terrestres à adopter des comportements antiprédateurs en réponse à des signaux chimiques issus de carabidae. Lefcort et al. (2006) indiquent que l'escargot *Theba pisana* (Müller, 1774) s'immobilise avant d'augmenter sa vitesse d'ascension d'objets verticaux et il accélère le rythme auquel il dépose ses œufs en présence de fèces du carabe *Carabus carabus* alimenté à l'aide d'escargots de la même espèce. Dans une autre étude réalisée par Armsworth et al. (2005), les paramètres kinésiques de déplacement (durée, vitesse et direction) relevés chez *Deroceras reticulatum* entre une zone sur laquelle des *Pterostichus melanarius* (Carabidae) se sont déplacés (zone traitée) et une zone témoin, indiquent qu'elles évitent la zone traitée. Les auteurs supposent que les limaces ont été capables de percevoir des résidus chimiques de nature kairomonales déposés par *P. melanarius*. Ils n'excluent pas que cette perception puisse être généralisée à l'ensemble des carabes prédateurs étant donné que beaucoup d'entre eux s'alimentent au dépend de limaces. Cependant, deux remarques peuvent venir nuancer ces conclusions.

Tout d'abord, les limaces employées ont été capturées dans des prairies et champs également fréquentés par *P. melanarius*. Il est donc possible que ces limaces aient déjà eu l'occasion de rencontrer ces carabes au cours de leur vie. Or de nombreux organismes, aussi bien vertébrés qu'invertébrés (Turner et al. 2006), sont capables d'apprendre à reconnaître

leurs prédateurs (Acquistapace et al. 2003; Ferrari et al. 2006). L'apprentissage par l'expérience permet aux proies de répondre de manière plus spécifique à un prédateur lorsqu'ils associent l'odeur de ce prédateur avec des signaux chimiques relatifs à la prédation comme, par exemple, des signaux d'alarmes de congénères blessés. Ainsi, Turner et al (2006) ont montré que la réponse comportementale de l'escargot aquatique *Physa acuta* (Draparnaud, 1805) en présence de signaux chimiques d'écrevisses est différente chez les individus sauvages (exposés à leur prédateur) de celle des individus élevés en laboratoire (non exposés à leur prédateurs).

Deuxièmement, au vu de la procédure expérimentale employée, il n'est pas exclu que le substrat ait été imprégné de composés issus des sécrétions défensives des carabes au cours de la phase de marquage. En effet, les carabes produisent une grande variété de sécrétions défensives constituées, entre autres, d'aldéhydes, de quinones et d'acides (acides acétiques et formiques) destinés à repousser leurs prédateurs (Moore and Wallbank 1968; Will et al. 2010). Les carabes libèrent facilement ces sécrétions lorsqu'ils sont perturbés, ce qui a pu être le cas au moment de la nécessaire manipulation des *P. melanarius* pour la réalisation de la phase de marquage de l'étude (transfert et retrait des carabes). Ainsi, la réponse comportementale observée chez les limaces testées a pu être engendrée, au moins pour partie, non pas par des composés sémiochimiques cuticulaires déposés au cours du déplacement des *Pterostichus* comme le suppose les auteurs de l'étude, mais par la présence de résidus issus de ces sécrétions défensives, finalement peu spécifiques.

L'un des principaux points soulevés par les auteurs de l'étude concerne le caractère spécifique ou non de la perception du risque de prédation posé par les carabes. En effet, leur étude ne permet pas de déterminer si le ou les composés responsable du comportement d'évitement observé chez les limaces sont spécifiques de l'espèce employée, *P. melanarius*, ou bien s'il(s) est/sont commun(s) à toutes les espèces de carabe.

Cependant, si la prédation a des conséquences irréversibles sur la fitness d'une proie, les comportements antiprédateurs ne sont pas non plus sans conséquence sur celle-ci. En effet, il existe un compromis entre les bénéfices qui peuvent être obtenus dans la réalisation d'un comportement de maintenance (se nourrir, se réfugier,…) et les risques de prédation encourus en l'accomplissant (Lima and Dill 1990; Houston et al. 1993). Ces risques peuvent

être diminués par l'adoption de comportements antiprédateurs. Toutefois, à un comportement destiné à éviter un prédateur est associé un coût énergétique qui ne peut être alloué à un autre besoin vital pour la proie. Ainsi, il peut être avantageux pour une proie de répondre de manière innée aux indices chimiques provenant des prédateurs qui présentent une menace existentielle particulièrement prégnante pour elle, comme les prédateurs spécialisés, afin de mieux préserver ses ressources énergétiques.

Parmi les Carabidae, le genre *Carabus* rassemble des espèces présentant des stratégies et/ou des adaptations morphologiques leur permettant de capturer et consommer efficacement les limaces. Ces espèces sont donc susceptibles d'être perçues comme des menaces importantes pour les limaces. Dans l'étude qui suit, nous avons évalué l'influence d'extraits cuticulaires de quatre espèces prédatrices du genre *Carabus* (*Carabus auratus* Linnaeus, 1761, *Carabus hispanus* Fabricius, 1787, *Carabus nemoralis* et *Carabus coriaceus*) sur le comportement de recherche d'abris de *Deroceras reticulatum*, un comportement important dans la survie des limaces. La réponse comportementale de *D. reticulatum* est susceptible de varier en fonction des caractéristiques écologiques propres à ces carabes. Aussi, afin d'évaluer si *D. reticulatum* peut percevoir ces prédateurs de manière innée, les limaces employées dans cette étude étaient issues d'un élevage réalisé en laboratoire, afin d'exclure tout contact avec leurs prédateurs naturels. Par ailleurs l'extrait cuticulaire d'un insecte neutre, celui de la mouche domestique (*Musca domestica* Linnaeus, 1758), a aussi été testé sur le comportement de ces limaces afin d'évaluer si la présence d'une nouvelle odeur est suffisante pour altérer le choix d'abris des limaces.

La réalisation de ce travail a nécessité la mise en place préalable d'un élevage en laboratoire de *D. reticulatum*, afin d'obtenir des individus d'âges et de masses similaires, exempts de tous contacts avec leurs prédateurs naturels.

L'élevage a été réalisé dans une enceinte (cf. photo 7-a p. 54) aux conditions abiotiques (température, humidité, cycle jour/nuit) contrôlées. Les limaces ont été placées, par groupe de quelques dizaines à centaines d'individus suivant la classe de poids (cf. photo 7-b p. 54), dans des récipients distincts en fonction de leur classe de poids (0-100 mg ; 100-500 mg ; 500mg-800 mg ; > 800 mg) et alimentées à l'aide de laitue et de granulés pour lagomorphes deux fois par semaine. Le substrat employé était constitué de papier Tork® humidifié à l'eau

du robinet (cf. photo 7-c et d ci-dessous) afin d'éviter la dessiccation des limaces et faciliter le nettoyage de leurs récipients d'élevage.



Photo 7 : principaux éléments du dispositif d'élevage de *D. reticulatum* : (a) enceinte générale avec contrôle des conditions abiotiques ; (b) maintien des limaces par catégorie de poids ; (c) et (d) substrat de papier Tork® humidifié des récipients d'élevage (© Piotr Bursztyka).

Espèces de carabes employées

Les espèces de carabes employées dans cette première étude étaient les suivantes (photos 8-a à d ci-dessous) :

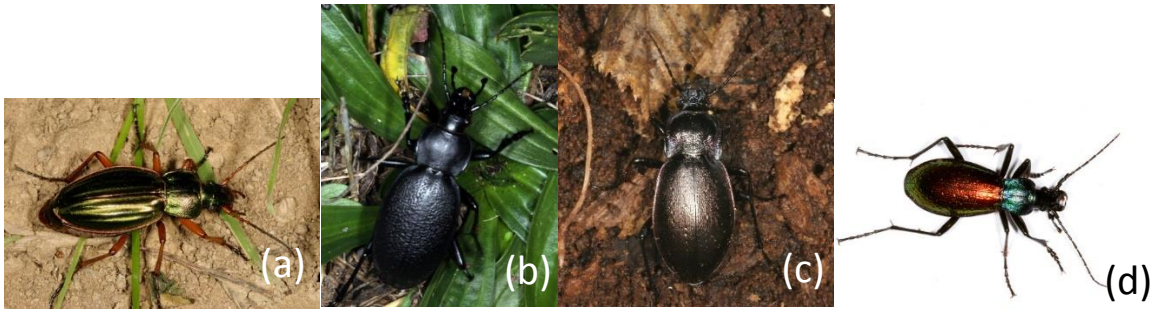


Photo 8 : habitus de *Carabus auratus* (a) *; Carabus coriaceus* (b) ; *Carabus nemoralis* (c) et de *Carabus hispanus* (d) (Copyright © Denis Bourgeois).

Dispositif expérimental

L'expérimentation a été réalisée en employant 6 dispositifs identiques constitués de deux abris (un traité et un témoin) et d'une zone éclairée (cf. photo 9 ci-après). Au début de chaque réplique, une limace pré-mature était disposée au centre de chaque dispositif sous une lumière du jour artificielle afin de les inciter à choisir l'un des deux abris.

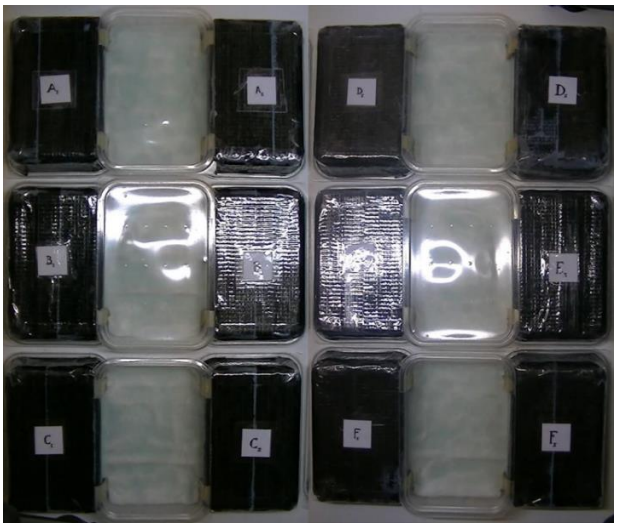


Photo 9 : disposition des dispositifs employés pour évaluer l'influence d'extraits cuticulaires de carabes sur le comportement de maintenance de recherche d'abris par la limace *D. reticulatum*. Chaque dispositif présente deux abris encadrant une zone centrale éclairée (© Piotr Bursztyka).

Article publié dans PLoS ONE le 14 novembre 2013

Chemical compounds related to the predation risk posed by malacophagous ground beetles alter self-maintenance behaviour of naïve slugs (*Deroceras reticulatum*)

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Chemical Compounds Related to the Predation Risk Posed by Malacophagous Ground Beetles Alter Self-Maintenance Behavior of Naive Slugs (*Deroceras reticulatum*)

Piotr Bursztyka[1,2]*, Dominique Saffray[1], Céline Lafont-Lecuelle[1], Antoine Brin[2], Patrick Pageat[1]

1 Department Agronomy-Aquaculture, Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology, Saint-Saturnin-lès-Apt, Vaucluse, France, **2** Biodiversité des Systèmes Agricoles et Naturels UMR 1201 Dynafor, Engineering School of Purpan, Toulouse, Haute-Garonne, France

Abstract

Evidence that terrestrial gastropods are able to detect chemical cues from their predators is obvious yet scarce, despite the scientific relevance of the topic to enhancing our knowledge in this area. This study examines the influence of cuticular extracts from predacious ground beetles (*Carabus auratus*, *Carabus hispanus*, *Carabus nemoralis* and *Carabus coriaceus*), and a neutral insect species (*Musca domestica*) on the shelter-seeking behavior of naive slugs (*Deroceras reticulatum*). Slugs, known to have a negative phototactic response, were exposed to light, prompting them to make a choice between either a shelter treated with a cuticular extract or a control shelter treated with pure ethyl alcohol. Their behavioral responses were recorded for one hour in order to determine their first shelter choice, their final position, and to compare the percentage of time spent in the control shelters with the time spent in the treated shelters.The test proved to be very effective: slugs spent most of the experiment in a shelter. They spent significantly more time in the control shelter than in the shelter treated with either *C. nemoralis* ($Z = 2.43$; $p = 0.0151$; Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test) or *C. coriaceus* cuticular extracts ($Z = 3.31$; $p < 0.01$; Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test), with a seemingly stronger avoidance effect when presented with *C. coriaceus* extracts. The other cuticular extracts had no significant effect on any of the behavioral items measured. Although it cannot be entirely excluded that the differences observed, are partly due to the intrinsic properties of the vehicle employed to build the cuticular extracts, the results suggest that slugs can innately discriminate amongst different potential predators and adjust their behavioral response according to the relevance of the threat conveyed by their predator's chemical cues.

Citation: Bursztyka P, Saffray D, Lafont-Lecuelle C, Brin A, Pageat P (2013) Chemical Compounds Related to the Predation Risk Posed by Malacophagous Ground Beetles Alter Self-Maintenance Behavior of Naive Slugs (*Deroceras reticulatum*). PLoS ONE 8(11): e79361. doi:10.1371/journal.pone.0079361

Editor: Erik Sotka, College of Charleston, United States of America

Received June 27, 2013; **Accepted** September 27, 2013; **Published** November 14, 2013

Copyright: © 2013 Bursztyka et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: No current external funding sources for this study.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: p.bursztyka@group-irsea.com

Introduction

Among the most essential needs for organisms, the ability to detect and avoid predators is paramount [1,2] because the consequences of predation are often irretrievable and dramatic for the lifespan – and hence the fitness – of prey species [3]. Predation is considered to be a major selection force that drives organism evolution [4–6] and intervenes in every phase of life by shaping morphology, behavior, ecology and life history traits [2,4,7].

It is to the benefit of prey to be able to assess, at any time, the actual threats posed by predation in order to adequately adjust activity rather than expend large amounts of energy in an attempt to escape a direct attack from a predator. Prey species may use many sensory modalities to track down any cues that betray the presence of a predator, but olfaction appears particularly suitable to fulfilling this task. Indeed, one of the main advantages of chemical cues is that they can be perceived from a distance, with no contact of any kind with the predator.

There is extensive literature on chemically mediated antipredator behaviors within aquatic organisms [8,9]. Because aquatic environment are frequently turbid, water-borne chemical cues are often the only reliable cue available to prey [1]. These chemicals can be dispersed in large volumes of water, even in very low amounts, increasing their likelihood of being perceived by target organisms [10]. Thus, if we consider that chemical senses are the oldest and the most ubiquitous form of sensory perception, it is not surprising that predation risk assessment through olfactory means is so common in aquatic environments [1,11,12].

Predation risk assessment through olfaction among organisms living in terrestrial ecosystems appears to have been investigated to a lesser extent [1]. However, most if not all terrestrial animals draw on chemical cues for a wide range of essential interactions with their environment, including managing the threat of predation. This is especially true among terrestrial invertebrates whose alternative vigilance senses, such as sight or mechanical stimuli, are usually less accurate than their counterparts found in vertebrates, or simply non-existent. Storm and Lima (2008) [13] pointed out the lack of investigation on the recognition of predator

chemical compounds among insects despite the prominent importance of chemical communication within this class as evidenced by the great diversity of their chemoreceptors [14–17]. The same observation can be made regarding terrestrial gastropods.

While chemically-induced antipredator behavioral responses have been extensively documented within aquatic gastropods [1,18 22], very few have focused on how related terrestrial species perceive their foes. It is well-known that, like aquatic gastropods, terrestrial gastropods rely mostly on olfaction [23 29]. Terrestrial gastropods have no acoustic sense and their eyes are largely inefficient as they appear to only be capable of distinguishing light and dark areas [27,29 32]. Consequently, critical behavioral decisions appeal to chemical cues gathered from the environment. Predation risk assessment is likely to be one of the most significant of these.

Terrestrial gastropods represent a regular food source for many different animals [33], particularly for ground beetles [34]. Only two studies have addressed the question of behavioral responses of terrestrial gastropods in the presence of chemical cues from two species of ground beetles. Studies show that the snail *Theba pisana* (Müller, 1774) remains stationary longer and climbs fastest in the presence of feces from *Carabus carabus* (Heller, 1993) fed with snails than in presence of various controls [35]. In another study, *Deroceras reticulatum* (Müller, 1774), a slug species, avoided paper that had been exposed to *Pterostichus melanarius* (Illiger, 1798), a common generalist predator in European fields, indicating the putative presence of a repulsive kairomone [36].

Ground beetles have been extensively studied for their ability to control populations of *D. reticulatum* [37–43] because of the detrimental impact of the slug species on several agricultural crops [28,44]. The beetles may also provide an ecological alternative to the usual chemical means of control, which present a number drawbacks [45 49]. Most of these studies focused on carabid beetles commonly found in fields, with the most representative species belonging to the subfamilies Nebrinae, Harpalinae, Pterostichinae, and Zabrinae [38,50 55]. Despite numerous direct and indirect observations attesting to the consumption of slugs by these species (see Symondson (2004) [34]), it appears that their predatory capabilities are largely confined to small slugs (i.e. young slugs) [39,50,56–58]. Surprisingly, few studies have examined the ground beetles from the subfamily Carabinae. However, the largest ground beetles belong to this subfamily and some evidence indicates that they possess superior skills in managing the main defense mechanisms displayed by slugs, such as heavy mucus exudation and autotomy [58–60]. This suggests that these predators may exert stronger selection pressure on slugs than more generalist feeders, like *Pterostichus spp.*

Taking into account these observations, the aim of this study was to evaluate whether chemical cues from *Carabus auratus* Linnaeus, 1761, *Carabus hispanus* Fabricius, 1787, *Carabus nemoralis* Müller, 1764, *Carabus coriaceus* Linnaeus, 1758, all four belonging to the Carabinae subfamily, could affect the behavior of slugs. Predator chemical signals can affect prey behavior in various ways. For instance, prey can adjust its movements (mobile or static, speed variation) [8,13,61–67], sheltering [68] or shoaling [69,70]. This study assesses the perception of chemical signals left by these grounds beetles in *D. reticulatum* by examining behavioral alterations in the search for shelter. Devoid of the protective shells of snails, slugs generally find protection under shelters, shielding them from the unfavorable conditions that generally prevail during the day due to heat, sunlight, or even drafts. Slugs are thus mainly active at night [28,71–73], whilst they principally seek shelter during the daytime [27,28,74 76]. Correlatively, it has been shown that slugs prefer dark areas to light ones [30,74]. Thus, an experimental choice test was conducted first, prompting the slugs to choose between two refuges under the influence of light. Secondly, cuticular extracts of ground beetles were deposited in one of the two shelters in order to assess whether the presence of these cues would drive the slugs to preferentially choose the control shelter.

Materials and Methods

Biological Material

Species of interest for the study. The slug from the species *Deroceras reticulatum* (Müller 1774) is a well known worldwide pest which hence is neither endangered nor protected. Adults were caught in fields and private gardens not subjected to regulatory protection in the vicinity of Apt (84400 Vaucluse, France) during spring 2011, with the agreements of the owners.

Carabid beetles from the species *Carabus auratus*, *Carabus nemoralis* and *Carabus hispanus* were captured in spring, and *Carabus coriaceus* were trapped in fall, in private gardens with the agreement of the owners. These all four ground beetles are neither endangered nor under law protection in France.

The snail species *Xeropicta derbentina* (Krynicki, 1836), which served to feed the ground beetles, is an alien species in Provence, France. It is thus not protected by law and was captured on the research institute's ground.

The house flies *Musca domestica* is a common species of the Diptera order found worldwide which is therefore not endangered nor subjected to any form of regulation. Adult flies were caught on the research institute property where the experiments were done.

Rearing of the Species

The slugs from the species *Deroceras reticulatum* (Müller 1774) employed for the study were raised from eggs laid by the collected adults. The slugs were housed in plastic boxes (L: 20 cm/l: 10,5 cm/h: 8 cm) lined with wet paper at 17°C +/−1°C and 80% RH +/−5% and were submitted to an L:D cycle of 11 hours and 13 hours respectively (lights on from 09:00 20:00). Twice a week, the boxes were cleaned and the slugs were fed lettuce and a supplement of commercial dry rabbit food (Coqtel). Slugs were reared in laboratory and were thus never exposed to their predators, notably carabid beetles, and can be considered as "naive" regarding such experience. Experiments were carried out with slugs in the intermediate life stage, as determined by body weight (ranging from 0.1 to 0.2 g) [36].

Ground beetles individuals from the same species were then collectively housed in a plastic box (l: 55 cm/w: 35/h: 14.5 cm) lined with 4 cm of moist loam covered by moss and placed at 20°C +/−2°C with an L:D cycle of 8 hours and 16 hours respectively (lights on from 10:00 18:00). They were fed daily with the land snail *Xeropicta derbentina* (Krynicki, 1836).

The house flies *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) were reared in laboratory. The imagos were maintained in a screened enclosure in a room at 22°C +/−3°C, with 50% RH +/−10%, and were subjected to an L:D cycle of 14 hours and 10 hours respectively and fed a 5 g mix of 50% castor sugar and 50% milk powder (Modern Veterinary Therapeutics formula for kittens and puppies, 25% protein and 24% fat), which was changed weekly. Hydration was provided by a water-soaked paper towel. Egg clutches were obtained on 5 to 10 g of chicken manure, first dried and then rehydrated to 70% RH. Eggs and then larvae were housed in the same previous substratum at 30°C +/−2°C and 50% RH +/−10% in a terrarium with a L:D cycle of 14 hours and 10 hours

respectively. Only imaginal life stage organisms obtained from this laboratory breeding were used in the experiment.

Production of the Stimuli

During their captivity, some of the ground beetles died, whether due to age (unknown at time of their capture) or any other reasons unknown. Carabid beetles were checked twice a day (once in the morning and once in the late afternoon) to ensure vitality. Those found freshly dead due to an apparently natural cause (i.e. other than cannibalism, accident or infection) were withdrawn from the breeding box and placed in a plastic beaker filled with pure ethyl alcohol (99.8%) depending on the species size to which the carabid beetle belonged: 15 ml for each *C. auratus*, *C. nemoralis* or *C. hispanus*, but 20 ml for each *C. coriaceus* as it is a larger species. These "stock solutions" were stored in a refrigerator at 4°C and gently shaken once a week during a variable time depending on the availability of the ground beetle species: about 6 months for *C. hispanus*, 4 months for *C. auratus* and 3 months for *C. nemoralis*, *C. coriaceus* and flies. Despite this seemingly long storage time, it has been shown that similar preparations of body extracts from cockroaches kept their property for at least one month [77,78]. We collected 2 ml of each stock solution in separate glass vials, just before the beginning of the trials. These working solutions were stored at 4°C and served throughout the trials, *i.e.* about two weeks. The study originally included carabid beetles from both sexes. However, due to breeding contingency and the period in which the present study was performed, only females were available for some of the carabid species in the laboratory's possession. Since Armsworth *et al.* (2005) [36] observed that slugs display no behavioral differences to treatments from male or female *Pterostichus melanarius* (Illiger, 1798), the trials were carried out with extracts from one ground beetle of female sex for each species – the only sex available for all ground beetle species at the time – in order to create a homogenous group of cuticular extracts, bearing in mind that sex would not have an incidence on the slugs' behavioral response. In addition, a cuticular extract was produced from *Musca domestica* because it is a taxonomically distant insect species and has a very different diet from ground beetles. A mixture of male and female flies (for a total of 15 individuals) were killed by frost (−18°C for one day) and then transferred into 15 ml of pure ethyl alcohol.

Behavioral Choice Experiments

Validation of the experimental design. The study involved a choice experiment designed to be convenient, easy to set up and efficient. Slugs were led to choose between two shelters, fulfilling the previous criteria while providing a very conspicuous behavior to evaluate the effect of the cuticular extracts on such a choice. The trial was carried out using handmade devices, hereafter referred to as "arenas" (fig. 1), made from sterilized boxes of transparent polystyrene typically used for growing plants (Dutscher, Ref.: 017001). Each arena was composed of three plastic boxes. The finished arena measured 27.5×14.5×4.5 cm. The three boxes were fitted together lengthwise. The two side boxes (shelters) were placed upside down with the lid of the middle box (lit area) resting on the bottom of the side boxes, creating a single arena with three compartments. The side trays were completely darkened by coating their external walls with black tape to fulfill the role of shelters, whereas the central one was left transparent to allow the light to pass through. An opening measuring 1.5×8 cm was cut on each side connecting the central part with the side boxes to allow slugs to access either of the two shelters. The bottoms of arenas were lined with an undersheet (Hartmann Molinea® Plus) moistened with tap water to provide a convenient and comfortable surface for crawling while maintaining a high humidity (about 99% RH) in each area of the arena. Ten arenas were built in order to perform ten replicates at the same time. The experiment took place in a still air room at a temperature of 15.5°C +/−1.5°C and an ambient relative humidity of 72% +/−5%, close to the optimum conditions for slug activity [73,79]. One slug of medium size was placed in the middle of the lit area of each arena under a red light rather than directly under a white light so as to minimize the burst of activity induced by white light at the beginning of a trial. Slugs were placed so that the body was parallel to the shelter entrances. Once each slug had been placed, a white light (6500°K, 220+/−5 lumens) was turned on and left lit for the duration of a replica (*i.e.* one hour) in order to create a burst of activity that spurred the slugs to seek shelter. Slug movement was recorded for one hour with two digital cameras (JVC HD Everio GZ-HM446) from the moment the slugs were placed under the red light.

Behavioral Choice Experiments in the Presence of Different Treatments

As slugs spent most of the time sheltered during the pretest (see results), tests were conducted to determine the effect of five cuticular extracts on slug shelter choice. The same device as described above was used with the following changes: six of the arenas were employed simultaneously. Slugs thus had to choose between one of the 6 experimental shelters (5 cuticular extracts or a blank) and a control shelter (pure ethyl alcohol at 99.8% used to produce the cuticular extracts). Treatments (i.e. cuticular extracts or ethyl alcohol) were applied at the rate of 100 µl using a micropipette, on small pieces of Whatman paper (grade 1) measuring 1.5×9 cm. The blank received no treatment (piece of Whatman paper alone). All the pieces of Whatman paper were left at room temperature for 12 minutes in order to allow the excess ethyl alcohol to evaporate. Based on findings by Chase (1982) [80], snails appear unable to detect ethanol through olfaction. It is thus reasonable to assume that slugs cannot detect it, but the high residual quantity of ethyl alcohol on paper strips may interact with the foot of the slugs when crawled upon and could therefore alter behavior. Once the alcohol had evaporated, a treated paper strip was placed in one of the two shelters in each arena using clean forceps, while the remaining shelter received a control paper strip. Each treatment was tested 24 times for one hour each time, and a new slug was used for each replicate. The location of the treatment and control were reversed for each new test and treatments were rotated from arena to arena in order to avoid both shelter and arena position bias. Trials were made with the same conditions of temperature and humidity as the pretest, the slugs used were of the same size, and the same precautions were taken at the beginning of each replicate. The head orientation of the slugs was reversed for each new replicate to avoid orientation bias. Once each slug had been placed, a white light (6500 K, 220+/−5 lumens) was turned on and slug movement was recorded for one hour using the same digital cameras as during the pretest. Two sets of replicates were performed between 9:00 and 12:00 every morning until a total of 24 replicates was reached for each of the 6 conditions. Arenas were thoroughly washed and dried in open air for 24 hours between each set of tests.

Statistical Analysis

Video recordings were used to determine several parameters based on slug movement. Only replicates where slugs went into at least one of the shelters and in which slug movement in the lit arena was clearly visible for the duration of the experiment were retained. Replicates for which those conditions were not fulfilled

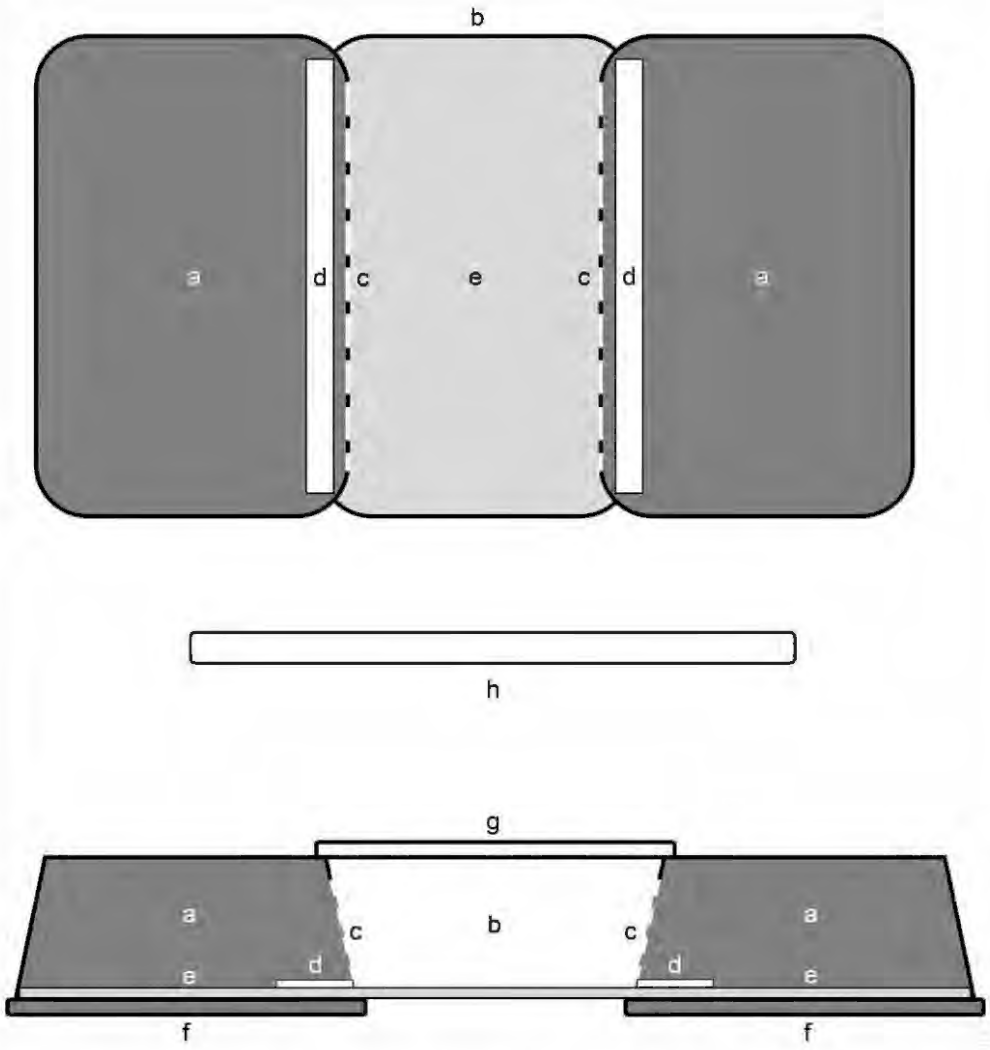


Figure 1. Top and side view of an experimental arena. *a:* dark shelter (3.8+/−0.4 lumens); *b:* lit area (221+/−5 lumens); *c:* shelter entrance; *d:* strip of Whatman paper with 100 µl of either a tested cuticular extract or control; *e:* undersheet moistened with 10 ml of tap water; *f:* dark lid; *g:* translucent lid; *h:* daylight tube (6500°K) 80 cm above the experimental arenas.
doi:10.1371/journal.pone.0079361.g001

were retested with the corresponding treatment using a new slug. Each treatment was thus tested 24 times against a control, without any loss of data.

To assess the relevance of the choice test design, the percentage of time spent in the sheltered area versus the time spent in the lit area was calculated as follows:

$$\frac{\text{time spent in a shelter or in the lit area (in seconds)}}{\text{total duration of the trail}} \times 100$$

and the proportion of time spent in each shelter was calculated as follows:

$$\frac{\text{time spent in the right or the left shelter}}{\text{total time spent in the right and the left shelter}} \times 100$$

These two behavioral parameters showed no significant deviation from a normal distribution (Wilk–Shapiro normality statistic), so a paired t test was used. The first shelter chosen by each slug and its position at the end of the trial (right/left shelter or treated/control shelter) were noted and significant differences between shelter preferences were evaluated using the McNemar test.

The same criteria as described for the pretest validation were used regarding the assessment of the treatment's effect on the slugs' choice of shelter. But as the normality was not ascertained using the percentage data, a Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test was used. Shelter preferences were also evaluated using the McNemar test. In addition, a one-way ANOVA was used to compare the different treatments. Data were transformed according to their nature to meet the conditions for an ANOVA. Data was recorded for access latency to the first refuge, total time spent sheltered, time spent in the treated shelter, and time spent in the control shelter. All these durations, expressed in seconds, were log-transformed [81]. The numbers of outings and the numbers of shelter permutations were noted and both of these were square-root transformed to improve normality. Lastly, ratio data was compared after transformation according to the arcsine of the square root [82]: the total time spent sheltered over total trial duration, the time spent in the treated shelter over total trial duration, the time spent in the control shelter over total trial duration, the time spent in the treated shelter over total time spent

sheltered, and the time spent in the control shelter over total time spent sheltered. Data analyses were carried out with Statistica 10.0 software and the significance threshold was classically fixed at 5%.

Results

Validation of the Experimental Design

Slugs spent significantly more time sheltered throughout the duration of a replicate than in the lit area ($P<0.001$), with an average of 78% spent in a shelter compared to 22% spent in the lit area (figure 2). The slugs showed no preference for either the left or the right shelter ($p = 0,954$) (figure 3). In addition, slugs did not show any preference for one of the two shelters, neither for their first choice of location or their final location at the end of the experiment ($p = 1$) as shown in figure 4.

Shelter Choice Test Results

The slugs spent most of the duration of the experiment sheltered, regardless of the treatment used in the tested arenas (figure 5), with an average of 86% of the total experiment time spent in a sheltered area and only 14% in the lit area. However, it is interesting to note that the time spent by slugs in each shelter varied according to treatment (figure 6). In most of the cases, slugs spent an equivalent time in the control shelter and in the treated shelter, except in two situations. Indeed, there were no significant differences between time spent in the control shelter versus the treated shelter when cuticular extracts of *C. auratus*, *C. hispanus*, *M. domestica* were present or when only a blank Whatman paper was present. However, slugs spent significantly more time in the control shelter than in the shelter where cuticular extracts from either *C. nemoralis* or *C. coriaceus* were present ($P = 0.015$ and $P<0.001$ respectively, Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test). The same observation was made regarding the slugs' initial choice of shelter location (control vs. treatment shelter), along with their final choice of shelter location observed at the end of the test (figure 7). Indeed, when given a choice between the alcohol treatment and a shelter where cuticular extracts from *C. auratus*, *C. hispanus*, or *M. domestica* or a blank Whatman paper was present, the total number of slugs choosing the test shelter and control shelter were similar, as was the total number of slugs found present at the end of the replicates in the control shelter or the shelters that were treated with the previously cited treatments. By contrast,

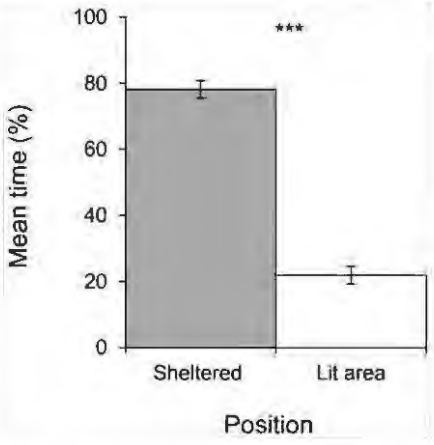


Figure 2. Comparison of the mean percentage of time spent by slugs sheltered with the mean time spent in the lit area. Data employed for the validation step of the design ($n = 10$, ***$P<0,001$, paired t test). Bars = ±1 SE, $n = 10$.
doi:10.1371/journal.pone.0079361.g002

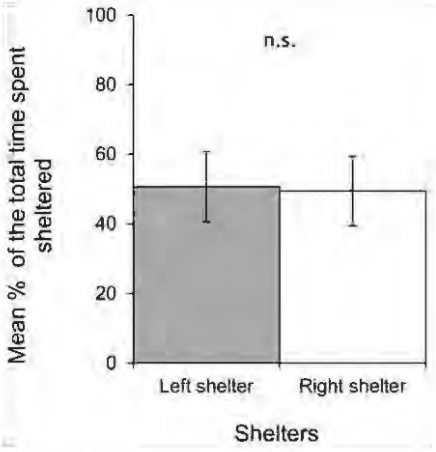


Figure 3. Comparison of the mean percentage of time spent by slugs in either the left shelter or the right shelter. Data employed for the validation step of the design (n.s. not significant, paired t test). Bars = ±1 SE, $n = 10$.
doi:10.1371/journal.pone.0079361.g003

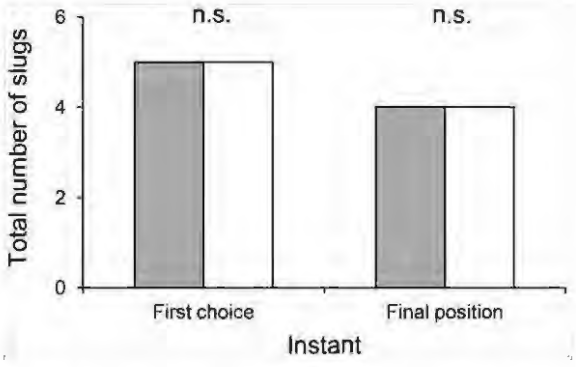


Figure 4. Total number of slugs having chosen either the left or the right shelter as their first choice and at the end of the experiment ($n = 10$, n.s. not significant, Mc Nemar's test). Solid bars = left shelter; empty bars = right shelter Data collected from ten replicates.
doi:10.1371/journal.pone.0079361.g004

slugs significantly chose the control shelter as their first choice and were significantly more likely to be found in the control shelter at the end of the replicates, when cuticular extracts from *C. nemoralis* or *C. Coriaceus* were present in the test shelter. This effect was stronger when slugs were faced with *C. coriaceus* cuticular extracts than when faced with *C. nemoralis* ($P = 0.001$ and $P = 0.014$ respectively at first choice and $P<0.001$ and $P = 0.014$ respectively for the final position).

One-way ANOVA on transformed data (table 1) only showed significant differences between treatments regarding the time spent in the treated shelter (when expressed in seconds), and in the percentage of time spent in the treated shelter over the total trial duration. Tukey post-hoc multiple comparisons of observed means pointed out that, in both cases, the differences were observed between the cuticular extracts from *Carabus coriaceus* and *Musca domestica*.

Discussion

This study provides a reliable experimental pattern to conduct choice tests with slugs, which could be applied in any exploratory

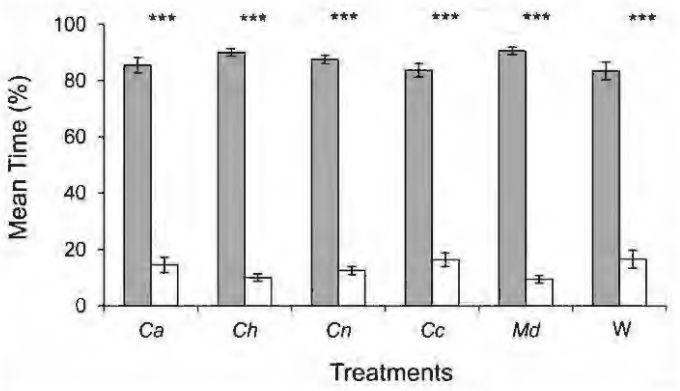


Figure 5. Comparison of the mean percentage of time spent sheltered (expressed as the mean time spent sheltered over the total trial duration) with the mean percentage of time spent in the lit area (expressed as the mean time spent in the lit area over the total trial duration), according to each treatment. Treatment applied in the treated shelter (dark boxes) for each test arena is indicated below each histogram pair: *Ca* (*Carabus auratus*), *Ch* (*Carabus hispanus*), *Cn* (*Carabus nemoralis*), *Cc* (*Carabus coriaceus*), *Md* (*Musca domestica*), W (strip of Whatman paper alone). Empty bars are the control (pure ethanol). Asterisks indicate significant differences: ***P<0.001. Bars = ±1 SE, n = 24 for each treatment.
doi:10.1371/journal.pone.0079361.g005

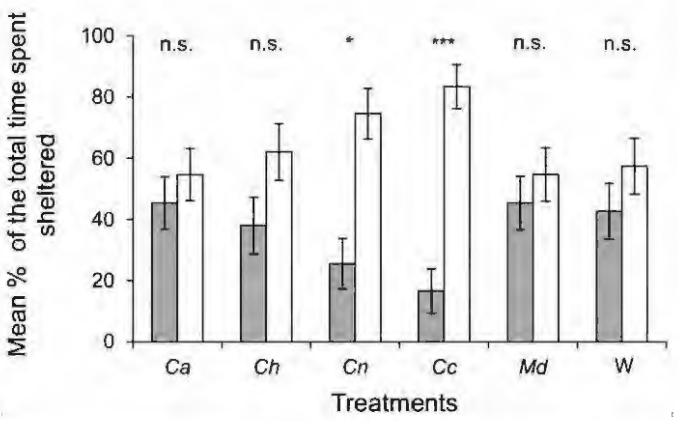


Figure 6. Proportion of time spent sheltered in either the treated or the control shelter for each of the 5 chemical treatment tested and the blank. Treatment applied in the treated shelter (dark boxes) for each test arena is indicated below each histogram pair: *Ca* (*Carabus auratus*), *Ch* (*Carabus hispanus*), *Cn* (*Carabus nemoralis*), *Cc* (*Carabus coriaceus*), *Md* (*Musca domestica*), W (strip of Whatman paper alone). Empty bars are the control (pure ethanol). Asterisks indicate significant differences: *P<0.05, ***P<0.001, n.s. not significant (Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test). Bars = ±1 SE, n = 24.
doi:10.1371/journal.pone.0079361.g006

choice experiment dealing with the assessment of attractant or repulsive chemical cues in slugs.

The device, simple in its design, benefits from the natural proclivity displayed by slugs for dark places and from the functioning of their innate clock. Indeed, slug activity is the result of a complex interaction between an endogenous rhythm controlled by circadian rhythms, which is itself modulated by environmental conditions [73,79,83,84]. Among these environmental factors, variations in temperature and light have a prominent influence on slug activity. For this reason, the beginning of the replicates was synchronized to the photoperiod cycle used in the slugs' rearing room. Replicates thus began at the start of the photophase, while other abiotic factors (i.e. temperatures and relative humidity) were kept constant. This was done in order to balance the need for suitable levels of humidity and appropriate temperatures for slug activity (i.e. crawling), while using light as an external constraint to encourage slugs to find refuge and faithfully reproduce conditions found at dawn in the wild.

Slugs usually leave shelters after dusk and return to them around dawn with the first appearance of light. Incidentally, trapping slugs with artificial shelters that are then examined early the following morning is a common methodology employed for assessing slug populations in exposed fields [85]. *D. reticulatum*, like many other slugs, is well-known for making extensive use of shelters, especially during its inactive phase which typically occurs during daylight hours [76]. Because slugs have a soft body and depend on moist environments for their water demands, the use of refuges is thought to be a means of protection against the harsh external abiotic factors that threaten their bodily integrity [86]. Shelter seeking can thus be regarded as a self-maintenance behavior.

In the present study, the onset of activity in the slugs may also have been influenced by factors other than light. The handling required in order to place them properly in the center of the arenas was without a doubt the very first stimulus to trigger activity. Previous studies demonstrate that a burst of activity occurs in slugs that have just been handled [79]. However, it would have been difficult to allow the slugs to become acclimated to the arena undisturbed and still avoid head orientation bias.

Temperature also has a major influence on slug activity. Thus a noticeable increase in temperature in the lit area (from 15°C to 23°C for instance) due to an increase in light intensity, with shelters remaining cooler, should further encourage shelter seeking behavior in tested slugs. Indeed, 21°C has been identified as the threshold temperature above which slugs dramatically reduce their activity (conversely, their activity is triggered when temperatures fall below 21°C) [79,83,87] and tend to seek shelter [83]. However, the additional measures required to account for these influences could prove quite tedious and are unlikely to significantly improve results when compared to the present model, which already successfully fulfills all of the assessment criteria (cf. fig. 2, 3, 4 and 5).

The implementation of the device provided the means to demonstrate that cuticular extracts from two ground beetles, *C. coriaceus* and *C. nemoralis*, were effective in dissuading tested slugs from entering shelters where either of these stimuli were present. Armsworth *et al.* (2005) [36] showed that slugs display anti-predator behaviors in the presence of paper previously exposed to the crawling of *P. melanarius*. It also appears, based on a similar experiment, that these carabid beetles avoid paper that has been exposed to congeners and preferentially accumulate on unexposed control paper [88]. It is quite probable that these residual chemicals were left by the carabid beetles' footprints.There are numerous studies reporting intra- and interspecific interactions mediated by insect footprints, which could serve to optimize foraging activities in humble bees [89–92] or act as host location kairomones [93,94]. In many cases, the origins of these scent markers remain unclear, as they could be actively (i.e. glandular origin) or passively secreted (merely residual footprints). In the latter case, it is likely that cuticular hydrocarbons (CHCs) are involved, as is suspected to be the case with *Spodoptera frugiperda* caterpillar footprint compounds, which betray the presence of the caterpillar to the benefit of the Braconidae parasitoid, *Cotesia marginiventris*.

CHCs are present throughout the outer surface of the insects' cuticle and have long been recognized for their many diverse

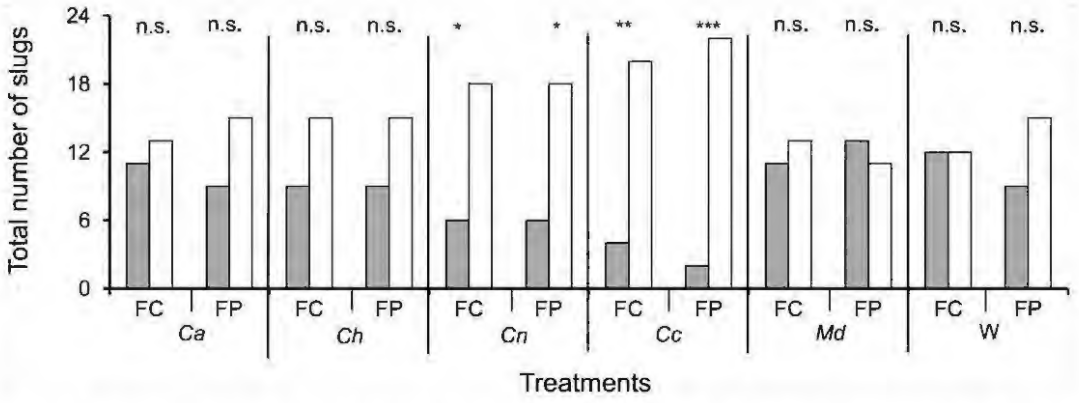


Figure 7. Total number of slugs having chosen a shelter with either treatment or control at first choice (FC) and total number of slugs found at the end of the experiment in each shelter according to the treatments (final position or FP). Dark boxes are the treated shelters, with: *Ca* (*Carabus auratus*), *Ch* (*Carabus hispanus*); *Cn* (*Carabus nemoralis*); *Cc* (*Carabus coriaceus*); *Md* (*Musca domestica*); W (strip of Whatman paper alone). Empty bars are the control shelters (pure ethanol). Asterisks indicate significant differences: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, n.s. not significant (McNemar's test). Data collected from twenty-four replicates for each condition.
doi:10.1371/journal.pone.0079361.g007

functions in insects, including both physiological and ecological roles (see [95–97]). Cuticular extracts are generally obtained using dichloromethane, pentane, chloroform or hexane. These solvents, being strong nonpolars (but in a lesser extent, that being said, regarding dichloromethane), are effective to extract surface cuticular lipids. However these have been known to contaminate the cuticular fraction with unrelated and undesired materials (internal glands, lipid extracts, etc.) [95,98]. Ethanol, in contrast, is a polar molecule that allows affinity for a wider spectrum of molecules species, to both hydrophobic and hydrophilic molecules and it was more suitable for our experiment, because of its nontoxicity towards slugs in the quantity used. Ethanol has been reported to conserve body extract hallmarks for at least one month after preparation [78,99]. It can thus be hypothesized that slugs were deterred by light chemical compounds which were leached out of the outer surface of the ground beetle's exoskeleton, which is typically deposited on the ground during regular activity.

C. coriaceus is heliciphagous, capable of overcoming the secondary defenses of large snails on which they feed [100]. Since its body is not shaped to force its way through the snails' aperture, like in *Cychrus spp.*, it appears to rely on the strength of its jaws to break the shell [101]. *C. coriaceus* also feeds on slugs and, given the previous considerations, it is likely that slugs' mucus exudation is ineffective in deterring attacks from this predatory beetle. *C. coriaceus* are eurytopic beetles that can be found in forests but demonstrate a preference for ecotones at forest edges and may even be found in open habitats, such as parks and gardens [102,103], a preference related to eye structure [103]. In this study, *C. coriaceus* were caught in hedges adjacent to fields where *D. reticulatum* were numerous. These two species are sympatric in west and central Europe and thus *D. reticulatum* may account for a

Table 1. Comparison of eleven behavior parameters of *D. Reticulatum* measured for each treatment[a].

	Treatments							
Behavior	*Ca*	*Ch*	*Cn*	*Cc*	*Md*	W	$F_{5,143}$	*P*
Access latency to the first refuge (sec)	302.88	271.71	278.83	409.33	189.81	267.33	1.74	0.1302
Number of outings	0.542	0.583	0.667	0.625	0.875	0.917	0.6	0.697
Number of shelter permutations	0.417	0.417	0.333	0.208	0.458	0.542	0.62	0.685
Total time spent sheltered (sec)	3076.458	3239	3149.92	3010.63	3260.54	3002.92	1.8	0.1096
Total time spent sheltered (%)	85.457	89.97	87.5	83.63	90.57	83.41	1.97	0.0866
Time spent in the treated shelter (sec)	1345.375 ab	1202.54 ab	812.71 ab	438.5 b	1487.17 a	1339.17 ab	2.82	0.0187
Time spent in the control shelter (sec)	1731.083	2036.458	2337.208	2572.125	1773.375	1663.75	1.13	0.3451
Time spent in the treated shelter upon the total trial duration (%)	37.372 ab	33.404 ab	22.575 ab	12.181 b	41.31 a	37.199 ab	2.47	0.0354
Time spent in the control shelter upon the total trial duration (%)	48.086	56.568	64.922	71.448	49.26	46.215	1.52	0.188
Time spent in the treated shelter upon the total time spent sheltered (%)	45.388	37.991	25.468	16.638	45.334	42.636	2.05	0.0749
Time spent in the control shelter upon the total time spent sheltered (%)	54.612	62.009	74.532	83.362	54.666	57.364	2.05	0.0749

[a]Different letters indicate significant differences between treatments based on a Tukey post-hoc comparison of means test. *F* ratios are based on one-way ANOVAs. N = 24/treatment.
doi:10.1371/journal.pone.0079361.t001

significant part of the diet of *C. coriaceus*, sufficient at least to represent such a major threat that the innate ability to detect this predator is mandatory for the survival of young slugs.

Likewise, *C. nemoralis* is found in similar habitats to *C. coriaceus*. It is generally encountered in open, anthropogenically altered areas like gardens and parks [51,104], or near set-aside arable areas [105,106]. Observations of diet preferences for *C. nemoralis* are somewhat conflicting, some consider it to be a specialist [107] while others view it as a generalist [108,109]. However, several studies have reported its skill in preying upon mollusks, notably on slugs at both a physiological level and in laboratory experiments. In particular, Digweed 1994 demonstrated that *C. nemoralis* orientate to *D. reticulatum* mucus trails and are able to consume large *A. lusitanicus*, up to 1.3 g, with a preference for slugs weighing less than 1 g [51]. Despite mucus from arionids being stickier than *D. reticulatum*, no marked consumption preference for either *A. lusitanicus* or *D. reticulatum* was noticed. *C. nemoralis* proved to be an efficient slug-killer, targeting its attack to the posterior end of the slugs, and often resulting in prey death at first strike [51,107]. Ayre (1995) [107] conducted a comparison consumption test on *D. reticulatum* weighing between 0.1 to 0.7 g using a mix of generalist and specialist ground beetles, and *C. nemoralis* appeared as efficient as the specialized *C. caraboides* and *C. violaceus* ground beetles in feeding on slugs. These observations indicate that this beetle may be capable of handling even large *D. reticulatum*. Thus, small slugs, like those used in the experiments, would have limited means of self-defense against *C. nemoralis*. Thus, the ability to detect the presence of this ground beetle may be a selective advantage, allowing to the slug to anticipate and avoid potentially risky areas.

For prey, avoiding predation threat has a cost, because it results in a shift of trade-offs [2]. Detection of predators is thus selective, as responding to cues from non-hostile organisms can be detrimental to prey, causing them to lose opportunities to perform activities that are essential to fitness. This was consistent with study results, as the slugs did not avoid the shelter treated with *M. domestica* extracts. Being a neutral insect, the house flies do not represent a threat to slugs. The two other cuticular extracts from ground beetles, *C. auratus* and *C. hispanus*, were also ineffective in deterring slugs from entering the treated shelters. It is also possible that the innate ability to perceive predators displayed by juvenile slugs is designed to act solely against the most relevant chemical cues, which correspond to their most threatening predators.

Regarding *C. hispanus*, explanations may suffer from lack of data, which is perhaps due to its endemic status in a narrow area of France. Nevertheless, from an ecological standpoint, some major distinctions between *C. hispanus*, *C. coriaceus* and *C. nemoralis* can be drawn. Indeed, *C. hispanus* is primarily a forest species with good tree climbing skills and an oligophagous diet [110] ranging from snails to fruits, which may account for its reduced threat to slugs.

Results obtained with *C. auratus* are somewhat surprising. Despite it being a highly voracious species and a well-known friend to gardeners, the cuticular extracts did not have a crucial impact on slug behavior. In fact, this species shares several features with the previous species. For example, *C. auratus* prefers open habitats, like *C. coriaceus* and *C. nemoralis*, whilst also being found in forests. The species is also very opportunistic, able to climb trees for hunting, as *C. hispanus* does. Thus, it is possible that *C. auratus*, like *C. hispanus*, prey on slugs to a lesser extent than *C. coriaceus* and *C. nemoralis*.

Studies by Armsworth *et al.* (2005) [36] show that slugs display anti-predator behaviors (area avoidance, increased speed, reduced turning rate) in the presence of papers previously exposed to the crawling of *P. melanarius*, a generalist species. In their experiments, slugs were caught in the wild making it impossible to account for life history traits. Thus the possibility that they learned to recognize *P. melanarius* through experience cannot be excluded, as it is a well-documented feature for a variety of taxa in many studies [3,111–113]. On the contrary, the slugs employed in our study were predator-naive, so they may have failed to respond to *C. auratus* and *C. hispanus* chemical cues because the two species may be less serious predators for slugs, and their cues may require learning.

In addition, prey often respond more readily to chemical cues of a predator fed with conspecifics or, at least, with a closely related species. For instance, Persons *et al.* (2001) [61] showed that anti-predatory behaviors against the wolf spider *Pardosa milvina* were stronger in the presence of cues from the predatory wolf spider *Hogna helluo* fed *P. milvina* than when fed the crickets *Acheta domesticus*. Likewise, Lefcort *et al.* (2006) [35] demonstrated that *Theba pisana* modulates its response according to the diet of *Carabus carabus*: anti-predator behaviors are more obvious when *T. pisana* is presented with feces cues from snail-fed ground beetles than in the presence of feces cues from *C. carabus* fed with chicken. In this study, the ground beetles are fed with *X. derbentina* which means that tested slugs do not react to conspecific dead material, like apneumones [114]. *X. derbentina* is a xerothermophilic land snail species native to Eastern Mediterranean Europe, accidently introduced in southeast France during the 1940s [115,116] and now well-established in Provence [117]. *X. derbentina* and *D. reticulatum*, while both belonging to the Stylommatophora order, are not only fairly phylogenetically distant from each other, but occur in different ecological habitats and thus experience very different constraints. Nevertheless, the juvenile slugs showed strong avoidance to chemical cues from *C. nemoralis* and *C. coriaceus*. This avoidance was quickly performed, sustained and irreversible for the duration of the experiment (see fig. 6 and 7), indicating that these ground beetles must exert such a selection pressure on slugs that even the consumption of a distant terrestrial gastropod cannot alter the young *D. reticulatum's* perception of these beetles as a foe. In contrast, the absence of avoidance in the presence of cuticular extracts from *C. auratus* or *C. hispanus* does not necessarily imply that they are inherently non-hazardous predators for slugs. Additional suitable cues, in the form of diet-based by-products (i.e., a diet based on related slugs species), may be required for the naive slugs to perceive these ground beetles as an actual threat. It is also possible that the cue was not eluted by ethanol, but it could be present in other solvents with greater affinity for hydrophobic compounds than ethanol, such as dichloromethane or hexane. Moreover, it cannot be excluded that the cue is concentration-dependant. From this point of view, a correlation can be drawn between the two ground beetle cuticular extracts that did not affect the slugs' behavior and their age. Indeed, *C. hispanus* and *C.auratus* cuticular extracts were made about 6 and 4 months respectively before the beginning of the trials, compared with the 3 months of standby for the other cuticular extracts. We can thus not rule out that the oldest solutions were somewhat altered in such extent that they could no more operate on slugs.

Refuges can be useful to prey devoid of efficient secondary defenses. Turner (1996) [118] found that in the presence of the specialist feeder fish, *Lepomis gibbosus*, *Physella* move under covered habitats to reduce the risk of being caught. Similarly, Symondson (1993) [119] deduced from his results that *D. reticulatum* uses large lettuce leaves as a means of protection against the generalist carabid beetle *A. parallelepipedus* by blocking its access. The results of this study are the first to expose the impact of chemical residuals from two specialist ground beetles in influencing the shelter choices of slugs. The slugs may be forced to travel further to find a suitable refuge, which could have a detrimental impact on fitness.

As their movements involve the excretion of large amounts of mucus, traveling a greater distance may affect their body water-content [120] and increase their vulnerability through prolonged exposure to adverse abiotic factors (increased risk of desiccation) and/or to predators. Questions may be raised as to the extent of the effect of ground beetle chemical cues on other important self-maintenance behaviors, such as foraging. Further experiments may be conducted to explore whether slugs are able to refine predation risk assessment according to predator diet, or whether they can learn to recognize predators based on diet. These investigations could be performed either with ethanol/dichloromethane cuticular extracts from ground beetles, or using residuals from the crawling of live predators left on substratum (such as Whatman paper). Finally, chemical analysis must be carried out so as to reveal the nature of the chemical compounds that mediate this predator-prey interaction before being put to the test through experiments on slugs' behavior.

Acknowledgments

We wish to thanks Benjamin Creton for his contributions in managing the experiments and Mr and Mrs Isnard for allowing catch *C. auratus* in their garden.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PB DS CLL AB PP. Performed the experiments: PB. Analyzed the data: CLL. Contributed reagents/materials/analysis tools: PB PP. Wrote the paper: PB AB PP.

References

1. Kats LB, Dill LM (1998) The scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animals. Ecoscience 5: 361–394.
2. Lima SL, Dill LM (1990) Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. Can J Zool 68: 619–640. doi:10.1139/z90-092.
3. Dicke M, Grostal P (2001) Chemical Detection of Natural Enemies by Arthropods: An Ecological Perspective. Annu Rev Ecol Syst 32: 1–23. doi:10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.113951.
4. Vermeij GJ (1994) The Evolutionary Interaction Among Species: Selection, Escalation, and Coevolution. Annu Rev Ecol Syst 25: 219–236. doi:10.1146/annurev.es.25.110194.001251.
5. Vermeij GJ (1982) Unsuccessful Predation and Evolution. Am Nat 120: 701–720.
6. Sih A (1987) Predators and prey life styles: an evolutionary and ecological overview. In: Predation: Direct and Indirect Impacts on Aquatic Communities. Kerfoot WC, Sih A, editors Hanover: Hanover, New Hampshire: University Press of New England.
7. Edmunds M (1974) Defence in animal: a survey of anti-predator defences. Edmunds M, editor Longman, Harlow, England.
8. Chivers DP, Smith RJF (1998) Chemical alarm signalling in aquatic predator-prey systems: A review and prospectus. Ecoscience 5: 338–352.
9. Ferrari MCO, Sih A, Chivers DP (2009) The paradox of risk allocation: a review and prospectus. Anim Behav 78: 579–585. doi:10.1016/j.anbehav.2009.05.034.
10. Wisenden BD (2000) Olfactory assessment of predation risk in the aquatic environment. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 355: 1205–1208. doi:10.1098/rstb.2000.0668.
11. Wisenden BD, Millard MC (2001) Aquatic flatworms use chemical cues from injured conspecifics to assess predation risk and to associate risk with novel cues. Anim Behav 62: 761–766. doi:10.1006/anbe.2001.1797.
12. Hara TJ (1992) Overview and introduction. In: Hara TJ, editor. Fish Chemoreception. New-York. 1–12.
13. Storm JJ, Lima SL (2008) Predator-naïve fall field crickets respond to the chemical cues of wolf spiders. Can J Zool 86: 1259–1263. doi:10.1139/Z08-114.
14. Slifer EH (1970) The structure of arthropod chemoreceptors. Annu Rev Entomol 15: 121–142. doi:10.1146/annurev.en.15.010170.001005.
15. Chapman RF (1998) Chemoreception. In: Chapman RF, editor. The Insects - Structure and Function. Cambridge: Cambridge University Press. 636–654.
16. Zacharuk RY (1985) Antennae and sensilla. In: Kerkut GA, Gilbert LJ, editors. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford: Oxford: Pergamon Press. 1–69.
17. Zacharuk RY (1980) Ultrastructure and Function of Insect Chemosensilla. Annu Rev Entomol 25: 27–47. doi:10.1146/annurev.en.25.010180.000331.
18. Dalesman S, Rundle SD, Cotton PA (2007) Predator regime influences innate anti-predator behaviour in the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. Freshw Biol 52: 2134–2140. doi:10.1111/j.1365-2427.2007.01843.x.
19. Orr MV, El-Bekai M, Lui M, Watson K, Lukowiak K (2007) Predator detection in Lymnaea stagnalis. J Exp Biol 210: 4150–4158. doi:10.1242/jeb.010173.
20. Turner AM, Turner SE, Lappi HM (2006) Learning, memory and predator avoidance by freshwater snails: effects of experience on predator recognition and defensive strategy. Anim Behav 72: 1443–1450. doi:10.1016/j.anbehav.2006.05.010.
21. Ferrari MCO, Wisenden BD, Chivers DP (2010) Chemical ecology of predator-prey interactions in aquatic ecosystems: a review and prospectus. Can J Zool 88: 698–724. doi:10.1139/Z10-029.
22. Jacobsen HP, Stabell OB (2004) Antipredator behaviour mediated by chemical cues: the role of conspecific alarm signalling and predator labelling in the avoidance response of a marine gastropod. Oikos 104: 43–50. doi:10.1111/j.0030-1299.2004.12369.x.
23. Croll RP (1983) Gastropod chemoreception. Biol Rev 58: 293–319. doi:10.1111/j.1469-185X.1983.tb00391.x.
24. Zaitseva OV (1994) Structural Organization of the Sensory Systems of the Snail. Neurosci Behav Physiol 24: 47–57. doi:10.1007/BF02355652.
25. Zaitseva OV (1999) Principles of the structural organization of the chemosensory systems of freshwater gastropod mollusks. Neurosci Behav Physiol 29: 581–593. doi:10.1007/BF02461151.
26. Kohn AJ (1961) Chemoreception in gastropod molluscs. Am Zool 1: 291–308.
27. Barker GM (2001) The Biology of Terrestrial Molluscs. Barker GM, editor Hamilton: CABI Publishing.
28. South A (1992) Terrestrial Slugs: Biology, Ecology, Control. London, New-York: Chapman & Hall.
29. Chase R (1986) Lessons from snail tentacles. Chem Senses 11: 411–426. doi:10.1093/chemse/11.4.411.
30. Zieger MV, Vakoliuk IA, Tuchina OP, Zhukov VV, Meyer-Rochow VB (2009) Eyes and vision in Arion rufus and Deroceras agreste (Mollusca; Gastropoda; Pulmonata): What role does photoreception play in the orientation of these terrestrial slugs? Acta Zool 90: 189–204. doi:10.1111/j.1463-6395.2008.00369.x.
31. Hamilton PV, Winter MA (1984) Behavioural responses to visual stimuli by the snails Tectarius muricatus, Turbo castanea, and Helix aspersa. Anim Behav 32: 51–57. doi:10.1016/S0003-3472(84)80323-1.
32. Eakin RM, Brandenburger JL (1975) Understanding a snail's eye at a snail's pace. Am Zool 15: 851–863. doi:10.1093/icb/15.4.851.
33. Barker GM (2004) Natural enemies of terrestrial gastropods. Barker GM, editor Hamilton: CABI Publishing.
34. Symondson WOC (2004) Coleoptera (Carabidae, Staphylinidae, Lampyridae, Drilidae and Silphidae) as predators of terrestrial gastropods. In: Barker GM, editor. Natural enemies of terrestrial molluscs. Hamilton: CABI. 37–84.
35. Lefcort H, Ben-Ami F, Heller J (2006) Terrestrial snails use predator-diet to assess danger. J Ethol 24: 97–102. doi:10.1007/s10164-005-0168-0.
36. Armsworth CG, Bohan DA, Powers SJ, Glen DM, Symondson WOC (2005) Behavioural responses by slugs to chemicals from a generalist predator. Anim Behav 69: 805–811. doi:10.1016/j.anbehav.2004.07.009.
37. Symondson WOC (1989) Biological control of slugs by carabids. In: Henderson IF, editor. Slugs and snails in world agriculture. Thornton Heath: British Crop Protection Council. 295–300.
38. Bohan DA, Bohan AC, Glen DM, Symondson WOC, Wiltshire CW, et al. (2000) Spatial dynamics of predation by carabid beetles on slugs. J Anim Ecol 69: 367–379. doi:10.1046/j.1365-2656.2000.00399.x.
39. McKemey AR, Symondson WOC, Glen DM, Brain P (2001) Effects of slug size on predation by Pterostichus melanarius (Coleoptera: Carabidae). Biocontrol Sci Technol 11: 81–91. doi:10.1080/09583150020029763.
40. Symondson WOC, Sunderland KD, Greenstone MH (2002) Can generalist predators be effective biocontrol agents? Annu Rev Entomol 47: 561–594. doi:10.1146/annurev.ento.47.091201.145240.
41. Symondson WOC (1994) The potential of Abax parallelepipedus (Col.: Carabidae) for mass breeding as a biological control agent against slugs. Entomophaga 39: 323–333. doi:10.1007/BF02373037.
42. Asteraki EJ (1993) The potential of carabid beetles to control slugs in grass/clover swards. Entomophaga 38: 193–198. doi:10.1007/BF02372553.
43. Kromp B (1999) Carabid beetles in sustainable agriculture: a review on pest control efficacy, cultivation impacts and enhancement. Agric Ecosyst Environ 74: 187–228. doi:10.1016/S0167-8809(99)00037-7.
44. Martin TJ, Kelly JR (1986) The effects of changing agriculture on slugs as pests of cereals. Proceedings 1986 Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases. Farnham: BCPC. 441–424.
45. Bourne NB, Jones GW, Bowen ID (1988) Slug feeding behaviour in relation to control with molluscicidal baits. J Molluscan Stud 54: 327–338. doi:10.1093/mollus/54.3.327.
46. Bailey SER, Wedgwood MA (1991) Complementary video and acoustic recordings of foraging by two pest species of slugs on non-toxic and

molluscicidal baits. Ann Appl Biol 119: 163–176. doi:10.1111/j.1744-7348.1991.tb04855.x.
47. Homeida AM, Cooke RG (1982) Pharmacological aspects of metaldehyde poisoning in mice. J Vet Pharmacol Ther 5: 77 81. doi:10.1111/j.1365-2885.1982.tb00500.x.
48. Johnson IP, Flowerdew JR, Hare R (1992) Populations and diet of small rodents and shrews in relation to pesticide usage. In: Greig-Smith PW, Frampton G, Hardy T, editors. Pesticides, cereal farming and the environment: the Boxworth project. 144 156.
49. Corfield GS, Connor LM, Swindells KL, Johnson VS, Raisis AL (2008) Intussusception following methiocarb toxicity in three dogs. J Vet Emerg Crit Care 18: 68–74. doi:10.1111/j.1476-4431.2007.00271.x.
50. Ayre K (2001) Effect of predator size and temperature on the predation of *Deroceras reticulatum* (Müller) (Mollusca) by carabid beetles. J Appl Entomol 125: 389–395. doi:10.1046/j.1439-0418.2001.00568.x.
51. Hatteland BA, Grutle K, Mong CE, Skartveit J, Symondson WOC, et al. (2010) Predation by beetles (Carabidae, Staphylinidae) on eggs and juveniles of the Iberian slug *Arion lusitanicus* in the laboratory. Bull Entomol Res 100: 559 567. doi:10.1017/S0007485309990629.
52. Kielty JP, Allen-Williams LJ, Underwood N, Eastwood EA (1996) Behavioral responses of three species of ground beetle (Coleoptera: Carabidae) to olfactory cues associated with prey and habitat. J Insect Behav 9: 237 250. doi:10.1007/BF02213868.
53. Oberholzer F, Frank T (2003) Predation by the Carabid Beetles *Pterostichus melanarius* and *Poecilus cupreus* on Slugs and Slug Eggs. Biocontrol Sci Technol 13: 99–110. doi:10.1080/0958315021000054421.
54. Symondson WOC, Glen DM, Wiltshire CW, Langdon CJ, Liddekk JE (1996) Effects of Cultivation Techniques and Methods of Straw Disposal on Predation by *Pterostichus melanarius* (Coleoptera: Carabidae) Upon Slugs (Gastropoda: Pulmonata) in an Arable Field. J Appl Ecol 33: 741–753.
55. Symondson WOC, Glen DM, Ives AR, Langdon CJ, Wiltshire CW (2002) Dynamics of the relationship between a generalist predator and slugs over five years. Ecology 83: 137 147. doi:10.1890/0012 9658(2002)083[0137:DOTR-BA]2.0.CO;2.
56. Mair J, Port GR (2002) The influence of mucus production by the Slug, Deroceras Reticulatum, on predation by Pterostichus madidus and Nebria brevicollis (Coleoptera: Carabidae). Biocontrol Sci Technol 12: 325 335. doi:10.1080/09583150220128112.
57. Mair J, Port GR (2001) Predation by the carabid beetle *Pterostichus madidus* and *Nebria brevicollis* is affected by size and condition of the prey slug *Deroceras reticulatum*. Agric For Entomol 3: 99 106. doi:10.1046/j.1461-9563.2001.00093.x.
58. Pakarinen E (1994) The Importance of Mucus As a Defence Against Carabid Beetles By the Slugs *Arion Fasciatus* and *Deroceras Reticulatum*. J Molluscan Stud 60: 149–155. doi:10.1093/mollus/60.2.149.
59. Pakarinen E (1994) Autotomy in Arionid and Limacid Slugs. J Molluscan Stud 60: 19 23. doi:10.1093/mollus/60.1.19.
60. Deyrup-Olsen I, Martin AW, Paine RT (1986) The autotomy escape response of the terrestrial slug *Prophysaon foliatum* (Pulmonata: Arionidae). Malacologia 27: 307 311.
61. Persons MH, Walker SE, Rypstra AL, Marshall SD (2001) Wolf spider predator avoidance tactics and survival in the presence of diet-associated predator cues (Araneae: Lycosidae). Anim Behav 61: 43–51. doi:10.1006/anbe.2000.1594.
62. Barnes MC, Persons MH, Rypstra AL (2002) The effect of predator chemical cue age on antipredator behavior in the wolf spider Pardosa milvina (Araneae: Lycosidae). J Insect Behav 15: 269 281. doi:10.1023/A:1015493118836.
63. Bell RD, Rypstra AL, Persons MH (2006) The Effect of Predator Hunger on Chemically Mediated Antipredator Responses and Survival in the Wolf Spider *Pardosa milvina* (Araneae: Lycosidae). Ethology 112: 903 910. doi:10.1111/j.1439-0310.2006.01244.x.
64. Persons MH, Rypstra AL (2001) Wolf spiders show graded antipredator behavior in the presence of chemical cues from different sized predators. J Chem Ecol 27: 2493 2504. doi:10.1023/A:1013679532070.
65. Lehmann LM, Walker SE, Persons MH (2004) The Influence of Predator Sex on Chemically Mediated Antipredator Response in the Wolf Spider Pardosa milvina (Araneae: Lycosidae). Ethology 110: 323–339. doi:10.1111/j.1439-0310.2004.00972.x.
66. Kiesecker JM, Chivers DP, Blaustein AR (1996) The use of chemical cues in predator recognition by western toad tadpoles. Anim Behav 52: 1237 1245. doi:10.1006/anbe.1996.0271.
67. Putdlitz MH, Chivers DP, Kiesecker JM, Blaustein AR (1999) Threat-sensitive Predator Avoidance by Larval Pacific Treefrogs (Amphibia, Hylidae). Ethology 105: 449 456. doi:10.1046/j.1439-0310.1999.00416.x.
68. Wahle RA (1992) Body-Size Dependent Anti-Predator Mechanisms of the American Lobster. Oikos 65: 52–60.
69. Ferrari MCO, Trowell JJ, Brown GE, Chivers DP (2005) The role of learning in the development of threat-sensitive predator avoidance by fathead minnows. Anim Behav 70: 777 784. doi:10.1016/j.anbehav.2005.01.009.
70. Ferrari MCO, Gonzalo A, Messier F, Chivers DP (2007) Generalization of learned predator recognition: an experimental test and framework for future studies. Proc R Soc B Biol Sci 274: 1853 1859. doi:10.1098/rspb.2007.0297.
71. Newell PF (1966) The nocturnal behaviour of slugs. Med Biol Illus 16: 146–159.
72. Barker GM (2002) Molluscs as Crop Pests. Thomas T &. Barker GM, editor Hamilton: CABI Publishing.
73. Wareing DR, Bailey SER (1985) The effects of steady and cycling temperatures on the activity of the slug *Deroceras reticulatum*. J Molluscan Stud 51: 257 266.
74. Lewis RD (1969) Studies on the locomotor activity of the slug *Arion ater* (Linnaeus) I. Humidity, Temperatur and Light reactions. Malacologia 7: 295–306.
75. Newell PF (1968) The measurement of light and temperature as factors controlling the surface activity of the slug *Agriolimax reticulatus* (Müller). In: Wadsworth RM, editor. The measurement of environmental factors in terrestrial ecology. Oxford: Blackwell. 141 146.
76. Hommay G, Lorvelec O, Jacky F (1998) Daily activity rhythm and use of shelter in the slugs *Deroceras reticulation* and *Arion distinctus* under laboratory conditions. Ann Appl Biol 132: 167 185. doi:10.1111/j.1744-7348.1998.tb05193.x.
77. Rollo CD, Borden JH, Casey IB (1995) Endogenously Produced Repellent from American Cockroach (Blattaria: Blattidae): Fuction in Death Recognition. Environ Entomol 24: 116–124.
78. Rollo CD, Czyzewska E, Borden JH (1994) Fatty acid necromones for cockroaches. Naturwissenschaften 81: 409 410. doi:10.1007/BF01132695.
79. Dainton BH (1954) The activity of slugs. I. The induction of activity by changing temperatures. J Exp Biol 31: 165–187.
80. Chase R (1982) The Olfactory Sensitivity of Snails, Achatina fulica. J Comp Physiol 148: 225 235.
81. Underwood AJ (1981) Techniques of analysis of variance in experimental marine biology and ecology. Oceanogr Mar Biol an Annu Rev 19: 513 605.
82. Krebs CJ (1989) Ecological Methodology. New-York: Harper & Row.
83. Rollo CD (1991) Endogenous and exogneous regulation of activity in *Deroceras reticulatum*, a wheather-sensitive terrestrial slug. Malacologia 33: 199–220.
84. Dainton BH (1954) The activity of slugs. II. The effects of light and air currents. J Exp Biol 31: 188 197.
85. Hommay G, Kienlen JC, Jacky F, Gertz C (2003) Daily variation in the number of slugs under refuge traps. Ann Appl Biol 142: 333–339. doi:10.1111/j.1744-7348.2003.tb00258.x.
86. Grewal PS, Grewal SK, Taylor RAJ, Hammond RB (2001) Application of Molluscicidal Nematodes to Slug Shelters: A Novel Approach to Economic Biological Control of Slugs. Biol Control 22: 72 80. doi:10.1006/bcon.2001.0958.
87. Dainton BH, Wright J (1985) Falling Temperature Stimulates Activity in the Slug Arion Ater. J Exp Biol 118: 439 443.
88. Guy AG, Bohan DA, Powers SJ, Reynolds AM (2008) Avoidance of conspecific odour by carabid beetles: a mechanism for the emergence of scale-free searching patterns. Anim Behav 76: 585–591. doi:10.1016/j.anbehav.2008.04.004.
89. Stout JC, Goulson D, Allen JA (1998) Repellent scent-marking of flowers by a guild of foraging bumblebees (Bombus spp.). Behav Ecol Sociobiol 43: 317 326. doi:10.1007/s002650050497.
90. Schmitt U, Bertsch A (1990) Do foraging bumblebees scent-mark food sources and does it matter? Oecologia 82: 137 144. doi:10.1007/BF00318545.
91. Gawleta N, Zimmermann Y, Eltz T (2005) Repellent foraging scent recognition across bee families. Apidologie 36: 325 330. doi:10.1051/apido:2005018.
92. Witjes S, Eltz T (2009) Hydrocarbon footprints as a record of bumblebee flower visitation. J Chem Ecol 35: 1320 1325. doi:10.1007/s10886-009-9720-7.
93. Rostás M, Wölfling M (2009) Caterpillar footprints as host location kairomones for Cotesia marginiventris: persistence and chemical nature. J Chem Ecol 35: 20–27. doi:10.1007/s10886-009-9590-z.
94. Wölfling M, Rostás M (2009) Parasitoids use chemical footprints to track down caterpillars. Commun Integr Biol 2: 353 355. doi:10.1007/s10886-009-9590-z.These.
95. Howard RW (1993) Cuticular hydrocarbons and Chemical communication. In: Stanley-Samuelson DW, Nelson DR, editors. Insect lipids: chemistry, biochemistry, and biology. Lincoln: Lincoln: University of Nebraska Press. 179 226.
96. Howard RW, Blomquist GJ (2005) Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. Annu Rev Entomol 50: 371–393. doi:10.1146/annurev.ento.50.071803.130359.
97. Chapman RF (1998) Excretion and salt and water regulation. In: Chapman RF, editor. The Insects - Structure and Function. Cambridge: Cambridge University Press. 478 508.
98. Bagnères AG, Morgan ED (1990) A simple method for analysis of insect cuticular hydrocarbons. J Chem Ecol 16: 3263–3276. doi:10.1007/BF00982097.
99. Yao M, Rosenfeld J, Attridge S, Sidhu S, Aksenov V, et al. (2009) The Ancient Chemistry of Avoiding Risks of Predation and Disease. Evol Biol 36: 267–281. doi:10.1007/s11692-009-9069-4.
100. Skłodowski JJW (2005) Interspecific body size differentiation in Carabus assemblages in the Białowieża Primeval Forest, Poland. In: Lövei GL, Toft S, editors. European Carabidology 2003. Proceedings of the 11th European Carabidologist Meeting. Foulum, Denmark: DIAS Reports no. 114, Vol. 114. 291 303.
101. Sturani M (1962) Osservazioni e ricerche biologiche sul genere *Carabus* L.(sl).(Coleoptera, Carabidae). Mem della Soc Entomol Ital 41: 85 202.
102. Riecken U, Raths U (1996) Use of radio telemetry for studying dispersal and habitat use of Carabus coriaceus L. Ann Zool Fennici 33: 109–116.

103. Talarico FF, Romeo M, Massolo A, Brandmayr P, Zetto T (2007) Morphometry and eye morphology in three species of *Carabus* (Coleoptera: Carabidae) in relation to habitat demands. J Zool Syst Evol Res 45: 33–38. doi:10.1111/j.1439-0469.2006.00394.x.
104. Niemelä JK, Spence JR (1994) Distribution of Forest Dwelling Carabids (Coleoptera): Spatial Scale and the Concept of Communities. Ecography (Cop) 17: 166–175. doi:10.1111/j.1600-0587.1994.tb00090.x.
105. Kennedy P (1994) The distribution and movement of ground beetles in relation to set-aside arable land. In: Desender K, Dufrene M, Loreau M,Cuff ML, Maelfait J-P, editors. Carabid Beetles: Ecology and Evolution. Dordrecht: Kluwer Academic. 439–444.
106. Gruttke H (1994) Dispersal of carabid species along a linear sequence of young hedge plantations. In: Desender K, Dufrêne M, Loreau M, Luff ML, Maelfait J-P, editors. Carabid Beetles: Ecology and Evolution. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 299–303.
107. Ayre K (1995) Evaluation of carabids as predators of slugs in arable land. Thesis, University of Newcastle Upon Tyne.
108. Hengeveld R (1980) Qualitative and quantitative aspects of the food of ground beetles (Coleoptera, Carabidae): a review. Netherlands J Zool 30: 555–563. doi:10.1163/002829679X00188.
109. Digweed SC (1994) Detection of mucus-producing prey by *Carabus nemoralis* Mueller and *Staphinotus marginatus* Fischer (Coleoptera: Carabidae). Coleopt Bull 48: 361–369.
110. Turin H, Penev L, Casale A, Arndt E, Assmann T, et al. (2003) Species accounts. In: Turin H, Penev L, Casale A, editors. The Genus Carabus in Europe. A synthesis. Leiden: Pensoft Publishers, Sofia-Moscow & European Invertebrate Survey. 141–286.
111. Chivers DP, Wisenden BD, Smith JF (1996) Damselfly larvae learn to recognize predators from chemical cues in the predators diet. Anim Behav 52: 315. doi:10.1006/anbe.1996.0177.
112. Ferrari MCO, Capitania-Kwok T, Chivers DP (2006) The role of learning in the acquisition of threat-sensitive responses to predator odours. Behav Ecol Sociobiol 60: 522–527. doi:10.1007/s00265-006-0195-z.
113. Mirza RS, Ferrari MCO, Kiesecker JM, Chivers DP (2006) Responses of American toad tadpoles to predation cues: behavioural response thresholds, threat-sensitivity and acquired predation recognition. Behaviour 143: 877–889. doi:10.1163/156853906778017926.
114. Nordlund DA, Lewis WJ (1976) Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. J Chem Ecol 2: 211–220. doi:10.1007/BF00987744.
115. Kiss L, Labaune C, Magnin F, Aubry S (2005) Plasticity of the Life Cycle of *Xerapicta Derbentina* (Krynicki, 1836), a Recently Introduced Snail in Mediterranean France. J Molluscan Stud 71: 221–231. doi:10.1093/mollus/eyi030.
116. Regteren A Van (1960) On the occurrence of a species of *Xeropicta* in France. Basteria 24: 21–26.
117. Labaune C, Magnin F (1999) Un escargot nouveau venu dans le Luberon et en Provence: *Xeropicta derbentina* (Krinicki, 1836). Courr Sci Du Parc Nat Régional Luberon 3: 102–110.
118. Turner AM (1996) Freshwater snails alter habitat use in response to predation. Anim Behav 51: 747–756. doi:10.1006/anbe.1996.0079.
119. Symondson WOC (1993) The Effects of Crop Development Upon Slug Distribution and Control by Abax Parallelepipedus (Coleoptera, Carabidae). Ann Appl Biol 123: 449–457. doi:10.1111/j.1744-7348.1993.tb04107.x.
120. Lyth M (1982) Water-content of slugs (Gastropoda: Pulmonata) maintained in standardised culture conditions. J Molluscan Stud 48: 214–218.

Deuxième Partie

La réponse d'évitement de l'escargot invasif *Xeropicta derbentina* à des sécrétions de carabes est liée aux caractéristiques de leurs traits écologiques

II Préambule

Contrairement aux limaces, les escargots disposent d'une coquille externe bien développée dont le polymorphisme et les traits morphologiques (taille, sculptures, épaisseur, forme…), aussi bien chez les espèces aquatiques que terrestres, correspondent à des adaptations à la pression de sélection exercées par la prédation (Vermeij and Covich 1978; Quensen III and Woodruff 1997; Hoso and Hori 2008).

Etant donné l'investissement énergétique que représentent les mesures défensives destinées à contrer les prédateurs, celles-ci ne sont généralement pas redondantes chez les proies (Kats and Dill 1998). Toutefois, les coquilles sont coûteuses à produire (Wilbur and Saleuddin 1983; Lewis and Magnuson 1999) et ne possèdent qu'une efficacité limitée qui ne représentent finalement pas un réel obstacle face à des prédateurs spécialisés capables de les pénétrer ou de les découper. Par exemple, la famille des Carabidae possède de nombreuses espèces disposant d'adaptations morphologiques (cf. fig. 17 et 18 p. 44) leur permettant de déjouer efficacement les coquilles des escargots. D'autre part, le peu de résistance physique offerte par le tégument des escargots, leur faible vitesse de déplacement par rapport à la plupart de leurs prédateurs et l'importance occupée par l'olfaction dans les interactions avec leur environnement, sont autant d'éléments qui confortent l'hypothèse de la nécessaire capacité des escargots à percevoir leurs prédateurs. Bien qu'il s'agisse d'une aptitude très largement documentée chez les escargots aquatiques et maritimes (Turner 1996; Kats and Dill 1998; Turner 2008) elle n'a, au contraire, fait l'objet que de très peu d'attention chez les escargots terrestres. Seule l'étude réalisée par Lefcort et al. (2006) rapporte les différences comportementales observées chez l'escargot terrestre méditerranéen *Theba pisana* (Müller, 1774), en réponse aux déjections d'un carabe prédateur, *Carabus carabus*, soumis à différents régimes alimentaires. Bien que les fèces constituent un indicateur indirect de risque de prédation pour de nombreuses espèces de proies (Apfelbach et al. 2005), ils s'agit souvent d'indicateurs peut spécifique du risque de prédation (Stoddart 1980; Dickman and Doncaster 1984) pouvant conduire les proies à surestimer le risque de prédation (Ferrari et al. 2010a).

Dans l'étude suivante, nous avons cherché à évaluer l'influence d'extraits cuticulaires de différentes espèces de carabes sur le choix du site de perchage de *Xeropicta derbantina*.

Xeropicta derbantina est une espèce d'escargot xérophile originaire de l'est du bassin méditerranéen qui est devenue invasive dans le sud-est de la France après son introduction à la fin des années 40 (Regteren 1960; Labaune and Magnin 1999). Bien que les comportements antiprédateurs des proies résultent généralement d'une histoire évolutive commune avec leurs prédateurs, il n'est pas rare que des proies perçoivent des signaux chimiques provenant de prédateurs allopatriques leur permettant d'adopter des comportements d'évasion. Cette aptitude est suspectée de provenir de similitudes partagées entre des archétypes de prédateurs, comme des adaptation morphologiques et/ou comportementales, que les proies sont en mesure de reconnaître (Cox and Lima 2006). Ainsi, les proies peuvent être naïves vis-à-vis de certaines catégories d'archétypes de prédateurs mais pas envers d'autres. Comme l'étude précédente l'a montré (Bursztyka et al. 2013), la réponse comportement antiprédatrice de *D. reticulatum* était associée à des messages chimiques véhiculés par les extraits cuticulaires d'espèces de carabes sympatriques de *D. reticulatum*, évoluant dans des biotopes similaires à ceux de *D. reticulatum* et dont le régime alimentaire est constitué en grande partie de limaces.

Comme *X. derbentina* a été introduite sans son cortège de prédateurs naturels, nous avons souhaité déterminer si la capacité à percevoir un prédateur dangereux est nécessairement liée au caractère sympatrique du prédateur ou si elle peut être plus largement associée à des facteurs environnementaux et écologiques du prédateur. Nous avons donc sélectionné 5 espèces de carabes pour la plupart exclusivement allopatriques de *X. derbentina*, mais occupant différents biotopes et ayant des régimes alimentaires distincts afin de dégager les critères écologiques susceptibles d'intervenir dans la perception du prédateur chez *X. derbentina* : *Carabus auronitens* Fabricius, 1792, *C. auratus*, *C. nemoralis*, *C. coriaceus* et *C. morbillosus* Fabricius, 1792. L'impact de ces différents extraits cuticulaires a été évalué sur la réponse du réflexe de perchage de *X. derbentina* au cours d'un test à deux choix. En effet, bon nombre d'espèces d'escargots xérophiles, comme *T. pisana* et *X. derbentina*, grimpent sur des objets verticaux afin d'éviter le sol surchauffé durant l'été. Il s'agit donc d'un comportement adaptatif, d'auto-entretien, intervenant directement dans la survie de l'escargot. Il est aussi considéré comme un comportement de défense, destiné à éviter les prédateurs épigés mais incapables d'escalader les surfaces verticales, comme bon nombre de carabes héliciphages (Lefcort et al. 2006).

Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons prédit que le comportement de choix d'abris de jeunes *D. reticulatum* ne serait pas affecté par la présence de l'extrait cuticulaire de *C. morbillosus*. En effet, considérant la disparité des exigences écologiques et des biotopes occupés entre *C. morbillosus* et *D. reticulatum* nous avons supposé que *C. morbillosus* ne correspond pas à un archétype de prédateur identifiable par *D. reticulatum*.

Espèces de carabe employées

Les extraits cuticulaires des 5 espèces de carabes suivantes ont été employés : *Carabus auratus* (cf. photo 8-a p. 54), *Carabus coriaceus* (cf. photo 8-b p. 54), *Carabus nemoralis* (cf. photo 8-c p. 54), *Carabus auronitens* (cf. photo 10-a ci-dessous) et *Carabus morbillosus* (cf. photo 10-b ci-dessous).

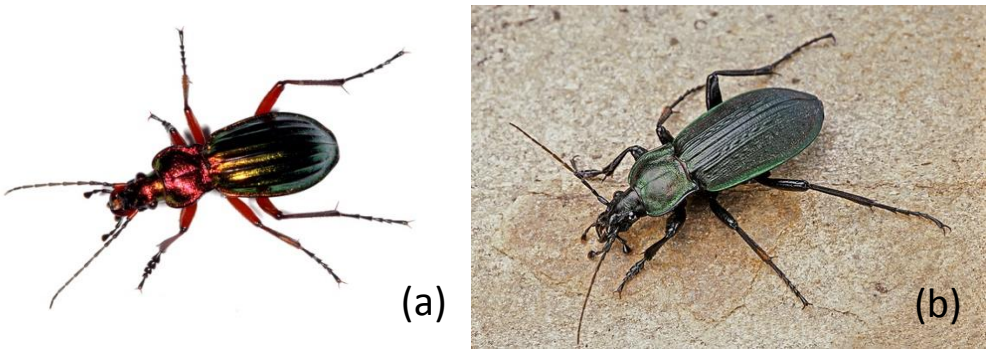


Photo 10 : habitus de *Carabus auronitens* (a) (Copyright © Denis Bourgeois) et de *Carabus morbillosus* (b) (Copyright © Paul Starosta).

Détermination de l'espèce d'escargot

Dans cet essai, les escargots *X. derbentina* ont directement été récupérés sur le site de l'étude (Vaucluse, Saint-Saturnin-lès-Apt, 84220). Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce mémoire (§ 1.3.b p. 29), *X. derbentina* peut être confondu avec *Theba pisana* et *Cernuella virgata*. Il était donc nécessaire de s'assurer que l'espèce sur laquelle nous nous proposions de travailler était bien *X. derbentina*. La seule manière fiable de le vérifier est d'observer le système reproducteur de l'escargot sous loupe binoculaire, après dissection de l'animal. La comparaison de la dissection du système reproducteur (photo 11 p. 72) avec les schémas des systèmes reproducteurs de *X. derbentina*, de *Theba pisana* et de *Cernuella virgata* donnés par la littérature (cf. fig. 19 ci-dessous), permet de confirmer que les escargots employés dans cette étude étaient bien de l'espèce *X. derbentina*. En effet, la présence d'un diverticule sur le pénis, les deux sacs du dard et les deux sacs accessoires sont caractéristiques de cette espèce (Bonavita 1965).

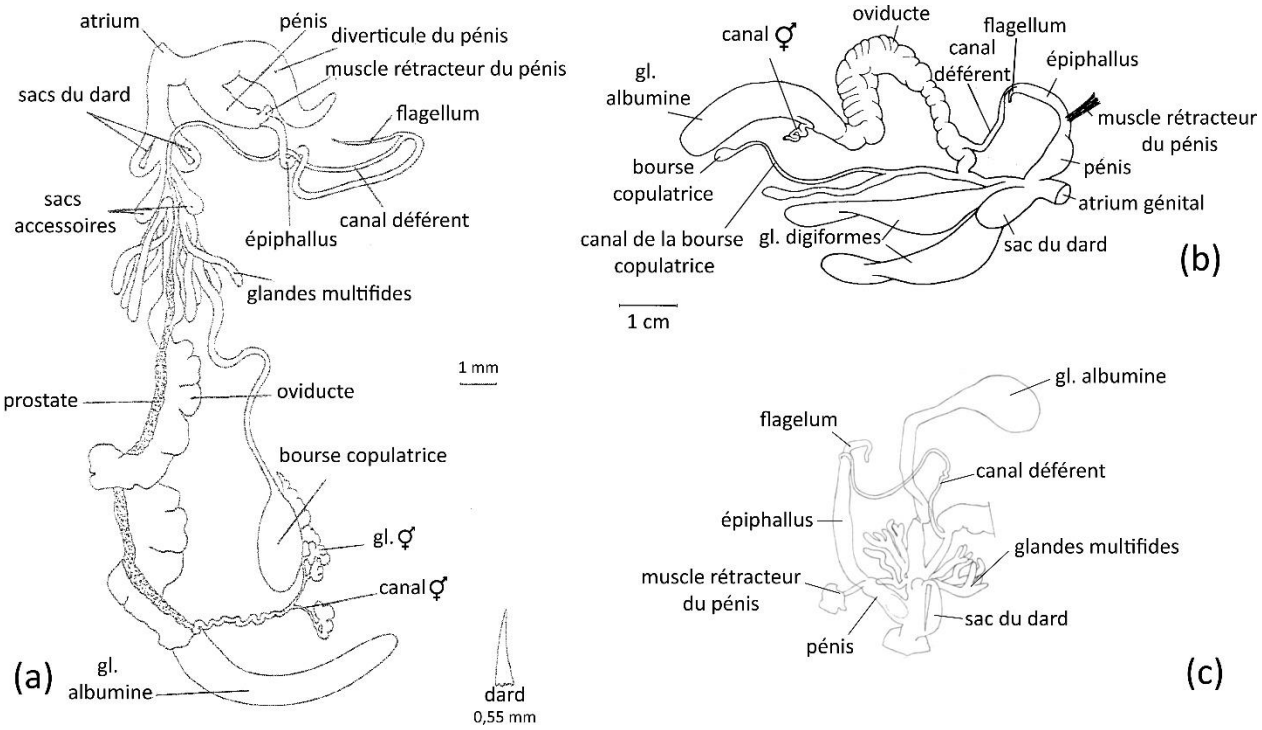


Figure 19 : schéma comparatif des systèmes reproducteur de : (a) *X. derbentina* (d'après Bonavita (1965)), (b) *Theba pisana* (d'après Giusti and Andreini (1988)) et (c) *Cernuella virgata* (d'après Clerx and Gittenberger (1977)).

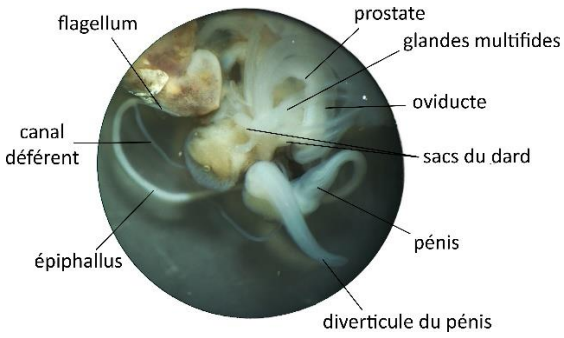


Photo 11 : système reproducteur de *X. derbentina* en grossissement 20x (note : les deux sacs accessoires sont dissimulés par les glandes multifides) (© Piotr Bursztyka)

Dispositif expérimental

Cet essai a été réalisé en employant 6 béchers de 2 litres renversés sur une alèse humidifiée (cf. photo 12 ci-après). Deux zones de perchage de surface identique (une zone traitement et une zone témoin) ont été établies en appliquant une bande de Fluon® dans le sens de la hauteur. Le Fluon® est un liquide composé de polytétrafluoroethylène (PTFE) qui, en séchant, constitue une barrière infranchissable pour les gastéropodes terrestres (Symondson 1993). Des groupes de 10 *X. derbentina* par dispositif devait réaliser un choix entre la zone de perchage traitée à l'aide d'un extrait cuticulaire de carabe et la zone témoin.



Photo 12 : ensemble des dispositifs, réalisés à l'aide de béchers de 2L, employés lors d'une réplique présentant les zones de perchage traitées et témoins de part et d'autre de la bande de Fluon® (en blanc) séparant chaque bécher dans le sens de la hauteur. Cet ensemble de dispositifs étaient destinés à évaluer l'influence de la présence d'extrait cuticulaire de différentes espèces de carabes sur le choix de la surface verticale réalisé par *X. derbentina* (© Piotr Bursztyka).

The behavioral response of an invasive land snail to chemical cues from native and a non-native ground beetle predators

Piotr Bursztyka[1,2], Céline Lafont-Lecuelle[3], Eva Teruel[3], Julien Leclercq[1], Antoine Brin[2], Patrick Pageat[1]

[1] Ethology and Neuroscience department, Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology, Apt, Vaucluse, France

[2] Biodiversité des Systèmes Agricoles et Naturels UMR 1201 Dynafor, Engineering School of Purpan, Toulouse, Haute-Garonne, France

[3] Statistics and data management services, Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology, Apt, Vaucluse, France

Article soumis dans PLOS ONE le 7 septembre 2015

Abstract

Successful acts of predation show no mercy for victims, making early detection of predators essential for prey in order to lessen the risk of being captured. Cues that allow prey to avoid predators without coming into direct contact appear particularly suitable to improve chances of survival. While the detection of chemical cues that betray the presence of predators has been observed and well documented in numerous taxa, few studies have been carried out on terrestrial gastropods, which rely on olfaction as their primary sense. A two choice climbing test was used to assess the response of the invasive alien snail in France, *Xeropicta derbentina*, in the presence of semiochemicals from predacious ground beetles (*Carabus auratus*, *Carabus auronitens*, *Carabus nemoralis*, *Carabus coriaceus* and *Carabus morbillosus*). Only *C. morbillosus*, a potent snail eater, significantly altered the snails' choice of climbing area (p=0,019; Student t-test), indicating the presence of relevant threatening chemical cues. These results are quite surprising given that this ground beetle and *X. derbentina* are allopatric species, leading to the conclusion that the capacity for detection arose from the species' ecological and biological features. Indeed, the cuticular extract had no effect on the two choice shelter test in the slug species, *Deroceras reticulatum*, selected as an antagonistic gastropod species to *X. derbentina* for its ecological requirements. We concluded that *C. morbillosus* shares chemical compounds with predator archetypes recognized by *X. derbentina*, which have been maintained by persistent predation pressure from sympatric predators, as predicated by the multipredator hypothesis.

Keywords: Allopatry; Predator-prey relationships; Risk assessment; Semiochemicals

II. 1 Introduction

The pervasive effects of predation can be measured through the tremendous diversity of specific (morphological, physiological, behavioral and life history traits) adaptations encountered in animals, testifying to the prominent place occupied by this selective force in driving their evolution (Lima and Dill 1990; Kats and Dill 1998). Since virtually all animals are susceptible, at some point in their lives, to be preyed on by others, defensive mechanisms in the animal kingdom are both common and diverse (Edmunds 1974; Sih 1987; Relyea 2005). Nevertheless, avoidance of predators remains the surest method of self preservation.

In this perspective, fine-tuned sensory modalities are essential to obtaining reliable spatial and temporal information on local predation risks. Vision and mechanosensory systems, such as the highly specialized cerci found throughout the Dictyopteran and Orthopteroidean groups (Camhi et al. 1978; Comer and Leung 2004), can provide highly accurate messages within those dimensions, but present intrinsic risks due to their operating mode, which often implies a direct vicinity with the predator (Brown and Magnavacca 2003; Brown et al. 2004). By contrast, semiochemicals (Law and Regnier 1971; Nordlund and Lewis 1976), despite being temporally and spatially less reliable in this context, may be advantageous as they are effective even without direct interaction with the predator (Kats and Dill 1998). Chemical signals are thus essential tools, ubiquitous in animal kingdom, to help prey make decisions in risky situations of predation. This has been widely illustrated in aquatic environments (Chivers and Smith 1998; Kats and Dill 1998; Ferrari et al. 2010), whose physico-chemical properties are particularly suited to the evolution of chemoreception (Wisenden 2000). While predation risk assessment using chemical cues is fairly widespread in terrestrial animals, studies are less frequent, even for organisms such as terrestrial mollusks whose behaviors depend largely and precisely on chemoreceptive abilities (Croll 1983; Chase 2001). In addition, they account for a substantial part of the diet of numerous animal species including ground beetles (Barker 2004), suggesting that they are under intense predation pressure, forcing them to develop avoidance behaviors, as it is the case in many other prey animals.

In fact, recent studies conducted both in slugs and snails (Armsworth et al. 2005; Lefcort et al. 2006; Bursztyka et al. 2013) have demonstrated their ability to adopt

antipredator behavior in the presence of chemical cues from several species of ground beetles, one of their main predators. More importantly, Bursztyka et al. (2013) have shown that the slug *Deroceras reticulatum* (Müller, 1774) only innately dodges cues from the most dangerous predatory ground beetles: ground beetles with a pronounced malacophagous diet that share the same habitat as the slug. This may indicate a response to specific cues rather than general cues. This appears to be a relevant strategy for weak organisms like terrestrial gastropods. By responding only to specific cues from a narrow range of predators, these species are able to conserve energy for other profitable fitness activities, as opposed to a generalized response (Lima and Bednekoff 1999), which is triggered by a broad range of potential predators. Such aptitude can be expected only if a common evolutionary history between the prey and predator has occurred (Dalesman et al. 2007; Sih et al. 2010). However, the recognition of specific predatory cues must be kept in perspective, as many organisms also display antipredator behaviors in the presence of chemical cues from non-native predators. This is due to the existence of predator archetypes: predators which share similar morphological and behavioral foraging attributes (Cox and Lima 2006). It is not yet known if this ability to adopt antipredator behavior in response to semiochemicals from specific predators exists for terrestrial snails.

In landsnails and of course in their aquatic counterparts, the extensive literature addressing the morphological trait functions and polymorphism of shells (Vermeij and Covich 1978; Quensen III and Woodruff 1997; Dewitt et al. 1999; Hoso and Hori 2008; Rosin et al. 2013) all indicates that these features primarily arise from adaptations against durophagous and heliciphagous species/gastropod specialist feeders. Kats and Dill (1998) have stressed the lack of redundancy in antipredator tactics. Thus one might argue that it could be a costly trade-off for snails to multiply defensive mechanisms, such as the ability to detect predators through chemical cues. But these shell traits are the last line of defense and can mean the difference between survival and death during a predator attack. Nevertheless, the maximum protection provided by such passive defense is limited since shells are costly to produce (Wilbur and Saleuddin 1983). When added to their slowness in comparison to most of their predators and their soft body, it appears particularly crucial for land snails to avoid direct contact with their predators. Snails have no acoustic sense and their vision is limited to such an extent (Eakin and Brandenburger 1975) that it allows at best the discrimination of luminance contrast

(Barker 2001; Zieger et al. 2009). On the other hand, olfaction is their main sensory modality, used in all of their major activities of foraging, mating and sheltering (Croll 1983). Lefcort et al. (2006) have already shown that *Theba pisana* (Müller, 1774) adopts antipredator behavior in response to feces (general chemical cues) from the sympatric ground beetle *Carabus carabus.* Hence, the present study intends to highlight whether antipredator behaviors displayed by terrestrial snails can be observed only against sympatric predatory ground beetles found in the same biotope as their prey – as suggested by the reports so far – or whether these behaviors can be linked with more general predatory components as propounded by Nolte et al. (1994).

For the purpose of the study, the behavioral response of *Xeropicta derbentina* (Krynicki, 1836) (Hygromiidae, Hygromiinae) was investigated using chemical cues from several predatory ground beetles. *X. derbentina* is an invasive snail species native to the eastern Mediterranean regions (Bulgaria, Caucasus, Croatia, Northern Greece, Romania, and Turkey) that became invasive in Provence after its accidental introduction in the southeast of France in the late 40s (Regteren 1960; Labaune and Magnin 1999). This xerophilous land snail of open and dry habitats displays a typical self-maintenance behavior when falling on the hot ground, known as the "climbing reflex" (Labaune 2001; Aubry et al. 2006): it quickly becomes active and climbs the nearest vertical resting site. It is also believed to act as an antipredator behavior against ground beetles, since most are unable to ascend vertical objects (Van der Laan 1975; Lefcort et al. 2006). Five predatory ground beetles were selected based on their geographical distribution, ecological habits and diets in order to better understand which ground beetles *X. derbentina* perceives as a threat along with the relevant ecological characteristics of the ground beetles that underlie this perception. *Carabus auronitens* Fabricius, 1792, *Carabus auratus* Linnaeus, 1761, *Carabus nemoralis* Müller, 1764, *Carabus coriaceus* Linnaeus, 1758 and *Carabus morbillosus* Fabricius, 1792. *C. auronitens*, and *C. auratus* belong mainly to the forests and rather wet open habitats of western and central Europe, are allopatric to *X. derbentina*, and are not gastropod specialists (Turin et al. 2003). *Carabus nemoralis* can be found in open habitats and is allopatric to *X. derbentina*, but is considered a malacophagous species with a marked preference for slugs. *C. coriaceus* is a snail crusher (Sturani 1962) and its natural range overlaps many parts of the native area of *X. derbentina*. Lastly, *C. morbillosus* was included in the study for its ecological and dietary traits. While native to northern Africa,

the species was accidentally introduced in the early 20th century and is now present in a very restricted part of Provence. It is a pronounced snail eater (Casale et al. 1982) found in sunny open ground habitats with environmental conditions similar to those of *X. derbentina*. It is not unusual to find antipredator behaviors in prey vis-à-vis predators that do not share the same spatial and temporal area (Freitas and Volpato 2008; Dunlop-Hayden and Rehage 2011).

It was hypothesized that, given a two choice test, *X. derbentina* would avoid vertical roosting sites with cuticular extracts of ground beetles that are likely to present an ecologically significant link with predation risk for this snail. In particular, it was predicted that, given the above information, *C. auratus*, *C. auronitens* and *C. nemoralis* would be an unlikely threat and therefore *X. derbentina* would show no adjustment in its refuge choice. Conversely, *Carabus coriaceus* was regarded as a possible threat. Indeed, it is heliciphagous and its cuticular extracts have already been shown to be effective in altering the self-maintenance behavior of predator-naïve juvenile slugs *Deroceras reticulatum* (Bursztyka et al. 2013). Lastly, considering the snail-based diet of *C. morbillosus* and the similarities that exist between its habitats and those of *X. derbentina*, it is hypothesized that this predator may be recognized as a dangerous predator archetype by this snail (Cox and Lima 2006). To confirm this assumption, the same two-choice shelter test was performed as described in Bursztyka et al. (2013) using the same species, *D. reticulatum*, because it lives in moist environments and is absolutely allopatric to *C. morbillosus*. It was predicted that this slug species would not respond to the cues of this ground beetle because it represents a kind of predator archetype that is far too remote from those with which *D. reticulatum* has shared an evolutionary history.

II. 2 Material and Methods

II. 2. a *Studied species*

Snails

The first experiment involved the snail *Xeropicta derbentina*. A stock of about 800 snails was established in late September 2013 to provide each replica with fresh individuals. The

snails were gathered by hand using laboratory gloves, from the wire mesh fencing surrounding the institute. They were then stored in a screened cage (dimensions: 50 x 30 x 30 cm) placed outside so as to be subjected to natural abiotic conditions, and were fed every day with fresh lettuce leafs.

Slugs

The second experiment was conducted using slugs from organic grassland provided by Arbiotech (ZAC des Bretins, 35590 Saint Gilles, Ille-et-Vilaine, Bretagne) in early February 2014. The slugs were stored in Pyrex® glass dishes (L: 25 cm / l: 20 cm / 8.5 cm) in a climatic chamber at 11 °C +/- 0.5 °C and 75% +/- 5 % RH and were submitted to an L/D cycle of 11 hours and 13 hours respectively (lights on from 0900 – 2000). Slugs all fell into a weight range of 0.3 +/- 0.1 g.

Ground beetles

Carabus coriaceus was captured alive in fall 2012. The ground beetles *Carabus auratus* and *Carabus nemoralis* were captured in the spring of 2013, in a private garden in Castellet (Vaucluse, France) and in deciduous forests near Rennes-les-Bains (Aude, France) respectively. *Carabus morbillosus* and *Carabus auronitens* were provided from by carabidologist in late winter 2013. They were housed in couples (with the exception of *C. nemoralis*: only females were available, so each individual was stored in a separate box) in plastic boxes (L: 22 cm / l: 13 cm / h: 9 cm) and placed in a climatic chamber (20 °C +/- 0.5 °C and 70 % +/- 2 % RH) with an L/D cycle of 9 hours and 15 hours respectively (light phase from 0800 to 1700). They were fed every day with *Xeropicta derbentina* (Krynicki, 1836), collected in the vicinity of the laboratory (IRSEA, 84490, Saint-Saturnin-lès-Apt, Vaucluse, Provence-Alpes-Côte d'Azur).

II. 2. b *Stimuli preparation*

The methodology employed to prepare stimuli from cuticular extracts was similar to the one described by Bursztyka et al. (2013). Male ground beetles were not available for each of the selected species, thus stimuli samples were only taken from female ground beetles. The decision to include only females had no incidence on the experiments as Armsworth et al.

(2005) observed no difference between the sexes of *Pterostichus melanarius*. One female from each tested ground beetle species was placed in a separate clean glass beaker for 48 hours to eliminate any residues present in the digestive tract. To avoid the release of defensive secretions, the ground beetles were transferred into a new clean glass beaker and placed in a refrigerator at 4°C. After 4 hours at this low temperature, ground beetles were plunged into a state of torpor enabling them to be smoothly placed in a freezer at -80°C for 4 hours. Once dead, each ground beetle was placed in a separate glass vial filled with a volume of pure ethyl alcohol (99.8%), so as to achieve 20 ml of pure ethanol per gram of live weight. These stock solutions were stored at 4°C, and gently shaken twice a week during 2 weeks, after which the ground beetles were removed from the vials using clean metallic forceps. "Working solutions" were built by placing 2 ml of each stock solution in new clean glass vials, which were stored à 4°C for the duration of the trial. Pure ethyl alcohol served as the control solution.

II. 2. c *Experimental design*

Climbing choice

The aim of this experiment was to assess if the presence of ground beetle cuticular extracts could alter their choice of vertical objects. The response of the snails towards ground beetle cues was assessed through a choice test between two vertical surfaces, one presenting a treatment (i.e. one of the cuticular extracts or the blank, consisting of a piece of Whatman paper alone) and the other, a control solution (pure ethanol).

Six devices, one per treatment, were made from 2000 ml Pyrex® glass beakers (24 cm high and 12 cm in diameter) arranged as follows for the purpose of the experiment. The inner surface was divided into two equal parts, hereafter referred to as climbing areas, thanks to the application of a 5 cm wide strip of liquid polytetrafluoroethylene (PTFE) polymers (Fluon®). Fluon® is a potent chemical fence used against numerous invertebrates, including terrestrial gastropods (Symondson 1993a), which precludes snails from switching from one side to another, and according to experiments by Armsworth et al. (2005), it has no side effect on the behavior of the tested animals. The beakers' spout served as the starting point for the strip of

Fluon®. Because beakers were inverted, the spouts formed a small hole from where snails might escape; these were obstructed using a piece of flexible plastic covered with Fluon®.

A strip of Whatman paper (13 x 2.5 cm, grade 1) was fixed on the inner side of the upper edge of each climbing area, bounded with the demarcation line made of Fluon®, with translucent tape applied over a width of 5 mm along the length of the Whatman paper strips. 100 µl of either a cuticular extract or control solution (i.e. pure ethanol) were then uniformly applied on this 26 cm^2 surface. Excess ethyl alcohol was left to evaporate at room temperature (20°C) for 12 minutes. Snails weighing between 0.3 and 0.6 g (0.46 +/- 0.13) were selected and their shells were washed with tap water before being dried with paper towel and coated with Fluon® to prevent phoresis between the snails (no toxicity was observed), which would otherwise have biased subsequent observations. 10 snails were used for each modality tested (cuticular extract or blank against the control) and replica. The snails were deposited on the center of the plasticized side of a piece of undersheet (16x16 cm), and the beakers were placed upside-down so that the snails were equidistant from each climbing area at the beginning of the trial. A total of 12 replicates were performed on a total of 720 snails throughout the entire experiment. Each lasted 15 hours during the night, from 1800 to 0900 the next morning. If a snail did not move to either side of the beaker, the corresponding treatment replica was discarded from the statistical analysis. The allocations of the treatments for the climbing areas were assigned so that beakers were reversed between replicates, in order to avoid both biases from the position of the treatments and the beakers. After each replica, the beakers were thoroughly washed with hot water and detergent before being dried for 2 hours of pyrolysis (500°C) to remove all trace marks of Fluon® and snail trails.

Shelter choice trial

The same two-choice experimental procedure was implemented as described in Bursztyka et al. (2013). A typical experimental device was built from plastic boxes (Dutscher, Ref.: 017001) so as to obtain a final arena with three equal parts, the bottom of which was lined with a moistened undersheet (Hartmann MolineaH® Plus): a lit area framed by two dark shelters. Two arenas were employed at the same time, a treated arena and a blank arena. 100 µl of treatment, either cuticular extracts from *Carabus morbillosus* or control solution, was applied on a strip of Whatman paper (1.5 x 9 cm, grade 1), and placed at the two shelter

entrances of the treated arena. The shelter entrances of the blank arena received either 100 µl of control solution or nothing (blank paper). Different, large satiated slugs weighing between 0.2 and 0.5 g, as determine by (Armsworth et al. 2005), were used for each of the 22 replicas carried out. Two sets of replicas were performed during the morning from 0900 to 1200, in a control chamber at 13.5°C +/- 1°C and 75% +/- 5% relative humidity. The slugs were put in the center of the arenas, parallel to the shelter entrances, under a red light to reduce the risk of a premature initiation of activity. A white light was then switched on (6500°K, 1000 lumens) to prompt slugs to shelter and their movements were recorded by video for a period of one hour, using a digital camera (JVC HD Everio GZ-HM446). Both the position of treatments and controls as well as the arenas were reversed between replicates and the devices were thoroughly washed with detergent and dried at room temperature for 24 hours. Replicas in which slugs did not make a choice were not included in the statistical analysis.

II. 2. d *Statistical analysis*

A paired Student T test was used to compare the mean number of snails present in each climbing area treated with a cuticular extract or the blank and the mean number of snails present in the climbing area treated with a control solution. The response observed between the different treatments against the control was also compared using a one-way ANOVA.

Based on the video recordings of the slugs' movements, a Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test was used to compare the mean percentage of time spent in each shelter (treated and control) over the duration of a replica and the total time spent sheltered.

All the data analyses were carried out with Statistica 10.0 software and the significance threshold was classically fixed at 5%.

II. 3 Results

II. 3. a *Experiment 1*

The number of *X. derbentina* found on the climbing area in presence of the cuticular extract treatment from *C. morbillosus* was significantly lower (p = 0,019) than the one found on the control area (figure 1). In contrast, there was no significant difference between the number of *X. derbentina* present on the climbing area treated with either one of the other cuticular extracts of carabid species, or the blank towards the vehicle. However, the one-way ANOVA ($F_{5, 57} = 0.37$, $P > 0.8$) did not show differences between the treatments for the number of snails found on the treated climbing area.

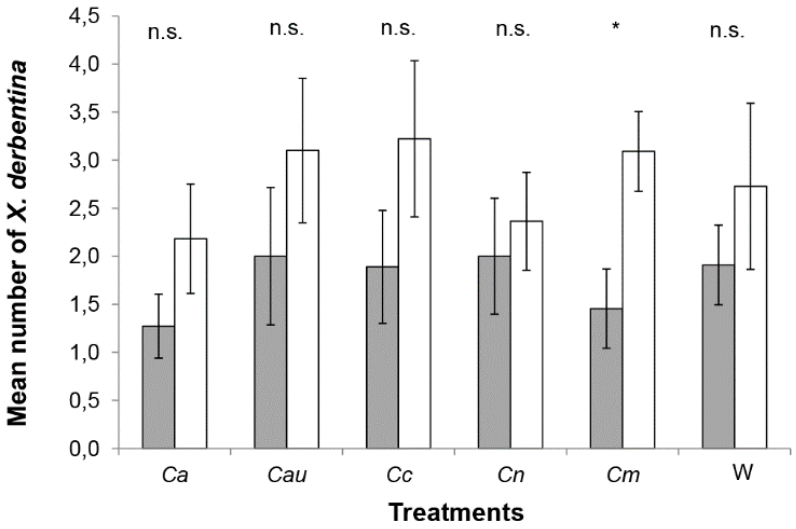


Figure 1 Comparison of the mean number of *X. derbentina* found on the treated or the control climbing area for each of the 5 ground beetle cuticular extracts and the blank. Treatments (dark boxes) are shown below each histogram couple: *Ca* (*Carabus auratus*), *Cau* (*Carabus auronitens*), *Cc* (*Carabus coriaceus*), *Cn* (*Carabus nemoralis*), *Cm* (*Carabus morbillosus*), W (strip of Whatman paper alone). White boxes are the control (pure ethanol). The asterisk indicates significant differences: * P < 0.05, n.s. not significant (paired Student T test). Bars = ± 1 SE, n = 11 for *Ca*, 10 for *Cau*, 9 for *Cc*, 11 for *Cn*, 11 for *Cm* and 11 for W.

II. 3. b *Experiment 2*

Statistical analysis were made using 19 replicated with the ground beetle cuticular extracts and 20 replicates with the control, instead of the 22 realized because some did not meet the conditions of application (no choice observed). The mean time spent sheltered

(figure 2) was consistent with the expected one (Bursztyka et al. 2013), indicating the strength of the procedure.

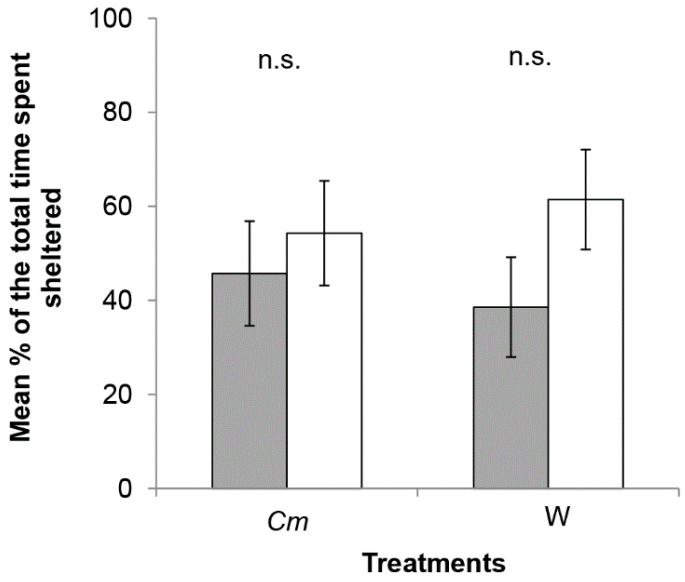


Figure 2: Proportion of time spent sheltered in either the treated or the control shelter for the chemical treatment tested and the blank. The treatment used in the treated shelter (dark boxes) of each test arena is indicated below histogram couples: Cm (Carabus morbillosus), W (strip of Whatman paper alone). Control shelters are shown with white boxes (pure ethanol). n.s. not significant (Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test). Bars = ± 1 SE, n = 19 and 20 for Cm and W treatment respectively.

II. 4 Discussion

As expected, semiochemicals from a predatory ground beetle can interfere with the self-maintenance, vertical climbing behavior displayed by *X. derbentina*. More importantly, *X. derbentina* only responded to semiochemicals from *C. morbillous*, a malacophagous ground beetle species that lives in dry biotopes similar to those of *X. derbentina*; however, no response was seen in regard to malacophagous species coming from temperate and humid environments. In this study, the climbing response obtained from the snails was rather weak: only about half of individuals tested climbed either of the two vertical choice areas, while the others remained on the arena floor, failing to make a choice. This may be due to the season in which the experiments were conducted, as the first half of October is characterized by a gradual cooling in the air and an increase in humidity. Fall is the beginning of the breeding

season in *X. derbentina* and is marked by a peak in its activity (Labaune 2001). The snails still climb vertical objects by the end of the night following nocturnal activities (Mazek-Fialla 1934; Machin 1968), but to a lesser extent than in the case of the climbing reflex (personal observation), i.e. scaling of a vertical object with the purpose of avoiding the hot ground during the summer months (Heller 1982; Di Lellis et al. 2012). Hence, experiments could be conducted during summer in order to obtain more explicit responses in regards to the number of choices made between the two vertical climbing areas. However, the test proved to be strong enough to demonstrate that *X. derbentina* perceived *C. morbillosus* as a threat since significantly more snails chose to climb and remain in the control area than on the climbing area containing body extract from this ground beetle. Climbing vertical objects or vegetation may be advantageous as it allows prey to avoid predators that lack this ability, as is the case for many ground beetles species (Turin et al. 2003). For instance, Symondson (1993) observed that more *D. reticulatum* moved into lettuce plants, out of reach from predation by the polyphagous carabid *Abax parallelepipedus*. Hence, this behavior may also be adaptive to avoid predators (Di Lellis et al. 2012). This feature has been illustrated by Lefcort et al. (2006) in *Theba pisana*, a xerophilous snail that climbs faster in the presence of feces from snails fed *Carabus carabus*, a ground beetle unable to pursue its prey in vegetation. Here, a negative reaction to a novel odor is excluded, since all ground beetles tested are allopatric to *X. derbentina* – with the exception of, at least partially, *C. coriaceus*. Nevertheless, avoidance behavior was only observed in the presence of *C. morbillosus* chemical cues. This indicates a specific and innate antipredator behavior towards this species, as *C. morbillosus* is not present in the area where the snails were sampled.

Selection of prey behaviors that mitigate the lethal risks of predators through innate recognition is not expected if a common evolutionary history is unlikely to have occurred between the protagonists (Gorman 1984; Barreto and Macdonald 1999; Dalesman et al. 2007; Sih et al. 2010). Coevolution, of which co-occurrence of the two species is the first mandatory requirement (Connell 1980), is generally regarded as the key prerequisite to the emergence of such mechanisms. Invasive species, such as *X. derbentina* in the area of this study, often lack effective defenses to native enemies due to the absence of such evolutionary history, a characteristic referred to as the prey naïveté hypothesis (Cox and Lima 2006). This lack of effective defense includes, among others, the inability to recognize a predator as an enemy

(Cox and Lima 2006; Banks and Dickman 2007). However, *X. derbentina* is well established and has flourished in southeastern France since its introduction in the 40s (Aubry et al. 2006). It is therefore likely that it has managed to avoid native predators or, on the contrary, the predators fail to prey on this snail due to the native enemy naïveté hypothesis (Cox and Lima 2006). However, the unresponsiveness of *X. derbentina* to most of the ground beetles tested is probably due to the fact that these predators do not represent a significant danger to the snail. Indeed, *C. auratus* and *C. auronitens* are allopatric to *X. derbentina* and are polyphagous beetles. Though *C. auratus* may be found in open and sunny habitats, like those occupied by *X. derbentina*, it is not able to kill live snails, and may rather hunt earthworms, caterpillars and various insect larvae. *C. auronitens* has the same diet and, in addition, its stenotypic habits restrict it to the wet forests of the hills, mountains and lowlands of northern and central Europe (Sturani 1962; Larochelle 1990). Likewise, *C. nemoralis* is allopatric to *X. derbentina*, and though it eats crushed snails in the laboratory setting (Larochelle 1990), it does not hunt live snails in the wild. The case of *C. coriaceus* is different in that its large natural range overlaps with *X. derbentina* in the Balkans and Turkey. In addition, considering its eurytopic habits, it is likely to be syntopic with *X. derbentina* in those areas (Sturani 1962; Turin et al. 2003). However, the results show that *X. derbentina* does not respond to *C. coriaceus* and may rather indicate either a lack of coevolution strength between these two species or that *C. coriaceus* is simply not an enemy to *X. derbentina*. Indeed, the invasive population of *X. derbentina* found in France is thought to originate from Istria or Croatia (Regteren 1960), areas where *C. coriaceus* is partially missing (Pavicevic and Mesaros 1997). It is therefore possible that the invasive population of *X. derbentina* had only a weak, if any, coevolutionary history with *C. coriaceus* in its native area, while interspecific interactions with the local population of *C. coriaceus* from the invaded area have begun only recently. The alternative explanation is that, being a small snail species, *X. derbentina* is likely an insignificant part of the diet of *C. coriaceus*, which is primarily a predator of large snails (Larochelle 1990; Turin et al. 2003). To remove doubts, experiments may be conducted using *X. derbentina* from populations that are sympatric with *C. coriaceus* to assess whether these snails do or do not respond to chemical cues from this ground beetle species in their native area. In parallel, the gut content from sympatric *C. coriaceus* may be assessed using molecular analysis (Symondson 2002; Hatteland et al. 2011) to find out whether *X. derbentina* can be preyed upon by this large ground beetle.

In contrast, while surprising, the response of *X. derbentina* to *C. morbillosus*, two clearly allopatric species, is not unusual either. Several studies have reported prey animals responding to nonnative predator stimuli, from either visual (Barreto et al. 2003; Freitas and Volpato 2008) or chemical cues (Head et al. 2002; Balderas-Valdivia and Ramírez-Bautista 2005). *C. morbillosus* is a pronounced snail eater, found in open country and Mediterranean scrub in the rather dry countries of Algeria and Tunisia (Larochelle 1990; Turin et al. 2003). It thus inhabits biotopes where abiotic conditions are similar to those of the steppe to which *X. derbentina* is well adapted in its natural range. So, the aversive response of *X. derbentina* to *C. morbillosus* may be an illustration of the multipredator hypothesis (Blumstein 2006), with *C. morbillosus* embodying a predator archetype (Cox and Lima 2006) that shares chemical compounds with some of *X. derbentina's* native predators. Similar cases have been reported, for instance in rabbits' response to the odor of an allopatric ferret (Barrio et al. 2010) or in the ringtail possum (*Pseudocheirus peregrinus*), which displays antipredator behavior toward the odor of the lace monitor (Anson and Dickman 2013). This assumption is strengthened by the results obtained from the shelter choice experiment conducted with *D. reticulatum,* a species adapted to a biotope that carries no resemblance to that of *X. derbentina*. These slugs are allopatric to *C. morbillosus* as they are native to Western Europe and inhabit wet environments due to their high susceptibility to drought. Hence, they do not show an aversive response to chemical cues from *C. morbillosus* probably because the ground beetle does not meet the predator archetype that these slugs typically encounter in their natural range, and with whom they have an evolutionary history (Bursztyka et al. 2013).

Introduced and successfully established alien species are a major threat to biodiversity in the world, and *X. derbentina* is no exception. However, no control strategy currently exists for this snail, despite it being an intermediate host of lung parasites in small ruminants (Labaune 2001). Only a handful of studies have explored the response of introduced prey to native predators (Dickman 1992; Barrio et al. 2010). The present study indicates that *X. derbentina* does not respond to native ground beetles because their ecological features are likely to be too different from those of this snail species. However, avoidance of chemical cues is observed toward the non-native beetle *C. morbillosus*, which is consistent with the concept of predator archetypes as described by Cox & Lima (2006). To verify this hypothesis, additional studies should be carried out to assess the behavioral response of *X. derbentina* toward native

predators from its native area, such as the silphid *Ablattaria arenaria*. The compounds responsible for the antipredator behavior displayed by *X. derbentina* should be identified to determine if similarities exist with those of *C. morbillosus*. More generally, biological control of invasive species should pay greater attention to predator archetypes, even those that are allopatric, since native predators are often unable to efficiently cope with invasive prey.

References

Anson JR, Dickman CR (2013) Behavioral responses of native prey to disparate predators: naiveté and predator recognition. Oecologia 171:367–377

Armsworth CG, Bohan DA, Powers SJ, et al (2005) Behavioural responses by slugs to chemicals from a generalist predator. Anim Behav 69:805–811

Aubry S, Labaune C, Magnin F, et al (2006) Active and passive dispersal of an invading land snail in Mediterranean France. J Anim Ecol 75:802–813

Balderas-Valdivia CJ, Ramírez-Bautista A (2005) Aversive behavior of beaded lizard, *Heloderma horridum*, to sympatric and allopatric predator snakes. Southwest Nat 50:24–31

Banks PB, Dickman CR (2007) Alien predation and the effects of multiple levels of prey naivete. Trends Ecol Evol 22:229–230

Barker GM (2004) Natural enemies of terrestrial gastropods. CABI Publishing, Wallingford

Barker GM (2001) The biology of terrestrial molluscs. CABI Publishing, Wallingford

Barreto GR, Macdonald DW (1999) The response of water voles, *Arvicola terrestris*, to the odours of predators. Anim Behav 57:1107–1112

Barreto RE, Luchiari AC, Marcondes AL (2003) Ventilatory frequency indicates visual recognition of an allopatric predator in naïve *Nile tilapia*. Behav Processes 60:235–239

Barrio IC, Bueno CG, Banks PB, Tortosa FS (2010) Prey naivete in an introduced prey species: the wild rabbit in Australia. Behav Ecol 21:986–991

Blumstein DT (2006) The multipredator hypothesis and the evolutionary persistence of antipredator behavior. Ethology 112:209–217

Brown GE, Magnavacca G (2003) Predator inspection behaviour in a characin fish: an interaction between chemical and visual information? Ethology 109:739–750

Brown GE, Poirier J-F, Adrian JCJ (2004) Assessment of local predation risk: the role of subthreshold concentrations of chemical alarm cues. Behav Ecol 15:810–815

Bursztyka P, Saffray D, Lafont-Lecuelle C, et al (2013) Chemical compounds related to the predation risk posed by malacophagous ground beetles alter self-maintenance behavior of naive slugs (*Deroceras reticulatum*). PLoS One 8:e79361

Camhi JM, Tom W, Volman S (1978) The escape behavior of the cockroach *Periplanata americana* II. Detection of natural predators by air displacement. J Comp Physiol 128:203–212

Casale A, Sturani M, Taglianti AV (1982) Coleoptera, Carabidae. I. Introduzione, Paussinae, Carabinae. Calderini, Bologna

Chase R (2001) Sensory organs and the nervous system. In: Barker GM (ed) The biology of terrestrial molluscs. CABI Publishing, Hamilton, pp 179–212

Chivers DP, Smith RJF (1998) Chemical alarm signalling in aquatic predator-prey systems: a review and prospectus. Ecoscience 5:338–352

Comer C, Leung V (2004) The vigilance of the hunted: mechanosensory-visual integration in insect prey. In: Prete FR (ed) Complex Worlds from Simpler Nervous Systems. MIT Press, Cambridge, pp 313–334

Connell JH (1980) Diversity and the coevolution of competitors, or the ghost of competition past. Oikos 35:131–138

Cox JG, Lima SL (2006) Naiveté and an aquatic-terrestrial dichotomy in the effects of introduced predators. Trends Ecol Evol 21:674–80

Croll RP (1983) Gastropod chemoreception. Biol Rev 58:293–319

Dalesman S, Rundle SD, Bilton DT, Cotton PA (2007) Phylogenetic relatedness and ecological interactions determine antipredator behavior. Ecology 88:2462–2467

Dewitt TJ, Sih A, Hucko JA (1999) Trait compensation and cospecialization in a freshwater snail: size, shape and antipredator behaviour. Anim Behav 58:397–407

Di Lellis MA, Seifan M, Troschinski S, et al (2012) Solar radiation stress in climbing snails: behavioural and intrinsic features define the Hsp70 level in natural populations of *Xeropicta derbentina* (Pulmonata). Cell Stress Chaperones 17:717–727

Dickman CR (1992) Predation and habitat shift in the house mouse , *Mus Domesticus*. Ecology 73:313–322

Dunlop-Hayden KL, Rehage JS (2011) Antipredator behavior and cue recognition by multiple Everglades prey to a novel cichlid predator. Behaviour 148:795–823

Eakin RM, Brandenburger JL (1975) Understanding a snail’s eye at a snail's pace. Am Zool 15:851–863

Edmunds M (1974) Defence in animal: a survey of anti-predator defences. Longman, Harlow, England

Ferrari MCO, Wisenden BD, Chivers DP (2010) Chemical ecology of predator-prey interactions in aquatic ecosystems: a review and prospectus. Can J Zool 88:698–724

Freitas RHA, Volpato GL (2008) Behavioral response of *Nile tilapia* to an allopatric predator. Mar Freshw Behav Physiol 41:267–272

Gorman ML (1984) The response of prey to Stoat (*Mustela erminea*) scent. J Zool 202:419–423

Hatteland BA, Symondson WOC, King RA, et al (2011) Molecular analysis of predation by carabid beetles (Carabidae) on the invasive Iberian slug *Arion lusitanicus*. Bull Entomol Res 101:675–686

Head ML, Keogh JS, Doughty P (2002) Experimental evidence of an age-specific shift in chemical detection of predators in a lizard. J Chem Ecol 28:541–554

Heller J (1982) Natural history of *Theba pisana* in Israel (Pulmonata: helicidae). J Zool 196:475–487

Hoso M, Hori M (2008) Divergent shell shape as an antipredator adaptation in tropical land snails. Am Nat 172:726–732

Kats LB, Dill LM (1998) The scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animals. Ecoscience 5:361–394

Labaune C (2001) L'invasion de la région méditerranéenne française par l'escargot *Xeropicta derbentina*: mécanismes, conséquences écologiques et agronomiques. Université de Droit, d'Economie et des Sciences D'Aix-Marseille (Aix-Marseille III)

Labaune C, Magnin F (1999) Un escargot nouveau venu dans le Luberon et en Provence: *Xeropicta derbentina* (Krinicki, 1836). Courr Sci Du Parc Nat Régional Luberon 3:102–110

Larochelle A (1990) The food of carabid beetles:(Coleoptera: Carabidae, including Cicindelinae). Fabreries, Supplément 5:1–132

Law JH, Regnier FE (1971) Pheromones. Annu Rev Biochem 40:533–548

Lefcort H, Ben-Ami F, Heller J (2006) Terrestrial snails use predator-diet to assess danger. J Ethol 24:97–102

Lima SL, Bednekoff PA (1999) Temporal variation in danger drives antipredator behavior : the predation risk allocation hypothesis. Am Nat 153:649–659

Lima SL, Dill LM (1990) Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. Can J Zool 68:619–640

Machin J (1968) The permeability of the epiphragm of terrestrial snails to water vapor. Biol Bull 134:87–95

Mazek-Fialla K (1934) Die lebensweise xerophiler Schnecken Syriens, Griechenlands, Dalmatiens und der Türkei und die Beschaffenheit ihrer subepithelialen Drüsen. Zeitschrift für Morphol und Ökologie der Tiere 28:445–468

Nolte DL, Mason JR, Epple G, et al (1994) Why are predator urines aversive to prey? J Chem Ecol 20:1505–1516

Nordlund DA, Lewis WJ (1976) Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. J Chem Ecol 2:211–220

Pavicevic D, Mesaros G (1997) Carabini of Jugoslavia and adjecent regions (Coleoptera: Carabidae). Catalogus Faunae Jugoslaviae. Encyclopaedia. Belgrade.

Quensen III JF, Woodruff DS (1997) Associations between shell morphology and land crab predation in the land snail Cerion. Funct Ecol 11:464–471

Regteren A Van (1960) On the occurrence of a species of *Xeropicta* in France. Basteria 24:21–26

Relyea RA (2005) Constraints on inducible defenses - Phylogeny, ontogeny, and phenotypic trade-offs. In: Barbosa P, Castellanos I (eds) Ecology of Predator-Prey Interactions. Oxford University Press, New-York, pp 189–207

Rosin ZM, Kobak J, Lesicki A, Tryjanowski P (2013) Differential shell strength of *Cepaea nemoralis* colour morphs-implications for their anti-predator defence. Naturwissenschaften 100:843–851

Sih A (1987) Predators and prey life styles: an evolutionary and ecological overview. In: Kerfoot WC, Sih A (eds) Predation: direct and indirect impacts on aquatic communities. Hanover, New Hampshire: University Press of New England, Hanover, pp 203–224

Sih A, Bolnick DI, Luttbeg B, et al (2010) Predator-prey naïveté, antipredator behavior, and the ecology of predator invasions. Oikos 119:610–621

Sturani M (1962) Osservazioni e ricerche biologiche sul genere *Carabus* L.(sl).(Coleoptera, Carabidae). Mem della Soc Entomol Ital 41:85–202

Symondson WOC (1993a) Chemical confinement of slugs: an alternative to electric fences. J Molluscan Stud 59:259–261

Symondson WOC (1993b) The effects of crop development upon slug distribution and control by *Abax parallelepipedus* (Coleoptera: Carabidae). Ann Appl Biol 123:449–457

Symondson WOC (2002) Molecular identification of prey in predator diets. Mol Ecol 11:627–641

Turin H, Penev L, Casale A (2003) The Genus *Carabus* in Europe. A synthesis. Pensoft Publishers, Sofia-Moscow & European Invertebrate Survey, Leiden

Van der Laan KL (1975) Aestivation in the land snail *Helminthoglypta arrosa* (Binney). Veliger 17:360–368

Vermeij GJ, Covich AP (1978) Coevolution of freshwater gastropods and their predators. Am Nat 112:833–843

Wilbur KM, Saleuddin ASM (1983) Shell formation. In: Saleuddin ASM, Wilbur KM (eds) The Mollusca. Academic Press, New-York, pp 235–287

Wisenden BD (2000) Scents of danger: the evolution of olfactory ornamentation in chemically-mediated predator-prey interactions. In: Espmark Y, Amundsen T, Rosenqvist G (eds) Animal Signals: Signalling and Signal Design in Animal Communication. Academic Press, Trondheim, pp 365–386

Zieger M V., Vakoliuk IA, Tuchina OP, et al (2009) Eyes and vision in *Arion rufus* and *Deroceras agreste* (Mollusca; Gastropoda; Pulmonata): What role does photoreception play in the orientation of these terrestrial slugs? Acta Zool 90:189–204

Troisième partie

Evaluation de la capacité dissuasive de la présence de sémiochimiques d'un carabe prédateur sur la prise alimentaire de *Deroceras reticulatum*

III Préambule

Les organismes répondent au risque de prédation en éliminant, ou du moins en réduisant, les activités et comportements à risque, c'est-à-dire ceux susceptibles de les exposer à leurs prédateurs. Ainsi, la plupart des comportements antiprédateurs des proies implique l'évitement de zones explorées par des prédateurs, la diminution de l'activité générale et une hausse de la fréquence d'occupation d'abris (Lawrence and Smith 1989). Nous avons pu mettre en évidence, dans les deux études précédentes, que la présence de composés chimiques cuticulaires de certaines espèces de carabes peuvent influer sur l'expression de comportements de maintenance essentiel chez *D. reticulatum* d'une part et *X. derbentina* d'autre part. Bien que les comportements de maintenance altérés dans ces expérimentations (respectivement la recherche d'abris et un site de perchage situé au-dessus du sol) soient cruciaux pour ces gastéropodes, la recherche et la prise alimentaire sont des comportements autrement plus fondamentaux à la survie de tout organisme, si bien que le risque de prédation perçu doit être particulièrement important pour induire un changement notable dans l'expression de ces comportements chez une proie.

Ainsi, les proies vont réduire le temps alloué à la recherche et à la prise de nourriture lorsqu'elles détectent des odeurs de prédateurs. De nombreuses études ont montré que les proies diminuent effectivement leurs efforts d'alimentation tout en augmentant leur vigilance lorsque le risque de prédation est élevé (comme en présence de sémiochimiques trahissant la présence d'un prédateur). Il s'agit d'un trade-off décrit par Lima et Bednekoff (1999) dans leur hypothèse de l'allocation lié au risque de prédation (*the predator risk allocation hypothesis*), destiné à assurer un apport énergétique suffisant permettant la survie de l'organisme tout en réduisant le risque d'être dévoré.

Bien que les extraits cuticulaires issus des carabes prédateurs *Carabus nemoralis* et *Carabus coriaceus* sont en mesure d'altérer le comportement de recherche d'abris (Bursztyka et al. 2013) chez *Deroceras reticulatum*, cela ne signifie pas pour autant qu'ils peuvent affecter significativement la prise alimentaire de cette espèce nuisible. Du fait de l'indisponibilité de *Carabus coriaceus* pour les besoins de l'expérimentation décrite dans cette partie, nous avons évalué la capacité d'extraits cuticulaires de *C. nemoralis* à préserver un appât de la

consommation par *Deroceras reticulatum*. L'appât employé était constitué de jeunes pousses de colza (*Brassica napus* Linnaeus, 1753), l'une des plantes cultivée les plus appétantes pour *D. reticulatum*. Des plantules au stade phénologique 10 d'après l'échelle BBCH (Meier 2001), correspondant à l'un des stades précoces les plus vulnérables à la consommation de *D. reticulatum*, ont été employés.

Espèces de carabe employées

Cet essai impliquait l'utilisation de l'extrait cuticulaire de *Carabus nemoralis* (cf. photo 8-c p. 54) uniquement et des limaces (*D. reticulatum*) obtenues auprès d'un fournisseur (Arbiotech, ZAC des Bretins, 35590 Saint Gilles, Ille-et-Vilaine, Bretagne).

Dispositif expérimental

Les dispositifs, au nombre de huit et tous identiques, ont été réalisés en aluminium permettant une application et un nettoyage aisés de Fluon® sur l'ensemble des parties verticales. Le Fluon® permet de contraindre les limaces employées à se déplacer uniquement sur la surface horizontale des dispositifs et de devoir traverser la zone traitée ou témoin pour pouvoir accéder aux appâts (cf. photo 13 ci-dessous).



Photo 13 : (a) ensemble des dispositifs et (b) détail de l'un d'entre eux, destinés à évaluer la capacité de l'extrait cuticulaire du carabe *C. nemoralis* à prévenir la consommation de jeunes pousses de colza par *D. reticulatum* au cours d'un test à 2 choix (zone traitée et zone témoin) (© Piotr Bursztyka).

Journal of Molluscan Studies Advance Access published 29 January 2016

Journal of Molluscan Studies

The Malacological Society of London

Journal of Molluscan Studies (2016) 1–6. doi:10.1093/mollus/eyv068

The foraging behaviour of the slug *Deroceras reticulatum* (Müller, 1774) is modified in the presence of cuticular scents from a carabid beetle

Piotr Bursztyka[1,2], Céline Lafont-Lecuelle[3], Eva Teruel[3], Julien Leclercq[4], Antoine Brin[2] and Patrick Pageat[1]

[1]*Department of Semiochemicals Identification and Analogous Conception, Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology, Quartier Salignan, 84400 Apt, Vaucluse, France;*
[2]*Biodiversité des Systèmes Agricoles et Naturels UMR 1201 Dynafor, Engineering School of Purpan, 75 voie du TOEC, 31076 Toulouse, Haute-Garonne, France;*
[3]*Statistics and Data Management Services, Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology, Quartier Salignan, 84400 Apt, Vaucluse, France; and*
[4]*Platform of Animal Experimentation, Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology, Quartier Salignan, 84400 Apt, Vaucluse, France*

Correspondence: P. Bursztyka; e-mail: p.bursztyka@group-irsea.com

(Received 7 September 2015; accepted 18 November 2015)

ABSTRACT

Chemicals are the major means of control used against slugs, which are serious pests of various crops. To increase the sustainability of farming practices, alternatives that do not harm nontarget organisms are necessary. One area of investigation focuses on the capacities of prey to perceive their predators, which enables them to display antipredator behaviours. This study presents initial evidence of the potential effectiveness of using chemical cues from a predatory ground beetle to protect young oilseed rape shoots against a worldwide pest, the slug *Deroceras reticulatum* (Müller, 1774) (Stylommatophora: Agriolimacidae). A two-choice assay was used to test whether chemical cues from *Carabus nemoralis* Müller, 1764 (Coleoptera: Carabidae) could impede the foraging of *D. reticulatum* on young oilseed rape shoots. Significantly fewer cotyledons were consumed when chemical cues from the ground beetle were present compared with the control area, where slugs were mainly found. Chemical cues from predatory ground beetles appear to be a promising solution for protecting at-risk crops from the depredations of pest slugs.

INTRODUCTION

Many studies have explored the use of natural enemies for managing slug populations (Barker, 2004). Among these predators, carabid (or ground) beetles occupy a prominent place (Kromp, 1999; Symondson, Sunderland & Greenstone, 2002), because they are naturally occurring in most agroecosystems and display useful features of generalist predators (Ekschmitt & Wolters, 1997; Symondson *et al.*, 2002; Symondson, 2004). Most of this research has examined direct effects of predation by carabids, i.e. regulation of the slug population through direct consumption (Symondson, 1993; Bohan *et al.*, 2000; Symondson *et al.*, 2006). However, predation may also have indirect, nonlethal effects on prey species, which can substantially affect their fitness (Brown, Laundré & Gurung, 1999; Preisser, Bolnick & Benard, 2005; Peckarsky, 2007) by altering their morphology, life-history traits and behaviours (Lima & Dill, 1990; Werner & Peacor, 2003). In other words, prey species shift their resource allocation in order to mitigate risks posed by predation attempts. In particular, avoiding areas visited by predators is a frequent means of reducing predation risks. This can be done through the use of indirect cues by prey, such as semiochemicals (Apfelbach *et al.*, 2005). In this regard, Armsworth *et al.* (2005) have demonstrated that the grey field slug *Deroceras reticulatum* (Müller, 1774) detects and avoids areas previously explored by the generalist carabid beetle *Pterostichus melanarius* (Illiger, 1798), indicating that slugs adopt antipredator behaviour in the presence of kairomones left by the carabid. In addition to generalist carabids, there are also specialist malacophagous ground beetles. Laboratory and field studies, as well as specialized morphological and behavioural features, have stressed their superiority in hunting and eating slugs, compared with small carabids. They are thus expected to exert stronger selection pressure on these prey, making avoidance of these predators even more critical. *Carabus nemoralis* Müller, 1764 is such a predator: gut contents reveal slugs remain in *C. nemoralis* (Tod, 1973; Hatteland *et al.*, 2011, 2013), while Digweed (1994) demonstrated that this ground beetle orientates to *D. reticulatum* mucus and, in a study by Ayre (1995), *C. nemoralis* was one of the most efficient of specialist predators in killing *D. reticulatum* as well as *Arion lusitanicus* (see Hatteland, 2010). In a recent study, Bursztyka *et al.* (2013) showed that *D. reticulatum* actively avoids potential refuges that have been previously sprayed with cuticular extract from *C. nemoralis*. This modification of such important self-maintenance behaviour for slug survival (Rollo & Wellington, 1977; Grewal *et al.*, 2001) has been observed in juvenile *D. reticulatum* deprived of any previous exposure to predators of any kind. This suggests that *C. nemoralis* cuticular extracts may contain semiochemicals, which play a role in the avoidance behaviour. Predatory cues are thus able to alter important behavioural processes such as sheltering.

© *The Author 2016. Published by Oxford University Press on behalf of The Malacological Society of London, all rights reserved*

Downloaded from http://mollus.oxfordjournals.org/ by guest on February 1, 2016

This study investigated whether chemical cues from *C. nemoralis* could protect oilseed rape (*Brassica napus*) seedlings from *D. reticulatum*, the most widespread and abundant pest slug in Western Europe (Moens & Glen, 2002), which can be exceedingly damaging during the early growth stages of this crop. This vulnerability has been exacerbated since the 1980s with the widespread planting of a 'double-low' variety for human consumption (Moens & Glen, 2002). This variety contains low concentrations of both erucic acid and glucosinolates, two substances that normally participate in the defence of brassicas against polyphagous plant feeders (Blau, Feeny & Contardo, 1978; Glen, Jones & Fieldsend, 1990). In a two-choice test, starved slugs were allowed to feed on young shoots of oilseed rape equitably distributed between two foraging area. The entrance to each foraging area, which the slugs had to cross to gain access to the oilseed rape shoots, was treated with either a cuticular extract from *C. nemoralis* or a control solution. It was hypothesized that slugs would preferentially feed on the foraging area treated with the control solution.

MATERIAL AND METHODS

Slugs

For the purpose of the experiment, slugs (*Deroceras reticulatum*) were caught from homogeneous organic grassland and supplied by Arbiotech (Ille-et-Vilaine, Brittany, France) in early April 2014, since *D. reticulatum* was quite difficult to obtain in the local area at this time of year. The slugs were placed in Pyrex dishes (25 by 20 cm, 8.5 cm deep) lined with damp paper towel and kept at 75 ± 5% relative humidity (RH) to ensure a moist environment (Hommay, 2001). Pyrex dishes were stored in a climatic chamber at 11 ± 0.5 °C, to limit the development and spread of disease among slugs (Armsworth *et al.*, 2005), with a L:D cycle of 11:13 h (light from 0900–2000). For 1 week before the trial, slugs were maintained on lettuce, and rabbit pellets (Coqtel®) were added as a convenient and standardized dietary supplement. Since terrestrial gastropods can show rapid learning for a particular food item after previous experience (Teyke, 1995; Cook *et al.*, 2000), oilseed rape shoots were also added to the diet of the tested slugs to enhance feeding intensity on this plant during the trial.

Carabid beetle

Carabus nemoralis beetles were captured during spring 2013 in deciduous forests near Rennes-les-Bains (Aude, France). Only females were caught at this time and were stored in plastic boxes (22 by 13 cm, by 9 cm deep) on moist peat and a layer of foam in a climatic room (20 ± 0.5 °C and 70 ± 2% RH) with a L:D cycle of 9:15 h (light from 0800 to 1700), corresponding to standard rearing conditions for many ground-beetle species (Symondson, 1994; Assmann, 2003; Giglio *et al.*, 2009). They were fed every day with *Xeropicta derbentina* snails, collected in the vicinity of the laboratory (Saint-Saturnin-lès-Apt, Vaucluse, France).

Baits

Young shoots of oilseed rape served as baits. The oilseed rape seeds were grown in a glass chamber with a sodium light (D:L 9:15 h) hung 40 cm above the seeds. The sodium light heated the chamber to a temperature of 28 ± 1.5 °C during the day, while the temperature dropped to about 12 ± 1 °C during the night. Oilseed rape seeds were sown on a fully hydrated vermiculite layer (about 1 cm thick) in a rectangular plastic box (12 by 5 cm, by 4 cm deep). Under such conditions, a growth period of about 4 days is needed to reach a suitable stage.

Cuticular extract

The methodology employed to prepare the cuticular extract was similar to that described by Bursztyka *et al.* (2013). One female, weighing 0.6 g, was placed in a clean glass beaker for 48 h to remove any digestive residues in the digestive tract. The beetle was then transferred to a new clean glass beaker and placed in a refrigerator at 4 °C for 4 h. At this low temperature the beetle enters a state of torpor and can then be transferred to a freezer at −80 °C for a further 4 h, avoiding the undesirable release of defensive secretions. Once dead, the beetle was placed in a new glass vial filled with 12 ml of pure ethanol (99.8%), equivalent to 20 ml of ethanol per gram of live weight. This stock solution was stored at 4 °C and gently shaken twice a week for 2 weeks. The beetle was then removed using clean metallic forceps. Working solutions were then created by placing 2 ml of stock solution in a new clean glass vial, stored at 4 °C for the duration of the trial. Pure ethanol, stored under the same conditions, served as a control solution.

Choice trials

The experiment was conducted using rectangular aluminium trays. Each tray measured 392 mm long, 77 mm wide and 35 mm deep, and had three parts (Fig. 1): a central rectangular crawling surface with a foraging area at either end. The crawling surface was covered with a piece of absorbent cellulose pad (Molinea® underpads, Hartmann Australasia) moistened with 20 ml of tap water upon which the slugs could move easily; the foraging areas were made from pieces of immunology plates (Dutscher cat. no. 055173) with eight rows of six wells each. Three young oilseed rape shoots were selected with their cotyledons completely unfolded, corresponding to the10th phenological stage of the BBCH scale (Meier, 2001). The shoots were placed in the fourth row of wells away from the crawling zone (i.e. roughly at the centre of the foraging zone), in three wells filled with hydrated vermiculite and separated from each other by a blank well, while all remaining wells were left empty. All inner walls were coated with Fluon® (AGC Chemicals Europe) both to prevent the slugs from escaping during the trials and to compel them to cross the treated thresholds providing access to the foraging areas. Treatments were applied at the junction of the crawling surface and the foraging areas, acting as a chemical fence which slugs had to cross in order to reach the baits behind. These thresholds were made from strips of Whatman paper (grade 1), 76 mm long by 26 mm wide, placed on a clean microscope glass slide of the same size in order to protect them from the moisture of the underlying pad. According to experiments by Armsworth *et al.* (2005), Fluon® has no effects on the behaviour of the tested animals.

Each treatment (the cuticular extract and a blank, i.e. a strip of Whatman paper moistened with 100 µl distilled water) was tested at the same time, in a separate device, against a control (the vehicle employed, i.e. pure ethanol). The foraging areas were distinguished according to the nature of the treatment applied to their thresholds, i.e. cuticular extract, blank or control.

Mature adult slugs, weighing between 0.3 and 0.5 g, were used for the experiment, as by Armsworth *et al.* (2005). This selected class size is representative of that found in crops and, along with a smaller class, it is more widespread in crops than the largest class (Archard *et al.*, 2004; Howlett, 2005); it is therefore responsible for most of the damage. Slugs make use of trail following for various purposes (Ng *et al.*, 2013), hence one slug was employed at a time to avoid interindividual choice bias. The tested slug was starved for 24 h, in order to enhance the motivational state and to reduce variation in food consumption (Rollo, 1988). One hour prior to the beginning of a replicate, the slug was placed in a habituation zone bounded by a circular

Downloaded from http://mollus.oxfordjournals.org/ by guest on February 1, 2016

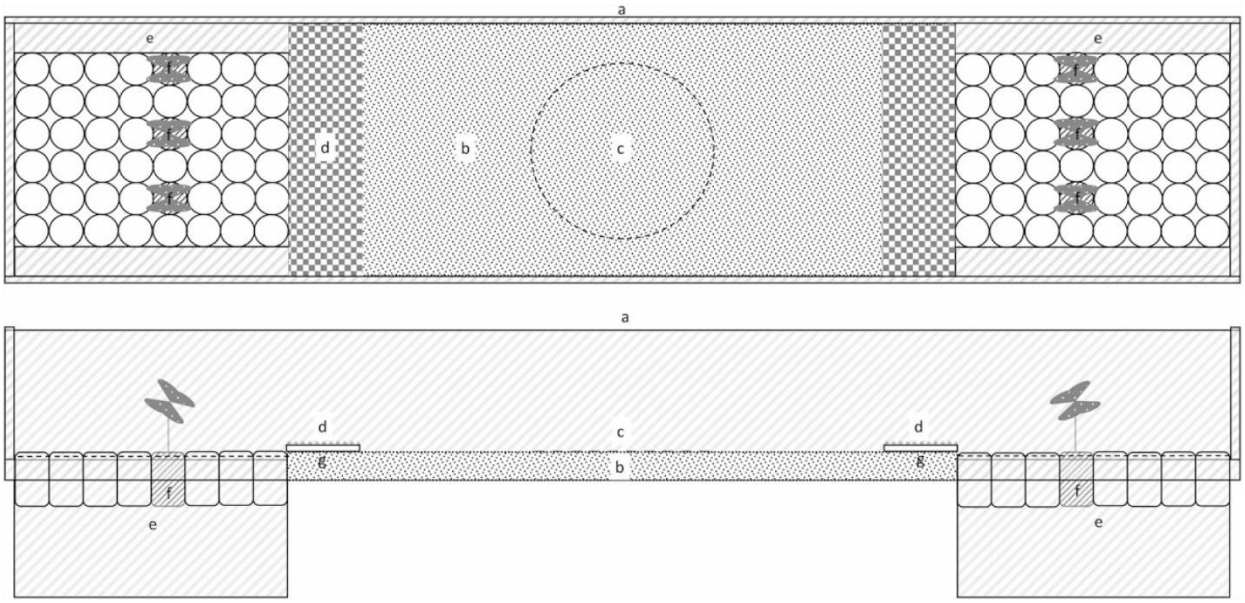


Figure 1. Top and side view of an experimental device (392 × 77 × 35 mm). Abbreviations: a, walls with inner surfaces covered with Fluon; b, crawling area (220 × 77 mm) made from a cellulose pad moistened with 20 ml of tap water; c, habituation zone (52 mm diameter); d, buffer zone made from a strip of Whatman paper (76 × 26 mm) with 100 µl of either *Carabus nemoralis* cuticular extract, ethanol (control) or distilled water (blank); e, foraging area (86 × 61 × 35 mm) consisting of 48 wells; f, young oilseed rape shoots; g, standard microscope glass slide (76 × 26 mm) as support for the strip of Whatman paper.

plastic cylinder, 52 mm in diameter and 50 mm high, whose inner surface was coated with Fluon®. This allowed the slug to become accustomed to the device. 100 µl of the treatment was applied with a micropipette to the strips of Whatman paper on the glass microscope slides. Ethanol was allowed to evaporate at room temperature (about 17 °C) for 10 min; at 1800 h the plastic cylinder of the habituation zone was removed from each device, marking the start of a replicate, which lasted until 0900 the next morning. All tests were blind. After each replicate, the devices and the glass slides were thoroughly washed with detergent and hot water and then dried at 200 °C for 2 h. All disposable parts (strips of Whatman paper, pads and baits) were replaced. New slugs were used for each replicate and the positions of treatments were swapped with the control to avoid any positional bias.

Batches of four replicates with the cuticular extract against the control, and four replicates with the blank against the control solution, were performed over six nights; two others replicates were conducted during an additional night. A total of 26 replicates were thus performed with the cuticular extract against the control and 25 with the blank against the control (one replicate was excluded because no choice was made by the tested slug).

Data analysis

First, comparisons were made between the mean number of cotyledons consumed in the foraging areas of each of the two-choice test conditions (cuticular extract *vs* control and control *vs* blank). While the consumption of a small part of the cotyledon may not preclude the survivorship of the plant, partially damaged cotyledons (i.e. cotyledons with only a trace of consumption) were considered consumed to avoid the subjectivity of an assessment using a visual damage scale (as usually employed to assess damage on true leaves with larger surface areas; Frank, 1998a). As normality was not ascertained, the Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test was used. The total number of slugs found in each foraging area was also compared using a binomial test. All data analyses were carried out using Statistica v. 10.0 software.

RESULTS

Significantly fewer cotyledons were consumed in the foraging area treated with the cuticular extract from *Carabus nemoralis* than in the area treated with the control solution ($P = 0.0280$). There was no significant difference ($P = 0.8295$) between the foraging areas treated with the control solution and those treated with the blank (Fig. 2).

Slugs were found significantly more often in the foraging area treated with the control solution than in those treated with the cuticular extract ($P = 0.0060$) (Fig. 3). The number of slugs found in the foraging area was almost the same in the control and blank conditions (12 and 13 respectively, $P = 0.8415$). Significantly fewer slugs were found in the foraging area when it was treated with the cuticular extract than when Whatman paper alone was used alone ($P = 0.0327$).

DISCUSSION

The experiment demonstrates that cuticular extract from *Carabus nemoralis* influences the grazing behaviour of *Deroceras reticulatum*. Significantly fewer cotyledons of oilseed rape were consumed in the foraging area with a threshold treated with *C. nemoralis* cuticular extract than in the control area. Chemical cues from *C. nemoralis* have already been shown to be effective in discouraging slugs from entering treated shelters (Bursztyka *et al.*, 2013). While sheltering is an important component in slugs' survivorship (Rollo & Wellington, 1977; Grewal *et al.*, 2001), foraging is obviously a more vital self-maintenance behaviour, so that interfering with it should be more difficult. The chemical cues were nevertheless successful in modifying foraging behaviour. The deterrent effect was not only observed in the reduced consumption of rape shoots in the treated plots, but also in the final position occupied by tested slugs at the end of the replicates. The chemical cues were potent in preventing slugs from reaching the protected foraging area, as shown by the greater number of slugs found in the control and blank foraging

Downloaded from http://mollus.oxfordjournals.org/ by guest on February 1, 2016

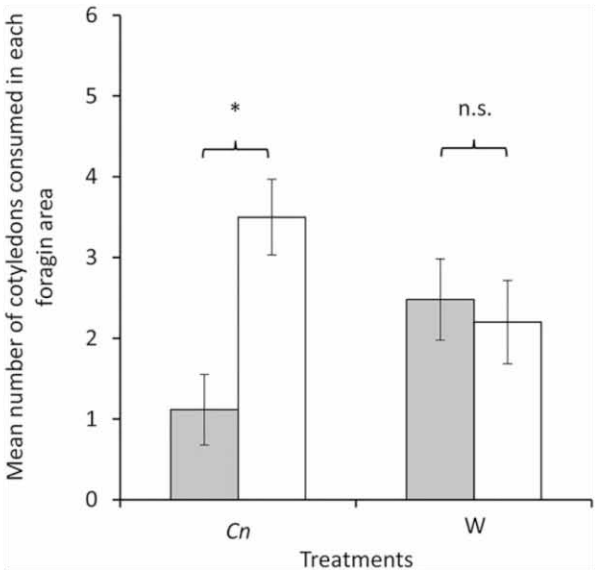


Figure 2. Comparison of the mean number of cotyledons consumed in each foraging area, in the presence of *Carabus nemoralis* extract (*Cn*) *vs* the control solution and in the presence of the blank (Whatman paper alone, W) *vs* the control solution. Solid bars refer to the treatments, while empty bars are the control solution. The Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test was applied for comparison of the treatment/control solution pairs. Asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$). Bars = ± 1 SE; $n = 26$ and 25 for *Cn* and W treatments, respectively.

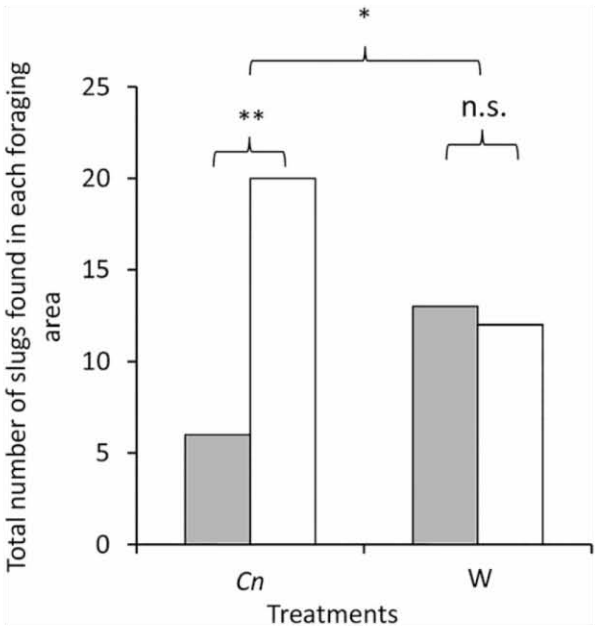


Figure 3. Comparison of total number of slugs found in each foraging area, depending on the treatment: *Cn*, cuticular extract from *Carabus nemoralis vs* control; W, strip of Whatman paper as blank *vs* control. Solid bars refer to the treatments, while empty bars are the control solution. Comparison of the treatment/control solution pairs was performed using the binomial test. Asterisks indicate significant differences: $*P < 0.05$; $**P < 0.01$. Bars = ± 1 SE; $n = 26$ and 25 for *Cn* and W treatments, respectively.

areas. As demonstrated by Bursztyka *et al.* (2013), this response is specific and not provoked simply by a new odour. *Deroceras reticulatum* is an epigeic feeder (Frank, 1998b), thus the treatment application method used here was particularly suitable to this species since slugs must crawl over the surface of the treated paper (rather than beneath it), as they would over the soil surface of a field. Furthermore, *C. nemoralis* is a ground-dwelling beetle that may leave residual chemical cues that are perceived by slugs, as observed with the generalist carabid predator *Pterostichus melanarius* (Armsworth *et al.*, 2005). The application method thus fits with the ecology of both the prey and the predator, an important characteristic that influences the ability of prey to detect predators (Downes & Shine, 1998; Head, Keogh & Daughty, 2002).

In considering their methodological experimental procedure, Armsworth *et al.* (2005) pointed out that the antipredator behaviour displayed by *D. reticulatum* should be a response to kairomones left by *P. melanarius* while the beetles are moving. In other words, the chemical cues of interest to the slugs are presumably deposited passively from the cuticular exoskeleton of the beetles while they were crawling on the experimental surface. For this reason, we employed ethanol as the solvent in our experiment because, unlike other more usual extraction procedures using hexane or dichloromethane for the cuticular extract, it has affinity for hydrophobic and hydrophilic molecules and is not toxic to slugs. In similar approaches, ethanol extracts from cockroaches (Rollo, Czyzwska & Borden, 1994; Rollo, Borden & Casey, 1995) and isopods (Yao *et al.*, 2009) proved effective to elute the repellent materials active against conspecifics.

The present study lays the groundwork for further research, which should focus first on identifying the compounds involved in the avoidance displayed by *D. reticulatum*, in order to consider the feasibility of creating a product based on these compounds for a practical application in pest management. Field experiments should be carried out to assess the efficacy of this semiochemical-based treatment in precluding severe damage to winter rape and other at-risk crops (such as winter wheat) and to evaluate this new approach as an additional tool for integrated pest management as part of a push-and-pull strategy. The chemical baits usually employed against slugs are less palatable than the crops they are supposed to protect, limiting their efficiency (Bailey, 2002). We can hence suggest that foraging slugs could be deflected from their favourite seedlings to the less palatable toxic baits—whose lethal potency would be increased as a result of the application of the deterrent semiochemical in the immediate surroundings of the seedlings. Similarly, slugs may be led to seek refuge (Bursztyka *et al.*, 2013) and to forage in field margins, where they may be subject to higher risks of predation since field margins are reservoirs for predatory arthropods (Dennis & Fry, 1992). However, care should be taken to assess any side effects of these chemical cues on other useful species. For instance, ground beetles seem to locate sparsely and randomly distributed prey, such as slugs, through optimal Lévy-flight searching patterns, executed by avoiding odour trail previously left by themselves or conspecifics (Reynolds, 2007; Guy *et al.*, 2008). It is believed that *D. reticulatum* detects these pheromone trails to its own benefit to avoid *P. melanarius* (Armsworth *et al.*, 2005; Guy *et al.*, 2008). It is therefore likely that the compounds in the cuticular extract from *C. nemoralis* involved in the deterrent effect on *D. reticulatum* have a similar purpose for these ground beetles. Consequently, a large-scale application of such semiochemicals may disturb the foraging behaviour of *C. nemoralis*, leading to a decrease of their predation upon slugs in the treated area. Nevertheless, such drawbacks should not be overestimated, since *C. nemoralis* is less common in arable crops than carabids from the tribe Pterostichini, such as *P. melanarius*.

Finally, it would be interesting to test the response of other pest slugs. For instance, *C. nemoralis* is an efficient predator of *Arion lusitanicus* (see Hatteland, 2010), which has become a major pest in central and northern Europe (Grimm, Paill & Kaiser, 2000; Hatteland *et al.*, 2010). It is therefore likely that

Downloaded from http://mollus.oxfordjournals.org/ by guest on February 1, 2016

chemical cues from *C. nemoralis* could deter this slug from foraging in a similar way as demonstrated in this study with *D. reticulatum*. Further experiments should be conducted on slug species which feed below ground, like *Deroceras laeve*, against which surface application may be ineffective.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Julien Delnatte for his help in catching *Carabus nemoralis* and his invaluable knowledge of entomology, Julie Fourrier for her enthusiastic assistance, Arbiotech (Saint Gilles, FR) for providing slugs and Myriam Robejean for her help in the rearing of the beetles and slugs. We are also grateful to Eve Landen for correcting the manuscript and providing useful comments.

REFERENCES

APFELBACH, R., BLANCHARD, C.D., BLANCHARD, R.J., HAYES, R.A. & MCGREGOR, I.S. 2005. The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **29**: 1123–1144.

ARCHARD, G.A., BOHAN, D.A., HUGHES, L.A. & WILTSHIRE, C.W. 2004. Spatial sampling to detect slug abundance in an arable field. *Annals of Applied Biology*, **145**: 165–173.

ARMSWORTH, C.G., BOHAN, D.A., POWERS, S.J., GLEN, D.M. & SYMONDSON, W.O.C. 2005. Behavioural responses by slugs to chemicals from a generalist predator. *Animal Behaviour*, **69**: 805–811.

ASSMANN, T. 2003. Biology and ecology. In: *The genus* Carabus *in Europe. A synthesis* (H. Turin, L. Penev & A. Casale, eds), pp. 287–306. Pensoft Publishers, Sofia & European Invertebrate Survey, Leiden.

AYRE, K. 1995. *Evaluation of carabids as predators of slugs in arable land*. PhD thesis, University of Newcastle upon Tyne.

BAILEY, S.E.R. 2002. Molluscicidal baits for control of terrestrial gastropods. In: *Molluscs as crop pests* (G.M. Barker, ed.), pp. 33–54. CABI Publishing, Wallingford, UK.

BARKER, G.M. (ed.) 2004. *Natural enemies of terrestrial gastropods*. CABI Publishing, Wallingford, UK.

BLAU, P.A., FEENY, P. & CONTARDO, L. 1978. Allylglucosinolate and herbivorous caterpillars: a contrast in toxicity and tolerance. *Science*, **200**: 1296–1298.

BOHAN, D.A., BOHAN, A.C., GLEN, D.M., SYMONDSON, W.O.C., WILTSHIRE, C.W. & HUGHES, L.A. 2000. Spatial dynamics of predation by carabid beetles on slugs. *Journal of Animal Ecology*, **69**: 367–379.

BROWN, J.S., LAUNDRÉ, J.W. & GURUNG, M. 1999. The ecology of fear: optimal foraging, game theory, and trophic interactions. *Journal of Mammalogy*, **80**: 385–399.

BURSZTYKA, P., SAFFRAY, D., LAFONT-LECUELLE, C., BRIN, A. & PAGEAT, P. 2013. Chemical compounds related to the predation risk posed by malacophagous ground beetles alter self-maintenance behavior of naive slugs (*Deroceras reticulatum*). *PLoS ONE*, **8**: e79361.

COOK, R.T., BAILEY, S.E.R., MCCROHAN, C.R., NASH, B. & WOODHOUSE, R.M. 2000. The influence of nutritional status on the feeding behaviour of the field slug, *Deroceras reticulatum* (Müller). *Animal Behaviour*, **59**: 167–176.

DENNIS, P. & FRY, G.L.A. 1992. Field margins—can they enhance natural enemy population-densities and general arthropod diversity on farmland? *Agriculture Ecosystems & Environment*, **40**: 95–115.

DIGWEED, S.C. 1994. Detection of mucus-producing prey by *Carabus nemoralis* Mueller and *Scaphinotus marginatus* Fischer (Coleoptera: Carabidae). *Coleopterists' Bulletin*, **48**: 361–369.

DOWNES, S. & SHINE, R. 1998. Sedentary snakes and gullible geckos: predator–prey coevolution in nocturnal rock-dwelling reptiles. *Animal Behaviour*, **55**: 1373–1385.

EKSCHMITT, K. & WOLTERS, V. 1997. Spiders, carabids, and staphylinids: the ecological potential of predatory macroarthropods. In: *Fauna in soil ecosystems: recycling processes, nutrient fluxes, and agricultural production* (G. Benckiser, ed.), pp. 307–362. CRC Press, New York.

FRANK, T. 1998a. Slug damage and number of slugs (Gastropoda: Pulmonata) in winter wheat in fields with sown wildflower strips. *Journal of Molluscan Studies*, **64**: 319–328.

FRANK, T. 1998b. The role of different slug species in damage to oilseed rape bordering on sown wildflower strips. *Annals of Applied Biology*, **133**: 483–493.

GIGLIO, A., BRANDMAYR, P., DALPOZZO, R., SINDONA, G., TAGARELLI, A., TALARICO, F.F., BRANDMAYR, T.Z. & FERRERO, E.A. 2009. The defensive secretion of *Carabus lefebvrei* Dejean 1826 pupa (Coleoptera, Carabidae): gland ultrastructure and chemical identification. *Microscopy Research and Technique*, **72**: 351–361.

GLEN, D.M., JONES, H. & FIELDSEND, J.K. 1990. Damage to oilseed rape seedlings by the field slug *Deroceras reticulatum* in relation to glucosinolate concentration. *Annals of Applied Biology*, **117**: 197–201.

GREWAL, P.S., GREWAL, S.K., TAYLOR, R.A.J. & HAMMOND, R.B. 2001. Application of molluscicidal nematodes to slug shelters: a novel approach to economic biological control of slugs. *Biological Control*, **22**: 72–80.

GRIMM, B., PAILL, W. & KAISER, H. 2000. Daily activity of the pest slug *Arion lusitanicus* Mabille. *Journal of Molluscan Studies*, **66**: 125–128.

GUY, A.G., BOHAN, D.A., POWERS, S.J. & REYNOLDS, A.M. 2008. Avoidance of conspecific odour by carabid beetles: a mechanism for the emergence of scale-free searching patterns. *Animal Behaviour*, **76**: 585–591.

HATTELAND, B.A. 2010. *Predation by carabid beetles (Coleoptera, Carabidae) on the invasive Iberian slug*. Arion lusitanicus PhD thesis, University of Bergen.

HATTELAND, B.A., GRUTLE, K., MONG, C.E., SKARTVEIT, J., SYMONDSON, W.O.C. & SOLHØY, T. 2010. Predation by beetles (Carabidae, Staphylinidae) on eggs and juveniles of the Iberian slug *Arion lusitanicus* in the laboratory. *Bulletin of Entomological Research*, **100**: 559–567.

HATTELAND, B.A., HAUKELAND, S., ROTH, S., BRURBERG, M.B., VAUGHAN, I.P. & SYMONDSON, W.O.C. 2013. Spatiotemporal analysis of predation by carabid beetles (Carabidae) on nematode infected and uninfected slugs in the field. *PLoS ONE*, **8**: 14.

HATTELAND, B.A., SYMONDSON, W.O.C., KING, R.A., SKAGE, M., SCHANDER, C. & SOLHØY, T. 2011. Molecular analysis of predation by carabid beetles (Carabidae) on the invasive Iberian slug *Arion lusitanicus*. *Bulletin of Entomological Research*, **101**: 675–686.

HEAD, M.L., KEOGH, J.S. & DOUGHTY, P. 2002. Experimental evidence of an age-specific shift in chemical detection of predators in a lizard. *Journal of Chemical Ecology*, **28**: 541–554.

HOMMAY, G. 2001. Growth and reproduction of the slug *Limax valentianus* Férussac in experimental conditions. *Journal of Molluscan Studies*, **67**: 191–207.

HOWLETT, S.A. 2005. *The biology, behaviour and control of the field slug* Deroceras reticulatum *(Müller)*. PhD thesis, University of Newcastle upon Tyne.

KROMP, B. 1999. Carabid beetles in sustainable agriculture: a review on pest control efficacy, cultivation impacts and enhancement. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **74**: 187–228.

LIMA, S.L. & DILL, L.M. 1990. Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology*, **68**: 619–640.

MEIER, U. 2001. *Stades phénologiques des mono- et dicotylédones cultivées*. BBCH Monographie, Centre Fédéral de Recherche Biologiques pour l'Agriculture et les Forêts.

MOENS, R. & GLEN, D.M. 2002. Agriolimacidae, Arionidae and Milacidae as pests in West European oilseed rape. In: *Molluscs as crop pests* (G.M. Barker, ed.), pp. 425–439. CABI Publishing, Wallingford, UK.

NG, T.P., SALTIN, S.H., DAVIES, M.S., JOHANNESSON, K., STAFFORD, R. & WILLIAMS, G.A. 2013. Snails and their trails:

Downloaded from http://mollus.oxfordjournals.org/ by guest on February 1, 2016

the multiple functions of trail-following in gastropods. *Biological Reviews*, **88**: 683–700.

PECKARSKY, B.L. 2007. Predator-prey interactions. In: *Methods in stream ecology* (F.R. Hauer & G.A. Lamberti, eds), pp. 561–584. Academic Press, Amsterdam.

PREISSER, E.L., BOLNICK, D.I. & BENARD, M.F. 2005. Scared to death? The effects of intimidation and consumption in predator–prey interactions. *Ecology*, **86**: 501–509.

REYNOLDS, A.M. 2007. Avoidance of conspecific odour trails results in scale-free movement patterns and the execution of an optimal searching strategy. *Europhysics Letters*, **79**: 1–5.

ROLLO, C.D. 1988. The feeding of terrestrial slugs in relation to food characteristics, starvation, maturation and life history. *Malacologia*, **28**: 29–39.

ROLLO, C.D., BORDEN, J.H. & CASEY, I.B. 1995. Endogenously produced repellent from American cockroach (Blattaria: Blattidae): function in death recognition. *Environmental Entomology*, **24**: 116–124.

ROLLO, C.D., CZYZEWSKA, E. & BORDEN, J.H. 1994. Fatty acid necromones for cockroaches. *Naturwissenschaften*, **81**: 409–410.

ROLLO, C.D. & WELLINGTON, W.G. 1977. Why slugs squabble. *Natural History*, **86**: 46–51.

SYMONDSON, W.O.C. 1993. The effects of crop development upon slug distribution and control by *Abax parallelepipedus* (Coleoptera: Carabidae). *Annals of Applied Biology*, **123**: 449–457.

SYMONDSON, W.O.C. 1994. The potential of *Abax parallelepipedus* (Col.: Carabidae) for mass breeding as a biological control agent against slugs. *Entomophaga*, **39**: 323–333.

SYMONDSON, W.O.C. 2004. Coleoptera (Carabidae, Staphylinidae, Lampyridae, Drilidae and Silphidae) as predators of terrestrial gastropods. In: *Natural enemies of terrestrial molluscs* (G.M. Barker, ed.), pp. 37–84. CABI, Wallingford, UK.

SYMONDSON, W.O.C., CESARINI, S., DODD, P.W., HARPER, G.L., BRUFORD, M.W., GLEN, D.M., WILTSHIRE, C.W. & HARWOOD, J.D. 2006. Biodiversity vs. biocontrol: positive and negative effects of alternative prey on control of slugs by carabid beetles. *Bulletin of Entomological Research*, **96**: 637–645.

SYMONDSON, W.O.C., SUNDERLAND, K.D. & GREENSTONE, M.H. 2002. Can generalist predators be effective biocontrol agents? *Annual Review of Entomology*, **47**: 561–594.

TEYKE, T. 1995. Food-attraction conditioning in the snail, *Helix pomatia*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology*, **177**: 409–414.

TOD, M.E. 1973. Notes on beetle predation of molluscs. *Entomologist*, **106**: 196–201.

WERNER, E.E. & PEACOR, S.D. 2003. A review of trait-mediated indirect interactions in ecological communities. *Ecology*, **84**: 1083–1100.

YAO, M., ROSENFELD, J., ATTRIDGE, S., SIDHU, S., AKSENOV, V. & ROLLO, C.D. 2009. The ancient chemistry of avoiding risks of predation and disease. *Evolutionary Biology*, **36**: 267–281.

Downloaded from http://mollus.oxfordjournals.org/ by guest on February 1, 2016

DISCUSSION GENERALE

I Objectifs, stratégie d'organisation du programme de recherche et principaux résultats

La prédation est souvent considérée du seul point de vue de son impact direct sur les proies, c'est-à-dire leur élimination définitive et ses conséquences sur la dynamique des populations de prédateurs et de proies des écosystèmes : c'est l'étude de l'effet létal de la prédation. Cependant, la prédation a aussi des effets non-létaux sur les proies, généralement moins évidents à observer (Lima 1998a). De nombreuses études ont démontré que les proies modifient leurs comportements afin de diminuer la probabilité d'être détectées par les prédateurs (Jackson et al. 2006). Dès lors, avant toute sélection d'une réponse comportementale, les proies doivent prendre en considération le risque de prédation qui lui est associé, ce qui s'accompagne d'une augmentation de la vigilance et d'une augmentation du délai de production de la réponse comportementale qu'on qualifie de phase d'attente (Hugie 2003; Jackson et al. 2006). Les indices chimiques que constituent diverses émissions odorantes des prédateurs sont d'une importance capitale pour un grand nombre d'organismes (Kats and Dill 1998).

L'objectif de ce travail de thèse était d'approfondir les connaissances, encore sommaires, actuellement disponibles concernant la capacité des gastéropodes terrestres à percevoir le risque de prédation représenté par les carabes du genre *Carabus*. En effet, alors que plusieurs espèces de ce genre sont des malacophages spécialisés, connues pour leur impact sur les populations de gastéropodes terrestres, les recherches se sont essentiellement focalisées sur des Carabidae généralistes du genre *Pterostichus*. Or, nombre d'études décrivant le rôle des signaux chimiques dans les stratégies de prévention de la rencontre avec un prédateur, insiste sur le fait que les proies ont généralement acquis cette capacité de détection contre leurs prédateurs les plus spécialisés (Sih 1986; Kats and Dill 1998; Venzon et al. 2000).

Nous avons axé nos recherches sur les réponses comportementales adoptées par la limace *Deroceras reticulatum* et l'escargot *Xeropicta derbentina*, en présence d'extraits cuticulaires de différentes espèces de carabe prédateurs du genre *Carabus*. Le choix portés sur ces deux espèces de gastéropodes terrestres a été motivé par leurs importances agricoles

et médicales respectives ainsi qu'en raison de l'antinomie de leurs caractéristiques écologiques. En effet, *Deroceras reticulatum* est la principale limace rencontrée, à travers le monde, dans les cultures qu'elle ravage, et elle évolue dans des milieux tempérés et humides ; tandis que *Xeropicta derbentina* est un escargot originaire de l'est du bassin méditerranéen, extrêmement bien adapté aux milieux secs et ensoleillés, invasif dans le sud-est de la France et vecteur de strongles de petits ruminants.

Il existe peu de données publiées concernant la perception du risque de prédation chez les gastéropodes terrestres. Nous avons donc réalisé une série d'études en laboratoire au moyen de dispositifs expérimentaux destinés à évaluer l'altération des comportements de maintenance propres à chacune de ces deux espèces, en présence d'extraits cuticulaires de différentes espèces de carabes prédateurs. Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence les résultats qui suivent.

Tout d'abord, la première étude a révélé que les extraits cuticulaires des carabes *C. nemoralis* et *C. coriaceus* sont capables d'altérer le comportement de recherche d'abris de *D. reticulatum*, un comportement essentiel à sa survie et plus généralement à celle de l'ensemble des limaces (Hommay et al. 1998; Grewal et al. 2001). En effet, les abris permettent de limiter la perte d'eau transcuticulaire pendant la période diurne et de limiter le risque d'exposition à un prédateur. Cette étude a permis de montrer que *D. reticulatum* répond à la présence de signaux odorants émis par *C. nemoralis* et *C. coriaceus*, deux carabes malacophages spécialisés dont l'un, *C. nemoralis* a une préférence démontrée pour les limaces (Ayre 1995). Ces carabes sont sympatriques de *D. reticulatum*. Ils sont eurytopiques et souvent retrouvés dans des milieux humides affectionnés par *D. reticulatum* pendant les périodes où elle est active. Ces deux espèces constituent sans doute des menaces significatives pour *D. reticulatum*. En revanche, l'absence de réponse observée en présence de l'extrait cuticulaire de *C. auratus* peut sembler surprenante, si on tient compte de la réputation d'auxiliaire de cultures qui entoure cette espèce. Cependant, son biotope habituel, constitué de milieux ouverts et ensoleillés au sol argileux, est assez éloigné de celui de *D. reticulatum* et, plus encore, son alimentation constituée de larves d'insectes et de vers de terre (Turin et al. 2003) font de ce carabe une menace peu pertinente pour cette espèce de limace.

Ce constat se vérifie dans la seconde expérimentation, où seul l'extrait cuticulaire de *Carabus morbillosus* est en mesure d'altérer le choix pour le site de repos chez l'escargot *X. derbentina*. Bien que *C. morbillosus* soit une espèce de carabes allopatrique de *X. derbentina*, il s'agit d'un redoutable prédateur d'escargots, évoluant en milieu ouvert et sec dans son aire d'origine (principalement les côtes de l'Afrique du nord). Il est donc probable que la signature chimique de cette espèce de carabe partage des composés avec des prédateurs rencontrés par *X. derbentina* dans son habitat natif, faisant de ce carabe un archétype de prédateur reconnu par cet escargot. Comme nous l'avons soupçonné, l'extrait cuticulaire de ce carabe n'a en revanche absolument aucune incidence sur le comportement de choix d'abris réalisé par *D. reticulatum*. En effet, *Deroceras* est une limace adaptée aux environnements humides tempérés, ce qui exclue probablement *C. morbillosus* de la liste de prédateurs identifiables comme une menace pour cette espèce de limace. En raison d'un déficit de disponibilité en limaces, il n'a pas été possible de tester l'extrait cuticulaire de *C. auronitens* sur le choix d'abris de *D. reticulatum*. Cependant ses caractéristiques nous autorisent à penser que cette limace ne percevrait pas *C. auronitens* comme une menace, bien que cette assertion mérite d'être vérifiée. En effet, les caractéristiques écologiques de *C. auronitens* sont similaires à celles de *C. hispanus*. Par ailleurs, *C. auronitens* est phylogénétiquement très proche de *C. hispanus* et de *C. morbillosus* (Deuve et al. 2012), au point qu'il est possible d'obtenir des hybrides entre ces différentes espèces (Camard and Leplat 2004). Or, aucune de ces deux espèces de carabe n'est perçue par *D. reticulatum*. En revanche, *C. coriaceus* n'a pas eu d'impact sur le choix réalisé par les escargots bien qu'il s'agisse d'un important prédateur héliciphage et qu'une partie de son aire de répartition recouvre celle de *X. derbentina* (Anatolie principalement) où ces deux espèces peuvent être syntopiques. Malgré tout, *C. coriaceus* n'est peut-être pas perçu comme un prédateur pertinent par *X. derbentina*, car c'est un carabe qui consomme préférentiellement les escargots épigés de grande taille du genre *Helix* et qui n'a pas l'habitude de grimper sur les végétaux pour rechercher ses proies, si bien qu'il est probable qu'il ne s'attaque pas, ou seulement peu, à *X. derbentina* dans les zones géographiques que ces espèces partagent (Talarico et al. 2007).

Le dernier essai a permis de révéler l'importance de l'information chimique provenant de l'extrait cuticulaire de *C. nemoralis* dans la perception du risque de prédation associé chez *D. reticulatum*. En effet, la présence de l'extrait cuticulaire issu de ce carabe a été en mesure

de protéger les plantules de colza de la consommation par des limaces, préalablement maintenues à jeun depuis 24h. La présence de l'extrait cuticulaire les a contraintes à s'alimenter dans la zone d'alimentation témoin (exempte d'extrait cuticulaire). Il s'agit ici de la première démonstration du potentiel représenté par l'exploitation de sémiochimiques évoquant un risque de prédation pour les limaces dans la protection d'une culture sensible à la consommation de l'espèce de limace nuisible *D. reticulatum*. Cette étude ouvre des perspectives nouvelles pour la limitation des dégâts infligées aux cultures par cette espèce de limace, notamment dans le cadre d'une lutte intégrée, de type push-and-pull (Khan and Pickett 2004). En effet, l'un des inconvénients majeur présenté par les granulés constitués de métaldéhyde ou de méthiocarbe, réside dans leur faible appétance pour les limaces, notamment en comparaison avec celle des plantes qu'ils sont supposés protéger. La protection des jeunes pousses par la présence de sémiochimiques de *C. nemoralis* pourrait inciter les limaces à s'orienter préférentiellement vers les appâts toxiques, augmentant ainsi leur efficacité.

II Critique méthodologique et mise en perspective des résultats avec la littérature

II. 1 Choix des espèces étudiées

Les résultats des expériences que nous avons conduites permettent de confirmer que les deux espèces de gastéropodes terrestres que nous avons étudiées, la limace *Deroceras reticulatum* et l'escargot *Xeropicta derbentina*, sont capables de détecter des composants cuticulaires issus de carabes prédateurs et de modifier leur comportement en réponse à sa détection. Chez ces deux gastéropodes, les comportements étudiés participent à la survie et à la protection de ces animaux, qu'il s'agisse du comportement de refuge dans le sol ou de la prise alimentaire pour *Deroceras* et de refuge en hauteur pour *Xeropicta*. Nos résultats ont aussi mis en évidence la spécificité de cette détection qui ne concerne que des carabidés spécialisés et écologiquement pertinents. Dans le cas de *Deroceras*, seuls les carabes *Carabus coriaceus* et *Carabus nemoralis* semblent émettre des signaux chimiques susceptibles

d'altérer les comportements de maintenance que nous avions retenus. En revanche, chez *Xeropicta*, ces espèces typiques de milieux septentrionaux, sont sans effet, tandis que les extraits cuticulaires du carabe héliciphage xérophile, *Carabus morbillosus*, perturbent le comportement de refuge en hauteur, typique de cet escargot.

Ces résultats peuvent susciter un certain nombre de remarques. Parmi celles-ci, la première concerne sans aucun doute le choix des espèces de gastéropodes terrestres que nous avons étudiées. Si l'importance agricole et économique de *Deroceras reticulatum* ne peut être contestée, il n'en demeure pas moins que cette limace n'est pas la seule espèce d'intérêt agronomique et que d'autres espèces, par exemple certaines espèces nuisibles appartenant au genre *Arion*, mériteraient d'être soumises au même type d'étude. De même, le choix de *Xeropicta derbentina* comme seul représentant des escargots, ne permet pas d'évaluer l'existence de capacités de détection chimique des carabes héliciphages chez des espèces de plus grande taille du genre *Helix*. Cette question est d'autant plus intéressante que ces escargots occupent habituellement des biotopes également fréquentés par *Deroceras* et les carabes prédateurs d'escargots comme *C. coriaceus* ou *nemoralis*. La prise en compte d'un plus grand nombre d'espèces de gastéropodes terrestres, proies de ces carabes, serait intéressante pour faciliter la recherche des associations chimiques communes à ces prédateurs et reconnues par la plupart de leurs proies. Dans le cas de *Xeropicta*, cette critique revêt une importance plus particulière, puisque le carabe xérophile testé, *Carabus morbillosus*, n'est pas une espèce sympatrique de *Xeropicta*. L'étude des réponses d'autres escargots xérophiles, comme *Theba pisana*, *Otala lactea* (Müller, 1774) ou *Eobania vermiculata* (Müller, 1774) pourrait permettre de préciser cette relation.

Cette critique concernant le choix des gastéropodes, conduit logiquement à discuter la pertinence des carabes retenus dans nos études. De fait, si des carabes malacophages comme *Carabus coriaceus* ou *Carabus nemoralis*, s'imposaient comme des espèces de référence, d'autres carabes hautement spécialisés comme *Cychrus caraboides* et *Licinus granulatus*, auraient été intéressants à prendre en compte et cela tout particulièrement pour *Xeropicta*. L'obligation de se fournir en capturant ces coléoptères dans la nature, a constitué un facteur limitant pour la constitution de notre banque d'extraits cuticulaires. Nous ne sommes pas parvenus à nous procurer l'ensemble des espèces initialement souhaitées et le nombre même d'individus dont nous avons pu disposer pour chacune des espèces finalement utilisées dans

nos études n'a pas permis de réaliser des comparaisons d'efficacité des extraits, selon qu'ils étaient issus de mâles ou de femelles. Cette comparaison aurait pourtant été très intéressante puisque la littérature nous apprend que les femelles de *Carabus nemoralis* sont attirées par les traces de mucus de *Deroceras reticulatum*, alors que les mâles ne le sont pas (Digweed 1994). Compte tenu de l'influence des hormones sexuelles sur les émissions odorantes de ces espèces (Giglio et al. 2011), il est parfaitement imaginable que les gastéropodes aient acquis une capacité sélective de détection du prédateur de sexe le plus enclin à les capturer. Dans la mesure où nous n'avons pas pu disposer d'un nombre suffisant d'individus de chaque sexe, pour l'ensemble des espèces de carabes que nous avons testées, on peut imaginer que l'absence d'effet sur le comportement de *Deroceras* ou de *Xeropicta* pour une espèce donnée, peut s'expliquer par le fait que les extraits provenaient de carabes d'un sexe non prédateur de ces gastéropodes. Il serait donc important de comparer des extraits obtenus à partir de carabes des deux sexes pour une même espèce, afin de mettre en évidence une possible différence d'efficacité.

II. 2 Pertinence des comportements étudiés

L'ensemble des observations réalisées durant ce travail soulève la question de la pertinence des comportements retenus comme indicateurs de la réponse des proies exposées aux stimuli chimiques émis par les prédateurs. Notre choix des comportements indicateurs retenus, a été guidé par le souci de ne prendre en compte que des comportements dont les altérations avaient un coût biologique significatif pour la proie, et nous avons donc focalisé notre attention sur des comportements de maintenance et de protection contre les prédateurs (certains comportements comme le fait de se placer dans un refuge en période diurne ou de grimper sur une tige végétale, sont à la fois des comportements de protection contre la dessiccation et contre les prédateurs). Les comportements de fuites ou d'évitement sont parmi les réponses comportementales les plus examinées dans les études abordant les stratégies de défense contre les prédateurs adoptées par les proies, en présence de composés chimiques de prédateurs (Kats and Dill 1998; Armsworth et al. 2005). Dans nos essais, les dispositifs expérimentaux ont été conçus de manière à permettre l'expression de comportements de maintenance connus des deux espèces de gastéropodes étudiées, et sans

créer une pression excessive : c'est pourquoi des situations de choix ont toujours été préférées. Au vu des résultats, ces dispositifs ce sont révélés appropriés, à la fois pour l'expression proprement dite de ces comportements de maintenance mais aussi pour en observer l'altération en présence de signaux chimiques issus des prédateurs. Cependant, ce constat est plus nuancé dans le cas de l'étude sur *X. derbentina*. En effet, la période durant laquelle elle s'est déroulée, ne permettait pas d'observer de façon optimale le réflexe de perchage caractéristique chez ce type d'espèce d'escargot xérophile, ce qui atténuait évidemment la possibilité de mesurer l'effet des extraits testés.

Les modèles d'étude des relations proie-prédateur montrent que la réponse défensive la plus commune chez les proies est le retrait dans un refuge ou une coquille (Hugie 2003). Ces stratégies peuvent être suffisamment efficaces pour modifier la dynamique prédateur-proie et déstabiliser cette relation (Krivan 1998). La qualité du refuge, et notamment sa capacité d'accueil, est un aspect déterminant de l'efficacité du refuge (Krivan 1998). Un refuge de forte capacité d'accueil autorise des regroupements d'individus. L'émission cumulée d'odeurs complique la détection olfactive par les prédateurs des proies placées dans un environnement n'autorisant pas l'utilisation des informations visuelles, comme une anfractuosité du sol (Johannesen et al. 2014). La possibilité de rester longtemps dans ce refuge est aussi une dimension importante dans les stratégies d'attente couramment utilisées par les proies pour se protéger des prédateurs (Hugie 2003). Les stratégies de défense contre les prédateurs incluent également le fait de se placer en hauteur, ce qui est spécialement pertinent pour *Xeropicta*, qui se soustrait ainsi à nombre de carabes de grande taille peu aptes à se hisser sur les tiges de végétaux. Chez cet escargot, on retrouve aussi l'avantage du regroupement de congénères avec son potentiel de perturbation des capacités de localisation olfactive des proies par le prédateur. Ces comportements sont donc spécialement importants pour *Deroceras* et *Xeropicta*, ce qui signifie que toute perturbation de ceux-ci ne peut résulter que d'un mécanisme de trade-off impliquant une contrainte vitale pour l'espèce. Là où l'observation de comportements d'évitements par des proies indique la perception d'une information liée au risque de prédation, l'altération de comportements de maintenance donnent un aperçu de l'importance de l'information perçue par la proie. Cependant, bien que les comportements impliqués dans les stratégies d'évitement des prédateurs aient une évidente importance pour la survie des proies concernées, on peut leur contester la qualité

de comportements de maintenance. Ainsi, bien que l'effet dissuasif des extraits cuticulaires de *C. coriaceus* et *C. nemoralis* sur le choix d'abris par *D. reticulatum* souligne l'importance du risque de prédation que représentent ces carabes, il nous est apparu nécessaire de compléter ces résultats en étudiant les modifications du comportement alimentaire de cette limace en présence d'extraits de *C. nemoralis*. Le comportement alimentaire, ou plus exactement la stratégie d'exploitation d'une ressource alimentaire (comportement d'exploration de la ressource, procédures de choix, consommation), est un comportement de maintenance typique, dont l'altération constitue une preuve évidente de l'importance des stimuli antagonistes testés (ici les émissions odorantes d'un prédateur). Afin de renforcer la motivation des limaces pour la consommation des aliments proposés, nous avons associé le jeûne (24h) et la présentation d'un aliment à forte valeur alimentaire : les germes de colza. La préférence affichée par ces limaces, après 24h de jeûne, pour les germes de colza présents dans la zone exempte de signaux odorants de carabe, est un indicateur particulièrement frappant de l'importance du risque véhiculé par les indices chimiques provenant de *C. nemoralis*. En effet, la manipulation de l'état de satiété des proies est considérée par de nombreux auteurs, comme une des meilleures approches permettant d'évaluer la manière dont les organismes choisissent entre le besoin de s'alimenter et celui de se prémunir contre leur(s) prédateur(s) (Lima 1998b). Cependant, l'approche expérimentale employée (test de choix pour deux sources alimentaires identiques) indique uniquement que la présence d'infochimiques provenant de *C. nemoralis* influence la façon dont les limaces exploitent la ressource alimentaire, pas qu'elle induit une inhibition du comportement de prise alimentaire stricto sensu. Cependant, une telle modification possède un coût biologique important pour la limace, qui consommera moins d'aliment dans un temps donné (Lima 1998b), consommera plus d'énergie durant cette période, du fait de déplacements plus importants, et s'exposera plus longtemps au risque de rencontre avec un prédateur (Hugie 2003). Nos résultats sont en accord avec les observations réalisés par d'autres auteurs sur différentes espèces de gastéropodes aquatiques. Ainsi, les escargots aquatiques *Helisoma trivolvis* (Say, 1817) et *Bellamya chinensis* (Gray, 1834), réagissent-ils aux sécrétions odorantes de deux de leurs prédateurs typiques, l'écrevisse *Orconectes propinquus* (Girard, 1852) et le poisson *Lepomis gibbosus* (Linnaeus, 1758), en diminuant leur comportement d'escalade des substrats et de confection de terriers (Armajo and Sura 2012). De même, un autre escargot aquatique, *Lymnaea stagnalis*, exposé à des extraits d'écrevisse (espèce non précisée par les auteurs), se

réfugie plus souvent dans sa coquille et diminue sa consommation d'oxygène (Orr et al. 2007). Chez ces trois gastéropodes aquatiques, les émissions odorantes de prédateurs réduisent l'activité exploratoire et activent les stratégies de défense contre le prédateur. Des réponses équivalentes sont observées chez d'autres espèces d'invertébrés et de vertébrés. Ainsi, (Bucciarelli and Kats 2015), ont mis en évidence une diminution de la fréquentation d'un environnement aquatique, par la microfaune invertébrée, lorsqu'on diffuse des émissions odorantes d'adultes du triton *Taricha torosa* (Rathke, 1833) en période de reproduction. Ces mêmes auteurs ont observé que les larves prédatrices de l'Odonate *Anax junius* (Drury, 1773) réduisent leur comportement prédateur et s'immobilisent. Ce type de réponse est tout à fait comparable avec nos observations chez *Deroceras reticulatum*. Un phénomène tout à fait comparable avec les observations de (Mathis 2003) sur le triton *Notophthalmus viridescens* (Rafinesque, 1820), une espèce dont les adultes pratiquent le cannibalisme, en consommant des larves de leur espèce. Cet auteur a démontré qu'en présence d'émissions odorantes d'adultes de leur espèce, les larves de *N. viridescens* réagissent en diminuant leur activité et en cessant la recherche de proies.

II. 3 Les stimuli odorants utilisés

Ces solutions ont été obtenues par simple macération de cadavres de carabes (ou de la mouche domestique *Musca domestica* comme témoin négatif), dans l'éthanol à température ambiante. Les insectes étaient sacrifiés par exposition à un froid intense (-80°C), afin de limiter le risque d'expulsion du contenu rectal ou d'expulsion des sécrétions défensives, largement répandues chez les Carabidae. L'utilisation de l'éthanol, un solvant amphiphile, dans un traitement à température ambiante, peut apparaître insuffisante pour réaliser l'extraction des espèces chimiques volatiles, généralement hydrophobes, fixées dans la cuticule d'insectes. Mais notre propos n'était pas de réaliser une caractérisation exhaustive des espèces chimiques présentes dans la cuticule des carabes considérés, mais bien d'obtenir la seule extraction des molécules présentes en surface de leur cuticule et susceptibles d'être déposées passivement au cours de déplacements de l'insecte. L'existence de tels dépôts a été mise en évidence, pour la première fois, par Armsworth et al. (2005), chez le carabe *Pterostichus melanarius* : ils entraînent des comportements d'évitement chez *Deroceras*. Mais

ces émissions odorantes, dont l'existence pourrait apparaître négative pour ce carabe, jouent aussi un rôle dans la communication intraspécifique de cette espèce, ainsi que le démontrent les travaux de (Guy et al. 2008). En effet, *P. melanarius* évite les traces laissées par ses congénères, ce qui semble participer à une optimisation de la recherche de ressources alimentaires, en évitant la prospection de sites précédemment explorés par un congénère. Du reste, le marquage passif de substrats est répandu chez de nombreux insectes, par exemple les bourdons et les abeilles, qui marquent les fleurs qu'ils viennent de visiter (Stout et al. 1998; Wilms and Eltz 2008), ou les chenilles de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797), qui laissent des empreintes qui sont détectées par leur parasitoïde *Cotesia marginiventris* (Cresson 1865) (Wölfling and Rostás 2009; Rostás and Wölfling 2009).

Le recours à des extraits cuticulaires pose évidemment la question du risque d'interférence du solvant utilisé, avec la proie étudiée. Ce solvant peut avoir un effet toxique ou répulsif stricto sensu, ce qui nous aurait exposé au risque d'identifier comme efficaces des extraits cuticulaires dont l'impact comportemental sur les limaces, n'aurait été dû qu'au solvant. Nous avons exclu ce risque en procédant systématiquement à des tests comparatifs impliquant un groupe témoin « solvant ». Par ailleurs, l'éthanol est un composé peu toxique et très volatile dont la présence n'a jamais affecté les limaces ni les escargots du groupe témoin « solvant », ainsi que le démontre la comparaison avec le groupe témoin (sans traitement d'aucune sorte). Cependant, la procédure d'extraction implique divers risques de distorsion du stimulus odorant testé, par comparaison avec la situation naturelle (traces passives du passage du prédateur). Les auteurs travaillant en environnement aquatique, un environnement plus simple à contrôler pour la diffusion des odorants, résolvent le problème en exposant les proies étudiées, à un flux d'eau en provenance d'une enceinte adjacente à celle dans laquelle elles se trouvent (Armajo and Sura 2012), ou en exposant celles-ci à de l'eau prélevée dans le bac d'élevage des prédateurs (Mathis 2003; Bucciarelli and Kats 2015). Dans notre cas, il aurait été intéressant de pouvoir tester des substrats sur lesquels des carabes auraient préalablement marché, comme l'avaient fait Armsworth et al. (2005). Nous avons tenté de réaliser ce type de test, mais les faibles populations de carabes dont nous disposions ne nous ont pas permis de produire des quantités de substrat suffisantes, ni surtout de nous assurer que les substrats en questions étaient imprégnés de quantités de signaux chimiques suffisantes et comparables. Il convient de noter que la solution consistant à

travailler avec des extraits ne semble pas entraîner systématiquement des biais. La reproductibilité des résultats que nous avons obtenus semble soutenir cette assertion, d'autant plus que les travaux d'Orr et al. 2007 fournissent un parfait contre-exemple. En effet, la mise à ébullition de l'eau exposée aux écrevisses perd son activité sur *Lymnaea stagnalis*, ce qui démontre qu'un traitement aussi brutal du signal odorant entraîne sa désactivation. A contrario, les résultats de ces auteurs obtenus avec l'eau exposée aux écrevisses laissée à température ambiante, recoupent parfaitement ceux de Armajo and Sura (2012) obtenus chez deux autres escargots aquatiques (*Helisoma trivolvis* et *Bellayma chinensis*) avec des effluents provenant de bacs dans lesquels vivaient l'écrevisse *Orconectes propinquus*. On peut donc considérer que les tests effectués avec des extraits cuticulaires réalisés « à froid » (à température ambiante) sont de bons témoins de la situation naturelle et qu'ils autorisent de surcroît une meilleure reproductibilité de l'intensité de la stimulation.

III Interprétation des résultats relatifs à la détection chimique du prédateur

Comme le soulignent Orr et al. (2007) « le meilleur moyen d'éviter de devenir une proie, est d'éviter la rencontre avec le prédateur ». Cette stratégie est rendue possible par différentes adaptations morphologiques et comportementales qui vont influer significativement sur la dynamique de la relation prédateur-proie (Ito et al. 2013). Parmi celles-ci, la capacité à détecter chimiquement les prédateurs semblent apporter un avantage évolutif significatif, qui vient amplifier l'efficacité des phases de vigilance observées chez tous les types de proies (Apfelbach et al. 2005). Durant les périodes d'immobilité vigilante, les proies peuvent détecter la présence des prédateurs à travers la perception d'informations visuelles, sonores ou chimiques. Takahara et al. (2012) ont clairement démontré, chez le crapaud *Hyla japonica* Günther, 1859 confronté aux larves prédatrices de l'Odonate *Anax julius*, que la détection chimique de celles-ci prévalait sur les informations visuelles. Cette détection est si importante qu'elle semble servir de socle dans les mécanismes d'apprentissage de la détection de nouveaux prédateurs chez le poisson *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) confronté à l'écrevisse invasive *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Cai et al.

2011). Mais elle rend aussi possible le conditionnement sur de nouvelles informations sensorielles comme le son, chez les poissons *Pimephales promelas* (Rafinesque, 1820) ou *Hemigrammus erythrozonus* Durbin, 1909 (Wisenden et al. 2008). La capacité à détecter chimiquement le prédateur peut évidemment résulter d'un apprentissage à la suite d'une exposition non-létale à un prédateur donné. Cet apprentissage n'apporte qu'un bénéfice limité à l'individu concerné, tandis que l'acquisition, au cours de l'évolution, d'une capacité innée, constitue un avantage significatif pour l'espèce (Brown and Chivers 2005). Dans les études consacrées à des invertébrés, de nombreux auteurs n'hésitent pas à considérer les signaux chimiques permettant la détection d'un prédateur, comme des kairomones (Orr et al. 2007; Bucciarelli and Kats 2015), soulignant ainsi le caractère inné de cette compétence sous-tendue par l'existence de récepteurs spécifiques et donc de gènes en contrôlant l'expression.

Chez les gastéropodes aquatiques, les travaux publiés par Orr et al. (2007) sur *Lymnaea stagnalis*, montrent très clairement que les réponses comportementales observées lors de l'exposition à un extrait d'écrevisse, ne sont pas influencées par l'expérience de possibles expositions préalables à ce prédateur, puisque les limnées impliquées dans ces études étaient issues de leur élevage, protégé de toute intrusion d'écrevisse. Leur démonstration apparait plus marquante encore si on étudie l'une des réponses d'ajustement des limnées à la présence des émissions chimiques d'écrevisse : la réduction des comportements de respiration aérienne. En effet, les neurones RPeD1, responsables du contrôle et obtenus à partir de limnées naïves, présentent une diminution de leur sensibilité membranaire lorsqu'ils étaient exposés aux extraits d'écrevisse. De tels mécanismes de détection chimique des prédateurs sont apparemment plus fréquemment observés chez les espèces aquatiques, placées dans un environnement spécialement favorable à la diffusion de telles informations, mais ils sont également observés en milieu aérien, et concernent aussi bien des invertébrés que des vertébrés (Kats and Dill 1998). En milieu aérien, seuls les travaux de Armsworth et al. (2005) montrant la capacité de *Deroceras reticulatum* à détecter le carabe *Pterostichus melanarius*, faisaient mention de cette modalité chez un gastéropode terrestre. Nos travaux sur cette même limace, réalisés sur des individus issus de notre élevage et donc totalement naïfs face aux carabes prédateurs dont provenaient les extraits testés, conduise à la même conclusion que les données publiées sur les gastéropodes aquatiques : *Deroceras reticulatum* possède la capacité innée de détecter les émissions chimiques de carabes malacophages spécialisés

comme *Carabus coriaceus* ou mieux encore *Carabus nemoralis*, une espèce qui consomme plus spécialement cette limace.

Nos résultats posent la question de la nature fonctionnelle et chimique des extraits que nous avons utilisés, c'est-à-dire de leur signification physiologique pour l'insecte émetteur. Si on admet donc que les extraits que nous avons utilisés dans notre travail, contiennent essentiellement des molécules présentes dans la partie la plus superficielle de la cuticule, et qui sont donc susceptibles d'être déposées par les carabes au cours de leurs déplacements, demeure la question de leur nature fonctionnelle. S'agit-il de composants caustiques émis par les glandes pygidiales au cours de réactions de défense, ou bien s'agit-il d'informations chimiques plus spécifiques ? En dépit de la méthode de sacrifice des insectes, que nous avons utilisée, la présence de sécrétions défensives provenant des glandes pygidiales ne peut pas être totalement exclue. Ces substances, acides méthacrylique, tiglique ou formique (Will et al. 2000; Assmann 2003), possèdent des propriétés caustiques, qui peuvent notamment expliquer les comportements d'évitement observés chez *Deroceras*, dans les travaux publiés par Armsworth et al. (2005). Nos résultats permettent toutefois de rejeter cette hypothèse. En effet, si l'ensemble des espèces de carabes que nous avons utilisées, possède de telles sécrétions (Will et al. 2000; Giglio et al. 2011), seuls les extraits de certaines espèces ont entraîné des modifications des comportements de maintenance des gastéropodes terrestres étudiés. Par ailleurs, il est important de noter que nous n'avons jamais observé les réactions de rétraction associées à l'émission de mucus, qui sont décrites dans la littérature comme des réponses typiques de *Deroceras* lors de l'exposition à des composés caustiques. On peut donc légitimement conclure de l'ensemble de ces données, que les modifications comportementales observées durant nos tests, découlent bien de l'effet d'informations chimiques et non d'un effet caustique ou toxique induit par des sécrétions défensives de carabes. Par ailleurs, ces réponses sont observées chez des sujets naïfs quant à l'exposition aux prédateurs considérés, ce qui permet de considérer les informations chimiques émises par les carabes, comme des sémiochimiques. Dans la mesure où la perception de ces sémiochimiques, semble entraîner un bénéfice pour la limace, il serait logique d'employer le terme « kairomone » pour les qualifier.

Cependant, on ne peut que s'interroger sur les différences observées quant à l'efficacité des extraits des différents carabes testés et tout particulièrement sur le fait que

deux espèces différentes (*C. nemoralis* et *C. coriaceus*) puissent induire les mêmes réactions chez *D. reticulatum*. On peut évidemment imaginer que ces limaces possèdent des récepteurs spécifiques permettant la détection de chacune ces deux espèces de carabes, mais le principe de parcimonie qui prévaut largement dans ce type de phénomène, conduirait plutôt à imaginer que les deux carabes partagent tout ou partie de la composition des sémiochimiques libérés. Les travaux de Will et al. (2000), sur la composition des sécrétions défensives de quelques tribus de Carabidae (Morionini, Catapieisini, Dercylini, Perigolini, Pterostichini, Loxandrini, Patrobini, Oodini et Odacanthini), montrent que ces sécrétions présentent des similitudes qui reflètent leur parenté. Or, les travaux de Andújar et al. (2012) sur la systématique moléculaire, basée sur l'étude de l'ADN nucléaire et mitochondrial, du sous-genre *Mesocarabus* et des autres *Carabus*, apporte un éclairage intéressant. Elle permet, en effet, de mettre en évidence une assez grande proximité entre *Carabus (Archicarabus) nemoralis* et *Carabus (Procustes) coriaceus*, tandis que ces deux espèces, détectées par *Deroceras* mais pas par *Xeropicta*, sont beaucoup plus distantes de *Carabus (Macrothorax) morbillosus*, à laquelle réagit *Xeropicta* et pas *Deroceras*. L'hypothèse d'une analogie totale, ou partielle, des sémiochimiques émis par *C. nemoralis* et *coriaceus*, semble donc possible en raison de leur proximité phylogénétique. Cette hypothèse ne pourra évidemment être confirmée que par l'analyse chimique des émissions de ces deux carabes.

Les sémiochimiques impliqués dans les phénomènes que nous avons mis en évidence, ne semblent pas liés à la consommation préalable des proies. L'importance de ce type de phénomène a été mise en évidence chez différentes proies. Chez le carassin doré, *Carassius auratus*, Cai et al. (2011) ont démontré que les poissons modifiaient profondément leur comportement en présence de fèces d'écrevisses (*Procambarus clarkii*) nourries avec des carassins dorés. De même, chez l'escargot xérophile *Theba pisana*, une espèce proche de *Xeropicta derbentina*, Lefcort et al. (2006) ont observé une immobilisation suivie d'une accélération de l'ascension de tiges verticales et une accélération de l'oviposition, lorsque les escargots étaient placés en présence de fèces de *Carabus carabus*, qui avaient été nourris de leurs congénères. Dans le cas de *Carassius*, les analyses chimiques ont permis de démontrer que les sémiochimiques impliqués étaient en réalité des phéromones d'alarme émises par les proies au moment de leur capture par les écrevisses, et passivement relarguées par celles-ci dans leurs déjections. On ne dispose pas d'informations sur la nature des sémiochimiques

responsables des modifications comportementales décrites chez *Theba pisana*, mais une hypothèse du même ordre ne peut être écartée. A moins qu'il ne s'agisse aussi d'apneumones, des sémiochimiques issus de tissus corrompus ou d'animaux morts, dont l'importance dans la modulation de nombreux comportements commence à être mieux comprise (Ferner et al. 2005; Navarro-Silva et al. 2009). L'implication de sémiochimiques issus du régime alimentaire des prédateurs que nous avons testés, ne peut être invoquée pour expliquer nos résultats. Les carabes utilisés pour la production des extraits que nous avons utilisés, ont été maintenus en vie durant plusieurs semaines dans notre laboratoire et leur alimentation était constituée d'un broyat de chair d'escargots de *Xeropicta derbentina*. Ils ne contenaient donc aucun composant provenant de limaces. Quant aux tests concernant *Xeropicta*, nous pouvons également écarter l'influence de tels composés, puisque, si tous les carabes testés avaient reçu la même nourriture, seul *Carabus morbillosus* a induit une modification du comportement de refuge sur les tiges verticales.

Il serait donc logique de considérer ces sémiochimiques comme des kairomones, puisqu'ils semblent entraîner un bénéfice pour le gastéropode qui pourrait, en ajustant son comportement, éviter de rencontrer le carabe prédateur. Cette approche nous semble toutefois excessivement simpliste. En effet, si la première conséquence incontestable de l'évitement d'une zone portant la trace odorante d'un carabe est de réduire le risque de rencontre immédiate, les modifications des comportements de maintenance qui accompagne cet évitement ont un prix biologique tout aussi incontestable. En contraignant la limace ou l'escargot à rejeter un abri pourtant parfaitement adapté, ces sémiochimiques augmentent l'activité des gastéropodes et la durée de leur séjour en zone découverte ou aisément accessible pour un prédateur. De même, en dissuadant les limaces de consommer des plantules de colza, de valeur nutritive parfaitement identique à celle des plantules ne portant pas de trace odorante de carabe, les sémiochimiques de ces prédateurs malacophages entraînent un déséquilibre du bilan énergétique des *Deroceras* et une augmentation de l'activité puisque la limace doit rechercher une autre source de nourriture. Or, les modèles de dynamique proie-prédateur, comme les études de ces interactions en laboratoire ou en situation contrôlée, sont unanimes pour souligner que les deux composantes principales des stratégies de protection des proies, sont la diminution d'activité et le recours à un refuge (Kats and Dill 1998; Krivan 1998; Hugie 2003). On ne peut donc pas considérer que les stratégies

adoptées par nos deux gastéropodes n'ont que des conséquences positives pour ces animaux, ce qui recoupe parfaitement les travaux de Jackson et al. (2006), Brown and Chivers (2005) ou Ito et al. (2013) : les stratégies de défense contre les prédateurs ou d'optimisation de l'efficacité de la prédation, voient leur efficacité compensées par le coût de ces stratégies. Dans le cas des interactions entre carabes et gastéropodes terrestres, on ne peut manquer de constater que la proie qui rejette un refuge possible ou une source de nourriture, parce qu'elle détecte les sémiochimiques d'un prédateur, s'expose au risque d'en rencontrer un autre, qui n'est pas encore eu la possibilité de marquer son passage, pendant sa quête d'un autre abri ou d'une autre plante à manger. Dès lors, l'utilisation du terme « kairomone » nous semble constituer une possible source d'erreur d'interprétation des dynamiques en cause, voire une caricature de la réalité. C'est pourquoi nous avons préféré utiliser le terme plus générique « sémiochimique », qui ne sous-entend que l'existence de mécanismes de détection chimique innés, propres à chaque espèce. Enfin, dans l'éventualité d'une application pratique de ces résultats dans le cadre de méthodes de luttes contre ces gastéropodes, il apparaît préférable de ne pas compliquer l'acceptation de cette nouvelle approche en donnant le sentiment que nous préconisons l'utilisation d'un traitement apportant un bénéfice pour les espèces que nous prétendons combattre.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En étudiant le comportement de deux espèces compétitrices de l'Homme dans ses activités de production végétale et animale, nous avons pu mieux comprendre les interactions de ces animaux avec leurs prédateurs, mais aussi la façon dont ils modulent certains des comportements qui contribuent à leur survie : prise alimentaire et recherche de refuges. C'est ainsi que nous sommes parvenus a montré que les gastéropodes terrestres *Deroceras reticulatum* et *Xeropicta derbentina,* sont capables de percevoir des traces chimiques provenant de carabes prédateurs. Ce phénomène, a priori favorable pour ces gastéropodes, qui peuvent ainsi éviter de rencontrer leurs prédateurs, se réalise au prix d'altérations de comportements de maintenance et d'autoprotection dont l'exécution est cruciale à la survie de ces espèces. Or, cette détection chimique n'est pas la conséquence de phénomènes d'apprentissage, par définition subjectifs puisqu'ils sont le résultat des expériences de chaque individu, mais bien d'une compétence innée de chémodétection impliquant une famille de stimuli odorants appelés sémiochimiques. L'existence d'un tel phénomène ouvre des perspectives très intéressantes pour le développement de nouvelles méthodes de lutte. En effet, il devient possible, une fois la composition de ces sémiochimiques établie, de développer des analogues synthétiques de ces sémiochimiques, afin de provoquer les mêmes modifications comportementales que celles que nous avons observées en laboratoire : rejet d'une ressource alimentaire marquée par ces substances, refus d'utilisation des refuges potentiels dans une zone traitée. Il serait donc possible de protéger les espèces cultivées habituellement ravagées par ces deux gastéropodes en déposant un sémiochimique synthétique, et cela sans recourir à l'utilisation de produits toxiques. En situation d'infestation massive, comme on l'observe dans certaines zones de production de colza, de maïs, ou de cultures maraîchères, l'utilisation de ces sémiochimiques pourrait être un apport intéressant pour l'optimisation et la rationalisation de l'utilisation de molluscicides. Une telle stratégie, dite push-pull, permettrait de dissuader les limaces de consommer les végétaux marqués, et les conduirait à se rabattre vers une autre ressource aisément accessible : les appâts contenant les molluscicides.

Nos résultats pourraient également apporter un nouvel éclairage dans la conception des méthodes de lutte biologique. En effet, nous avons démontré que cette perception chimique des prédateurs n'est pas généralisée à l'ensemble des espèces de la famille des Carabidae, comme aurait pu le laisser supposer les travaux de Armsworth et al. (2005), mais

est spécifiquement dirigée contre certaines espèces de carabes spécialisés dans la consommation de gastéropodes terrestres. Cette spécificité dans la perception du risque de prédation doit constituer un avantage adaptatif certain pour des organismes aussi fragiles que les gastéropodes terrestres qui ne peuvent se permettre d'éviter chaque situation potentiellement à risque, à moins que l'information perçue ne provienne d'une menace pertinente (Lima and Bednekoff 1999). On comprend donc bien que l'éventuel recours au lâcher de carabes pour contrôler les populations de limaces (Symondson 1994), ne peut être pleinement efficace que s'il implique l'utilisation des prédateurs réellement considérés comme significatifs par les espèces cibles. Cette nécessité devient particulièrement complexe à gérer lorsqu'on s'intéresse à des espèces invasives, dont on prétend contrôler la pullulation hors de leur écosystème d'origine. Une stratégie évidente, naïve et dangereuse, mais malheureusement utilisée par l'homme, à de multiples reprises, est l'introduction de prédateurs originaires du même biotope que l'espèce qu'on prétend combattre. Or, si cette méthode de lutte biologique, dite « classique » (Eilenberg et al. 2001), peut enregistrer des succès, elle peut aussi s'avérer catastrophique dans certaines situations. L'espèce volontairement introduite devenant elle-même invasive et provoquant des bouleversements des écosystèmes bien plus conséquents que le mal qu'elle était supposée combattre (Cox 2004). Nos observations sur la réponse comportementale de *X. derbentina*, une espèce invasive typique, exposée aux sémiochimiques émis par *C. morbillosus*, constituent une bonne illustration du concept d'archétype de prédateur exposé par Cox and Lima (2006). Ces deux espèces ont évolué dans des zones géographiques différentes, mais dans des biotopes comparables. Or, il s'avère que l'escargot exposé aux sémiochimiques de ce carabe, présente des modifications comportementales typiques des stratégies de protection contre les prédateurs, chez les gastéropodes mis en présence des sémiochimiques de leurs prédateurs. Ainsi, il pourrait être avantageux de rechercher dans la faune de la zone géographique envahie par une espèce donnée, des prédateurs pertinents. Le recours à des tests visant à étudier les réponses des espèces invasives concernées, en présence des sémiochimiques provenant de ces prédateurs, permettrait de définir une liste d'archétypes de prédateurs de ces espèces invasives. Il deviendrait alors possible de recourir à des espèces indigènes répondant à ces critères, plutôt que d'introduire directement des espèce(s) compétitrice(s) exotique(s) dans un nouvel écosystème.

Mais le développement de nouveaux produits ou méthodes basés sur les résultats de notre travail, implique la réalisation de nouvelles étapes de recherche. Tout d'abord, il est nécessaire d'élucider la composition des sémiochimiques impliqués dans les réponses d'évitement observées. Afin de faciliter l'identification des espèces chimiques pertinentes, il est nécessaire de constituer une banque d'extraits cuticulaires de bonne qualité, ce qui implique de disposer d'insectes dont la cuticule ne s'est pas chargée d'une multitude de composés odorants rencontrés au cours des déplacements de l'insecte. Cette condition est plus facilement réalisée lorsqu'il est possible de disposer d'insectes nés et maintenus en élevage avec un régime alimentaire standardisé. Il convient aussi de disposer d'individus des deux sexes, de représentants d'espèces spécialisées ou généralistes, mais aussi de Carabidés non-prédateurs comme *Zabrus* (un phytophage), afin de constituer des extraits témoins. Afin d'éviter le risque de ne pas identifier des composants très volatiles, présents à la surface de la cuticule, l'utilisation de méthodes de piégeage sur carboglace ou sur polymères, pourrait s'avérer intéressant.

Ces travaux d'identification chimique doivent permettre de préciser les modalités de perception employées par ces deux espèces de gastéropodes. Il est notamment important de déterminer si elles détectent ces sémiochimiques à distance ou par contact. Des tests non-invasifs (observation des comportements en situation contrôlée), devront être complétés par des procédures invasives, parmi lesquelles l'électrophysiologie constituera un élément essentiel.

Les informations ainsi obtenues permettront alors de développer des analogues structuraux des sémiochimiques identifiés, afin de mettre au point des produits utilisables en agriculture. Les tests établis durant notre travail de thèse serviront de base pour la mise au point des procédures de screening à l'aide des prototypes réalisés. Ces étapes préliminaires permettront la réalisation de tests en situation réelle, au cours desquels l'impact des produits utilisés, sur les écosystèmes environnants, sera étudié.

La mise au point de méthodes de lutte utilisant les sémiochimiques est une étape probablement déterminante dans le remplacement des méthodes de lutte chimique au moyen de produits toxiques. De telles méthodes emploieront des moyens ressemblant à ceux des méthodes conventionnelles (des produits chimiques épandus dans les cultures), mais

dépourvus de leurs effets toxiques directs et agissant sur les dynamiques de populations (répartition, expansion), plutôt que par le biais de la destruction d'une partie de ces écosystèmes. L'acceptabilité de telles stratégies, rappelant des modes d'utilisation déjà connus, sera plus grande. Ce bénéfice indirect du développement de méthodes de lutte sémiochimiques est susceptible de jouer un rôle essentiel, en limitant la portée des changements nécessaires des pratiques agricoles.

BIBLIOGRAPHIE

Acquistapace P, Hazlett BA, Gherardi F (2003) Unsuccessful predation and learning of predator cues by crayfish. J Crustac Biol 23:364–370

Agelopoulos NG, Birkett MA, Hick AJ, et al (1999) Exploiting semiochemicals in insect control. Pestic Sci 55:225–235

Airey WJ (1987) Laboratory studies on damage to potato tubers by slugs. J Molluscan Stud 53:97–104

Ajadi AR, Gazal OS, Otesile EB, Kasali OB (2013) Evaluation of glucosamine and snail mucin on the progression of experimental knee osteoarthritis in dogs. Int J Morphol 31:280–286

Aktipis SW, Giribet G, Lindberg DR, Ponder WF (2008) Gastropoda: an overview and analysis. In: Ponder WF, Lindberg DR (eds) Phylogeny and evolution of the Mollusca. University of California Press, Berkeley, pp 201–238

Allen RT (1979) The occurrence and importance of ground beetles in agricultural and surrounding habitats. In: Erwin TL, Ball GE, Whitehead DR (eds) Carabid beetles: their evolution, natural history and classification. Proceedings of the First International Symposium of Carabidology. Junk Publishers, The Hague, pp 485–506

Amiri-Besheli B (2009) Toxicity appraisement of methaldehyde, ferricol®, snail repellent tape® and sabzarang ® (snail repellent paint) on land snails (*Xeropicta derbentina*), (*Xeropicta krynickii*). African J Biotechnol 8:5337–5342

Anderson RC (2000a) Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission, 2nd edn. CABI Publishing, Wallingford

Anderson RC (2000b) The superfamily Metastrongyloidea. In: Anderson RC (ed) Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission, 2nd edn. CABI Publishing, Wallingford, pp 129–230

Andújar C, Gómez-Zurita J, Rasplus J-Y, Serrano J (2012) Molecular systematics and evolution of the subgenus *Mesocarabus* Thomson, 1875 (Coleoptera: Carabidae: *Carabus*), based on mitochondrial and nuclear DNA. Zool J Linn Soc 166:787–804

Apfelbach R, Blanchard CD, Blanchard RJ, et al (2005) The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. Neurosci Biobehav Rev 29:1123–1144

Arad Z, Avivi TR (1998) Ontogeny of resistance to desiccation in the bush-dwelling snail *Theba pisana* (Helicidae). J Zool 244:515–526

Armajo BJ, Sura MS (2012) Effects of predator chemical cues on snail behavior. Pract F Biol BIOS 35502:1–7

Armsworth CG, Bohan DA, Powers SJ, et al (2005) Behavioural responses by slugs to chemicals from a generalist predator. Anim Behav 69:805–811

Assmann T (2003) Biology and ecology. In: Turin H, Penev L, Casale A (eds) The genus *Carabus* in Europe. A synthesis. Pensoft Publishers, Sofia-Moscow & European Invertebrate Survey, Leiden, pp 287–306

Aubry S, Labaune C, Magnin F, et al (2006) Active and passive dispersal of an invading land snail in Mediterranean France. J Anim Ecol 75:802–813

Aubry S, Labaune C, Magnin F, Kiss L (2005) Habitat and integration within indigenous communities of *Xeropicta derbentina* (Gastropoda: Hygromiidae) a recently introduced

land snail in south-eastern France. Divers Distrib 11:539–547

Ayre K (1995) Evaluation of carabids as predators of slugs in arable land. Thesis, University of Newcastle Upon Tyne

Ayre K (2001) Effect of predator size and temperature on the predation of *Deroceras reticulatum* (Müller) (Mollusca) by carabid beetles. J Appl Entomol 125:389–395

Bailey SER (1989) Foraging behaviour of terrestrial gastropods: integrating field and laboratory studies. J Molluscan Stud 55:263–272

Bailey SER (2002) Molluscicidal baits for control of terrestrial gastropods. In: Barker GM (ed) Molluscs as Crop Pests. CABI Publishing, Wallingford, pp 33–54

Bailey SER, Wedgwood MA (1991) Complementary video and acoustic recordings of foraging by two pest species of slugs on non-toxic and molluscicidal baits. Ann Appl Biol 119:163–176

Barker GM (2001a) Gastropods on land: land phylogeny, diversity and adaptive morphology. In: Barker GM (ed) The biology of terrestrial molluscs. CABI Publishing, Wallingford, pp 1–146

Barker GM (2001b) The biology of terrestrial molluscs. CABI Publishing, Wallingford

Barker GM (2002a) Molluscs as crop pests. CABI Publishing, Wallingford

Barker GM (2004) Natural enemies of terrestrial gastropods. CABI Publishing, Wallingford

Barker GM (2002b) Gastropods as pests in New Zealand pastoral agriculture, with emphasis on Agriolimacidae, Arionidae and Milacidae. In: Barker GM (ed) Molluscs as crop pests. CABI Publishing, Wallingford, pp 361–424

Barnett EA, Fletcher MR, Hunter K, Sharp EA (2003) Pesticide poisoning of animals 2003. York

Bennet MF (1974) Living clocks in the animal world. Charles C. Thomas, Springfield

Berny P, Caloni F, Croubels S, et al (2010) Animal poisoning in Europe. Part 2: Companion animals. Vet J 183:255–259

Bett JA (1960) The breeding seasons of slugs in garden. Proc Zool Soc London 135:559–568

Bieler R (1992) Gastropod phylogeny and systematics. Annu Rev Ecol Syst 23:311–338

Bobkova M V., Gál J, Zhukov V V., et al (2004a) Variations in the retinal designs of pulmonate snails (Mollusca, Gastropoda): squaring phylogenetic background and ecophysiological needs (I). Invertebr Biol 123:101–115

Bobkova M V., Tartakovskaya OS, Borissenko SL, et al (2004b) Restoration of morphological and functional integrity in the regenerating eye of the giant African land snail *Achatina fulica*. Acta Zool 85:1–14

Bonavita A (1965) Révision et étude écologique des Helicellines de Provence. Université de Provence, Marseille

Bonnemain B (2005) *Helix* and drugs: snails for western health care from antiquity to the present. Evidence-based Complement Altern Med 2:25–28

Booze F, Oehme FW (1986) An investigation of metaldehyde and acetaldehyde toxicities in dogs. Fundam Appl Toxicol 6:440–446

Bouchet P (2007) Inventorying the molluscan fauna of the world: how far to go? In: Jordaens

K, Houtte N Van, Goethem J Van, Backeljau T (eds) Abstracts of the World Congress of Malacology. Unitas Malacologica, Antwerp, pp 24–25

Bourne NB, Jones GW, Bowen ID (1988) Slug feeding behaviour in relation to control with molluscicidal baits. J Molluscan Stud 54:327–338

Bourne NB, Jones GW, Bowen ID (1990) Feeding behaviour and mortality of the slug *Deroceras reticulatum*, in relation to control with molluscicidal baits containing various combinations of metaldehyde with methiocarb. Ann Appl Biol 117:455–468

Brandmayr P, Brandmayr TZ (1986) Food feeding behavior *Licinus* species coleoptera carabidae Licinini. Monit Zool Ital 20:171–181

Březina B (1999) World Catalogue of the Genus *Carabus* L. (Coleoptera, Carabidae). Publishers, Pensoft, Sofia-Moscow

Brooks AS, Cook MJ (2003) The use of molluscicides in UK agriculture and their effects on non-target organisms.

Brooks AS, Wilcox A, Cook RT, et al (2006) The use of an alternative food source (red clover) as a means of reducing slug pest damage to winter wheat: towards field implementation. Pest Manag Sci 62:252–262

Brown GE, Chivers DP (2005) Learning as an adaptive response to predation. In: Barbosa P, Castellanos I (eds) Ecology of Predator-Prey Interactions. Oxford University Press, Inc., Oxford, pp 34–54

Bucciarelli GM, Kats LB (2015) Effects of newt chemical cues on the distribution and foraging behavior of stream macroinvertebrates. Hydrobiologia 749:69–81

Bursztyka P, Saffray D, Lafont-Lecuelle C, et al (2013) Chemical compounds related to the predation risk posed by malacophagous ground beetles alter self-maintenance behavior of naive slugs (*Deroceras reticulatum*). PLoS One 8:e79361

Cai F, Wu Z, He N, et al (2011) Can native species crucian carp *Carassius auratus* recognizes the introduced red swamp crayfish *Procambarus clarkii*? Curr Zool 57:330–339

Camard A, Leplat J (2004) Hybrides du genre *Carabus*. Magellanes, Conflans Sainte Honorine

Cates RG, Orians GH (1975) Sucessional status and the palatability of plants to generalized herbivores. Ecology 56:410–418

Chase R (2002a) The Gastropods. In: Chase R (ed) Behavior and its neural control in gastropod molluscs. Oxford University Press, Inc., Oxford, pp 3–16

Chase R (1986) Lessons from snail tentacles. Chem Senses 11:411–426

Chase R (2002b) Sensory systems. In: Chase R (ed) Behavior and its neural control in gastropod molluscs. Oxford University Press, Oxford, pp 34–52

Chase R (2001) Sensory organs and the nervous system. In: Barker GM (ed) The biology of terrestrial molluscs. CABI Publishing, Hamilton, pp 179–212

Chase R, Boulanger CM (1978) Attraction of the snail Achatina fulica to extracts of conspecific pedal glands. Behav Biol 23:107–111

Chase R, Croll RP (1981) Tentacular function in snail olfactory orientation. J Comp Physiol A Neuroethol Sensory, Neural, Behav Physiol 143:357–362

Chase R, Tolloczko B (1993) Tracing neural pathways in snail olfaction: From the tip of the

tentacles to the brain and beyond. Microsc Res Tech 24:214–230

Chase R, Tolloczko B (1986) Synaptic glomeruli in the olfactory system of a snail, *Achatina fulica*. Cell Tissue Res 246:567–573

Christian DG, Bacon ETG, Brockie D, et al (1999) Interactions of straw disposal methods and direct drilling or cultivations on winter wheat (Triticum aestivum) grown on a clay soil. J Agric Eng Res 73:297–309

Clerx JPM, Gittenberger E (1977) Einiges über *Cernuella* (Pulmonata, Helicidae). Zool Meded 52:27–56

Cook A (1994) Trail following in slugs: the stimulus, its reception and the behavioural response. Ethol Ecol Evol 6:55–64

Cook A (2001) Behavioural ecology: on doing the right thing, in the right place at the right time. In: Barker GM (ed) The biology of terrestrial molluscs. CABI Publishing, Wallingford, pp 447–487

Cook A (1979) Homing by the slug *Limax pseudoflavus*. Anim Behav 27:545–552

Corfield GS, Connor LM, Swindells KL, et al (2008) Intussusception following methiocarb toxicity in three dogs. J Vet Emerg Crit Care 18:68–74

Cowie RH (1992) Evolution and extinction of Partulidae, endemic Pacific island land snails. Philos Trans R Soc B Biol Sci 335:167–191

Cowie RH, Hayes KA, Tran CT, Meyer WM (2008) The horticultural industry as a vector of alien snails and slugs: widespread invasions in Hawaii. Int J Pest Manag 54:267–276

Cox GW (2004) Alien species and evolution - The evolutionary ecology of exotic plants, animals, microbes, and interacting native species. Island Press, Washington

Cox JG, Lima SL (2006) Naiveté and an aquatic-terrestrial dichotomy in the effects of introduced predators. Trends Ecol Evol 21:674–80

Croll RP (1983) Gastropod chemoreception. Biol Rev 58:293–319

Crowell HH (1977) Chemical control of terrestrial slugs and snails. Corvallis, Or.: Agricultural Experiment Station. Oregon State University.

Cuttelod A, Seddon M, Neubert E (2011) European red list of non-marine molluscs. Publications Office of the European Union, Luxembourg

Dainton BH (1954) The activity of slugs. I. The induction of activity by changing temperatures. J Exp Biol 31:165–187

Dalesman S, Rundle SD, Cotton PA (2007) Predator regime influences innate anti-predator behaviour in the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. Freshw Biol 52:2134–2140

Däumer C, Greve C, Hutterer R, et al (2012) Phylogeography of an invasive land snail: natural range expansion versus anthropogenic dispersal in *Theba pisana pisana*. Biol Invasions 14:1665–1682

Davis AJ (1989) Effects of soil compaction on damage to wheat seeds by three pest species of slug. Crop Prot 8:118–121

Dawkins G, Hislop J, Luxton M, Bishop C (1986) Transmission of bacterial soft rot of potatoes by slugs. J Molluscan Stud 52:25–29

Dawkins G, Luxton M, Bishop C (1985) Transmission of liquorice rot of carrots by slugs. J Molluscan Stud 51:83

Dayrat B, Tillier S (2002) Evolutionary relationships of euthyneuran gastropods (Mollusca): A cladistic re-evaluation of morphological characters. Zool J Linn Soc 135:403–470

Deuve T, Cruaud A, Genson G, Rasplus J-Y (2012) Molecular systematics and evolutionary history of the genus *Carabus* (Col. Carabidae). Mol Phylogenet Evol 65:259–75

Deyrup-Olsen I, Martin AW (1982) Surface exudation in terrestrial slugs. Comp Biochem Physiol Part C Comp Pharmacol 72:45–51

Dickman CR, Doncaster CP (1984) Responses of small mammals to red fox (*Vulpes vulpes*) odour. J Zool 204:521–531

Dieterich A, Fischbach U, Ludwig M, et al (2012) Daily and seasonal changes in heat exposure and the Hsp70 level of individuals from a field population of *Xeropicta derbentina* (Krynicki 1836) (Pulmonata, Hygromiidae) in Southern France. Cell Stress Chaperones 18:405–414

Digweed SC (1994) Detection of mucus-producing prey by *Carabus nemoralis* Mueller and *Scaphinotus marginatus* Fischer (Coleoptera: Carabidae). Coleopt Bull 48:361–369

Dinapoli A (2009) Phylogeny and Evolution of the Heterobranchia (Mollusca, Gastropoda).

Dinapoli A, Klussmann-Kolb A (2010) The long way to diversity--phylogeny and evolution of the Heterobranchia (Mollusca: Gastropoda). Mol Phylogenet Evol 55:60–76

Dmitrieva EF (1969) Population dynamics of growth, feeding and reproduction of the field slug. Zool Zhurnal 48:802–810

du Chatenet G (2005) Coléoptères d'Europe. Volume I, Adephaga: carabes, carabiques et dytiques. N.A.P. Edition, Rodez

Duval DM (1970) Some aspects of the behaviour of pest species of slugs. J Conchol 27:163–170

Edwards CA, Arancon NQ, Vasko-Bennett M, et al (2009) The relative toxicity of metaldehyde and iron phosphate-based molluscicides to earthworms. Crop Prot 28:289–294

Eilenberg J, Hajek A, Lomer C (2001) Suggestions for unifying the terminology in biological control. BioControl 46:387–400

Eisthen HL (2002) Why are olfactory systems of different animals so similar? Brain Behav Evol 59:273–293

Ellis MA, Funt RC, Wright S, et al (2006) Midwest Strawberry Production Guide. The Ohio State University Extension Services, Columbus

Emden H van (2002) Integrated pest management. In: Pimentel D (ed) Encyclopedia of Pest Management, Volume 1. CRC Press, New York, pp 413–415

Emery DG (1992) Fine structure of olfactory epithelia of gastropod molluscs. Microsc Res Tech 22:307–324

Farkas SR, Shorey HH (1976) Anemotaxis and odour trail following by the terrestrial snail Helix aspersa. Anim Behav 24:686–689

Fedonkin M a., Waggoner BM (1997) The Late Precambrian fossil Kimberella is a mollusc-like bilaterian organism. Nature 388:868–871

Ferner MC, Smee DL, Chang YP (2005) Cannibalistic crabs respond to the scent of injured conspecifics: Danger or dinner? Mar Ecol Prog Ser 300:193–200

Ferrari MCO, Brown GE, Jackson CD, et al (2010a) Differential retention of predator recognition by juvenile rainbow trout. Behaviour 147:1791–1802

Ferrari MCO, Capitania-Kwok T, Chivers DP (2006) The role of learning in the acquisition of threat-sensitive responses to predator odours. Behav Ecol Sociobiol 60:522–527

Ferrari MCO, Wisenden BD, Chivers DP (2010b) Chemical ecology of predator-prey interactions in aquatic ecosystems: a review and prospectus. Can J Zool 88:698–724

Flint ML, Bosch R van den (1981) Man, pests, and the evolution of IPM: an introduction. In: Flint ML, Bosch R van den (eds) Introduction to integrated pest management. Plenum Press, New York, pp 1–7

Frank T (1998) Slug damage and number of slugs (Gastropoda: Pulmonata) in winter wheat in fields with sown wildflower strips. J Molluscan Stud 64:319–328

Friedrich A, Teyke T (1998) Identification of stimuli and input pathways mediating food-attraction conditioning in the snail, Helix. J Comp Physiol - A Sensory, Neural, Behav Physiol 183:247–254

Frýda J, Nützel A, Wagner PJ (2008) Paleozoic Gastropoda. In: Ponder FW, Lindberg DR (eds) Phylogeny and evolution of the Mollusca. University of California Press, Berkeley, pp 239–270

Garraway R (1992) The action of semiochemicals on olfactory nerve activity and behaviour of Deroceras reticulatum (Müll.). Portsmouth Polytechnic

Garthwaite DG, Thomas MR (1996) The usage of molluscicides in agriculture and horticulture in Great Britain over the last 30 years. In: Henderson IF (ed) Slug and Snail Pests in Agriculture. British Crop Protection Council, Canterbury, pp 39–46

Gelperin A (1974) Olfactory basis of homing behavior in the giant garden slug, *Limax maximus*. Proc Natl Acad Sci 71:966–970

Gervais R, Kleinfeld D, Delaney KR, Gelperin A (1996) Central and reflex neuronal responses elicited by odor in a terrestrial mollusk. J Neurophysiol 76:1327–1339

Giglio A, Brandmayr P, Talarico FF, Brandmayr TZ (2011) Current knowledge on exocrine glands in carabid beetles: structure, function and chemical compounds. Zookeys 201:193–201

Gimingham CT (1940) Some recent contributions by english workers to the development of methods of insect control. Ann Appl Biol 27:161–175

Gimingham CT, Newton HCF (1937) A poison bait for slugs. J Minist Agric 3:242–246

Giusti F, Andreini S (1988) Morphological and ethological aspects of mating in two species of the family Helicidae (Gastropoda Pulmonata): Theba pisana (Mueller) and Helix aparta Born. Monit Zool Ital 22:331–364

Glen DM (2000) The effects of cultural measures on cereal pests and their role in integrated pest management. Integr Pest Manag Rev 5:25–40

Glen DM, Jones H, Fieldsend JK (1990) Damage to oilseed rape seedlings by the field slug *Deroceras reticulatum* in relation to glucosinolate concentration. Ann Appl Biol 117:197–

201

Glen DM, Milsom NF, Wiltshire CW (1989) Effects of seed bed conditions on slug numbers and damage to winter wheat in a clay soil. Ann Appl Biol 115:117–190

Glen DM, Spaull AM, Mowat DJ, et al (1993) Crop monitoring to assess the risk of slug damage to winter wheat in the United Kingdom. Ann Appl Biol 122:161–172

Glen DM, Wilson MJ, Hughes LA, et al (1996) Exploring and exploiting the potential of the rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* as a biocontrol agent for slugs. In: Henderson IF (ed) Slug and Snail Pests in Agriculture. University of Kent, Canterbury, pp 271–280

Grande C, Templado J, Zardoya R (2008) Evolution of gastropod mitochondrial genome arrangements. BMC Evol Biol 8:15

Grant JF, Yeargan K V., Pass BC, Parr JC (1982) Invertebrate organisms associated with alfalfa seedling loss in complete-tillage and no-tillage plantings. J Econ Entomol 75:822–826

Greig-Smith PW (1991) The boxworth experience: effects of pesticides on the fauna and flora of cereal fields. In: Firbank LG, Carter N, Derbyshire JF, Potts GR (eds) The Ecology of Temperate Cereal Fields. Blackwell Scientfic Publications, Oxford, pp 333–371

Greve C, Hutterer R, Groh K, et al (2010) Evolutionary diversification of the genus *Theba* (Gastropoda: Helicidae) in space and time: a land snail conquering islands and continents. Mol Phylogenet Evol 57:572–584

Grewal PS, Grewal SK, Taylor RAJ, Hammond RB (2001) Application of molluscicidal nematodes to slug shelters: a novel approach to economic biological control of slugs. Biol Control 22:72–80

Guy AG, Bohan DA, Powers SJ, Reynolds AM (2008) Avoidance of conspecific odour by carabid beetles: a mechanism for the emergence of scale-free searching patterns. Anim Behav 76:585–591

Hammond RB (1985) Slugs as a new pest of soybeans. J Kansas Entomol Soc 58:364–366

Hammond RB, Beck T, Smith JA, et al (1999) Slugs in conservation tillage corn and soybeans in the eastern corn belt. J Entomol Sci 34:467–478

Harasewych MG (2002) Pleurotomarioidean gastropods. Adv Mar Biol 42:237–294

Hasan S, Vago C (1966) Transmission of *Alternaria brassicicola* by slugs. Plant Dis Report 50:764–767

Hass B, Hughes LA, Glen DM (1999) Overall versus band application of the nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* with and without incorporation into soil, for biological control of slugs in winter wheat. Biocontrol Sci Technol 9:579–586

Haszprunar G (1988) On the origin and evolution of major gastropods group, with special reference to the streptoneura. J Molluscan Stud 54:367–441

Haszprunar G, Schander C, Halanych KM (2008) Relationships of higher molluscan taxa. In: Ponder WF, Lindberg DR (eds) Phylogeny and evolution of the Mollusca. University of California Press, Berkeley, pp 19–32

Hata TY, Hara AH, Hu BK-S (1997) Molluscicides and mechanical barriers against slugs, *Vaginula plebeia* Fischer and *Veronicella cubensis* (Pfeiffer) (Stylommatophora:

Veronicellidae). Crop Prot 16:501–506

Hatteland BA (2010) Predation by carabid beetles (Coleoptera, Carabidae) on the invasive Iberian slug *Arion lusitanicus*. University of Bergen

Hatziioannou M, Eleutheriadis N, Lazaridou- Dimitriadou M (1994) Food preferences and dietary overlap by terrestrial snails in Logos area (Edessa, Macedonia, Northern Greece). J Molluscan Stud 60:331–341

Heller J (2001) Life history strategies. In: Barker GM (ed) The biology of terrestrial molluscs. CABI Publishing, Wallingford, pp 413–445

Henderson IF, Triebskorn R (2002) Chemical control of terrestrial gastropods. In: Barker GM (ed) Molluscs as crop pests. CABI Publishing, Wallingford, pp 1–31

Hommay G, Lorvelec O, Jacky F (1998) Daily activity rhythm and use of shelter in the slugs *Deroceras reticulation* and *Arion distinctus* under laboratory conditions. Ann Appl Biol 132:167–185

Hoso M, Hori M (2008) Divergent shell shape as an antipredator adaptation in tropical land snails. Am Nat 172:726–732

Houston A, McNamara JM, Hutchinson JMC (1993) General results concerning the trade-off between gaining energy and a voiding predation. Philos Trans Biol Sci 341:375–397

Howes NH, Wells GP (1934) The water relations of snails and slugs II. Weight rhythms in *Arion ater* and *Limax flavus* L. J Exp Biol 11:344–351

Howlett SA (2012) Terrestrial slug problems: classical biological control and beyond. CAB Rev Perspect Agric Vet Sci Nutr Nat Resour 7:10

Howlett SA (2005) The biology, behaviour and control of the field slug *Deroceras reticulatum* (Müller). The University of Newcastle upon Tyne

Howling GG (1990) The foraging and feeding behaviour of pest slugs with reference to control in the field. University of Newcastle upon Tyne

Howse PE, Stevens IDR, Jones OT (1998) Insect pheromones and their use in pest management. Springer Netherlands, Salisbury

Hugie DM (2003) The waiting game: a “battle of waits” between predator and prey. Behav Ecol 14:807–817

Hunter PJ, Symonds B V. (1971) The leap-frogging slug. Nature 229:349–349

Irikov A, Gerdzhikov G (2013) Mollusca (terrestrial and marine Gastropods et Bivalvia) from Morocco. ZooNotes 50:1–5

Ito I, Nakamura H, Kimura T, et al (2000) Neuronal components of the superior and inferior tentacles in the terrestrial slug, *Limax marginatus*. Neurosci Res 37:191–200

Ito T, Pilat ML, Suzuki R, Arita T (2013) Coevolutionary dynamics caused by asymmetries in predator-prey and morphology-behavior relationships. Adv Artif Life 439–445

Jackson AL, Beauchamp G, Broom M, Ruxton GD (2006) Evolution of anti-predator traits in response to a flexible targeting strategy by predators. Proc Biol Sci 273:1055–1062

Jacobsen HP, Stabell OB (2004) Antipredator behaviour mediated by chemical cues: the role of conspecific alarm signalling and predator labelling in the avoidance response of a marine gastropod. Oikos 104:43–50

Johannesen A, Dunn AM, Morrell LJ (2014) Prey aggregation is an effective olfactory predator avoidance strategy. PeerJ 2:16

Jörger KM, Stöger I, Kano Y, et al (2010) On the origin of Acochlidia and other enigmatic euthyneuran gastropods, with implications for the systematics of Heterobranchia. BMC Evol Biol 10:20

Kats LB, Dill LM (1998) The scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animals. Ecoscience 5:361–394

Keiser A, Häberli M, Stamp P (2012) Quality deficiencies on potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers caused by *Rhizoctonia solani*, wireworms (*Agriotes ssp.*) and slugs (*Deroceras reticulatum*, *Arion hortensis*) in different farming systems. F Crop Res 128:147–155

Kelly JR, Martin TJ (1989) Twenty one years experience with methiocarb bait. In: Henderson IF (ed) BCPC Mono. No. 41 Slugs and Snails in World Agriculture. .F. British Crop Protection Council, Thornton Heath, pp 131–145

Kerkut GA, Taylor BJR (1956) The sensitivity of the pedal ganglion of the slug to osmotic pressure changes. J Exp Biol 33:493–501

Kerney MP, Cameron RAD (2006) Guide des escargots et limaces d'Europe. Delachaux et Niestlé, Paris

Khan ZR, Pickett JA (2004) The "push–pull" strategy for stemborer management: a case study in exploiting biodiversity and chemical ecology. In: Gurr GM, Wratten SD, Altieri MA (eds) Ecological engineering for pest management: advances in habitat manipulation for arthropods. CSIRO Publishing, Collingwood, pp 155–164

Kimura T, Toda S, Sekiguchi T, Kirino Y (1998) Behavioral modulation induced by food odor aversive conditioning and its influence on the olfactory responses of an oscillatory brain network in the slug *Limax marginatus*. Learn Mem 4:365–375

Kiss L, Labaune C, Magnin F, Aubry S (2005) Plasticity of the life cycle of *Xeropicta derbentina* (Krynicki, 1836), a recently introduced snail in Mediterranean France. J Molluscan Stud 71:221–231

Kittel R (1956) Untersuchungen über den Geruchs und Geschmackssin bei den Gattungen *Arion* und *Limax* (Mollusca: Pulmonata). Zool Anz 157:185–195

Kleinkauf A, MacDonald DW, Tattersall FH (1999) A bitter attempt to prevent non-target poisoning of small mammals. Mamm Rev 29:201–204

Kohn AJ (1961) Chemoreception in gastropod molluscs. Am Zool 1:291–308

Kotze DJ, Brandmayr P, Casale A, et al (2011) Forty years of carabid beetle research in Europe–from taxonomy, biology, ecology and population studies to bioindication, habitat assessment and conservation. Zookeys 148:55–148

Kozłowski J, Zielinska M, Pawłowska A, Kozłowska M (2006) Susceptibility of some vegetable species to feeding of *Cepaea hortensis* (Müller) and *Arion rufus* (Linnaeus). J Plant Prot Res 46:231–240

Krivan V (1998) Effects of optimal antipredator behavior of prey on predator-prey dynamics: the role of refuges. Theor Popul Biol 53:131–142

Kromp B (1999) Carabid beetles in sustainable agriculture: a review on pest control efficacy, cultivation impacts and enhancement. Agric Ecosyst Environ 74:187–228

Labaune C (2001) L'invasion de la région méditerranéenne française par l'escargot *Xeropicta derbentina*: mécanismes, conséquences écologiques et agronomiques. Université de Droit, d'Economie et des Sciences D'Aix-Marseille (Aix-Marseille III)

Labaune C, Magnin F (1999) Un escargot nouveau venu dans le Luberon et en Provence: *Xeropicta derbentina* (Krinicki, 1836). Courr Sci Du Parc Nat Régional Luberon 3:102–110

Lambion J (2007) Limaces et escargots en agriculture biologique : quelles alternatives au metaldehyde ? AFPP – 7e Conférence Iinternationale sur les ravageurs en culture Montpellier – 26 et 27 octobre 2005. Montpellier, p 8

Land MF (1968) Functional aspects of the optical and retinal organization of the mollusc eye. Symp Zool Soc London 23:75–96

Langan AM, Shaw EM (2006) Responses of the earthworm *Lumbricus terrestris* (L.) to iron phosphate and metaldehyde slug pellet formulations. Appl Soil Ecol 34:184–189

Lawrence BJ, Smith RJF (1989) Behavioral response of solitary fathead minnows, *Pimephales promelas*, to alarm substance. J Chem Ecol 15:209–219

Lefcort H, Ben-Ami F, Heller J (2006) Terrestrial snails use predator-diet to assess danger. J Ethol 24:97–102

Lewis DB, Magnuson JJ (1999) Intraspecific gastropod shell strength variation among north temperate lakes. Can J Fish Aquat Sci 56:1687–1695

Lewis RD (1969) Studies on the locomotor activity of the slug *Arion ater* (Linnaeus) I. Humidity, Temperatur and Light reactions. Malacologia 7:295–306

Lima SL (1998a) Nonlethal effects in the ecology of predator-prey interactions: What are the ecological effects of anti-predator decision-making? Bioscience 48:25–34

Lima SL (1998b) Stress and decision making under the risk of predation: recent developments from behavioral, reproductive, and ecological perspectives. In: Møller AP, Milinski M, Slater PJB (eds) Advances in the Study of Behavior. Elsevier, pp 215–290

Lima SL, Bednekoff PA (1999) Temporal variation in danger drives antipredator behavior : the predation risk allocation hypothesis. Am Nat 153:649–659

Lima SL, Dill LM (1990) Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. Can J Zool 68:619–640

Linse K, Griffiths HJ, Barnes DKA, Clarke A (2006) Biodiversity and biogeography of Antarctic and sub-Antarctic mollusca. Deep Res Part II Top Stud Oceanogr 53:985–1008

Lydeard C, Cowie RH, Ponder WF, et al (2004) The global decline of nonmarine mollusks. Bioscience 54:321–330

Lyth M (1983) Water contents of slugs (Gastropoda: Pulmonata) in natural habitats and the influence of culture conditions on water content stability in *Arion ater* Linné. J Molluscan Stud 49:179–184

Mathis A (2003) Use of chemical cues in detection of conspecific predators and prey by newts, *Notophthalmus viridescens*. Chemoecology 13:193–197

McCrone EJ, Minnen J van, Sokolove PG (1981) Slug reproductive maturation hormone: In vivo evidence for long-day stimulation of secretion from brains and cerebral ganglia. J Comp Physiol A Neuroethol Sensory, Neural, Behav Physiol 143:311–315

McKemey AR, Symondson WOC, Glen DM (2003) Predation and prey size choice by the carabid beetle *Pterostichus melanarius* (Coleoptera: Carabidae): the dangers of extrapolating from laboratory to field. Bull Entomol Res 93:227–234

Meier U (2001) Stades phénologiques des mono- et dicotylédones cultivées - BBCH Monographie.

Mellanby K (1961) Slugs at low temperatures. Nature 189:944–944

Moens R, Glen DM (2002) Agriolimacidae, Arionidae and Milacidae as Pests in West European Oilseed Rape. In: Barker GM (ed) Molluscs as Crop Pests. CABI Publishing, Wallingford, pp 425–439

Moore BP, Wallbank BE (1968) Chemical composition of the defensive secretion in carabid beetles and its importance as a taxonomic character. Proc R Entomol Soc London Ser B, Taxon 37:62–72

Mordan PB, Wade C (2008) Heterobranchia II: the Pulmonata. In: Ponder FW, Lindberg DR (eds) Phylogeny and evolution of the Mollusca. University of California Press, Berkeley, pp 409–426

Murdoch WW, Chesson J, Chesson PL (1985) Biological control in theory and practice. Am Nat 125:344–366

Mutze GJ, Hubbard DJ (2000) Effects of molluscicide baits on field populations of house mice. Agric Ecosyst Environ 80:205–211

Nash MA, Thomson LJ, Hoffmann AA (2007) Slug control in Australian canola: monitoring, molluscicidal baits and economic thresholds. Pest Manag Sci 63:851–859

Navarro-Silva MA, Marques FA, Duque L JE (2009) Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. Rev Bras Entomol 53:1–6

Newell PF (1966) The nocturnal behaviour of slugs. Med Biol Illus 16:146–159

Newell PF (1965a) Time lapse ciné recording the soil surface activity of slugs. Anim Behav 13:583

Newell PF (1965b) The behaviour and distribution of slugs. University of London

Newell PF, Newell GE (1968) The eye of the slug, *Agriolimax reticulatus* (Müller). Symp Zool Soc London 23:97–111

Ng TPT, Saltin SH, Davies MS, et al (2013) Snails and their trails: the multiple functions of trail-following in gastropods. Biol Rev 88:683–700

Nilsson D-E, Pelger S (1994) A pessimistic estimate of the time required for an eye to evolve. Proc R Soc London B 256:53–58

Nordlund DA (1996) Biological control, integrated pest management and conceptual models. Biocontrol news Inf 17–35

Orr M V., El-Bekai M, Lui M, et al (2007) Predator detection in *Lymnaea stagnalis*. J Exp Biol 210:4150–4158

Pakarinen E (1994a) Autotomy in Arionid and Limacid slugs. J Molluscan Stud 60:19–23

Pakarinen E (1994b) The importance of mucus as a defence against carabid beetles by the slugs *Arion fasciatus* and *Deroceras reticulatum*. J Molluscan Stud 60:149–155

Pandey VS, Cabaret J, Fikri A (1984) The effect of strategic anthelmintic treatment on the breeding performance and survival of ewes naturally infected with gastro-intestinal strongyles and protostrongylids. Ann Rech Vet 15:491–496

Paraud C, Cabaret J, Pors I, Chartier C (2005) Impact of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Muellerius capillaris* larvae in goat faeces. Vet Parasitol 131:71–8

Patel Z, Gill AC, Fox MT, et al (2014) Molecular identification of novel intermediate host species of Angiostrongylus vasorum in Greater London. Parasitol Res 113:4363–4369

Ponder WF, Lindberg DR (2008) Molluscan evolution and phylogeny. In: Ponder WF, Lindberg DR (eds) Phylogeny and evolution of the Mollusca. University of California Press, Berkeley, pp 1–18

Ponder WF, Lindberg DR (1997) Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an analysis using morphological characters. Zool J Linn Soc 119:83–265

Port CH, Port GR (1986) The biology and behaviour of slugs in relation to crop damage and control. Agric Zool Rev 1:255–299

Port GR, Ester A (2002) Gastropods as pests in vegetables and ornamental crops in Western Europe. In: Barker GM (ed) Molluscs as crop pests. CABI Publishing, Wallingford, pp 337–352

Prior DJ (1985) Water-regulatory behaviour in terrestrial gastropods. Biol Rev Camb Philos Soc 60:403–424

Prystupa BD, Holliday NJ, Webster GRB (1987) Molluscicide efficacy against the marsh slug, *Deroceras laeve* (Stylommatophora, Limacidae), on strawberries in Manitoba. J Econ Entomol 80:936–943

Purvis G (1996) The hazard posed by methiocarb slug pellets to carabid beetles: Understanding population effects in the field. In: Henderson IF (ed) Slugs and Snails Pests in Agriculture. British Crop Protection, pp 189–196

Quensen III JF, Woodruff DS (1997) Associations between shell morphology and land crab predation in the land snail *Cerion*. Funct Ecol 11:464–471

Rae RG, Robertson JF, Wilson MJ (2009) Optimization of biological (*Phasmarhabditis hermaphrodita*) and chemical (iron phosphate and metaldehyde) slug control. Crop Prot 28:765–773

Rae RG, Verdun C, Grewal PS, et al (2007) Biological control of terrestrial molluscs using *Phasmarhabditis hermaphrodita*—progress and prospects. Pest Manag Sci 63:1153–1164

Redbond M (2003) Slugs and snails.

Regteren A Van (1960) On the occurrence of a species of *Xeropicta* in France. Basteria 24:21–26

Rollo CD (1991) Endogenous and exogneous regulation of activity in *Deroceras reticulatum*, a wheather-sensitive terrestrial slug. Malacologia 33:199–220

Rollo CD (1982) The regulation of activity in populations of the terrestrial slug *Limax maximus* (Gastropods: Limacidae). Res Popul Ecol 24:1–32

Rollo CD, Wellington WG (1977) Why slugs squabble. Nat Hist 86:46–51

Rollo CD, Wellington WG (1981) Environmental orientation by terrestrial Mollusca with particular reference to homing behaviour. Can J Zool 59:225–239

Rollo CD, Wellington WG (1979) Intra-and inter-specifie agonistic behavior among terrestrial slugs (Pulmonata: Stylommatophora). Can J Zool 57:846–855

Rose JH (1957) Observations on the larval stages of *Muellerius capillaris* within the intermediate hosts *Agriolimax agrestis* and *A. reticulatus*. J Helminthol 31:1–16

Ross JL, Ivanova ES, Severns PM, Wilson MJ (2009) The role of parasite release in invasion of the USA by European slugs. Biol Invasions 12:603–610

Rostás M, Wölfling M (2009) Caterpillar footprints as host location kairomones for *Cotesia marginiventris*: persistence and chemical nature. J Chem Ecol 35:20–7

Ruthensteiner B (1997) Homology of the pallial and pulmonary cavity of gastropods. J Molluscan Stud 63:353–367

Shirley MDF, Rushton SP, Young AG, Port GR (2001) Simulating the long-term dynamics of slug populations: a process-based modelling approach for pest control. J Appl Ecol 38:401–411

Shore RF, Feber RE, Firbank LG, et al (1997) The impacts of molluscicide pellets on spring and autumn populations of woodmice *Apodemus sylvaticus*. Agric Ecosyst Environ 64:211–217

Sigwart JD, Sutton MD (2007) Deep molluscan phylogeny: synthesis of palaeontological and neontological data. Proc Biol Sci 274:2413–2419

Sih A (1986) Antipredator responses and the perception of danger by mosquito larvae. Ecology 67:434–441

Sih A, Ziemba R, Harding KC (2000) New insights on how temporal variation in predation risk shapes prey behavior. Trends Ecol Evol 15:3–4

Sokolove PG, Beiswanger CM, Prior DJ, Gelperin A (1977) A circadian rhythm in the locomotive behaviour of the giant garden slug *Limax maximus*. J Exp Biol 66:47–64

South A (1992a) Terrestrial slugs. Biology, ecology and control. Chapman & Hall, London

South A (1992b) Behaviour. In: South A (ed) Terrestrial slugs. Biology, ecology and control. Chapman & Hall, London, pp 168–202

South A (1965) Biology and ecology of *Agriolimax reticulatus* (Mull.) and other slugs: spatial distribution. J Anim Ecol 34:403

South A (1974) Changes in composition of the terrestrial mollusc fauna. In: Hawksworth DL (ed) The Changing Flora and Fauna of Britain. Academic Press, London, pp 255–274

South A (1989) A Comparison of the life cycles of the slugs *Deroceras Reticulatum* (Müller) and *Arion Intermedius* Normand on permanent pasture. J Molluscan Stud 55:9–22

South A (1992c) Life cycles. In: South A (ed) Terrestrial slugs. Biology, ecology and control. Chapman & Hall, London, pp 203–219

South A (1982) A comparison of the life cycles of *Deroceras reticulatum* (Müller) and *Arion intermedius* Normand (Pulmonata: Stylommatophora) at different temperatures under laboratory conditions. J Molluscan Stud 48:233–244

Stephenson JW (1964) Slug parasites and predators.

Stoddart DM (1980) Some responses of a free-living community of rodents to the odors of predators. In: Müller-Schwarze D, Silverstein R (eds) Chemical Signals: Vertebrates and Aquatic Invertebrates. Plenum Publishing, New-York, pp 1–10

Stout JC, Goulson D, Allen JA (1998) Repellent scent-marking of flowers by a guild of foraging bumblebees (*Bombus* spp.). Behav Ecol Sociobiol 43:317–326

Strong EE, Gargominy O, Ponder WF, Bouchet P (2008) Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. Hydrobiologia 595:149–166

Studdert VP (1985) Epidemiological features of snail and slug bait poisoning in dogs and cats. Aust Vet J 62:269–272

Symondson WOC (2004) Coleoptera (Carabidae, Staphylinidae, Lampyridae, Drilidae and Silphidae) as predators of terrestrial gastropods. In: Barker GM (ed) Natural enemies of terrestrial molluscs. CABI, Hamilton, pp 37–84

Symondson WOC (1997) Does *Tandonia budapestensis* (Mollusca: Pulmonata) contain toxins? Evidence from feeding trials with the slug predator *Pterostichus melanarius* (Coleoptera: Carabidae). J Molluscan Stud 63:541–545

Symondson WOC (1993) Chemical confinement of slugs: an alternative to electric fences. J Molluscan Stud 59:259–261

Symondson WOC (1994) The potential of *Abax parallelepipedus* (Col.: Carabidae) for mass breeding as a biological control agent against slugs. Entomophaga 39:323–333

Symondson WOC, Glen DM, Ives AR, et al (2002) Dynamics of the relationship between a generalist predator and slugs over five years. Ecology 83:137–147

Takahara T, Kohmatsu Y, Maruyama A, et al (2012) Inducible defense behavior of an anuran tadpole: Cue-detection range and cue types used against predator. Behav Ecol 23:863–868

Talarico FF, Romeo M, Massolo A, et al (2007) Morphometry and eye morphology in three species of *Carabus* (Coleoptera: Carabidae) in relation to habitat demands. J Zool Syst Evol Res 45:33–38

Tamamaki N (1989) The accessory photosensory organ of the terrestrial slug, *Limax flavus* L. (Gastropoda, Pulmonata): morphological and electrophysiological study. Zoolog Sci 6:877–883

Tan L, Grewal PS (2001) Infection behavior of the rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* to the grey garden slug *Deroceras reticulatum*. J Neurosci 87:1349–54

Tarrant KA, Westlake GE (1988) Laboratory evaluation of the hazard to wood mice, *Apodemus sylvaticus*, from the agricultural use of methiocarb molluscicide pellets. Bull Environ Contam Toxicol 40:147–152

Tod ME (1973) Notes on beetle predation of molluscs. Entomol 106:196–201

Toor RF Van (2006) The effects of pesticides on Carabidae (Insecta: Coleoptera), predators of slugs (Mollusca: Gastropoda): literature review. New Zeal Plant Prot 216:208–216

Triebskorn R, Christensen K, Heim I (1998) Effetcs of orally and dermally applied methaldehyde on mucus of slugs (*Deroceras reticulatum*) depending on temperature and duration of exposure. J Molluscan Stud 64:467–487

Turin H, Penev L, Casale A (2003) The genus *Carabus* in Europe. A synthesis. Pensoft Publishers, Sofia-Moscow & European Invertebrate Survey, Leiden

Turner AM (1996) Freshwater snails alter habitat use in response to predation. Anim Behav 51:747–756

Turner AM (2008) Predator diet and prey behaviour: freshwater snails discriminate among closely related prey in a predator's diet. Anim Behav 76:1211–1217

Turner AM, Turner SE, Lappi HM (2006) Learning, memory and predator avoidance by freshwater snails: effects of experience on predator recognition and defensive strategy. Anim Behav 72:1443–1450

Unterstenhöfer G (1962) Mesurol, a polyvalent insecticide and acaracide. Pflanzenschutz Nachrichten, Bayer 15:177–189

Venzon M, Janssen A, Pallini A, Sabelis MW (2000) Diet of a polyphagous arthropod predator affects refuge seeking of its thrips prey. Anim Behav 60:369–375

Vermeij GJ, Covich AP (1978) Coevolution of freshwater gastropods and their predators. Am Nat 112:833–843

Wade CM, Mordan PB, Naggs F (2006) Evolutionary relationships among the Pulmonate land snails and slugs (Pulmonata , Stylommatophora). Biol J Linn Soc 87:593–610

Waite TA (1988) Huddling and postural adjustments in response to desiccating conditions in *Deroceras reticulatum* (Müller). J Molluscan Stud 54:249–250

Wareing DR, Bailey SER (1985) The effects of steady and cycling temperatures on the activity of the slug *Deroceras reticulatum*. J Molluscan Stud 51:257–266

Wedgwood MA, Bailey SER (1988) The inhibitory effects of the molluscicide metaldehyde on feeding, locomotion and faecal elimination of three pest species of terrestrial slug. Ann Appl Biol 112:439–457

Welter-Schultes F (2012) European non-marine molluscs, a guide for species identification. Planet Poster Editions, Göttingen

Wester RE (1964) Transmission of downy mildew of lima beans by slugs. Phytopathology 54:749–775

Wheater CP (1989) Prey detection of some predatory Coleoptera (Carabidae and Staphylinidae). J Zool 218:171–185

Wiktor A (2000) Agriolimacidae (Gastropoda: Pulmonata) — a systematic monography. Ann Zool 49:547–590

Wilbur KM, Saleuddin ASM (1983) Shell formation. In: Saleuddin ASM, Wilbur KM (eds) The Mollusca. Academic Press, New-York, pp 235–287

Will KW, Attygalle AB, Herath K (2000) New defensive chemical data for ground beetles (Coleoptera: Carabidae): interpretations in a phylogenetic framework. Biol J Linn Soc 71:459–481

Will KW, Gill AS, Lee H, Attygalle AB (2010) Quantification and evidence for mechanically metered release of pygidial secretions in formic acid-producing carabid beetles. J Insect Sci 10:1–17

Wilms J, Eltz T (2008) Foraging scent marks of bumblebees: footprint cues rather than

pheromone signals. Naturwissenschaften 95:149–53

Wilson M (2007) A novel nematode for management of slugs. In: Vincent C, Goettel MS, Lazarovits G (eds) Biological control: a global perspective. CABI Publishing, Wallingford, pp 152–159

Wisenden BD, Pogatshnik J, Gibson D, et al (2008) Sound the alarm: Learned association of predation risk with novel auditory stimuli by fathead minnows (*Pimephales promelas*) and glowlight tetras (*Hemigrammus erythrozonus*) after single simultaneous pairings with conspecific chemical alarm cu. Environ Biol Fishes 81:141–147

Wölfling M, Rostás M (2009) Parasitoids use chemical footprints to track down caterpillars. Commun Integr Biol 2:353–355

Wolters V, Ekschmitt K (1997) Gastropods, Isopods, Diplopods, and Chilopods: neglected groups of the decomposer food web. In: Benckiser G (ed) Fauna in soil ecosystems: recycling processes, nutrient fluxes, and agricultural production. CRC Press, New-York, pp 551–635

Yamagishi M, Ito E, Matsuo R (2008) Redundancy of olfactory sensory pathways for odor-aversion memory in the terrestrial slug Limax valentianus. J Exp Biol 211:1841

Young AG, Port GR (1991) The influence of soil moisture content on the activity of *Deroceras reticulatum* (Müller). J Molluscan Stud 57:138–140

Zieger M V., Meyer-Rochow VB (2008) Understanding the cephalic eyes of pulmonate gastropods: A review. Am Malacol Bull 26:47–66

Zieger M V., Vakoliuk IA, Tuchina OP, et al (2009) Eyes and vision in Arion rufus and Deroceras agreste (Mollusca; Gastropoda; Pulmonata): What role does photoreception play in the orientation of these terrestrial slugs? Acta Zool 90:189–204