



Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille - 446

Unité de Taphonomie Médico-Légale de Lille – UTML – EA 7367

Cindy AUBERNON

STRATEGIES DEVELOPPEMENTALES CHEZ LES LARVES DE
CALLIPHORIDAE :
ENTRE REGULATION THERMIQUE ET SOCIALITE

*Thèse présentée devant l'Université de Lille pour obtenir le grade de Docteur en Physiologie,
Biologie des organismes, populations, interactions*

Dirigée par le Docteur Damien CHARABIDZE

Rapporteurs : Pr. Claudio LAZZARI
Pr. Jean-Claude GREGOIRE

Membres : Dr. Audrey DUSSUTOUR
Pr. Jean-Christophe DE BISEAU D'HAUTEVILLE
Dr. Gregory SEMPO

Résumé

Les larves de Diptères nécrophages se développant sur un cadavre font face à de fortes pressions de sélection. Nous démontrons comment cet environnement extrême aurait favorisé l'apparition de stratégies comportementales efficaces et originales, basées sur des mécanismes comme la régulation thermique mais également la socialité.

Ce travail pose en premier lieu les bases du comportement de régulation thermique des larves de Diptères Calliphoridae. En effet, celles-ci sont confrontées à un environnement thermique très hétérogène, dans lequel elles vont sélectionner la zone la plus appropriée à leur activité métabolique. Bien que différentes espèces exploitent la même ressource au même moment, nous avons observé que les larves de *Lucilia sericata*, *Calliphora vomitoria* et *Calliphora vicina* ont chacune une température préférentielle de développement. De plus, nous démontrons que ces larves sont en recherche constante de leur température préférentielle (thermorégulation), et qu'elles adaptent leur alimentation à la température du milieu. Ce premier volet d'expérimentations illustre ainsi le rôle prépondérant de la température dans le comportement des larves. En second lieu, ce travail s'intéresse à la dimension sociale des larves nécrophages, et plus particulièrement au comportement d'agrégation. Nous avons démontré chez *Lucilia sericata* un fort effet attractif et rétentif des congénères, rendant manifeste une prévalence de la socialité sur la régulation thermique. Les résultats sont cependant drastiquement différents dans des conditions hétérospécifiques, où la formation du groupe varie selon les températures préférentielles et les cinétiques d'agrégation de chaque espèce. Ainsi, la température sélectionnée par un groupe hétérospécifique émerge d'un compromis entre les comportements de thermorégulation et d'agrégation. Enfin, ce travail analyse l'effet de ces stratégies comportementales sur le développement des individus.

Nous montrons que le comportement de thermorégulation et l'action des congénères affectent la température sélectionnée par les larves, et donc, leur développement. De tels résultats démontrent l'existence de véritables stratégies comportementales individuelles et collectives de développement, reposant sur l'optimisation de paramètres multiples permettant aux larves de se développer au mieux dans cet écosystème extrême qu'est le cadavre en décomposition.

Abstract

On a cadaver, necrophagous dipteran larvae suffer from strong selection pressures during their development. The premise of this thesis is that such an extreme, competitive and constraining environment would have favored the emergence of efficient developmental strategies, based on mechanisms such as thermal regulation but also sociality. This PhD work is divided into three parts. The first part focuses on the thermal behavior of Calliphorids larvae, which are confronted with a heterogeneous thermic environment on the corpse, in which they select the most appropriate area for their metabolic activity. Firstly, this part shows that larvae have a preferential developmental temperature, which is different according to the species (*Lucilia sericata*, *Calliphora vomitoria* and *Calliphora vicina*), although they exploit the same resource at the same time. Secondly, this part demonstrates that the larvae are always in search of this preferential temperature and thirdly, that they adapt both their displacement and their food intake according to the temperature of the nourishing substrate. This first part of experiments demonstrates that the temperature parameters have a strong effect on larval behavior. The second part of this work focuses on the social dimension of larval behavior by analyzing the influence of congeners, mainly through their active aggregation behavior. We show for *Lucilia sericata* a strong attractive and retentive effect of the group, making obvious that sociality prevails over thermal regulation. However, these results are radically different under heterospecific conditions where the group formation strongly depends on preferential temperatures as well as aggregation kinetics of each species. Finally, the third part of this work analyzes the effects of temperature and congeners on the development of individuals and shows that both the behavior of thermoregulation and the action of congeners impact the temperature selected by larvae, and therefore, their development. These results indicate the existence of individual and collective behavioral development strategies based on the optimization of multiple parameters that allow larvae to develop ideally in this extreme ecosystem of a decaying corpse.

Remerciements

J'aimerais remercier les Professeurs Didier Gosset et Valéry Hédouin pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de leur équipe ainsi que d'avoir tout mis en œuvre pour me permettre d'obtenir un poste de titulaire d'adjoint technique recherche et formation.

J'aimerais remercier tous les membres de l'IML : médecins légistes, agents de morgue, et secrétaires pour les bons moments passés ensemble.

J'aimerais aussi remercier les membres du jury, pour avoir pris le temps de corriger ce travail et pour toutes les remarques pertinentes qui me permettent d'avancer.

Je remercie chaleureusement les membres de la formation initiale de l'UTML, notamment le Professeur Thomas Colard, le Docteur Julien Boulay et Mr Maxime Lemoine. Vous me manquez les gars !

Je remercie également les collègues fraîchement ou sur le point de partir, le Docteur Erwan Le Garff et Mr Pierre Marchandise. Merci pour toutes les discussions scientifiques ou non, vous avez apporté une belle ambiance au labo.

Un grand merci au Professeur Jean-Louis Deneubourg pour s'être lourdement creusé les méninges quant à mes distributions hétérospécifiques.

Merci aux membres de mon comité de suivi de thèse, les Docteurs Grégory Sempo et Cédric Devigne ainsi que le Professeur Claudio Lazzari. Vous m'avez permis d'avancer et de grandir scientifiquement.

Merci à mes collègues doctorants ou stagiaires, notamment Madame Larissa Komo, Messieurs Quentin Fouché et Quentin Scanvion. Vous êtes des collègues géniaux sur qui on peut compter. Merci pour toutes les fois où vous m'avez aidé (et ça fait beaucoup), pour toutes ces riches discussions scientifiques et pour les sorties un peu moins sérieuses.

Je tiens aussi à remercier tous les stagiaires que j'ai pu encadrer. C'est aussi grâce à vous que j'apprends.

Un grand merci tout particulier à mon collègue, ami, confident, le Docteur Mickaël Canouil. Pour toutes ces soirées, ces avant-premières, ces sauvetages statistiques et surtout ces heures de cours sur R. J'espère que tu trouveras ce que tu cherches, tu le mérites tellement.

Merci aux copains BioAddoct, et notamment les Docteurs Marine Cargoët et Clément Bournonville pour les weekends, soirées ou conseils d'administration endiablés.

Merci à mes amis, de toujours ou plus récents, mon équipe de basket, les copains jeux de rôle et notamment le Docteur Clément Danis. Merci d'être dans ma vie malgré mon caractère de cochon. Vous m'apportez tellement.

Un grand merci à mes copines, ces tatas extraordinaires, Mesdames Julie Auge, Maddy Fleury, Marjorie Quief, Laura Hendrick et Justine Serre, pour m'avoir encouragée lors du concours « Ma Thèse en 180 secondes », pour tous ces moments passés ensemble et tous ceux qui nous attendent.

Merci à la famille Salésienne de Lille Sud. Merci de m'avoir accueillie aussi chaleureusement. J'aimerais remercier les jeunes de LaDoMusique qui se donnent tellement ainsi que toute l'équipe de musiciens et notamment les Sœurs Marie Vaillant et Anne-Flore Mignan. Enfin, un merci tout particulier à Sœur Valentine Delafon, pour son esprit si courageux et son aide pour la capture de *Calliphora vicina*.

Merci à Agnès et Gaëtan, des amis si exceptionnels et précieux. Merci de faire partie de ma vie.

Merci à mes parents, pour m'avoir toujours permis de faire ce que je voulais, que ce soit pour les études ou les activités extra scolaires. Merci de m'avoir apporté cette qualité de vie. Merci à mon frère et ma sœur que je ne vois pas assez souvent.

Merci aux amours de ma vie, Mr Vivien Vaxelaire, l'être le plus ouvert d'esprit et le plus intègre que je connaisse. Merci d'être à mes côtés chaque jour et je sais combien ça peut être difficile. Merci aussi à mes enfants, pour tout l'amour que vous m'apportez. J'espère être digne de vous un jour.

Enfin, le meilleur pour la fin, un énorme merci à mon directeur de thèse le Docteur Damien Charabidzé. Merci pour tout ce que tu m'as apporté, humainement et scientifiquement. Tu es vraiment le directeur rêvé et je mesure ma chance. Cette thèse n'aurait jamais pu aboutir sans toi et je te remercie pour tous ces conseils, relectures et corrections (et Dieu sait qu'elles sont nombreuses). Je te souhaite vivement un plein épanouissement personnel et professionnel, tu le mérites.

Table des matières

RESUME	V
ABSTRACT	VII
REMERCIEMENTS	IX
TABLE DES MATIERES	XIII
AVANT-PROPOS	XVII
INTRODUCTION.....	1
LES DIPTERES CALLIPHORIDAE	3
<i>Généralités</i>	3
<i>Entomologie médico-légale</i>	6
L'ECOSYSTEME CADAVERIQUE.....	2
<i>La carcasse</i>	3
<i>Facteurs abiotiques</i>	3
<i>Facteurs biotiques</i>	4
ECOLOGIE COMPORTEMENTALE ET STRATEGIES DE DEVELOPPEMENT	5
<i>Le grégarisme</i>	7
<i>Auto-organisation et émergence</i>	9
<i>Thermorégulation</i>	11
OBJECTIFS DE LA THESE	16
PLAN.....	16
CHAPITRE 1 : TEMPÉRATURES PRÉFÉRENTIELLES.....	20
THERMOREGULATION IN GREGARIOUS DIPTERAN LARVAE: EVIDENCE OF SPECIES-SPECIFIC TEMPERATURE SELECTION.....	20
<i>Abstract</i>	20
<i>Introduction</i>	21
<i>Materials and methods</i>	21
<i>Statistical analysis</i>	24
<i>Results</i>	24
<i>Discussion</i>	27
CHAPITRE 2 : THERMORÉGULATION.....	32
THE MAGGOT, THE ETHOLOGIST AND THE FORENSIC ENTOMOLOGIST: SOCIALITY AND THERMOREGULATION IN NECROPHAGOUS LARVAE	32
<i>Abstract</i>	32
<i>Introduction</i>	33

<i>Material and methods</i>	34
<i>Statistical Analysis</i>	36
<i>Results</i>	36
<i>Discussion</i>	40
<i>Conclusion</i>	43
TO EAT OR GET HEAT: BEHAVIORAL TRADE-OFFS BETWEEN THERMOREGULATION AND FEEDING IN GREGARIOUS NECROPHAGOUS	
LARVAE.....	46
<i>Abstract</i>	46
<i>Introduction</i>	47
<i>Materials and methods</i>	49
<i>Data analyses</i>	51
<i>Results</i>	52
<i>Discussion</i>	55
CHAPITRE 3 : DÉVELOPPEMENT ET STRATÉGIES ÉVOLUTIVES	60
EFFECT OF THERMOREGULATION AND AGGREGATION ON <i>LUCILIA SERICATA</i> DEVELOPMENT AND <i>FITNESS</i>	
<i>Introduction</i>	61
<i>Matériel et méthodes</i>	61
<i>Analyse statistique</i>	64
<i>Résultats</i>	64
DISCUSSION.....	65
CHAPITRE 4 : GROUPES HETEROSPECIFIQUES	68
MIXED-SPECIES AGGREGATIONS IN ARTHROPODS	
<i>Abstract</i>	68
<i>Background</i>	69
<i>Definitions</i>	69
<i>Types of Mixed-Species Groupings</i>	71
<i>Aggregation Vectors and Cross-Species Recognition</i>	75
<i>Benefits</i>	78
<i>Species Competition</i>	80
<i>Conclusion</i>	82
BE LONELY OR FEEL COLD: THE CRUEL DILEMMA OF INTERSPECIFIC AGGREGATION IN BLOWFLIES' LARVAE.....	
<i>Introduction</i>	87
<i>Matériel et méthodes</i>	88
<i>Analyse statistique</i>	88
<i>Résultats</i>	89
<i>Discussion</i>	91

DISCUSSION	96
COMPORTEMENT DES LARVES.....	98
STRATEGIE EVOLUTIVE	101
CONCLUSION.....	103
BIBLIOGRAPHIE	104
ANNEXES.....	134
ANNEXE 1 : ARTICLE DE VULGARISATION POUR MEDECINE/SCIENCE.....	134
<i>Les larves de Diptères nécrophages en entomologie médico-légale : une histoire de température</i>	<i>134</i>
ANNEXE 2 : TEMPERATURE PREFERENTIELLE DE <i>LUCILIA SERICATA</i> SELON LE STADE LARVAIRE	142
ANNEXE 3 : GROUPES HETEROSPECIFIQUES.....	144
COMMUNICATION	146
ECRITE.....	146
ORALE	146
AFFICHEES.....	147
VULGARISATION	147
<i>Ecrite.....</i>	<i>147</i>
<i>Orale.....</i>	<i>147</i>
ENCADREMENTS	147
PRIX	148

Avant-propos

Les mouches, insectes de l'ordre des Diptères, sont de petits animaux rarement appréciés dans notre quotidien. Au vu des moyens déployés par l'homme pour s'en débarrasser, nous considérons ces bestioles plutôt comme une vermine infâme que comme une source d'intérêt et d'attrait. Bien qu'il soit de l'ordre de l'humain de dénigrer facilement les espèces qui le dégoutent, il est de l'ordre de l'entomologiste de décrire ces espèces sous un jour attractif et d'en présenter toute la beauté. Cependant, provoquer l'extase devant un insecte nécrophage dont l'une des espèces phares est la fameuse *mouche à merde* est certainement une entreprise délicate. Cette mouche, qui aime à se repaître de fèces, dont la descendance, ces larves grouillantes que l'on appelle asticots, se nourrissent en s'y baignant de toutes chairs en décomposition, est pourtant le sujet de ce travail. Aussi repoussant que fascinant.

Je vais tenter de vous montrer que ces mouches, utilisées dans de nombreux domaines comme la médecine et la justice, ne sont pas que des nuisibles prêts à se jeter sur le premier morceau de viande venu. Elles sont la Fin et le Début. D'une grande importance en écologie, leurs larves sont des « éboueurs entomologiques bénévoles » [1] qui permettent le recyclage des animaux morts, produisant la matière nécessaire aux plus petits organismes à la base de toute chaîne alimentaire. Cette action de recyclage nécessite une certaine ruse pour exploiter au mieux les cadavres avant leur disparition complète. Les larves de Diptères nécrophages se sont ainsi adaptées au cours de l'évolution, particulièrement en développant des stratégies sociales. C'est selon ce point de vue, qui mêle adaptabilité et socialité, que j'ai abordé l'étude de ces insectes. En étudiant leur développement ainsi que leur comportement, nous sommes plus à même de comprendre leur rôle écologique ainsi que les stratégies évolutives leur permettant d'exploiter efficacement ce qui n'était avant eux plus que matière morte.

Introduction

*« Les mouches bourdonnaient sur ce ventre putride,
D'où sortaient de noirs bataillons
De larves, qui coulaient comme un épais liquide
Le long de ces vivants haillons. »*

Charles Baudelaire
Une charogne, Les Fleurs du Mal

Cette thèse s'intéresse aux stratégies développementales des larves de Diptères (i.e. asticots). Ayant pour habitat un environnement extrême, affecté par de multiples pressions de sélection, nous avons postulé que ces larves avaient développé des stratégies adaptatives originales et efficaces basées sur la thermorégulation ainsi que la socialité.

Les Diptères Calliphoridae

Généralités

Dans le Règne animal, les insectes appartiennent à l'Embranchement des arthropodes. Ils caractérisent une Classe constituant plus de 70% de la biodiversité, subdivisée en 30 Ordres dont l'Ordre des Diptères [2]. Ces derniers représentent les « mouches vraies » et forment l'un des Ordres le plus important avec environ 122 000 espèces en Europe. La plupart de ces insectes ont un rôle majeur au sein des écosystèmes avec une action de pollinisateurs, parasites, prédateurs ou encore de décomposeurs. Cependant, certaines espèces ont aussi un effet dévastateur sur la population humaine comme vecteurs de nombreuses maladies telles que la malaria, la dengue ou encore la fièvre jaune.

Les Diptères sont caractérisés par leurs ailes postérieures réduites à l'état de balanciers (haltères) : ils ne présentent donc qu'une seule paire d'ailes membraneuses fonctionnelle qui donne son nom à cet Ordre « à deux ailes » [3]. Deux sous-Ordres sont définis : les Nématocères, qui regroupent entre autre les tipules ainsi que les moustiques, et les Brachycères, représentés par les syrphes, les taons, les drosophiles ou encore les Calliphoridae. Ces dernières, communément appelées « mouches vertes et mouches bleues », sont une Famille de Brachycères calyptères¹ cyclorrhaphes² représentant environ 1000 espèces caractérisées par un abdomen de couleur métallique [4]. Principalement détritiphages, nécrophages ou coprophages, ces insectes sont également les premiers colonisateurs des carcasses animales et humaines [5].

Les mouches Calliphoridae ont colonisé tous les continents. Elles sont massivement représentées parmi la faune liée aux cadavres et jouent un rôle écologique très important dans le recyclage de la matière organique [4]. Elles sont majoritairement attirées par les cadavres de mammifères mais peuvent aussi coloniser d'autres cadavres tels que ceux des poissons [6].

La saisonnalité et les micro climats affectent fortement leurs populations [7]. La répartition des espèces est donc très dépendante des latitudes [8], de l'altitude [9] ou des types de climats [10].

¹ Calyptère : adjectif et nom commun caractérisant l'expansion thoracique recouvrant les balanciers des Diptères.

² Cyclorrhaphe : pseudo-taxon faisant référence à l'ouverture circulaire de la puppe lors de l'émergence de l'adulte.

Les trois espèces utilisées dans ce travail de thèse sont très présentes en France et en Europe et sont de globalement très communes [7], [11], [12]. *Lucilia sericata*³, la mouche verte aux yeux rouges, est présente dans la majorité des biotopes et est visible dans nos régions principalement au printemps et en été [7]. Lorsque les conditions sont favorables, dont une température ambiante supérieure à 14 °C, elle va coloniser rapidement les cadavres [13]. Espèce ubiquiste, *L. sericata* se développe aisément sur les cadavres de petits comme de gros mammifères [6]. *Calliphora vomitoria*⁴ est une espèce de couleur bleu foncé, plus trapue que *L. sericata* [3]. Plutôt rurale [6], *C. vomitoria* se rencontre tant en périodes froides que chaudes [7] où elle va coloniser les corps plus tardivement [13]. Mieux adaptée aux carcasses de grande taille [6], elle n'est pas très bonne compétitrice et est réputée favoriser des colonisations conspécifiques [6]. Enfin, la troisième espèce étudiée dans ce travail est *Calliphora vicina*⁵, une autre mouche de couleur bleue, plus adaptées aux petits cadavres, aux zones urbaines et sub-urbaines ainsi qu'aux températures plus fraîches [6], [14]. En effet, il n'est pas rare d'observer une activité de cette espèce en plein hiver [7] ou dans des conditions de froid extrême [15]. Dans les cas de faibles température, elle sera majoritairement seule colonisatrice, mais elle peut aussi coloniser les corps en même temps que d'autres espèces [6]. Dans nos régions françaises et d'Europe occidentale, ces trois espèces peuvent occuper simultanément le même cadavre [11].

Les Calliphoridae sont des insectes holométaboles, c'est-à-dire à métamorphose complète : le stade larvaire est morphologiquement et comportementalement différent de l'adulte (Figure 1). Les mouches Calliphoridae adultes, d'une taille allant de 6 à 14 mm, consomment principalement du nectar, qui couvre leurs besoins en sucre. La consommation d'autres nutriments, tels que certaines vitamines ou encore des sels minéraux, ne semble pas primordiale au stade adulte car les larves acquièrent ces nutriments lors de leur développement [2], [16]. Dans le cas où il leur serait nécessaire d'en consommer, les adultes peuvent se nourrir de miellat ou de sucres végétaux. Cependant, les femelles anautogènes [2] ont besoin d'un apport protéique pour permettre la maturation des œufs. Chez les Calliphoridae, cet apport implique la consommation de matières animales en décomposition ou encore de fèces, permettant ainsi, après quelques jours, une maturation complète des œufs. Une fois gravides, les femelles recherchent un cadavre pour y pondre leur œufs, au nombre d'environ 200 par ponte pour l'espèce *Lucilia sericata* [17]. Elles sont attirées rapidement après la mort [18] et sur de très longues distances [19], principalement par des composés riches en ammoniac ainsi que des phéromones [20] et des composés sémiochimiques.

³ *Lucilia sericata* : Calliphoridae, Meigen, 1826.

⁴ *Calliphora vomitoria* : Calliphoridae, Linnaeus, 1758.

⁵ *Calliphora vicina* : Calliphoridae, Robineau-Desvoidy, 1830.

A l'éclosion, les myriades d'œufs laissent place à autant de larves d'un blanc crémeux, qui passent par trois stades durant lesquels elles se nourrissent du cadavre, pour finalement atteindre une taille variant, selon les espèces, de 8 à 23 mm. Cette étape est cruciale : il est en effet nécessaire pour les larves d'atteindre une masse critique permettant de finaliser le développement durant les phases post-alimentation [21]. Cette masse critique dépend en particulier de la qualité nutritive du milieu. On observe ainsi des différences entre les régimes alimentaires, où les muscles sont préférés au foie ou aux intestins [11], [22], [23]. Pour se nourrir, les larves utilisent leur crochets buccaux ainsi que deux organes sensoriels : l'organe dorsal pour l'olfaction et l'organe terminal pour la gustation [24]. Elles peuvent ainsi sélectionner les odeurs d'intérêt [25] dans l'énorme bouquet odorant qu'est le cadavre [26].

Une fois la masse critique atteinte, les larves peuvent se métamorphoser. Elles changent de comportement et arrêtent de se nourrir pour trouver un endroit propice à la poursuite de leur développement. Durant cette phase, appelée *post-feeding*, les larves vont généralement fuir le cadavre de façon radiale pour fouir les sols meubles et rechercher des abris afin de se protéger durant le stade pupa [27]. Une fois le lieu propice sélectionné, la larve va s'immobiliser et réaliser une dernière mue dont l'exuvie se rigidifiera pour former le cocon (puparium). Le stade pupa est immobile et dure environ 45 % du développement ; il s'achève avec l'émergence de l'imago [28]. La durée de ce cycle dépend de deux paramètres principaux : l'espèce et la température. C'est cette relation qui est utilisée en entomologie médico-légale pour l'estimation de la date du décès. Ces durées sont connues pour la plupart des espèces nécrophages et pour un grand nombre de températures [29].

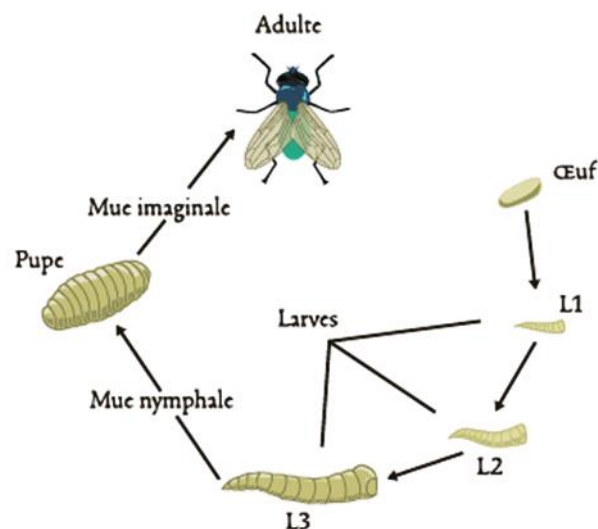


Figure 1 : Cycle de développement des Calliphoridae. J. Boulay. D'après Aubernon et al., (2014) [27].

Entomologie médico-légale

L'utilisation des insectes nécrophages pour dater le décès, ou entomologie médico-légale, a été formalisée par Bergeret en 1855 [19]-[20]. Basée en premier lieu sur la théorie de développement successif des insectes sur le corps, cette science utilise aujourd'hui principalement la corrélation entre température et développement des larves pour dater le décès [32]-[33].

Cette relation permet, pour une espèce donnée, de définir le pourcentage de développement par unité de temps en fonction de la température. En effet, en connaissant les conditions environnementales durant le développement des larves, et notamment la température, l'expert peut calculer l'âge de ces individus et en déduire un Intervalle Post-Mortem minimum⁶ (IPMm). En fonction des conditions climatiques et de l'accessibilité au cadavre, il pourra estimer le délai de colonisation du cadavre [13] et ainsi estimer la période du décès [32]. Cependant, les méthodes de calcul peuvent différer selon les experts : certains se basent sur le cycle complet de développement alors que d'autres considèrent plutôt la taille des larves [28], d'où d'éventuelles divergences [34].

Depuis quelques années, les publications relatant des paramètres à prendre en compte dans le cadre d'expertises entomologiques se sont multipliées, sans réellement apporter d'outils pratiques permettant d'appliquer ces recommandations. Ces études démontrent notamment le rôle de facteurs abiotiques sur le développement des larves [35]–[37]. De plus, ces travaux sont majoritairement focalisés sur la physiologie du développement, omettant souvent de considérer le comportement des larves comme un facteur de variabilité [28]. Dans ce contexte, une vision d'ensemble replaçant les insectes dans leur milieu de vie semble nécessaire pour réellement améliorer l'expertise [38].

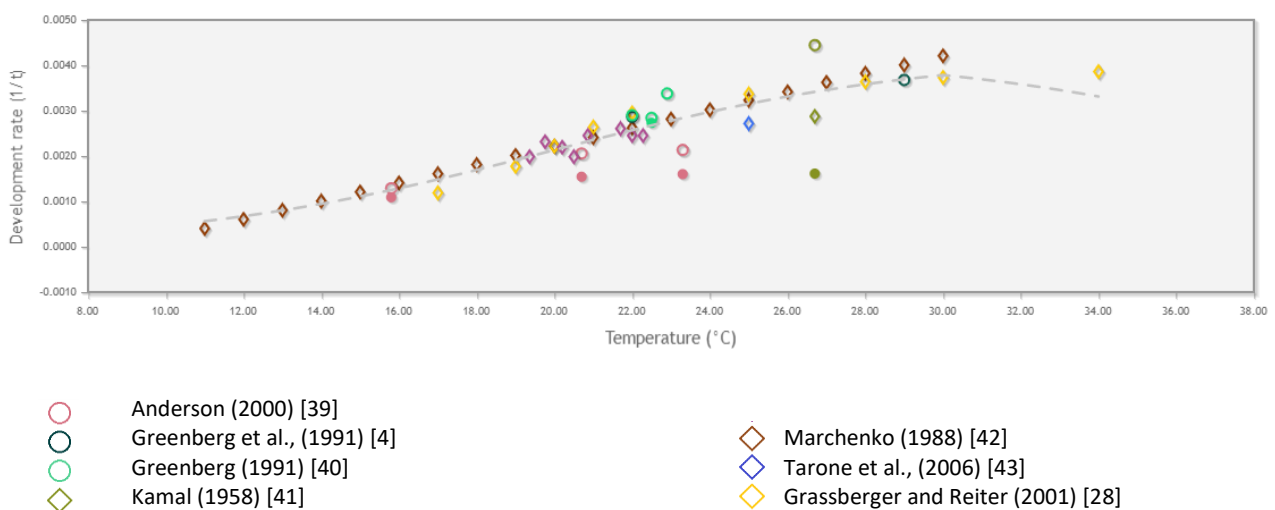


Figure 2 : Effet de la température de développement sur l'émergence de l'imago chez *Lucilia sericata* selon différentes études.

⁶ IPMm : Temps entre la date de découverte du cadavre et la date de la première ponte, date à laquelle, la personne était déjà décédée.

Tableau 1 : Synthèse non exhaustive de différents protocoles expérimentaux pour l'étude du développement de *Lucilia sericata*. Ces protocoles considèrent différents paramètres tels que la température, le nombre d'individus, le substrat nourricier ou encore la souche de l'espèce, dans des conditions hétéro ou conspécifiques.

Température (°C)	Nombre d'individus	Substrat	Souche	Facteurs	Condition	Référence
26.66	100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 16000	Viande de bœuf (140g)	Canada	Compétition	Conspécifique	[44]
25	10, 50, 100, 200, 350, 500	Mélange d'agar sang de cheval et levures	Royaume-Uni	Compétition	Conspécifique	[45]
25	20, 30, 50, 150, 300, 650, 750	Foie de porc (15g)	Royaume-Uni et Espagne	Compétition	Conspécifique et hétérosppécifique	[46]
25	10, 50, 100, 250, 500	Muscle de bœuf (100g)	France	Compétition	Conspécifique	[47]
25	100, 125, 250	Muscle de bœuf (100g)	France	Compétition	Hétérosppécifique	[48]
16, 26, 36	100	Cœur de bœuf haché (125g)	USA	Population	Conspécifique	[49]
24 et 25		Viande de bœuf	Inde	Population	Conspécifique	[50]
7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25, 27.5, 30, 32.5	20	Foie de bœuf (10g)	USA	Température	Conspécifique	[51]
8, 10, 18, 25, 30, 35, 37	12	Muscle de bœuf (20g)	Equateur	Température	Conspécifique	[52]
5, 13, 29 et 5 à 29	50, 100 ou 200	Viande de porc (40g)	Allemagne	Température	Conspécifique	[53]
10, 12, 15, 18, 24, 30	50	Muscle de bœuf	France	Température	Conspécifique	[54]
15, 17, 19, 20, 21, 22, 25, 28, 30, 34	100	Foie de bœuf (250g)	Autriche	Température	Conspécifique	[28]
25	100	Foie de bœuf (100g)	France	Toxiques	Conspécifique	[36], [37]
4	100, 500, 1000, 5000	Foie de bœuf (4kg)	Australie	Température	Conspécifique	[55]

L'écosystème cadavérique

Tout organisme vivant fait partie de la biocénose⁷ composant son écosystème⁸. À sa mort, sa carcasse va influencer significativement sur cet environnement [56]. De nombreux animaux tels que les charognards [57] et les détritivores vont coloniser le cadavre et se nourrir de cette nécromasse⁹ [38]. Les composés de dégradation des tissus ainsi que les fèces de ces colonisateurs vont apporter aux bactéries et aux champignons des nutriments essentiels et enrichir les sols en composés organiques

⁷ Biocénose : Ensemble des organismes, de leurs comportements et interactions dans un espace écologique.

⁸ Ecosystème : Communauté d'êtres vivants en interaction avec son environnement (biotope).

⁹ Nécromasse : Ensembles des organismes non-vivants disponibles (ici animaux).

tels que l'azote [58]. Cet enrichissement du milieu agit directement sur les plantes environnantes qui ont en retour une action sur les herbivores et la microfaune. Le cadavre peut donc être considéré comme un écosystème à part entière, accueillant des organismes qui profitent de ce milieu pour s'alimenter [12], chasser [59], se reproduire [60] ou s'abriter [61]. Comme dans tout écosystème, on y observe des pressions de sélections affectant plus ou moins la colonisation, le développement ou encore la survie des organismes qui s'y trouvent [63], [64]. Milieu attractif pour les espèces l'exploitant ainsi que leurs prédateurs [64], le cadavre et son environnement associé présentent donc des contraintes biotiques et abiotiques qui ont une action forte les organismes qui l'exploitent [65].

La carcasse

Le cadavre passe par plusieurs stades de décomposition [63]. Son apparition dans l'environnement va notamment, du fait du panel d'odeurs dégagées [26], attirer des insectes nécrophages [16]. Ainsi, on observe en premier le stade frais, propice à la ponte des Diptères Calliphoridae. S'ensuit le stade de décomposition « gonflé », durant lequel on observe une forte action bactérienne produisant de grosses quantités de gaz. L'activité des insectes notamment, induit la rupture des enveloppes, ce qui provoque l'expansion des fluides corporels. On observe ensuite les stades de décomposition active et avancée, où les insectes sont nombreux, produisant des dégagements d'ammoniac. Enfin, le stade sec, qui se poursuit jusqu'à la disparition complète de la carcasse, est le temps où l'activité fongique est à son maximum du fait de la libération antérieure d'ammoniac [61]. Les stades de décomposition peuvent être altérés par plusieurs paramètres, notamment la taille de la carcasse [66], ainsi que les conditions climatiques, saisonnières [67] ou environnementales [68]. Selon le type de carcasse, notamment en fonction de la taille et l'espèce, la colonisation varie en nombre et diversité des colonisateurs [69]. La présence de fourrure ou de poils affecte par exemple la ponte des adultes [70] ainsi que l'activité microbienne [71]. Le type même de cadavre (espèce animale) est déterminant : une étude a d'ailleurs démontré que les larves de la mouche *Calliphora vicina* se développaient moins bien (individus plus petits) sur des cadavres de poisson que sur ceux de mammifères [72].

Facteurs abiotiques

L'environnement agit très fortement sur les populations d'insectes. Ainsi, les larves d'une même espèce peuvent présenter des tailles et des vitesses de développement différentes selon leur micro-habitat [73]. A l'échelle du cadavre, la dégradation est facilitée par de fortes chaleurs, une exposition au soleil permettant la colonisation de la carcasse par une plus grande diversité d'insectes [75], [76]. Les précipitations facilitent quant à elles la prise alimentaire des larves en liquéfiant les tissus

[76]. Cependant, ces actions climatiques réduisent la durée d'exploitation du cadavre, ce qui affecte directement les chances de survie des organismes s'en nourrissant [53]. D'autres facteurs abiotiques comme l'humidité [77], la vitesse du vent [78] ou encore la composition du sol [62], [79], ont un effet sur la décomposition. Tous ces facteurs agissent souvent simultanément, facilitant ou entravant la survie des colonisateurs. On observe ainsi que les bactéries et les insectes sont fortement affectés par la température, notamment concernant leur croissance et leur métabolisme [28], [77]. Cependant, la prolifération bactérienne est facilitée par l'humidité mais également par de fortes températures, températures qui jouent sur la dessiccation [77]. Les organismes décomposeurs peuvent ainsi subir des pressions contraires : ils se doivent de jongler avec ces paramètres abiotiques pour lesquels ils sont particulièrement sensibles [15], [62]. Aujourd'hui, l'écologie du cadavre n'étant que peu étudiée [38], ces interactions entre les facteurs abiotiques et biotiques restent mal comprises [80].

Facteurs biotiques

Sur le cadavre, les organismes sont aussi affectés par les autres individus exploitant cette ressource [38], [81] notamment via la prédation, la compétition inter et intra-spécifique ou encore le charognage [32]. Parmi ces pressions, on observe par exemple les interactions entre insectes et bactéries, où la présence de différentes espèces bactériennes peut favoriser l'attraction des Diptères ainsi que la ponte des femelles [82]. Bien que certaines bactéries comme *Escherichia coli*¹⁰ puissent être nocives pour les Diptères [83], d'autres espèces comme *Proteus mirabilis*¹¹ sont bénéfiques pour les Calliphoridae. En présence de cette bactérie, on observe en effet une élévation du pH du milieu qui limite les bactéries pathogènes [84]. Cependant, certains Coléoptères colonisant plus tardivement les cadavres peuvent éliminer *P. mirabilis* via des sécrétions spécifiques, ce qui leur confère un avantage sur les asticots [84], [85]. Les bactéries peuvent aussi avoir une action moins spécifique, via un effet dit de « spoiling », grâce auquel elles rendent la nourriture inapte à la consommation pour les insectes ou les mammifères charognards [86].

On observe également d'autres interactions plus directes entre les organismes décomposeurs. Les larves de *Chrysomya rufifacies*¹² ou le Staphylinidae *Creophilus maxillosus*¹³ sont ainsi de gros prédateurs de larves de Calliphoridae [87], [88]. Ces comportements de prédation peuvent modifier drastiquement le processus de décomposition, comme cela a également été démontré en présence de certaines fourmis [89]. Enfin, le cadavre étant une ressource limitée dans le temps, la compétition est

¹⁰ *Escherichia coli* : Enterobacteriaceae, T. Escherich, 1885.

¹¹ *Proteus mirabilis* : Enterobacteriaceae, Hauser, 1885.

¹² *Chrysomya rufifacies* : Calliphoridae, Macquart, 1842.

¹³ *Creophilus maxillosus* : Staphylinidae, Linnaeus, 1758.

souvent une des pressions les plus fortes s'exerçant sur les individus, les larves de Calliphoridae cherchant toutes un accès simultané à la même ressource éphémère.

Toutes ces pressions de sélection, qu'elles soient biotiques ou abiotiques, ont un véritable effet sur les organismes exploitant la carcasse [47], [53], [86]. Pour survivre et exploiter efficacement cette ressource, les insectes nécrophages doivent donc minimiser ces pressions notamment en limitant le temps passé sur le cadavre.

Écologie comportementale et stratégies de développement

L'écologie comportementale associe aux actions des individus une valeur adaptative. Selon cette idée, l'expression de tel ou tel comportement se traduirait par des traits d'histoire de vie¹⁴ de meilleure qualité qui *in fine* confèreraient une meilleure valeur sélective¹⁵ (*fitness*) aux individus concernés [38], [91]. On observe donc l'existence de stratégies dites évolutives, qui sont autant de réponses aux contraintes propres à chaque situation. Cependant, bien que parfois étonnamment complexes, ces stratégies ne sont pas « réfléchies » et sont le résultat de la sélection naturelle [92].

Cette approche a vu le jour dans les années 1970, avec notamment la publication d'un livre fondateur dans cette discipline publié par Krebs et Davis [93]. L'écologie comportementale s'est rapidement diversifiée, étudiant principalement trois concepts : la nourriture, le territoire et la vie en groupe. Cette vie en groupe est notamment étudiée chez les grands singes et les insectes eusociaux (fourmis, termites, etc.). On observe dès lors différents échelons de socialité [94], allant du simple regroupement à la société vraie, où la coopération est de mise pour la survie de toute la colonie. L'organisation de la colonie chez les insectes sociaux est ainsi composée de nombreux individus interagissant localement pour produire des attributs globaux bien supérieurs à la simple somme des interactions locales [95], [96]. Chez les insectes nécrophages, l'étude du comportement et des bénéfices associés s'est surtout portée sur les nécrophores, qui apportent des soins parentaux à leurs larves [97]. À l'inverse, bien que le comportement des asticots ait été étudié dans le cadre de l'agrégation [98], [99] ou de leurs réactions face à divers stimuli [100], cette approche écologique est plutôt nouvelle. Pourtant, nous observons chez les larves de Diptères nécrophages des comportements particuliers suggérant des stratégies visant à augmenter la *fitness* des individus.

¹⁴ Trait d'histoire de vie : traits biologiques impliqués dans la contribution à la descendance.

¹⁵ Valeur sélective : *fitness*, représentant la capacité d'un individu à se reproduire, à partager ses gènes.

Pour faire face aux pressions de sélection propres à l'écosystème cadavérique, les femelles Calliphoridae déposent une phéromone de ponte sur le chorion de leurs œufs [101], créant ainsi une amplification du signal à mesure que le nombre de femelles venant pondre augmente [102]. Cette agrégation des pontes limite la perte d'eau et réduit la probabilité de prédation des œufs. De plus, la fécondité élevée de ces insectes permet de palier la forte mortalité des stades pré-reproducteurs. Leur cycle de vie court, leur croissance rapide et leur maturité sexuelle précoce permettent également une exploitation rapide de la ressource cadavérique. Ces caractéristiques sont typiques des organismes présentant une stratégie démographique évolutive dite de type r pour *reproduction rate* [103]. Cette stratégie, décrite pour la première fois par MacArthur et Wilson en 1967, est basée sur la reproduction, en opposition à une seconde stratégie dite de type K, pour *Kapazitätsgrenze* (capacité d'accueil du milieu), basée sur le soin apporté aux jeunes [104]. Ainsi, dans des habitats où les ressources vitales sont imprévisibles et où les risques sont élevés, les organismes, via la stratégie r, vont miser sur le grand nombre de descendants [103]. En revanche, dans des milieux où les conditions de vie sont prévisibles et où les risques sont faibles, les organismes, via la stratégie K, vont miser sur des caractéristiques inverses. Les insectes nécrophages, au sein du règne animal, sont clairement de stratégie r.

Cependant, lorsque l'on regarde ces caractéristiques à l'échelle de l'écosystème cadavérique, cette répartition ne semble pas aussi stricte. Introduites en premier lieu par Grime en 1977, les notions de stress et de perturbation environnementale montrent que ces stratégies r et K ne sont pas si clairement définies [105]. C'est d'ailleurs ce qu'affirmait Pianka en 1970 en présentant des compromis r/K dans les stratégies des organismes où la sélection naturelle pousse à passer de stratégie r vers K [103]. Ainsi, au sein des Diptères nécrophages, il est possible d'observer deux stratégies bien distinctes [81]. Les Sarcophagidae étant plus grosses que les Calliphoridae, et pratiquant la larviposition (ponte de larves de stade 1 et non d'œufs), elles sont décrites par Denno et Cothran en 1976 comme ayant une stratégie K, tandis que les Calliphoridae auraient une stratégie r. Cependant, les Sarcophagidae étant moins bonnes compétitrices que les Calliphoridae, elles adaptent leurs pontes en fonction de la colonisation du cadavre, qui, en absence de Calliphoridae, peut être multipliée par 6, ce qui n'est pas compatible avec une stratégie de type K. Ainsi, déjà en 1976, ces auteurs avançaient la notion de compromis au sein de ces stratégies comportementales [81] et introduisaient les conditions d'adaptabilité nécessaire à la survie des individus dans des habitats extrêmes.

Les larves de Diptères nécrophages présentent ainsi des comportements adaptatifs : les larves de *Lucilia sericata* et *Phormia regina*¹⁶ se développent plus vite en présence de larves prédatrices telles que *Chrysomya rufifacies* [38]. La même stratégie est employée par les larves de *C. macellaria* contre les larves de *Chrysomya megacephala*¹⁷ [28] [80] ainsi que par les compétiteurs, qui se développent plus rapidement, atteignant une masse critique précocement et augmentant ainsi leur taux de survie [106]. Ce développement accéléré est efficace dans ce contexte, car les larves atteignent rapidement leur masse critique et augmente donc leur survie [21], mais elles deviennent des mouches de petite taille, qui produisent moins d'œufs. La valeur de ces stratégies est donc dépendante du contexte.

Le grégarisme

L'agrégation est considérée comme le premier échelon de la socialité [94]. Elle peut être passive, notamment en réponse à des facteurs abiotiques et des hétérogénéités environnementales, ou active, c'est-à-dire en réponse à d'autres individus [92]. Polyphylétique¹⁸ et apparue sporadiquement, la vie en groupe semble être une réponse évolutive à différentes contraintes environnementales [107]. Ces contraintes sont notamment liées à la structure de l'habitat, la prédation ainsi que la recherche de nourriture [92]. L'agrégation peut donc apporter des bénéfices sur ces trois points majeurs, bénéfices qui dans ce cas [27], supplantent les coûts liés à la compétition et aux divers effets délétères de ce mode de vie [92]. On observe ainsi chez de nombreux oiseaux grégaires des bénéfices limitant la prédation grâce à l'augmentation de la vigilance ainsi que l'effet de dilution, qui diminuent le risque d'être prédaté [94]. Le comportement d'agrégation peut être observé ponctuellement, par exemple lors de la recherche de nourriture, ainsi qu'à différents stades de développement [108]. Bien que majoritairement conspécifique, il peut dans certain cas être hétérospécifique [99].

Chez les larves de Calliphoridae, l'agrégation est active [98] et résulte de communications entre individus [98], [100]. Elle est observée au stade larvaire, phase durant laquelle les individus s'agrègent en masses extrêmement denses [109]. Les individus de différents stades et souvent de différentes espèces peuvent se regrouper massivement. Cette agrégation des larves est principalement basée sur des interattractions [110] et des communications indirectes, notamment le dépôt de traces laissées lors des déplacements [98]. On observe ainsi des mécanismes d'attraction et de rétention des individus par les groupes [98], [99], [100]. De par leur physiologie, leurs préférences nutritionnelles ou thermiques, il arrive que les espèces agissent l'une sur l'autre jusqu'à créer une

¹⁶ *Phormia regina* : Calliphoridae, Meigner, 1826.

¹⁷ *Chrysomya megacephala* : Calliphoridae, Fabricius, 1794.

¹⁸ Polyphylétique : Caractéristique de taxons sans ancêtre commun récent.

ségrégation au sein des masses. On observe ainsi, dans certaines conditions extrêmes, une expulsion en marge de l'agrégat de l'espèce la moins compétitive [83], [84].

Pour s'orienter face aux ressources telles que de la nourriture [98], des congénères [99] ou encore une source de température [113], les larves de Calliphoridae présentent un comportement de « scanning » (Figure 3). Ces mouvements leur permettent de sonder localement leur milieu [114]. Via ce comportement, les larves vont pouvoir comparer les stimuli, qu'ils soient olfactifs ou encore lumineux, entre leur droite et leur gauche, s'orientant ainsi principalement en fonction des gradients [115]. C'est d'ailleurs ainsi que les larves fuient la lumière, orientant à chaque contraction corporelle leurs organes sensoriels dans le sens opposé [115]. De la même façon, les larves peuvent suivre des odeurs [99] ou un gradient thermique [113] : dans ce dernier cas, on observe leur vitesse de déplacement s'accroître en corrélation avec l'élévation de température [116], [117]. Ce comportement d'orientation intervient également dans l'agrégation et permet aux larves de suivre des signaux déposés au sol et de rejoindre des groupes existants [99].

Bien que le comportement d'agrégation soit relativement bien décrit [60], [98], notamment grâce aux travaux de notre équipe, peu de choses sont connues sur le déplacement des groupes, ni sur le comportement des larves au sein de celui-ci [113]. Cependant, certains phénomènes sont connus chez d'autres espèces grégaires. Ainsi, si les chenilles *Malacosoma disstria*¹⁹ sont, à titre individuel, parfaitement aptes à discriminer et à sélectionner la nourriture optimale pour leur développement [96], ce choix est beaucoup plus compliqué lorsqu'elles sont en groupe. En effet, les groupes de chenilles semblent choisir leur nourriture aléatoirement [96]. En réalité, du fait de l'allo-mimétisme et de la tendance qu'ont les individus suivants à mimer le comportement du précédent, on observe des choix stochastiques, entièrement dépendants du déplacement du premier individu, survenu avant même l'analyse de la ressource [96]. Les comportements sociaux sont donc susceptibles d'affecter fortement les décisions individuelles, que ce soit pour les déplacements ou la prise alimentaire. Comme détaillé par la suite, nous avons travaillé sur l'existence de tels mécanismes chez les larves de Diptères Calliphoridae.

¹⁹ *Malacosoma disstria* : Lasiocampidae, Jacob Hübner, 1822.

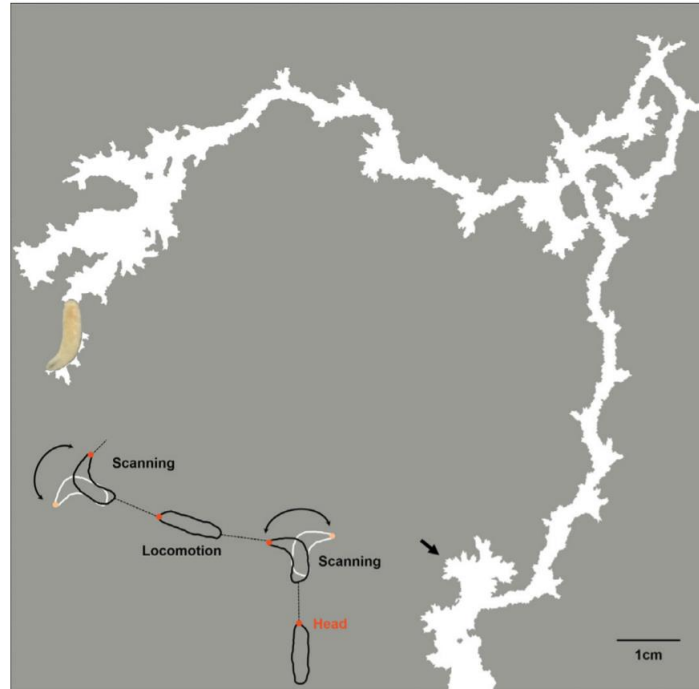


Figure 3 : Locomotion et mouvement de *scanning* d'une larve de *Lucilia sericata*. D'après Boulay et al. 2015 [114].

Auto-organisation et émergence

La mise en place de l'agrégation passe par l'auto-organisation. L'auto-organisation est basée sur des interattractions stochastiques et non déterministes et implique des individus qui n'ont qu'une connaissance locale de leur environnement [118]. Non prédictible lorsque l'on observe le comportement des organismes à l'état individuel, elle produit néanmoins de façon reproductible des structures et des comportements complexes [119]. De ces formations peuvent émerger des phénomènes particuliers issus des interactions entre individus et apportant des bénéfices en terme de développement ou de survie [47], [120], [121]. Par exemple, des individus ayant tendance à suivre les traces d'individus précédent (stigmergie²⁰) vont s'attirer mutuellement jusqu'à la formation d'un agrégat. Le recrutement de nouveaux individus est une boucle de rétrocontrôle positif : pour stabiliser le système, des boucles de rétrocontrôle négatif existent généralement, notamment via des phénomènes de saturation ou de compétition. Ainsi, si l'agrégat devient trop gros, les ressources manquent et les individus se dispersent. Enfin, l'aléatoire a aussi un rôle important dans ces systèmes, générant au niveau collectif des réponses différentes en fonction de l'environnement alors même que le comportement individuel reste le même.

²⁰ Stigmergie : Mécanisme de coordination indirect entre agents.

Effet Allee

Phénomène densité-dépendant, l'effet Allee est un mécanisme permettant aux individus, en formant un groupe, d'obtenir des bénéfices du fait de ce groupe. Ainsi, dans l'ensemble, la *fitness* individuelle, où l'un de ses estimateurs, est positivement corrélée à la taille ou la densité de la population [122]. Au contraire de la compétition, l'effet Allee postule donc une augmentation de la *fitness* corrélée au nombre de congénères. On observe cependant un seuil maximal du nombre d'individus permettant de maximiser les bénéfices : au-delà de ce seuil, les bénéfices diminuent (compétition), jusqu'à une valeur critique où il n'y a plus d'intérêt à se regrouper [92]. Chez les espèces bénéficiant de l'effet Allee, il existe donc théoriquement des tailles optimales de groupe. Cependant, on observe souvent des groupes de tailles supérieures, ne permettant plus cette maximisation. Chez les orques par exemple, la taille optimale pour chasser est de 3 individus, cependant, il est plus souvent observé des groupes de 5 [92]. Par ailleurs, ce principe de formation de groupes peut, dans certains contextes, aboutir à des comportements qui semblent être contre-productifs [96], n'orientant pas le groupe dans la condition lui permettant de maximiser sa *fitness*. C'est le cas chez la chenille à tente *Malacosoma disstria* [96] où le groupe, par allo-mimétisme, pourra ne pas choisir la source de nourriture la plus adaptée à son développement, du fait du choix stochastique du premier individu. Le groupe sera ainsi « piégé », pendant un temps plus ou moins long, avant de faire un choix plus intuitif, supposant un désavantage uniquement durant une période transitoire. Chez les larves de Calliphoridae, l'effet Allee a été observé à partir de 250 individus, réduisant dès lors la durée de développement ainsi que la mortalité [47]. Ce bénéfice collectif serait en fait lié à plusieurs mécanismes distincts, dont l'exodigestion et le *larval-mass effect*.

La prise alimentaire des asticots résulte d'une adaptation du fait de la grande quantité de larves colonisant au même moment une carcasse. Ces larves ne peuvent en effet pas ingérer directement des fragments de chairs du fait de leur appareil buccal non adapté pour la mastication [2]. Elles vont donc liquéfier leur nourriture avant de l'ingérer, grâce à des enzymes protéolytiques de type trypsine, lipases ou encore amylases [60], [123]. Une fois les tissus liquéfiés, la larve peut sucer le substrat et l'ingérer : cette technique de prise alimentaire est nommée exodigestion [47]. Lorsqu'elles sont agrégées, cette exodigestion est amplifiée, permettant à chaque larve de bénéficier de l'action enzymatique des autres. En rendant la ressource cadavérique plus facilement ingérable, l'agrégation est donc directement bénéfique pour les larves de Calliphoridae [43], [47], [60].

A ce premier mécanisme, observable pour un faible nombre d'individus, s'ajoute un second mécanisme à plus grande échelle. Phénomène visible à haute densité, nécessitant plusieurs centaines à plusieurs milliers d'individus [124], le *larval mass effect* est une augmentation de température

enregistrée au sein des agrégats de grande taille [125]. La production de chaleur résulte du métabolisme des larves et est dépendante de la température ambiante ainsi que du volume de la masse larvaire [126]. Dans des conditions où la carcasse est assez grande pour supporter une forte densité larvaire, la température au sein de la masse peut dépasser de 30 °C la température ambiante et dépasser 45°C [124], [125]. Ainsi, les larves qui se trouvent au sein de cette masse ne ressentent pas la même température que des larves isolées, et obtiennent donc des bénéfices avec notamment un développement plus rapide [113], [127]. Un turn-over est observé au sein des agrégats, permettant aux larves de ne pas subir trop longtemps les températures extrêmes [113].

Thermorégulation

Chez les insectes, beaucoup de comportements sont thermo-dépendants, comme la marche [117], le vol [128], la recherche alimentaire et la prise de nourriture [129], [130] ou encore la reproduction [131]. Ainsi, pour ne pas subir les températures trop extrêmes et pour optimiser leur physiologie et activités métaboliques, les insectes effectuent une régulation thermique. En effet, du fait de leur petite taille, les larves ont un ratio « surface / volume » assez élevé, les rendant incapables de maintenir leur température corporelle uniquement via leur activité métabolique [132]. Leur température corporelle, comme tout animal ectotherme, est donc très fortement liée à la température ambiante, mais aussi à leur comportement. Cependant, le maintien de la température corporelle est particulièrement important puisque le métabolisme et le comportement sont optimaux sur une gamme de températures allant, chez les insectes, majoritairement de 20 à 30 °C [2], [130], [131].

Dans cette introduction, nous avons vu que l'agrégation et le déplacement des larves nécrophages leur permettait de réguler leur température [45], [51], [113]. Phénomène discontinu, la thermorégulation est décrite par May comme un ensemble de mécanismes impliquant des modifications dans les échanges, la perte et la production de chaleur avec l'environnement [135], [136]. Grâce à ces échanges, les insectes ajustent leur température corporelle via une thermorégulation soit comportementale, soit endogène. Du point de vu endogène, certains insectes peuvent se réchauffer via notamment des contractions musculaires ou en utilisant leur hémolymphe pour homogénéiser leur température corporelle à partir de la chaleur de leur thorax. Les Calliphoridae étant des ectothermes de relativement petite taille, leur thermorégulation sera principalement comportementale [137] et ce notamment au stade larvaire. En effet, les insectes pourront d'une façon assez simple se déplacer dans des zones présentant un microclimat [74], [132], [135], modifier leur posture face aux radiations solaires ou aux courants d'air [120], [124], [138] ou encore en fouissant le sol pour se protéger [128], [139]. Au sein des masses larvaires, nous observons en effet que les larves

les plus proches du centre sont soumises à des températures extrêmement élevées, dépassant parfois de plusieurs dizaines de degrés leurs température létale [125], [140]. Les phénomènes d'hystérèse, couplés à l'habituation et à la synthèse de protéines de types *heatshock* [2], [139], permettent aux larves de s'affranchir, le temps de la prise alimentaire, de ces températures trop élevées pour leur organisme.

*« L'égalité, la seule égalité en ce monde,
l'égalité devant l'asticot. »*

Jean-Henri Fabre
Souvenirs entomologiques

Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons vu, cette thèse s'intéresse aux stratégies développementales des larves de Diptères nécrophages. Ayant pour seul habitat et ressource un environnement extrême et sujettes à de multiples pressions de sélection, les larves nécrophages de Diptères Calliphoridae dominent pourtant cet écosystème. L'hypothèse de ce travail est que pour maximiser leur *fitness*, les larves présentent une stratégie de développement optimisée alliant des mécanismes de thermorégulation à une forme de socialité simple mais extrêmement efficace.

Plan

Cette thèse comporte 4 chapitres dont les articles associés sont soit publiés, soit en cours de rédaction pour soumission dans une revue à comité de lecture.

Le premier chapitre étudie la température préférentielle des larves de Diptères Calliphoridae. Le cadavre étant colonisé par différentes espèces, dont certaines ont des niches écologiques très différentes, la question s'est posée quant aux préférences thermiques de trois espèces de Diptères nécrophages communes (*Lucilia sericata*, *Calliphora vomitoria* et *Calliphora vicina*). Bien qu'elles puissent coloniser le cadavre au même moment, nous mettons en évidence que les larves de stade 3 de ces espèces possèdent des températures préférentielles bien distinctes, respectivement 33, 29 et 22 °C. Nous supposons ici que ces températures sont adaptées pour optimiser les activités métaboliques des larves. Ce chapitre est composé d'un seul article, publié dans *Entomologia Experimentalis et Applicata* intitulé : *Thermoregulation in gregarious dipteran larvae : evidence of species-specific temperature selection*.

Le second chapitre, composé de deux articles, s'intéresse aux compromis entre socialité et thermorégulation. Nous avons postulé que les larves devaient concilier la recherche de leur température préférentielle, de congénères (pour les bénéfices associés à l'agrégation) et d'une nourriture de qualité. Le premier article, intitulé : *The maggot, the ethologist and the forensic entomologist: Sociality and thermoregulation in necrophagous larvae (Journal of Advanced Research)*, s'intéresse à la réponse des larves de *Lucilia sericata* face à un environnement thermique variable. Nous démontrons que la capacité de régulation thermique des larves est nuancée par leur composante sociale. J'ai en effet pu observer que la présence d'un agrégat pouvait altérer le comportement d'optimisation thermique, soulignant ainsi les forts bénéfices développementaux liés à l'agrégation des larves. Le second article présente ainsi le comportement de prise alimentaire des larves, au niveau

individuel, face à une source de nourriture à différentes températures. On observe ici clairement un comportement de thermorégulation, avec notamment des nombres d'allers-venues ainsi que des durées d'arrêt différentes. Pour ce travail, intitulé *To eat or get heat: Behavioral trade-offs between thermoregulation and feeding in gregarious necrophagous larvae* et publié dans *Insect Science*, j'ai réalisé la partie statistique, l'analyse et la présentation des résultats et ai participé à la rédaction de la discussion (2nd auteure).

Le troisième chapitre de cette thèse s'attarde sur les conséquences développementales (*fitness*) des comportements larvaires. En suivant le développement complet des larves dans différentes conditions de choix entre optimisation thermique et agrégation, nous démontrons que les larves font des compromis entre ces deux comportements. Ces choix permettent aux larves de maintenir une durée de développement minimale dans une variété de conditions environnementales, y compris fortement défavorables (température froide). Ces résultats sont discutés d'un point de vue fondamental (écologie adaptative), mais également applicatif dans le cadre de l'expertise entomologique. Ce travail est toujours en cours et sera soumis prochainement dans *Journal of Insect Physiology* sous le titre : *Effect of thermoregulation and aggregation on Lucilia sericata development and fitness*.

Le quatrième chapitre s'intéresse à la formation de groupes hétérospécifiques dans un environnement thermique hétérogène. Bien que les différentes espèces soient capables de reconnaître mutuellement leurs dépôts de trace et de former des groupes hétérospécifiques, le fait que leurs températures préférentielles soient différentes rend difficile l'anticipation du choix final des larves. Ce chapitre est composé de deux articles dont le premier est une revue introductive sur les agrégats hétérospécifiques chez les arthropodes. Il montre que la formation de tels groupes n'est pas rare mais qu'il est encore difficile d'en comprendre le sens, à la limite entre coopération et compétition. Pour cet article je suis second auteure, ayant pris part à la bibliographie ainsi qu'aux nombreux réagencements et relectures. Cette revue a été publiée dans *Insect Science* sous le titre : *Mixed-species aggregations in arthropods*. Le second article s'intéresse précisément à la formation de groupes hétérospécifiques et démontre que le compromis entre socialité interspécifique et température préférentielle dépend principalement des cinétiques d'agrégation ainsi que de l'ordre d'arrivée des espèces. Ce travail est encore en cours et s'intitule : *Be lonely or feel cold: the cruel dilemma of interspecific aggregation in blowflies' larvae*. Il sera soumis début 2020 au journal *Behavioral Ecology*.

Un dernier article, en annexe de ce manuscrit, a été rédigé sur invitation de la revue *Médecine/Science*. Il récapitule à des fins de vulgarisation scientifique tout mon travail en lien avec les

autres travaux du laboratoire. Ce travail s'intitule : *Les larves de Diptères nécrophages en entomologie médico-légale : une histoire de température.*

Enfin, ce manuscrit de thèse s'achève par une discussion générale replaçant dans un contexte écologique et évolutif les résultats que j'ai obtenus. Elle permet de mettre en évidence que les asticots, qui semblent être des organismes simples, ne doivent pas être considérés comme tels. Leurs règles comportementales, associées aux conditions extrêmement variables que peut présenter le cadavre, aboutissent à des décisions collectives complexes mais qui apparaissent particulièrement efficaces pour exploiter au mieux la ressource cadavérique.

Chapitre 1 : Températures préférentielles

Thermoregulation in gregarious dipteran larvae: evidence of species-specific temperature selection

Cindy Aubernon, Julien Boulay, Valéry Hédouin & Damien Charabidzé

Abstract

There is a clear recognition that local temperature controls the development time of blowfly larvae (Diptera: Calliphoridae). It has been supposed that each species has an optimal development temperature characterized by a short development time and high survival rate. Accordingly, the temperature experienced by larvae during their development on a cadaver appears to be strongly dependent on behavioural regulation. We hypothesized that the temperature selected by larvae may not only minimize their development time on a cadaver but also may result from a trade-off between development quality and duration. According to this hypothesis, larvae of each species should select the highest temperature that allows them to develop normally. Consequently, the use of ambient temperature or maximum larval mass temperature to estimate the development time of larvae on a cadaver would be inaccurate. We designed the Thermograde, which is an 80-cm-long linear thermal gradient setup, to study species-specific preferential temperatures. Experiments were performed using three species: *Lucilia sericata* (Meigen), *Calliphora vomitoria* (L.), and *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy. For each species and replication, 80 young third instars were placed evenly spaced on the Thermograde along with 500 g of mixed beef liver. The location of larvae in the thermal gradient was observed after 19 h with fifteen replications per species. The larvae formed aggregations that were always located at the same species-specific temperatures, which were 33.3 ± 1.52 °C for *L. sericata*, 29.6 ± 1.63 °C for *C. vomitoria*, and 22.4 ± 1.55 °C for *C. vicina*. These results reveal important information concerning larval preferences and thermoregulation. Our experiments raise questions regarding the way larvae moved along the gradient and located their preferential temperatures. Further studies are needed on larval displacement and thermoregulation strategies, which are also important for post-mortem interval estimation in forensic entomology.

Introduction

Necrophagous blowfly larvae (Diptera: Calliphoridae) feed on decomposing remains, mostly on vertebrate cadavers [141]. Like all poikilothermic species, the internal temperature of larvae depends on the environmental temperature [2] – their physiological processes are directly controlled by external heat. This is especially true for development speed. Developmental curves generally show a sigmoidal relationship: the development rate is close to zero at low values, increases linearly over a medium range of temperatures, and then slows down at higher temperatures until reaching a lethal point [142]. For necrophagous blowflies, the relationship between temperature and development time has been well-documented in the context of forensic entomology [28], [143]. Restricting the development time of necrophagous larvae on a cadaver seems to be essential to prevent food shortages because of the ephemeral nature of animal carcasses in the field [144]. Furthermore, because the probability of being predated or parasitized increases with feeding duration on a cadaver, faster development should limit predation or parasitism and increase larval survival rate [51]. Accordingly, we theorized that larvae would prefer temperatures that speed up their development, thus minimizing the time they must spend on the carcass.

Various thermoregulation behaviours exist among insects. Because of their poikilothermic physiology, insects select and move between specific microclimates to adapt their body temperatures [135]. For necrophagous larvae, a preferential choice for warm areas was reported for larvae growing on carcasses that had both sunny and shady sides [74]. Conversely, larval escape from overly hot locations was also observed [111], [125].

This study was designed to (1) test the ability of necrophagous larvae to orientate in a heterogeneous thermal environment, and (2) compare the temperatures selected by the larvae of three common blowfly species. For this purpose, we designed a setup we named Thermograde. This setup consists of a food-supplied linear thermal gradient that allows larvae to move, feed, and grow in close-to-real conditions, and to choose to stay and feed at a given temperature along the gradient. Larvae of three common calliphorid species of forensic importance were tested using this setup: *Lucilia sericata* (Meigen), *Calliphora vomitoria* (L.) and *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy.

Materials and methods

Thermograde

Strains of *L. sericata* and *C. vomitoria* were collected in 2014 and 2015 in all seasons, in France (Verminière de l'Ouest; 48.424292N, -1.487749W) and the strain of *C. vicina* originated from Belgium

(near Brussels; 50.891047N, 4.392724E). Insects were reared in tulle cages (50 × 50 × 50 cm). Inbreeding was controlled by monthly introducing 50% wild-type individuals; the flies caught are reared and kept during several generations. Adult flies (250 ± 100) from a single emergence pool were maintained at 20 ± 2 °C with a daylight photoperiod and for a maximum of 30 days. Flies were fed ad libitum with caster sugar and water. To allow egg-laying, 20 ± 5 g of mixed beef liver was placed in a pill-box inside the insectariums. After egg-laying, the eggs were removed and placed at 19 °C in a MIR-554 climatic chamber (Sanyo, Moriguchi City, Osaka, Japan) in closed plastic boxes (143 × 105 × 59 mm) with 100 ± 5 g of mixed beef liver until reaching the third instar. Corresponding development times for each species at 19 °C were found in the ForenSeek database [28], [145]–[147].

Experiments were performed under controlled conditions using the Thermograde, an apparatus we designed to provide a linear thermal gradient (Figure 4). The Thermograde is composed of a heating shelf and a gutter-like galvanized steel bar (5 × 5 × 80 cm). Fresh mixed beef liver (500 g) was spread inside the bar to create a 2-cm-high food layer. The heating shelf was placed underneath the bar to spread the heat along the bar and obtain a linear thermal gradient inside the beef liver. The shape of this gradient was controlled by changing ambient (i.e., outside the bar) temperature. I-button temperature recorders (DS1921G Thermochron i-Button, accuracy: ± 0.5 °C; Maxim Integrated, San Jose, CA, USA) were placed every 5 cm (from 2.5 to 77.5 cm) to monitor the local temperature.

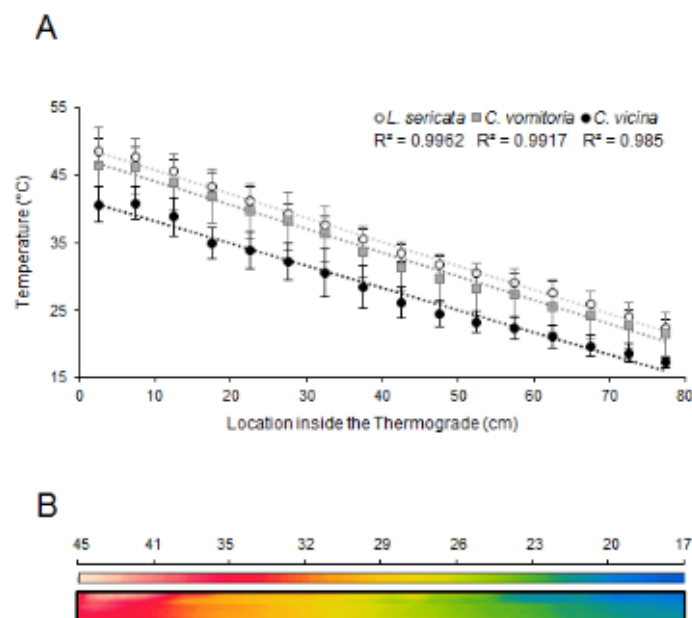


Figure 4: (A) Thermal gradients used to test temperature preferences of larvae of three blowfly species, *Lucilia sericata*, *Calliphora vomitoria*, and *C. vicina*. Data points represent the mean (± SD; n = 15 for each species) temperature inside the food substrate (beef liver) according to their locations inside the Thermograde and the species studied. (B) Thermic photograph of the Thermograde for *Lucilia sericata* as an example. The scale is in °C, the upper bar indicates the temperature colors, the lower bar indicates the temperatures measured in the Thermograde. R^2 , factor of determination.

For each experiment, 80 young third instars were sampled from the rearing box and starved in a pillbox for 4 h at 19 °C [148]. This number of insects was previously shown to be sufficient to allow aggregation [98], yet small enough to prevent larval-mass effect and thus heat emission [124], [125]. After starvation, larvae were spread on the beef liver inside the bar in a homogeneous manner (one larva per cm). Finally, the bar was closed with an opaque black plastic cap (5.5 × 3 × 80 cm).

Experiments were stopped after 19 h. According to developmental data for the three species, this duration was short enough to prevent larvae from reaching the wandering stage [28], [146], [147]. The cover was removed and the Thermograde was divided into 5-cm sections. The beef liver in each section was removed and the larvae inside were counted. The temperature values recorded during the experiment were extracted from the temperature recorders. Fifteen replicates were performed for each species.

In addition, two control experiments were performed on *L. sericata*. The first used the Thermograde without heating (i.e., 20 ± 1 °C homogeneous temperature) to test the distribution of the larvae inside the Thermograde (control 1; six replicates). The second control (control 2) was designed to ensure that heating had not affected the beef liver's nutritional value [149], potentially influencing larvae's preference. For this purpose, 'cooked' liver (i.e., incubated at 37 °C for >19 h) was used instead of fresh beef liver to create the thermal gradient. By doing this, we obtained the same thermal gradient created during the regular (non-control) experiments, but with meat previously exposed to heat. Fifteen replications were performed.

Binary choice experiment

The purpose of this experiment was to test whether the larvae in the Thermograde selected an area based on local temperature or because of food quality. The setup was composed of two translucent pillboxes (150 ml, 57 mm diameter, 73 mm high) closed with a screw cap with 1-mm drilled holes and connected with a 40-mm-long translucent plastic pipe (Figure 5). Fresh beef liver (40 g), previously heated for 19 h at either 33 or 37 °C, was placed in each pillbox. The quantity of food in the pillboxes was selected to expect 100% survival according to Ireland & Turner [150]. Twenty larvae previously starved for 4 h at 19 °C [148] were put inside each of these two pillboxes for a total of 40 larvae per setup. The entire setup was placed in a MIR-554 climatic chamber at 19 °C for 19 h. The pillboxes and tube were then disassembled and the larvae inside each pillbox were counted. The setup was kept at 19 °C during all experiments, but the liver was heated to varying temperatures before the experiments began. Three liver-temperature conditions were tested: 33 vs. 33 °C (i.e., 33 °C control; n = 15), 37 vs. 37 °C (i.e., 37 °C control; n = 15), and 33 vs. 37 °C (n = 15).

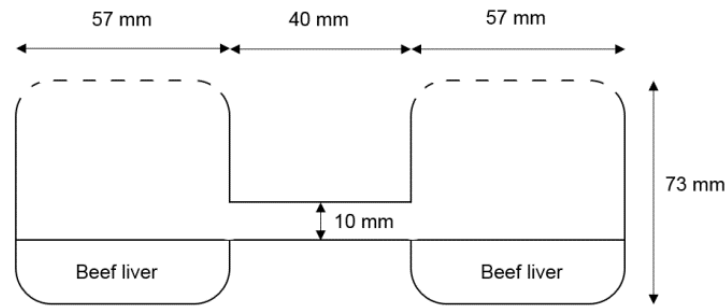


Figure 5: The binary-choice setup. Beef liver was heated at 33 or 37 °C for 19 h before experiments. After the beef liver had cooled to 19 °C, 20 *Lucilia sericata* larvae were placed in each side, and the setup was kept at 19 °C for 19 h.

Statistical analysis

A χ^2 test was used for the larval distribution and Fisher's test was used for the distribution of the aggregates. A Shapiro-Wilk test was performed to analyse the larval distribution in the Thermograde. ANOVA and post-hoc Tukey's and Dunnett's tests were used to compare the mean survival rate and the mean selected temperature between species. Finally, a z-test was performed to analyse binary choice for each replication, and Student's t-test was used to compare the mean number of individuals. All analyses were done with XLStat 2016 software (Addinsoft, Paris, France) ($\alpha = 0.05$).

Results

Our setup was designed to allow larval thermal choice under non-stressing rearing conditions. The repartition of *L. sericata* larvae in the Control-1 condition significantly differed from a homogeneous distribution ($\chi^2 = 152$, d.f. = 7, $P < 0.0001$). During each replication, most larvae aggregated in a single mass. The location of this mass in the setup differed among replicates, but did not statistically differ from a random location (Fisher's test: $P = 0.82$). In other words, without heating (i.e., homogeneous temperature), larvae aggregated inside the Thermograde, but the location of the aggregation was random (Figure 6).

When the heating was turned on, the thermal gradient inside the Thermograde was close to linear, with a drop of temperature equal to 1.8, 1.8, and 1.7 °C per 5 cm for *L. sericata*, *C. vomitoria*, and *C. vicina*, respectively (Figure 4A). Some larvae died during experiments. The mean (\pm SD) survival rate was $78.4 \pm 14.4\%$ for *L. sericata*, $87.3 \pm 9.4\%$ for *C. vomitoria*, and $87.0 \pm 6.6\%$ for *C. vicina*. No difference existed between the survival rates of the tested species and the *L. sericata* survival rate in Control 1 (ANOVA: $F_{x,y} = 2.12$, $P = 0.11$; Tukey's procedure: *L. sericata* vs. *C. vomitoria*: $P = 0.16$, *L. sericata* vs. *C. vicina*: $P = 0.14$, *C. vomitoria* vs. *C. vicina*: $P = 1.0$, *L. sericata* vs. Control 1: $P = 0.79$, *C. vomitoria* vs. Control 1: $P = 0.76$, *C. vicina* vs. Control 1: $P = 0.74$).

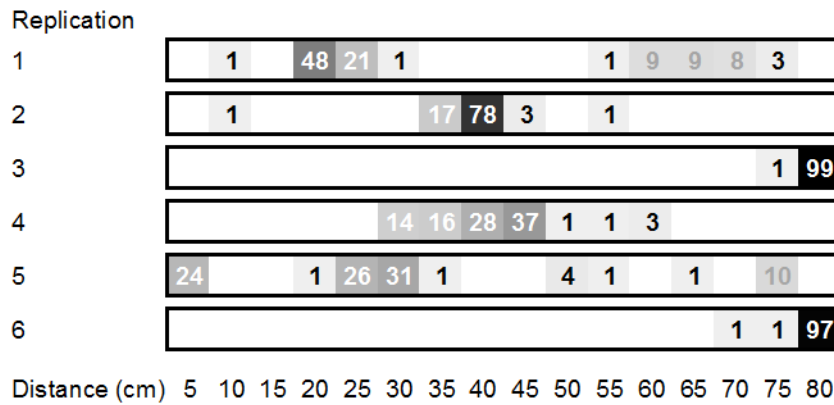


Figure 6: Percentages of larvae per 5-cm section of the Thermograde in each of the six replications (Control 1: temperature gradient absent).

The results showed that *L. sericata*, *C. vomitoria*, and *C. vicina*'s aggregates ($\chi^2 = 549.33-2015.12$, d.f. = 7, $P < 0.0001$) were not randomly located on the thermal gradient (Fisher's test: *L. sericata*: $P = 0.01$; *C. vomitoria*: $P = 0.002$; *C. vicina*: $P < 0.0001$). Larvae of each species were preferentially observed in a species-specific location: *L. sericata* larvae were found located at 33.3 ± 1.5 °C, *C. vomitoria* larvae were found at 29.6 ± 1.6 °C, and *C. vicina* larvae at 22.6 ± 1.6 °C (Figure 7). These temperature values differed significantly between the three species (ANOVA: $F_{x,y} = 144.60$, $P < 0.0001$; Tukey's procedure: *L. sericata* vs. *C. vomitoria*, *L. sericata* vs. *C. vicina*, *C. vomitoria* vs. *C. vicina*: all $P \leq 0.0001$). The larval distributions were normal (Shapiro-Wilk test; *L. sericata*: $W = 0.96$, $P = 0.45$; *C. vomitoria*: $W = 0.96$, $P = 0.29$; *C. vicina*: $W = 0.96$, $P = 0.45$) (Figure 8).

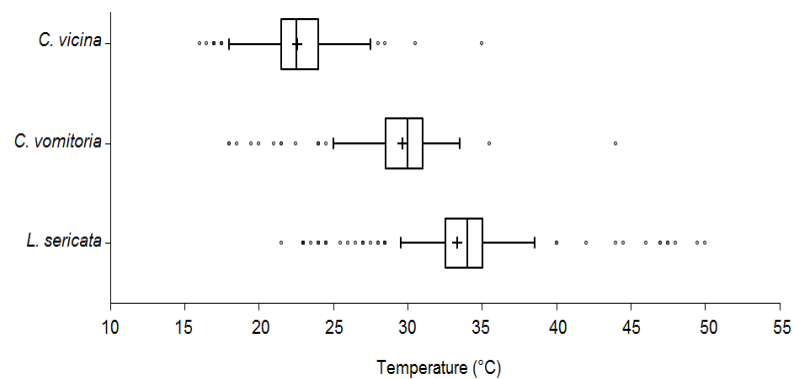


Figure 7: Box plots representing the location of the larvae according to the temperature gradient inside the Thermograde. The vertical bar inside the box represents the median, the cross represents the mean, and the dots represent outliers, i.e., isolated individuals not located in the aggregation. The lower and upper limits of the box represent the first and third quartiles, respectively. Whiskers indicate the 1.5 x interquartile range.

Finally, the repartition of *L. sericata* larvae in Control 2 differed significantly from a homogeneous distribution ($\chi^2 = 288.11$, d.f. = 7, $P < 0.0001$). Larvae were observed aggregated at a mean temperature of 33.0 ± 1.6 °C (Fisher's test: $P = 0.01$), which was not different from *L. sericata*'s selected temperature during the raw meat experiments (Dunnett's procedure: $P = 0.91$). Survival rate

was $83.3 \pm 6.9\%$, which was also not different from the raw meat experiments (Dunnett's procedure: $P = 0.65$).

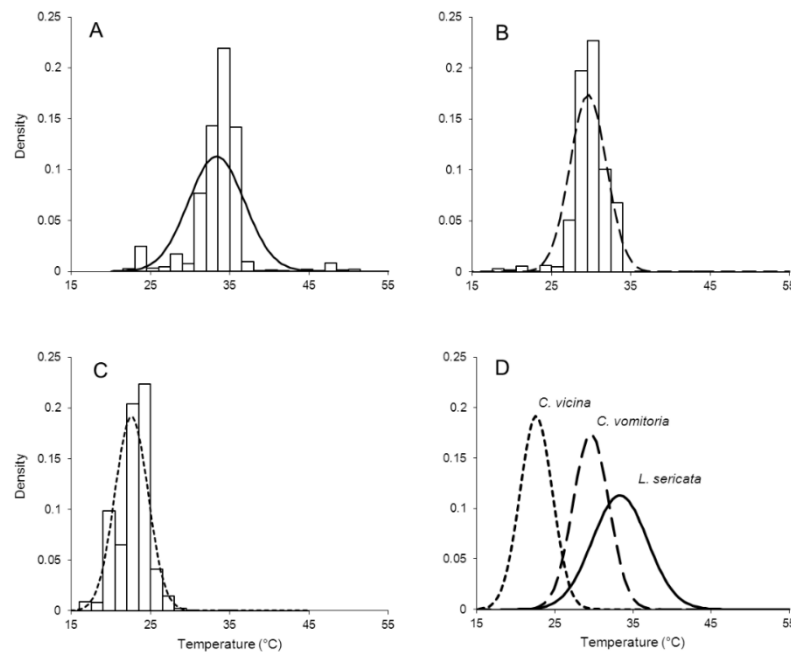


Figure 8: Density distributions of larvae of (A) *Lucilia sericata*, (B) *Calliphora vomitoria*, and (C) *C. vicina* inside the Thermograde according to temperature (°C). (D) Comparison of the three normal distributions.

In the binary-choice experiment, each replicate was divided into one ‘winner’ pillbox (the one with more larvae inside) and one ‘loser’ pillbox (Figure 9). We determined the winner and loser pillboxes for each replication by comparing the single proportion with a z-test.

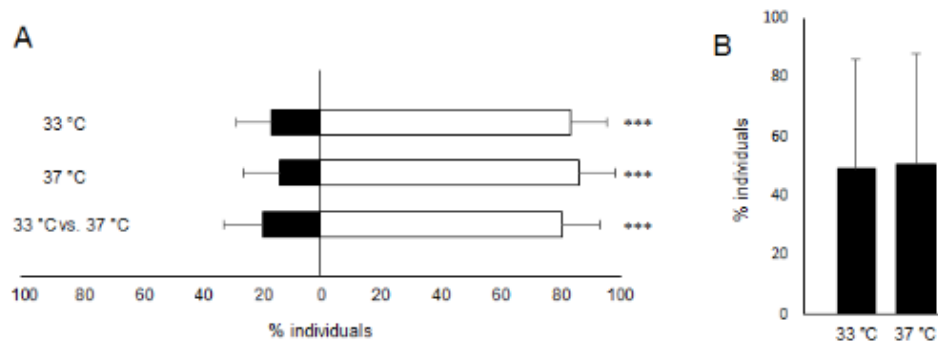


Figure 9: Mean (+ SD) percentage of larvae (A) over two connected [winner (white) and loser (black)] pillboxes containing meat previously heated at 33 vs. 33 °C, 37 vs. 37 °C (both controls), or 33 vs. 37 °C, and (B) inside the winner pillbox at 33 or 37 °C.

Three replicates (out of 15) were not significant for the 33 °C control, four for the 37 °C control, and four for 33 vs. 37 °C experiments. These non-significant choices were removed from the analysis. In the 33 °C control, the 37 °C control, and the 33 vs. 37 °C experiments, we noticed that the mean percentage of individuals was higher in winner pillboxes, with 80.6 vs. 19.4% for 33 °C control

(Student's test: $t_{\text{observed}} = -8.30$, d.f. = 11), 86.2 vs. 13.8% for 37 °C control ($t_{\text{observed}} = -10.04$, d.f. = 10), and 83.6 vs. 16.4% for the 33 vs. 37 °C experiment ($t_{\text{observed}} = -0.08$, d.f. = 10; all $P < 0.0001$). Finally, we noticed that for the 33 vs. 37 °C experiment, the 33 °C pillbox won 49.1% of the time, whereas the 37 °C pillbox won 50.9% of the time, that is, 33 °C was the winner 5× and 37 °C was the winner 6×. This did not differ from an equal (50:50) repartition (z-test: $P = 0.76$; χ^2 -test: $P = 0.55$). Last, the mean percentage of individuals was the same in both 33 and 37 °C pillboxes (Student's t-test: $t_{\text{observed}} = -9.36$, d.f. = 10, $P = 0.94$) and did not show larval preference for a given food substrate.

Discussion

This study is the first observation of collective preferential temperature selection by three species of necrophagous larvae of forensic importance. The highlight of this study was that the larvae of each species were able to locate and select a preferred species-specific temperature. These values were 33.3 °C for *L. sericata*, 29.6 °C for *C. vomitoria*, and 22.4 °C for *C. vicina*. Such a clear result raises interesting questions regarding developmental physiology and thermal regulation in necrophagous larvae.

It is known from the literature that a measurable increase in temperature can arise inside aggregates (larval-mass effect) [125], [126]. Such local heating begins with an aggregate of approximately 1 000 third-instar individuals and increases with the quantity of larvae [124]. During our experiments, the number of larvae was kept low enough to prevent this phenomenon, and thermometers inside the bar did not record any local increase of temperature in the places where larvae aggregated. Accordingly, any larval-mass effect in our experiment can be excluded. One might also object that the larvae did not select a given temperature but instead selected a food quality. In that case, the nutritional value of the beef liver should change depending on its temperature and according to blowfly species. However, no difference for *L. sericata* was observed between experiments with raw or 37 °C-incubated foods (Control 2). Furthermore, binary-choice test experiments did not show any larval preference between foods incubated at 33 vs. 37 °C; larvae were gathered at both temperatures and at the same mean percentage. Hence, larval distribution in the Thermograde was not due to differences in food quality, but rather to preferential temperature selection.

Larvae were able to aggregate into a single group inside the Thermograde [60], [98]. Under Control-1 conditions (20 ± 1 °C homogeneous temperature, no heating), these aggregates were located randomly throughout the apparatus. This control demonstrates that the distributions observed in the gradient experiments were not due to setup bias or increased probability to cross and aggregate in the

middle of the Thermograde. On the contrary, for the three tested species, aggregates clearly occurred in different areas of the Thermograde at given species-specific temperature values. In addition to the well-known larval aggregation behaviour [98], our results demonstrate for the first time the search behaviour and collective preference of necrophagous larvae for a given temperature. The selected temperature was highly species-specific.

In a recent study, Johnson *et al.* [113] studied larval temperature selection of two necrophagous species, *C. vicina* and *Chrysomya rufifacies* (Macquart). Using a thermal gradient created with a heating spot and a cold bath, the authors observed 3× the selection of third instars, defined as the temperature value where larvae stopped and stayed after 2 h. According to this protocol, *C. vicina* larvae preferred a temperature of ca. 24.5 °C. This value is 2 °C above the one we measured (22.4 °C). This difference may be influenced by the few replicates performed (only 3 with third instars), the exactness of the thermal gradient used (the temperature was known each 10 cm in a range of 23-54 °C), or by differences between the two studied insect populations. The *C. vicina* larvae studied by Johnson *et al.* [113] came from Australia, whereas ours came from Belgium. Local fly populations are morphologically and physiologically adapted to their environment [73], [151], [152]. For example, differences exist in the diapause and low-temperature survival rates between Scottish, Finnish, and Italian populations of *C. vicina* [153]. *Calliphora vicina* from Switzerland have even been shown to develop in extremely cold environments that are usually not suitable for this species [15].

The temperature preferences of each species are not yet understood. Larvae feeding and growing on carrion face high selection pressure [62]. Decomposition processes can alter flesh within a few days, and quick drying of the tissues can make cadavers inedible for blowfly larvae [23]. Furthermore, numerous opportunistic scavengers, such as wild boars, foxes, or crows, can eat small cadavers or deflesh larger ones within minutes [154]. Thus, larvae should minimize the time spent on the cadaver and maximize their rate of development. This can be achieved by moving to high-temperature areas [28]. Accordingly, larvae of each species are expected to select the highest temperature allowing their development. However, developmental data from the literature do not validate this hypothesis; these data are mostly restricted to medium temperature ranges, only a few values are available for high temperatures. Reiter [140] noticed that when constant temperatures were beyond 30 °C, *C. vicina* larvae were deformed or died. Donovan *et al.* [151] reported a larval lethal temperature for *C. vicina* of 35 °C, more than 10 °C above the value larvae selected in the Thermograde. We hypothesized that the temperature preferred by larvae would not be selected solely to minimize development time on the cadaver, but instead may result from a trade-off between development quality and duration. Temperature controls not only the physiology of the larvae and their

development rate [2], but also the quality of their growth, in short the individuals' *fitness*. Larvae growing under too-high temperatures could be malformed or stay small [140], and physiological parameters (e.g., respiration) or the eggs may also be affected [155]. Such effects are even transmitted to the second generation: Zamudio et al. [131] demonstrated that *Drosophila melanogaster* (Meigen) *fitness* depends on parental rearing temperature. In order to test our developmental trade-off hypothesis, breeding experiments are currently being performed in our laboratory to gather developmental data (duration, survival rate, length, weight) at high temperature for the three blowfly species.

Finally, our experiments raise questions regarding the way larvae moved on the gradient and located their preferential temperature. From our results, it is not possible to determine whether the aggregate was created by the sum of individual thermal preferences, or whether larvae first aggregate and then move together. Previous studies of larval masses noticed a turnover of larvae inside masses, a behaviour that supposedly allows larvae to cool off and prevents overheating of the aggregates [148], [156]. Further studies need to be conducted on individual larva displacement and thermoregulation strategies, which are also important for post-mortem interval estimation in forensic entomology.

Acknowledgment

We thank Luc Bourguignon and Yves Braet for providing *Calliphora vicina* strains, as well as Gregory Sempo and Cédric Devigne for their helpful comments.

Chapitre 2 : Thermorégulation

The maggot, the ethologist and the forensic entomologist: sociality and thermoregulation in necrophagous larvae.

Cindy Aubernon, Valéry Hédouin, Damien Charabidzé

Abstract

Necrophagous insects are mostly known through forensic entomology. Indeed, experimental data investigating the effect of temperature on larval development underlies post-mortem interval estimations. However, such developmental studies rarely considered the behavior of maggots. In contrast, previous results supposed that calliphoridae larvae use behavioral strategies to optimize their development on carcasses. To test this idea, we analyzed the trade-off between thermal regulation (individual thermal preferences) and social behavior (aggregation) in *Lucilia sericata* larvae. The first set of experiments analyzed the behavior of third instars in response to thermal changes in their environment. The results demonstrated a clear thermoregulation behavior, supporting the assumption that larvae continuously move to reach a suitable internal temperature. The second set of experiments focused on the trade-off between thermal optimization and aggregation. The results showed a constant search for congeners and an attractiveness of aggregates, sometimes to the detriment of thermal optimization. Together, these results demonstrate a balance between behavioral thermoregulation and social strategies, two significant mechanisms for developmental optimization in necrophagous larvae. In conclusion, these findings highlight unexpected (social) strategies to cope with ephemeral resource and high selection pressure. They also raise important questions for forensic entomology.

Introduction

Aggregation, often considered as the first stage of sociality, can be described as a simple inter-attractive behavior resulting in a local increase in individual density (i.e., an aggregate) [157]. This behavior can be observed during larval and/or adult life stages and be composed of individuals of a single or sometimes different species [158]. In any case, aggregation is based on direct or environmentally-mediated (i.e., stigmergy) communication and involves feedback loops [95], [159]. While apparently simple, such stochastic and repeated interactions between members of a group can result in complex structures and serve critical roles [160].

To understand the developmental strategies of such group-living animals, reductionist approaches (i.e., focusing on individuals) are limited. Indeed, the study of single individuals placed under strictly controlled conditions noticeably fails to explain how larger scales of organization influence the behavior and *in fine* the *fitness* of these individuals. A more realistic consideration is that complex systems have features that none of their individual parts have and must be studied as a whole. As an example of this approach, Dombrovski et al. recently discovered cooperative behavior in *Drosophila* larvae [121]. While foraging in liquid food, larvae aligned themselves and coordinated their movements to drag a common air cavity and access deeper food. According to the authors, this social cooperation could be a strategy to cope with a harsh environment. As insects breeding on fresh carcasses face high selection pressures, they provide interesting opportunities to study such social adaptations. As with *Drosophila* larvae [121], blowfly larvae may have developed complex social strategies resulting in better development on carrion.

From a niche-partitioning point of view, blowflies (Diptera: Calliphoridae) can be regarded as a pioneer species; they are the first colonizers of vertebrate carcasses. Calliphorid larvae (i.e., maggots) are among the few insects able to grow on fresh necromass (i.e., animal's carcasses), and they dominate the carrion ecosystem during the first decomposition stages [161]. Their growth is strongly correlated with heat: in a range of favorable conditions, larval development speed increases linearly with temperature [28]. Due to its importance for calculating the minimum post mortem interval (mPMI) [162], this relationship between temperature and blowfly larval development has been extensively studied in the context of forensic entomology. While the first studies on maggot development time [146] focused on the effect of ambient temperature, later research has shown that behavior also affects larval development [47]. A striking example is the larval mass effect [163]-[164]. This local heat emission is the consequence of larval crowding and can increase local temperatures above 40 °C, resulting in faster development of aggregated larvae [125], [163]. These results shed light on the effect of social strategies on larval development and the limitations of development data based

on reductionist experiments. In the present study, the hypothesis is that individual and social thermal regulation behavior may exist in blowflies necrophagous larvae.

At the individual level, most ectotherms regulate body temperature using microhabitat selection [165], [166]. Compliant with this idea, necrophagous larvae have been observed to adapt their foraging activity according to local temperature [70]. Larvae are also able to move toward a thermal gradient to locate and select a preferred species-specific temperature [167]. The authors hypothesized this temperature as a trade-off allowing larvae to grow fast but efficiently (i.e. large individuals with low mortality rate). Furthermore, Scanvion et al. [47] demonstrated that aggregation facilitates exodigestion and food intake, thus contributing to a shorter development time and better *fitness* of aggregated larvae. Accordingly, a trade-off between individual (thermal regulation) and social (aggregation) behavior may exist. To test this idea, the present work analyzes the trade-off between thermal regulation (individual thermal preferences) and social behavior (aggregation) in Calliphoridae larvae.

Material and methods

Insect breeding

Lucilia sericata adult flies (approximately 250 ± 50) were reared in $50 \times 50 \times 50$ cm tulle cages with caster sugar and water *ad libitum*. Eggs were obtained by placing a pillbox of 20 ± 1 g of mixed beef liver inside the insectarium during a maximum of four hours. Presence of eggs was checked hourly: laying time was thus known with a more or less 30-minute resolution. The eggs obtained were kept in closed plastic boxes ($143 \times 105 \times 59$ mm) inside a climatic chamber (Sanyo, Moriguchi City, Osaka, Japan) at 19 ± 0.1 °C on 100 ± 5 g of mixed beef liver until reaching the appropriate instar [28].

Thermal regulation behavior

The experimental setup named *choice setup* consisted of a $40 \times 5 \times 5$ cm gutter-like metallic bar containing 250 ± 5 g of mixed beef liver. This bar was closed with an opaque plastic lid and kept at 21 ± 2 °C ambient temperature. Two heating pads (Groupe Thermo Technologies, Annecy, France, Schutzart IPX4) placed at each extremity under the bar created two hot spots (HS). iButton thermometers were deposited every 5 cm (from 2.5 to 37.5 cm) inside the liver to monitor local temperatures (DS1921G Thermochron iButton, accuracy: 0.5 °C; Maxim Integrated, San Jose, CA, USA).

The same protocol was used for all experiments; only the temperature of the hot spots and durations changed. Eighty third instars were removed from rearing boxes and placed in a pillbox to starve [148]. After 4 hours, these larvae were spread over the bar, one each half centimeter, and the

bar was closed. At the end of the experiment, the lid was opened, and the bar was divided into four 10 cm sections. The larvae in each section were counted, and the temperature was recorded.

Four different experiments were performed using this setup. (A) The ability of larvae to select and aggregate on a hot spot was analyzed (*A-Single hot spot*). For this purpose, only one spot was heated at 27 °C, while the rest of the bar was at ambient temperature (Figure 10 A). The location of larvae was analyzed after 8 or 16 hours with 17 and 18 replicates respectively. (B) The ability of larvae to locate and select the warmest spot was investigated (*B-Two hot spots*). For this purpose, one spot was heated at 27 °C, while the second spot was set at 36 °C (Figure 10 B). This last temperature is close to that one observed by Aubernon et al. [167] as the preferential value for this species. Two durations, 8 and 16 hours, were investigated (15 replicates). (C) The ability of aggregated larvae to relocate on a hot spot (27 °C) when the temperature of their local environment (36 °C) decreased was analyzed (*C-Hot spot cooling*). This experiment thus mimics temperature changes on a carcass during night time (surface temperature drop). For this purpose, the experiments started with two hot spots turned on: one at 27 °C and the second at 36 °C. After 16 hours, the 36 °C spot was turned off while the other spot stayed at 27 °C for eight more hours (14 replicates). (D) Finally, the ability of aggregated larvae to move to a new and hotter spot (*D-Hotter spot*) was investigated. For this experiment, a first spot was heated to 27 °C. After 8 or 16 hours, a second spot was turned on at 36 °C for 16 or 8 hours, respectively, so that the total experiment duration was always equal to 24 hours. Sixteen replications were performed for each condition.

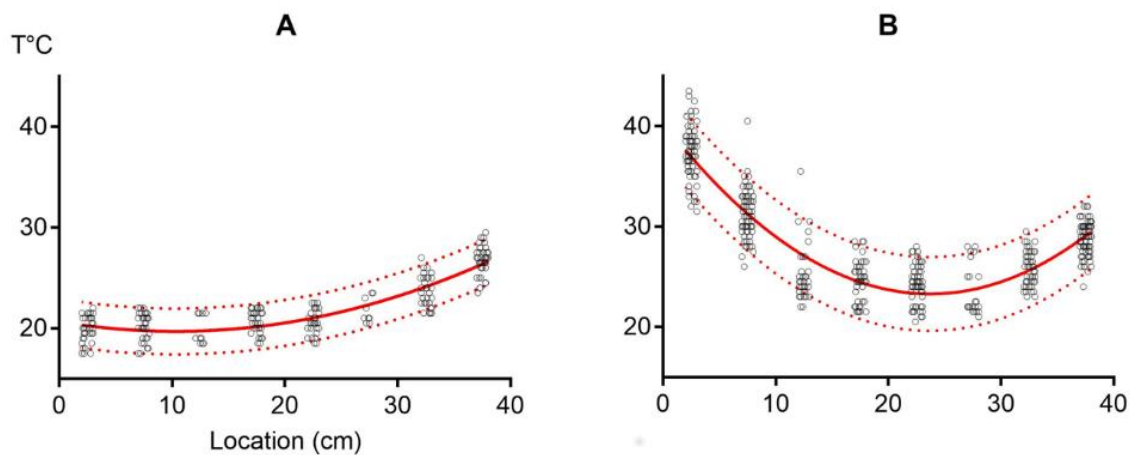


Figure 10: Curves representing the temperature inside the choice setup (each 5 cm) at the end of the experiment. Dotted lines represent the boundary markers for 2.5 and 97.5 percentiles. A: Thermal profile when only the less warm spot is turned on. B: Thermal profile when the two hot spots are turned on.

E-Aggregation VS thermal optimization

To analyze the trade-off between aggregation and thermal optimization, larvae were placed in a thermal gradient (Thermograde, [167]) with a conspecific captive group located at a sub-optimal temperature. In brief, Thermograde is composed of a heating shelf and a gutter-like galvanized steel bar (80 × 5 × 5 cm). Before each experiment, 500 ± 5 g of fresh mixed beef liver was spread inside the bar to create a 2 cm high food layer. The heating shelf underneath the bar created a linear thermal gradient inside the beef liver ranging from 22 ± 0.5 to 49 ± 0.5 °C (i.e., a 0.36 °C increase every cm). Forty third instars were homogeneously spread on the setup. A captive aggregate formed by 40 or 20 third instars enclosed in a tulle bag (5 × 5 × 0.2 cm) with 10 pieces of polyethylene foam (0.1 ± 0.01 g) was placed in the colder area of the Thermograde. After 19 h, the number of larvae located inside each 5 cm section was counted (14 replicates with 40 larvae in the tulle bag, and 8 replicates with 20 larvae). A control experiment was performed using the same setup but an empty tulle bag (7 replicates).

Statistical Analysis

For part A to D, the insect count (i.e., presence or absence) in each area have been modelled using a logistic regression under a quasi-binomial distribution assumption. Binary choices between areas for one replicate have been analyzed using z-tests. For part E, a dendrogram based on a hierarchical clustering approach was created to qualify the differences between replications (experiments with a ratio of 20/40). Finally, Mann-Whitney test has been used to compare mean temperature selection to the one reported in Aubernon et al., [167]. Logistic regression and hierarchical clustering have been performed using R software v.3.3.2 (R development Core Team). Z and Mann-Whitney tests were performed using XLStat (XLStat, Addinsoft, Paris, France, 2016).

Results

The experiments were performed on a natural food substrate (ground beef liver), in the dark, and at realistic larval densities. Due to this experimental design and the burrowing behavior of larvae, it was not possible to monitor individuals in real time. To prevent any disturbance of larvae during behavioral experiments, their location in the setup have been observed only once per trial at the end of the given experimental time (8, 16, 19 or 24 hours). In other words, the results observed after 16 h were not the pursuit of 8 h experiments, but a second set of experiments lasting longer. While these methods are more time consuming than repeated monitoring of the same experiment over time, it allows observation of the exact location of all the larvae without disrupting aggregates or exposing larvae to light and other stress factors. Using this setup, the mean survival rate for all our experiments was 91.53 ± 7.44 %.

Thermal regulation behavior

A-Single hot spot

The thermal gradient inside the choice setup was shaped as a curved slope with the base at 20.19 ± 0.74 °C and the top at 26.66 ± 0.32 °C (Figure 10 A). Under these conditions, larvae promptly moved inside the bar and gathered on the hottest spot. Results clearly shown the majority of the larvae in the warmer area: 98.59 ± 1.18 % of the larvae after 8 h and 98.69 ± 2.70 % after 16 h (Figure 11). No difference was observed between these two durations (logistic regression: estimate = -0.35, $p = 0.635$).

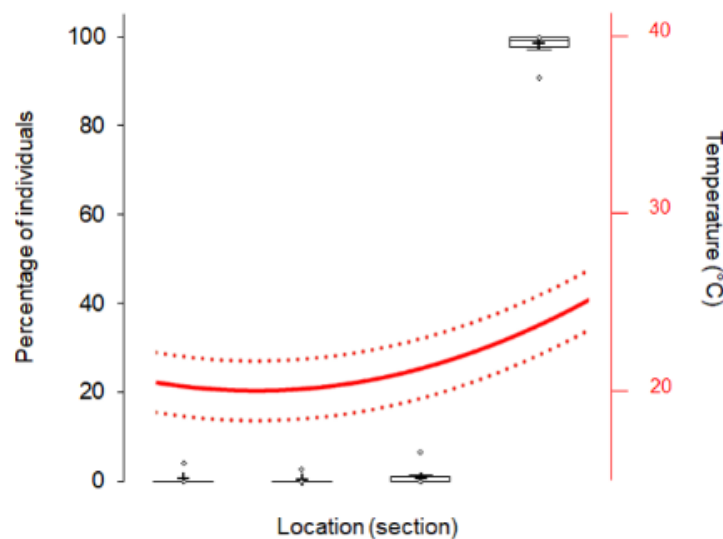


Figure 11: Chart representing the location of the maggots according the temperature inside the choice setup when only the less warm spot is turned on at 8 h or 16 h. The solid red line represents the temperature (°C), and the red dotted lines represent the boundary markers for 2.5 and 97.5 percentiles. Box plots represent the percentage of maggots in each of the four sections of the choice setup. The horizontal line inside the box represents the median, the cross the mean, and the dots represent minimum and maximum. The lower and upper limits of the box are the first and third quartiles, respectively. Whiskers indicate the 1.5 x interquartile range.

B-Two hot spots

The thermal gradient inside the choice setup was bowl-shaped, with one side at 27.33 ± 1.27 °C and the other side at 37.32 ± 1.29 °C, while the central area was at 24.53 ± 3.58 °C (Figure 10 B). After 8 hours, 71.06 ± 19.98 % of individuals were located on the hottest spot, and one third were observed at 27.33 ± 1.27 °C (Figure 12 A). However, after 16 hours, the repartition shifted with 95.16 ± 3.19 % of individuals located on the warmer spot (Figure 12 B). Statistical analyses showed that larval repartition differed according to experiment duration: significantly more larvae were located on the warmer spot after 16 h than after 8 h (logistic regression: estimate = 2.08, $p = 1.61e^{-08}$).

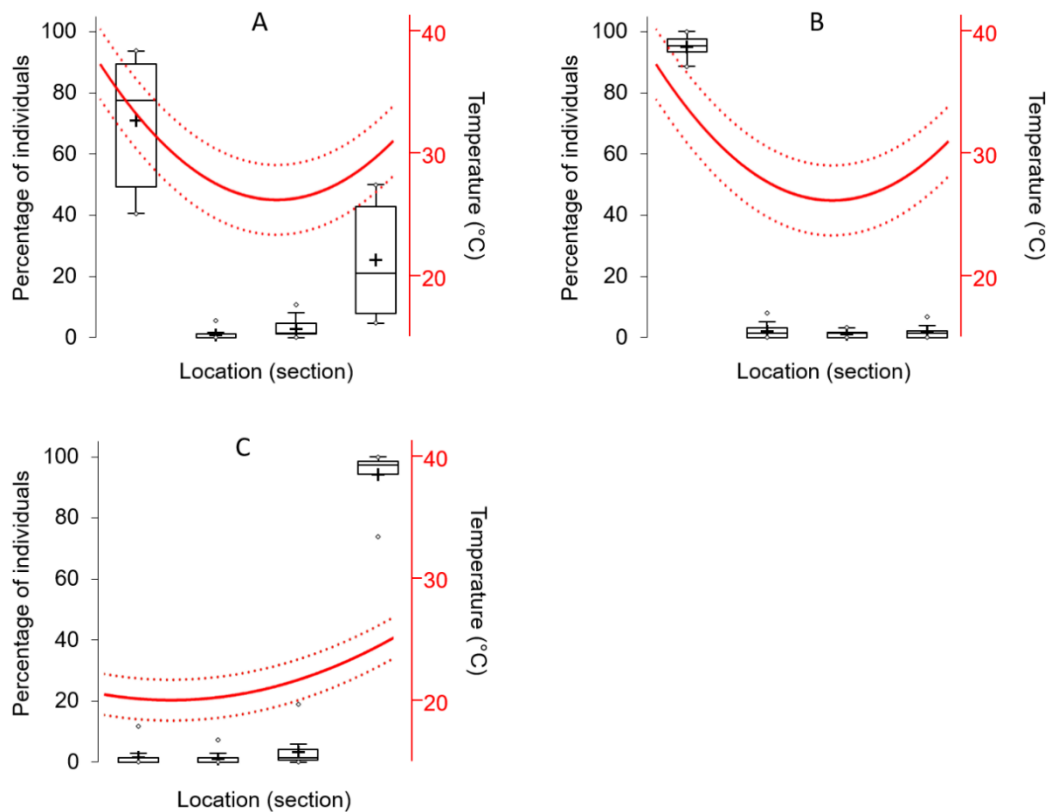


Figure 12: Chart representing the location of the maggots according the temperature inside the choice setup. The solid red line represents the temperature ($^{\circ}\text{C}$), and the red dotted lines represent the boundary markers for 2.5 and 97.5 percentiles. Box plots represent the percentage of maggots in each of the four sections of the choice setup. The horizontal line inside the box represents the median, the cross the mean, and the dots represent minimum and maximum. The lower and upper limits of the box are the first and third quartiles, respectively. Whiskers indicate the 1.5 x interquartile range. A and B: Representation when the two spots are turned on during 8 and 16 hours, respectively. C: Representation at 24 hours when the warmer spot had been turned off for 8 hours.

C-Hot spot cooling

After 16 hours on, the hottest spot ($37.32 \pm 1.29^{\circ}\text{C}$) was turned off, resulting in a cooling of the spot and a shift in temperature profile (from Figure 10 B to Figure 10 A). The results showed that 8 hours after this shift occurred, $94.17 \pm 8.10\%$ of the larvae moved from this first spot and relocated to the $27.33 \pm 1.27^{\circ}\text{C}$ spot (Figure 12 C). This distribution significantly differed from that observed when the 2 spots were turned on (logistic regression: estimate = -7.001 , $p < 2e^{-16}$).

D-Hotter spot

Larvae were located on the 27°C spot during the first 8 or 16 hours (see A- Single Hot Spot). When the 36°C spot was then turned on (for 16 h or 8 h, respectively), a slight displacement of the larvae toward this warmer spot occurred (for 16 h logistic regression estimate = 4.65 , $p = 2.47e^{-4}$; for 8 h logistic regression estimate = 5.17 , $p = 0.001$). Considering each experiment by itself (Figure 13), it

has been observed, for most replications, a unimodal repartition with a significant choice for one of the two spots (z-tests for all replicates: $z > |2.68|$, $p < 0.03$). However, for six replicates out of 48, the repartition was not different from a 50/50 one (z-tests for all 6 replicates: $z < |1.78|$, $p > 0.06$).

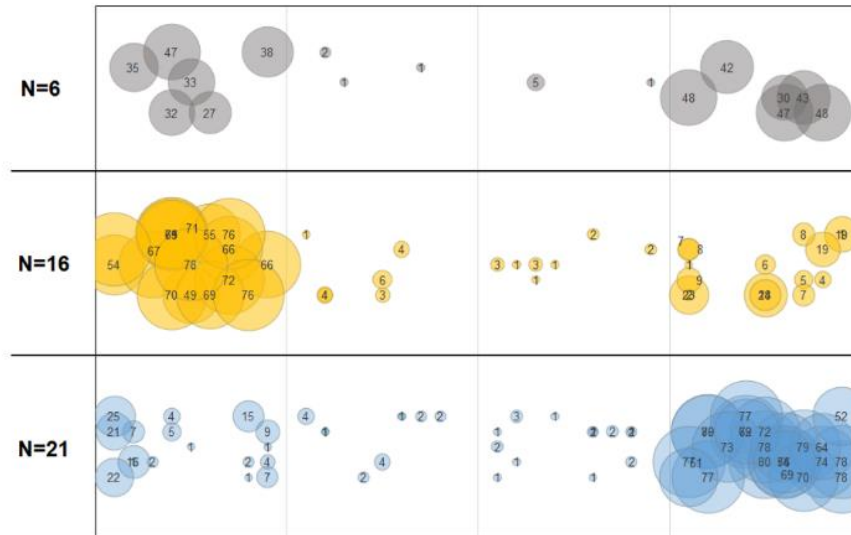


Figure 13: Repartition of maggots inside the apparatus according to their choice to move to the warmer spot or to stay in their previous aggregation area on the less warm spot. Bubbles represent the percentage of maggots per each replicate. In gray, at the top, is representation of the 6 replicates without choice. In yellow, at the middle, is representation of 16 replicates when larvae decide to move to the warmer spot. In blue, at the bottom, is representation of 21 replicates when larvae decide to stay on the less warm spot at the aggregation position.

E-Aggregation VS thermal optimization

Placing a bag containing 40 captive larvae at 23 ± 1 °C resulted in 98.72 ± 2.80 % of the 40 free larvae moving at 23 ± 1 °C (Figure 14). Using 20 captive individuals, which is half as many as free individuals, the choice was not as strict, with a non-homogeneous aggregation between replicates (cf. cluster dendrogram on figure 14). However, larvae were always located between their preferential temperature and the captive larvae. On the opposite, control experiments showed that an empty bag did not affect the location of the larvae inside the Thermograde (compared to Aubernon et al. [167], Mann-Whitney test: $U = 41$, $p = 0.45$).

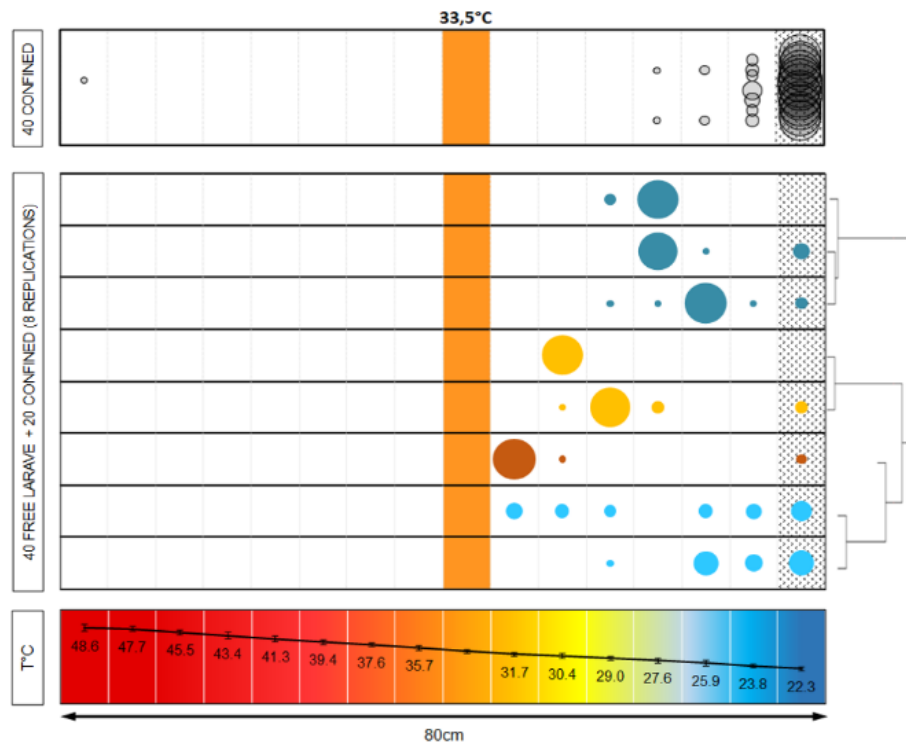


Figure 14: Representation of the location of maggots inside the Thermograde experiments. At the bottom, the colorful scale describes the temperature sample in the Thermograde from 22.3 to 48.6 °C. The orange bar identifies the location of the preferential temperature of *L. sericata* and thus the selected area in previous experiments. At the top, the bar represents all the replicates when 40 free larvae confronted 40 trapped maggots. In the middle, each bar represents one replicate when 40 free larvae confronted 20 trapped maggots. These replicates are compared using the dendrogram placed on the right of the chart.

Discussion

Necrophagous larvae are mostly known from forensic entomology research [146]. Most of the developmental data have been obtained in this context, focusing on the effect of ambient temperature on development time [28]. Not surprisingly, the majority of these studies have been performed under similar conditions, using constant and homogeneous temperatures, easy to ingest food and a restricted number of insects [28], [143]. Furthermore, the experimental procedure often includes regular measurement or sampling, and thus, the perturbation of aggregated larvae [90]. Analyzing larval behavior was not an issue. Actually, Grassberger and Reiter specifically designed their Material and Methods to “achieved a more two-dimensional and disseminated feeding behavior, which is essential to prevent maggot mass formation” [28]. Moreover, several parameters that determine population *fitness* (e.g., survival rate) were not studied [168]. However, there is a growing recognition that several biotic parameters, and more particularly behavior, affect larval development and *fitness* [169]. The present study highlight complex behavioral strategies likely resulting in a better development on

carrions, and suggest how forensic entomology could benefit from this behavioral ecology point of view.

Thermoregulation

Heat is especially important for the development of insect larvae. The local temperature prevailing during larval development noticeably impacts their survival rate [170], activity [171], development speed [28] and morphometrics [150], as well as adult size and fertility [73], [131]. Thus, temperature is a key parameter not only for larval growth but also for the *fitness* and other life history traits of the population [73], [168]. Consequently, most ectotherms regulate body temperature to some extent using behavioral mechanisms such as changes in posture and microhabitat selection [165], [166]. As necromass is a rich but ephemeral resource with high selection pressure, it has been shown that necrophagous larvae should tend to grow fast, which can be obtained by favoring high local temperatures [28]. To test this idea, an observation of the reaction of larvae to temperature changes has been made. Results demonstrate a thermal regulation behavior by blowfly larvae in their environment, and supports the assumption that larvae continuously move to maintain a suitable internal temperature [60], [70], [113].

Results also demonstrated that larvae were able to locate hot spots and preferentially aggregated on these areas. Whether with one or two hot spots turned on, larvae gathered on the hotter place. When only one hot spot was present, this aggregation occurred directly; when two hot spots were available, aggregation was achieved in two steps. Larvae initially moved to a near hot spot, resulting in two different aggregates; in a second step, all larvae gathered on the hotter spot. This unbalanced proportion of larvae on the two spots during the first step, with the two thirds on the hotter spot and the other third on the less warm spot, strongly suggests a gradient-following behavior. Indeed, the inflexion point of the thermal curve occurred on the third part of the setup (Figure 10 B). It is thus likely that the larvae first followed the ascending gradient on their side resulting in the 2/3 VS 1/3 initial repartition. Compliant with this result, larvae already aggregated on a hot spot (less warm spot) also reacted to the warming of a distant location (warmer spot) and were able to move to that location. In contrast, when a location became less favorable (cooling of the warmer spot), larvae moved to the other hot area that was previously avoided. These experiments demonstrate that larvae not only search for high temperatures, but also for the best available temperature.

In calliphorids larvae, both development and growth rate increase with temperature, and the balance of the two also determine how adult size changes [28], [73]. Although fast growth seems to be generally favored by natural selection, it also carries costs, and individuals grow more often at a lower rate than they are physiologically capable of [172]. Thus, growth results in a trade-off between

development speed and quality (as defined in [173] and [174], without taking into account the reproductive performance). Aubernon *et al.*, [167] demonstrated that *L. sericata* larvae placed in a thermal gradient selected a 33.3 ± 1.52 °C area to aggregate. According to the authors, this choice could be the optimum allowing larvae to optimize both development duration and quality. While this temperature is quite high (in most European countries, such temperatures are only punctually recorded under field conditions), local temperatures inside large larval masses often reach or exceed this threshold [125], [163].

Social behavior

Calliphorids larvae are also known for their strong social behavior, resulting in large maggot-masses gathering hundreds to thousands of individuals [60]. This social behavior brings several advantages in terms of *fitness* [60]. Accordingly, we hypothesized a trade-off between individual (thermal preference) and social (aggregation) behavior to optimize larval development.

Compliant with this idea, this study highlights an effect of the group on the selected temperature. In other words, there was a retentive effect of the group, and this retention prevented larvae from relocating to a more suitable temperature. During experiments involving the warming of a second spot, larvae initially aggregated on the first spot (less warm) did not always move to the later hotter spot. It is supposed that the benefits of aggregation and the cost of moving might have balanced the benefits of a higher local temperature. It is important to note here that in any case, a group of 40 larvae does not produce heat; the larval mass effect has only been demonstrated for larger groups gathering hundreds to thousands of larvae [134]. Furthermore, such a retention cannot be simply explained by group inertia; indeed, aggregated larvae were observed moving during cooling experiments. Thus, a more complex balance between aggregation and thermoregulation must be involved. Here, the benefits of aggregation could be a mutualized food intake (i.e. exodigestion) that permits a nourishment facility [47]. Consistent with this idea, Padmanabha et al. [134] observed that *Aedes aegypti* larval development is sensitive to the combination of nutrient and thermal conditions.

In a second set of experiments, larvae faced a choice between aggregation and thermal optimization. In such conditions, they always selected the 40-larvae group located at cold temperatures (23.52 ± 0.81 °C) rather than the uncrowded but hotter area. Such a result confirms the existence of a trade-off between aggregation and thermal optimization. Interestingly, the same experiment performed with a group of only 20 captive larvae resulted in more qualified results. Instead of gathering with the fewer larvae located in the cold area, the 40 free larvae were found spread between 33 ± 0.5 °C and 24 ± 0.5 °C or aggregated at an intermediate temperature (i.e., 26.82 ± 2.54 to 29.68 ± 2.39 °C). Larvae were therefore able to assess the number of aggregated larvae and/or the

costs/benefits of joining the group, and adjusted their behavior accordingly. Compliant with this idea, Fouché *et al.* [100], demonstrated that blowfly larvae can discriminate the signals of different species and to infer the quantity of larvae from ground-deposited cues.

Conclusion

From an adaptive point of view, gregariousness is often considered a strategy to cope with harsh environments, particularly through protection against predation and parasites [175]. Additional specific benefits have also been demonstrated for necrophagous larvae, namely, collective exodigestion and heat emission [47], [60], [125]. Overall, the reason for a given larva to stay within an aggregate appears to be a balanced choice considering at least some immediate costs (displacement, cold temperature) and benefits (high temperature, collective exodigestion, protection against predators and parasites). To conclude, larval behavior appears to be a complex trade-off between the search for congeners (i.e., aggregation) and suitable environmental conditions, particularly, an optimal local temperature. Due to the rarity of high (i.e., close to 34 °C) ambient temperature in central Europe, aggregation can be regarded as an alternative way to reduce development time through mutualized food intake [47] and the emergence of social phenomena such as larval mass effects [125].

From a more practical point of view, these findings should be kept in mind when performing developmental studies or caseworks in forensic entomology. Since maggot's behavior and group retention strongly affect the temperature experienced by larvae, we can suppose that development time could be impacted as well. However, given the complexity of behavioral regulations, it appears utopian to establish *a posteriori* the exact temperature experienced by larvae during their development. Consequently, mPMI calculation errors might appear, particularly in cases with high temperature variations. Therefore, we recommend increasing the margin of error on the development time calculations, especially in cases involving strong thermal variations and weak larval density. We also suggest reconsidering the way forensic entomology development data are obtained to include the social behavior of larvae in forthcoming studies.

Acknowledgment

Thanks are expressed to M. Canouil for assistance with statistical analysis.

To eat or get heat: Behavioral trade-offs between thermoregulation and feeding in gregarious necrophagous larvae

Jana Podhorna, Cindy Aubernon, Marie Borkovcova, Julien Boulay, Valery Hédouin, Damien Charabidzé

Abstract

The thermoregulation behavior of *Lucilia sericata* larvae (Diptera: Calliphoridae), a necrophagous species that feeds on vertebrate cadavers, was investigated. These larvae require high heat incomes to develop, and can elevate temperatures by forming large aggregates. We hypothesized that *L. sericata* larvae should continue to feed at temperatures up to 38 °C, which can be reached inside larval masses. Thermal regulation behavior such as movement between a hot food spot and colder areas was also postulated. The hypotheses were tested by tracking for 1 h the activity of single, starved third instar larvae in a Petri dish containing 1 food spot (FS) that was heated to a constant temperature of 25 °C, 34 C or 38 C with an ambient temperature of 25 °C. The influence of previous conspecific activity in the food on larval behavior was also tested. The crops of larvae were dissected to monitor food content in the digestive systems. Based on relative crop measurements, larvae fed at all food temperatures, but temperature strongly affected larval behavior and kinematics. The total time spent by larvae in FS and the duration of each stay decreased at high FS temperature. Previous activity of conspecifics in the food slightly increased the time spent by larvae in FS and also decreased the average distance to FS. Therefore, necrophagous *L. sericata* larvae likely thermoregulate during normal feeding activities by adjusting to local fluctuations in temperature, particularly inside maggot masses. By maintaining a steady internal body temperature, larvae likely reduce their development time.

Introduction

The thermal regulation abilities of individual *Lucilia sericata* larvae (Diptera: Calliphoridae) (Meigen 1826), a common necrophagous species of forensic importance, were investigated in this study. Larvae of *L. sericata* are ectotherms and develop more rapidly as ambient temperatures elevate up to an upper thermal limit. Thus, *L. sericata* larvae thermoregulatory and feeding adaptations likely facilitate rapid larval development, reduce mortality rates by reducing the time larvae remain on cadavers and increase the probability of reaching the minimum body mass threshold required for pupation [176]–[178].

According to Chapman [2], temperature is the climatic condition that has the greatest effect on insects, with activity and development significantly affected [128], [135]. May [135] describes thermoregulation in insects as a generally discontinuous phenomenon, involving changes in production, loss and heat exchange with the environment. However, because insects are small in size and weight, behavioral regulation is often more effective and adaptable than endogenous thermoregulatory mechanisms [2], [128], [179]. Indeed, body temperature is strongly influenced by the surrounding environment, and because of the small size of insects, many species use small-scale variations in microclimate to maintain a relatively constant and optimum temperature [124]. Strategies that maintain the internal temperature within a narrow range are the mechanisms of thermoregulation or thermal regulation [136]. One common thermoregulation strategy is the continuous selection of the most suitable thermal microhabitat [135]. With this type of behavior, overall feeding and growth rates can increase because of a reduction in the range of temperatures experienced or an increase in the average temperature [180]. Using more complex, collaborative strategies, the thermoregulation of many social insects is more efficient than that of solitary species [181], with such behaviors described extensively in eusocial species such as ants, bees and wasps [181], [182]. However, other and less organized insect colonies can also form dense groups to heat or reduce convection cooling [135], [183]–[186]. For example, social caterpillars build silk tents and use collective metabolic heat to accelerate development [185]. Because additional heat gain reduces developmental time, this behavior confers selective advantages. Among necrophagous dipteran larvae, gregarious thermal behavior is also common [125].

Larvae of the common green bottle fly *L. sericata* are poikilothermic, and therefore, the time required for development depends on the heat incomes [142]. The rate of development of these larvae follows a sigmoidal curve: the rate is close to zero at low temperatures, increases linearly at medium range values, and then decreases at high temperatures. For this species, the maximum rates for development are between 30 °C and 34 °C, with death occurring when larvae spend too much time

above this threshold [28], [167]. Furthermore, because these larvae grow on cadavers, their survival is strongly linked to the duration of their development. When the larvae develop rapidly, less time is spent on the cadaver and the risk of predation and the probability of a food shortage decrease [51]. Accordingly, larvae should maintain their temperature as close as possible to that for the most rapid development. For example, calliphorid larvae growing on carcasses that had both sunny and shady sides were observed feeding on the warmer side [74]. Similarly, during field experiments on cow cadavers, larvae entered the skull on cold spring nights and then reformed larval masses on the surface during the day (pers. observation). Necrophagous larvae also move away from locations that are too hot [111], [125]. In further investigation of larval temperature preferences, Aubernon *et al.* [167] observed that larvae orient on a thermal gradient and select species-specific preferential temperatures. For third instar *L. sericata*, the preferred temperature was 33.3 ± 1.5 °C, which the authors viewed as the trade-off temperature to maintain rapid and efficient development [167], [187].

Active aggregation behavior is also a characteristic of *L. sericata* larvae, which can form large masses gathering several thousands of larvae [98], [99]. Feeding within an aggregate releases enzymes and ammonia, which allow the larvae to externally predigest the food [188]–[191]. A dense aggregation can also lead to an increase in local temperature, which is a well-known phenomenon in forensic entomology and is commonly referred to as the “maggot-mass effect” [125]. Notably, Greenberg and Kunich [192] report cases in which larvae remain aggregated with the local temperature reaching 45 °C, in addition to reports of mass-temperatures above 40 °C and up to 50 °C [125], [163]. Evolutionary advantages are predicted for accelerated development at elevated temperatures, but elevated temperatures can also be potentially detrimental [155], [193], [194]. According to Rivers *et al.* [190], the overheating observed inside larval masses might constitute proteotoxic or thermal stress, which compromises normal protein synthesis and ultimately affects larval development. Notably, these authors observed that larvae appeared to behaviorally regulate their temperatures and avoid overheating by moving in and out of the aggregates.

Indeed, several other behavioral observations indicate that larvae do not always stay in the same place within an aggregate [42], [99], [148]. Larvae crawl in the periphery of the mass, particularly when the temperature inside the aggregate is high, thereby producing a continuous “boiling” movement [195]–[197]. As a result of this turnover, individual larvae experience continuous variation in temperature [18], [195], [198]. Therefore, larval aggregation and turnover inside the mass are likely thermal strategies to increase the probability of surviving [53], [60], [98], [111], [199], [200].

Within this framework, the present study was designed to analyze the thermal behavior of third instar *L. sericata*. We hypothesized that larvae should continue to feed at temperatures up to 38 °C, which

can be reached inside larval masses [192]. However, according to field observations, thermal regulation behavior, such as movement between a hot food spot and colder areas, was also postulated. Because aggregation and larval-mass cohesion is mediated by conspecific signals [98], [99], we also investigated the effect of the previous conspecific activity in the food. To test these hypotheses, single, starved third instar larvae were placed at an ambient temperature of 25 °C in a Petri dish that contained 1 food spot (mixed beef liver, marked or unmarked by conspecifics) heated to a constant temperature of 25 °C (control), 34 °C or 38 °C. Video tracking was used to analyze the behavior of the larvae, and crop dissection was performed to monitor food content in the larval digestive system.

Materials and methods

Insect rearing

Experiments were conducted using *L. sericata* larvae that were obtained from rearing colonies bred in the laboratory. The gene pool of the colonies was renewed every 2 months with new batches of wild flies. Adults were reared in 50 × 50 × 50 cm synthetic fiber net cages and fed *ad libitum* with caster sugar and water at ambient temperatures (23 ± 2 °C) with natural light. Minced beef liver was added to provide the proteins required to induce vitellogenesis and trigger egg laying [201].

Batches of eggs were collected and placed in 14 × 12 × 7 cm plastic boxes, and the larvae were fed 100 g of fresh, minced beef liver and maintained in the dark at 19 ± 0.5 °C (SANYO® MIR-554, SANYO Electric Co., Ltd, Osaka, Japan). Young third instars 12 ± 3 mm in length were used in the experiments (i.e., 5-d-old larvae in Grassberger & Reiter, [28]). For each experiment, 2 larvae were randomly sampled, and to starve them and clean the cuticle, the larvae were placed into a plastic cup with a wet paper tissue in the dark for 1 h at 25 ± 1 °C [98].

Experimental setup

The experimental setup was designed to observe the thermoregulation behavior of larvae, which was achieved by heating 1 food spot (FS) in a circular, food-free arena. The base of the device was a 1 cm thick piece of translucent acrylic with a 14 mm diameter hole drilled into it (Figure 15). A stainless steel cylinder with a 1 cm dip on the top was filled with food and positioned inside the hole. With a temperature probe connected to a PID controller, a 3-watt resistor plugged into the cylinder was used to warm and keep the food in the dip at the selected temperature. According to our calibrations, the temperature of food during the experiments remained constant with an accuracy of 0.5 °C. A 14.2 cm diameter polystyrene Petri dish (surface 158 cm²; height 1 cm) was placed to cover the acrylic and touch the edge of the food spot (Figure 15).

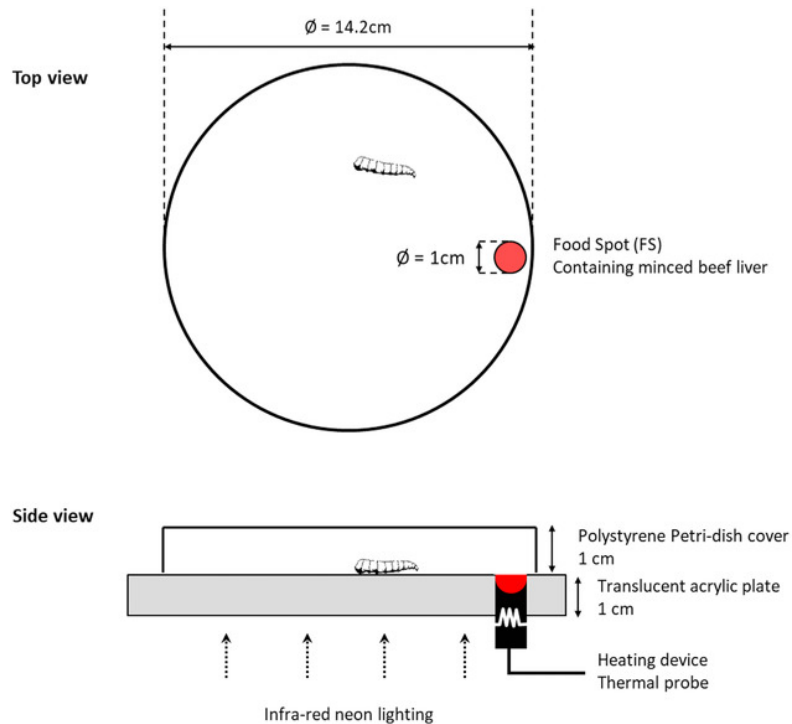


Figure 15: Experimental setup showing the Food Spot (FS) in red and the heating system.

Because larvae avoid light, all experiments were performed in a closed climatic chamber (Firlabo®, Lyon-Meyzieu, France) at 25 ± 1 °C under infrared lighting (8 W Velopexw fluorescent neon light with red ROSCOTM Roscolux #19 filter) [99], [202].

Trials

For each trial, 2 ± 0.3 g of minced beef liver was placed into the food spot (top of the filled bowl leveled with the surface). When the temperature of the food stabilized (10 min), the arena was sprayed with distilled water to maintain a high humidity, and the starved test larva was placed in the center of the arena, which was covered with the Petri dish. The other starved larva (control) was immediately killed by immersion in a preservative solution (60% methanol, 30% chloroform, and 10% acetic acid). After recording for 60 min, the test larva was removed and also placed in preservative solution. After each trial, the arena and cylinder were cleaned and wiped with 90% ethanol.

Unmarked food experiments

The food spot was prepared from freshly thawed, minced beef liver. The following 3 temperatures of the food were tested: 25 °C (i.e., equal to ambient, control condition), 34 °C (preferred temperature of larvae according to Aubernon *et al.*, [167] and 38 °C (close to the lethal temperature; [125], [203])). Twenty-five replications were performed at 25 °C, 33 at 34 °C, and 23 at 38 °C.

Marked food experiments

Food marked with the conspecific signal was prepared by adding 20 ± 0.5 g of live third instars (i.e., 780 ± 180 larvae) to 20 ± 0.5 g of fresh liver at 23.5 ± 1 °C (Kern® KERN & SOHN GmbH, Balingen, Germany, ALT310-4 Precision balance, $d = 0.1$ mg). After 1 h of marking, all larvae were removed from the liver. For the controls, the same amount of fresh minced liver without exposure to larvae was simultaneously prepared in the same conditions. Both marked and control livers were then frozen at -18 °C until used (5 d maximum). The foods were defrosted for 1 h at ambient temperature before the experiments and then stored in a refrigerator and used within 48 h. Twenty-three replications were performed with unmarked food at 34 °C, 22 with marked food at 34 °C, 21 with unmarked food at 38 °C, and 23 with marked food at 38 °C.

Crop dissection

Killed larvae were maintained in a refrigerator for 3–4 d before determination of larval length and crop size [148]. The crop, a pouch-like expansion of the esophagus, is in the anterodorsal part of larvae. The dorsal cuticle of larvae was carefully removed using Dumont forceps, and the extricated crops were individually placed in Eppendorf tubes containing preservative solution. A glass slide with a 0.4 ± 0.02 mm deep well covered by another glass slide was used to flatten the crops, and the surface area of the crops was measured to provide an estimate of the food that they contained [148].

Data analyses

Activity of the larvae in the arena was monitored using a digital camera (Veditec® VED-037, 2 MPX, Lyon, France) coupled to video tracking software (Ethovision 8.5 XT, Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands). The following primary parameters were measured: time spent in FS, total distance travelled, mean velocity, latency period before first entry to FS, frequency of entering FS, average duration of a bout in FS (i.e., mean time the larvae stayed before leaving FS) and total time spent in FS. The data were analyzed using XLStat 2016 software (Addinsoft, Paris, France). Because the surface of the crop is linked to larval size, a relative crop surface (crop surface/larval length) was calculated for comparisons among experiments [148]. Student's *t*-test was used for pairwise comparison of the normally distributed relative size of crop in unmarked food experiments. The same test was used to compare the time elapse in FS during marked food experiments. After checking homoscedasticity and normality, one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test was used to compare 3 parameters according to temperature in unmarked food experiments: the crops size, the velocity, and the distance travel. Due to non-homoscedasticity of data in unmarked food experiment and the low number of conditions (3), a Kruskal–Wallis' test with Dunn's *post hoc* procedure and Bonferonni correction were used to compare the delay for the first entrance in FS, the

total duration in FS and the average of bouts duration between the 3 temperatures. Mann-Whitney's pairwise comparison test was used to compare the non-normal distribution of bouts duration between used and not used food (marked food experiments). A χ^2 test was used to compare the travelled distance in marked food test (proportion according to distance interval to FS). All the tests were performed under a significant level α equal to 0.05. This level was decreased to 0.0167 when Bonferonni's correction was used.

Results

Experiments with unmarked food

Based on the relative crop measurements, larvae fed at all FS temperatures. For the starved larvae sampled before experiments, the mean relative crop surface was 0.392 ± 0.32 . This surface increased significantly at the end of experiments (0.699 ± 0.36 ; $T = 6.2494$, $P < 0.0001$). Furthermore, the temperature of FS did not affect larval feeding, with no significant difference observed in the relative crop surface among larvae at the 3 FS temperatures ($F_{2, 78} = 1.8904$, $P = 0.1579$).

By contrast, temperature of FS strongly affected larval behavior and kinematics. The delay before entering FS increased as the temperature increased (mean delay \pm SD: 97 ± 65 s at 25 °C; 393 ± 588 s at 34 °C, and 318 ± 502 s at 38 °C; $K = 5.6476$, $P = 0.0594$, NS due to high variability). Inversely, the total time spent by larvae in FS decreased when the temperature of FS increased. The longest duration in FS was at 25 °C: larvae spent an average of 62.5% of the experiment inside FS (2250 ± 1051 s). Compared with 25 °C, the time spent in FS was reduced significantly at 34 °C and 38 °C (Figure 16 A; $K = 33.46$, $P < 0.0001$, Dunn's *post hoc* tests, all $P < 0.01$). The results for the bout duration (i.e., the time elapsed between each entry and exit of the larvae from FS) were similar; larvae performed more bouts at higher temperatures but with shorter stays (Figure 16 B). Average bout duration was 77 ± 31 , 28 ± 15 , and 10 ± 57 s at 25 °C, 34 °C, and 38 °C, respectively, demonstrating a significant decrease with temperature (Figure 16 B; $K = 140$, $P < 0.0001$, Dunn's *post hoc* tests, all $P < 0.0001$). Finally, bout duration was also affected by the time elapsed. At 25 °C, the first stays of larvae in FS were very long, then shortened (Figure 17). The pattern appeared similar but less pronounced at 34 °C. At 38 °C, the stays were only very short, with this behavior relatively consistent during the 60 min trials.

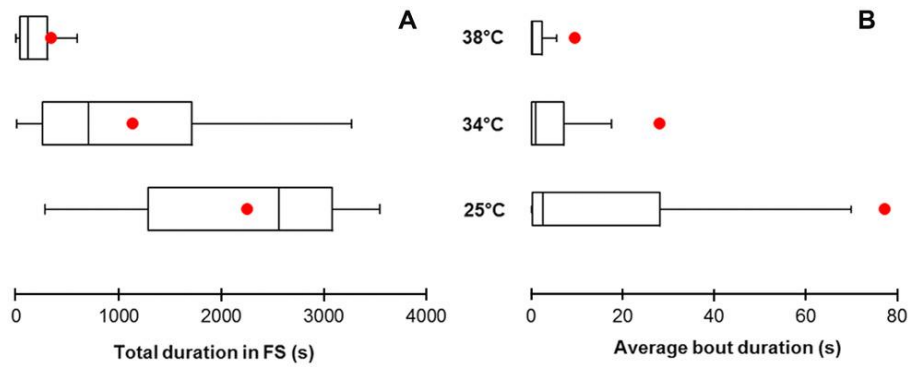


Figure 16: Boxplots of the total duration (A) and average bout duration (B) in FS according to its temperature (°C, reported in the middle). Twenty-five replications were performed at 25 °C, 33 at 34 °C, and 23 at 38°C. The mean total duration (red spots) was 2250.2, 1135.7, and 342.9 s at 25 °C, 34 °C, and 38 °C, respectively. The mean average bout duration was 77.3, 28.1, and 9.6 s at 25 °C, 34 °C, and 38 °C, respectively.

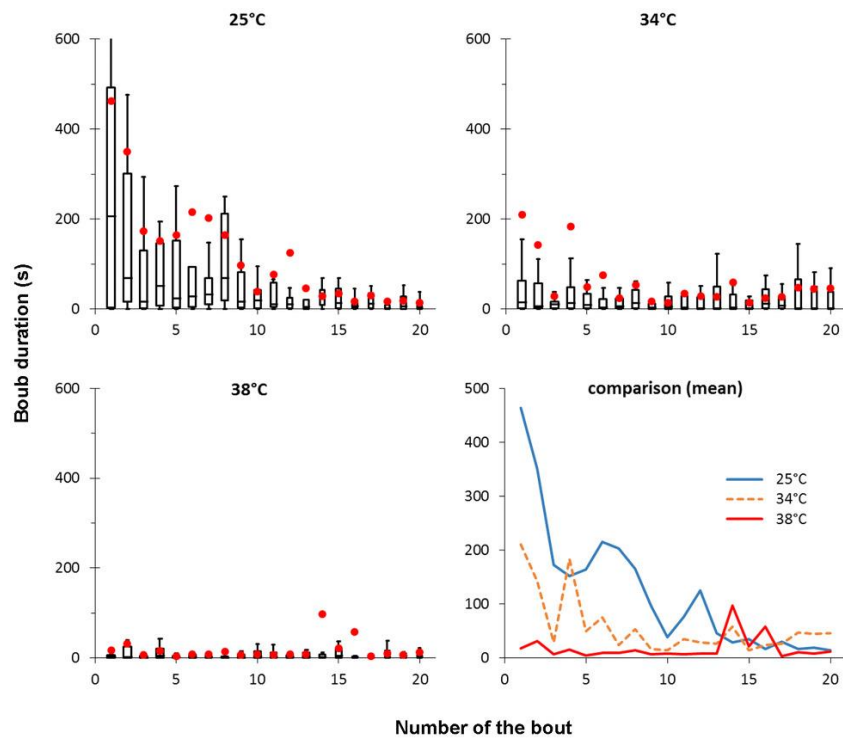


Figure 17: Scatterplot of bout duration according to the rank and food spot temperature. The number of the bout is on the x-axis, with 1 the first time the larvae entered FS, 2 the second time, and continuing until the 20th bout (the bouts following the 20th bout are not shown but trends were the same). Mean values are represented by the red dots. For comparisons, curves of the means for each FS temperature are shown together in the bottom right panel. At the different temperatures, average number of bout per larva was as follows: 25 °C = 27 ± 42, N = 25; 34 °C = 34 ± 54, N = 33; and 38 °C = 56 ± 42, N = 23.

Furthermore, the area explored by larvae was significantly different when FS temperature increased (34 °C: $\chi^2 = 58629$, 38 °C: $\chi^2 = 149422$, ddl = 29, $P < 0.0001$). At 25 °C, larvae mostly stayed inside FS, while they avoided it at 38 °C (Figures 18 and 19). However, when larvae were outside, the

mean distance to FS center was 4.7 ± 4.5 cm at 25 °C but decreased to 3.6 ± 3 cm at 38 °C (Figures 18 and 19). Therefore, whereas larvae spent most of the time inside the food spot at 25 °C, they spent much of the time moving close to FS at higher temperatures.

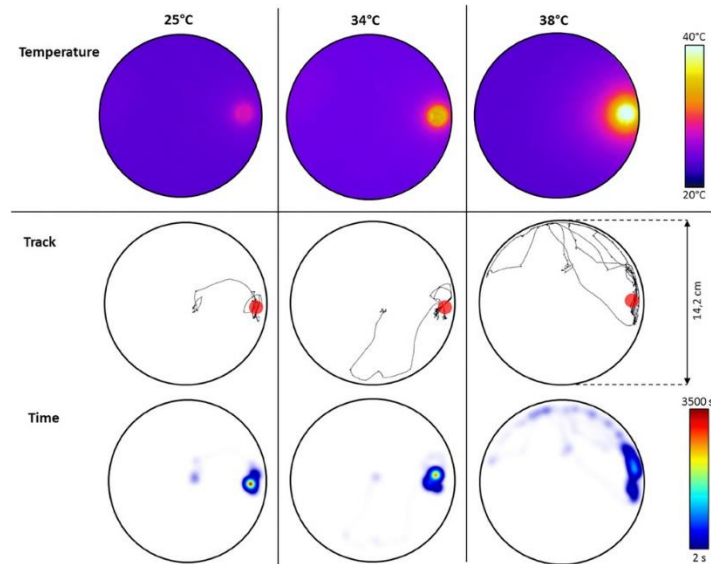


Figure 18: Visualization of 3 sample trials with food spots at different temperatures (from left to right: 25 °C, 34 °C, and 38 °C). The top row shows thermal imaging of the arena according to a color scale ranging from deep blue (20 °C) to white (40 °C) (T420 Infra-red camera, $\epsilon = 0.94$, FLIR® Systems, Inc Wilsonville, USA). The middle row shows the tracking of the larva, with FS a red spot located to the right in the arena. The larva traveled a total distance of 138.4, 155, and 661.7 cm at 25 °C, 34 °C, and 38 °C, respectively. The bottom row shows the location of time spent in the arena according to a color scale: white, the larva was not there; blue, indicating a short stay (2 s); and red, a long stay (3500 s). Total time spent in FS was 2981, 2598, and 116 s at 25 °C, 34 °C, and 38 °C, respectively.

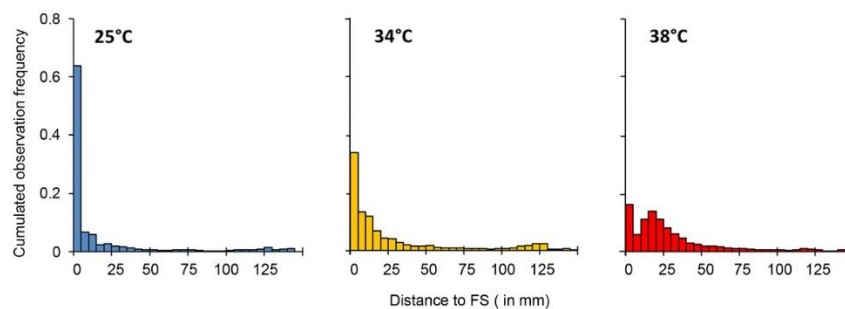


Figure 19: Distribution of the total time spent by larvae in the arena according to the distance to FS center (in cm, x-axis) and the temperature (°C). With more bars close to 0, more larvae stayed in or close to FS. A larva inside FS is represented by the first bar (0–0.5 cm to FS center). Twenty-five replications were performed at 25 °C, 33 at 34 °C, and 23 at 38 °C.

Experiments with marked food

Previous conspecific activity in the food slightly increased the time spent by larvae in FS, but the differences were not significant ($T = -1.11$, $P = 0.2721$, NS). The average duration (total time) in an unmarked food spot at 34 °C was 1698 ± 1133 s (47.2% of experiment duration); this value increased to 2082 ± 1018 s (57.8% of experiment duration) when the food was previously marked by conspecifics. The same trend was observed at 38 °C: larvae spent an average of 449 ± 517 s (12.5%) in unmarked food and 673 ± 752 s (18.7%) in marked food. The average bout duration was also affected by the marking of conspecifics. At 34 °C, average bout duration was 92.3 ± 264.3 s in unmarked food and decreased to 67.2 ± 195.4 s when food was marked by conspecifics ($U = 142444$, $P = 0.3564$, NS). By contrast, at 38 °C, average bout duration increased slightly in marked food (marked = 14.7 ± 44.5 s, unmarked = 13.7 ± 22.7 s, $U = 241776$, $P = 0.0001$). Furthermore, we observed a significant effect of marking on the distance of larvae to the food spot, with larvae remaining closer to marked food, and this behavior was observed at both 34 °C and 38 °C (34 °C: $\chi^2 = 12653$, $ddl = 29$, $P < 0.0001$; 38 °C: $\chi^2 = 4164$, $ddl = 28$, $P < 0.0001$).

Discussion

The thermoregulation strategies of many insect larvae allow body temperature to deviate several degrees from the surroundings [204]. Blow fly larvae growing on cadavers face high selection pressures; decomposition processes can quickly alter flesh and make it inedible [23] and opportunistic scavengers can eat or deflesh a carcass in a few minutes [57], [205]. Facing these pressures, larvae should benefit from minimizing development time on a cadaver, which can be achieved by favoring high temperatures that increase the rate of development [28]. However, exposure to high temperatures can also cause thermal stress and death [190], [206]–[209]. The primary effects of high temperature stress include inhibition of feeding/growth, delay in development, decrease in size and weight and malformations [206], [210]–[212]. Thus, larval behavior is the result of a trade-off between food intake and thermal optimization or regulation of overheating [73], [148], [167], [190].

This trade-off is particularly important because of the gregarious behavior of larvae, which can lead to larval masses in which thousands of individuals gather. According to previous developmental studies [28] and behavioral observations [167], larval masses temperatures can rise far above the critical thermal maximum of *L. sericata* larvae. But although behavioral thermal regulation inside larval masses is often postulated, no experimental data support this hypothesis [117], [190]. With this background, the aim of this study was to determine the thermal regulation abilities of individual larvae when facing a high temperature (34 °C and 38 °C).

Our results demonstrate that *L. sericata* third instars preferred a moderate temperature (25 °C) for feeding and under experimental conditions, avoided long stays in hot FS (34 °C and 38 °C). Notably, video tracking revealed that larvae adapted foraging behavior according to FS temperature. At 25 °C, larvae first stayed inside FS for a long time, likely feeding. The larvae later decreased the stays and moved away from FS. By contrast, at high temperatures, larvae engaged in only very short feeding sessions but were observed moving back and forth around FS. These thermal regulation behaviors highlighted the following: (1) efficient thermal detection and orientation behavior of larvae and (2) feeding times adjusted by larvae according to the local temperature. Therefore, as proposed, necrophagous *L. sericata* larvae likely thermoregulate during normal feeding activities by adjusting to local fluctuations in temperature, particularly inside maggot masses. FS was remotely detected by larvae [196], and the larvae fed regardless of the temperature, which was clearly demonstrated by the increase in size of the relative crop area at the end of trials compared with the control larvae [148]. Furthermore, larval foraging and displacement in the arena during the 60 min trials were strongly affected by FS temperature. Miller [116] skimpily showed an attraction of *L. sericata* larvae to laterally applied radiant heat. However, in this study, the shortest latency period to enter FS occurred at 25 °C, with the latency periods longer at 34 and 38 °C. Differences were also observed for the total time spent in FS and the average bout duration. At ambient temperature (25 °C), the stays were longer and they decreased when temperatures increased. Additionally, larvae entered FS rapidly and the first stay was very long at 25 °C. At the high temperatures, larval foraging behaviors were more discontinuous, and FS was avoided with only short feeding sessions. As the final crop surface showed, no significant differences in feeding were related to FS temperatures. Therefore, 2 primary hypotheses can be considered.

According to the first hypothesis, a high (i.e., above optimal) FS temperature would result in more rapid feeding, but ultimately, larvae would have the same food intake during the 60 min trial regardless of temperature. Consistent with this hypothesis, Charabidze *et al.* [148] observed that the foraging behavior of *L. sericata* larvae is discontinuous and that larvae can ingest faster than they can digest. Furthermore, in some lepidopteran larvae and grasshoppers, increases in body temperature result in increased rates of feeding [213], [214]. For dipteran larvae, Williams and Richardson [155] showed that elevated metabolic rates in several species of calliphorids corresponded with increased efficiency in food assimilation and therefore more rapid development.

The second hypothesis is that high temperatures affect the amount of food ingested. In this scenario, higher temperatures should result in underfed larvae, thereby affecting developmental landmarks and increasing mortality. In this study, the experiments were performed during short runs

of 1 h, which did not measure the effect of local temperature on larval development. However, it is well known that the metabolism of larvae is significantly affected by the temperature, and their development time may vary from days to weeks according to ambient temperature. Most of the published data are focused on the middle temperature range (10–30 °C), and only a few studies have investigated the effect of high temperatures on *L. sericata* development [28], [51], [167]. Based on the few available data, at high temperatures of 30–35 °C, the development rate slows or even decreases [28], [51], [215]. Additionally, larvae bred at high temperature are usually smaller with lower probability to successfully develop into an adult fly [28], [215]. These high temperature effects are dependent on the critical thermal maximum of each species [42], [167]. Rivers *et al.* [190] observed lower pupal weights and reduced ability to hatch in necrophagous larvae reared in the largest maggot masses. These authors attributed this altered development to the induction of heat stress caused by high temperatures inside the largest maggot masses, which is a hypothesis supported by the expression of heat shock proteins in those larvae. Based on these data, the hypothesis of food restriction and altered development under high temperatures seems consistent.

Organisms exposed to high temperatures synthesize heat shock proteins (HSPs) to provide protection to cellular components from the injurious effects of overheating. As observed by Chen *et al.* [206] in studies with sarcophagid flies, thermotolerance can be enhanced by a first exposure to mild temperatures before heat shock. Such pre-exposure triggers synthesis of a low level of HSPs, which prepares the organism to develop a rapid and efficient thermotolerance when later exposed to severe temperatures. According to these authors, physiological processes may reflect an adaptation to the high ambient temperatures that larvae encounter, particularly inside larval masses. Thus, previous exposure to high temperature is an important consideration when discussing heat adaptation: the heat shock response of necrophagous larvae may be modulated according to developmental stage and previous exposure to thermal stress [190].

The density of larvae also affects the development rate of necrophagous larvae [163]. Therefore, we also investigated the effect of previous conspecific activity in food on the thermal behavior of larvae. According to Boulay *et al.* [98], the conspecific signal deposited by *L. sericata* larvae has a movement-retentive effect that favors larval aggregation. However, our experiments showed only a slight attractive/retentive effect of conspecific-marked food. According to this result, the persistence of larval aggregation far above the 34 °C preferred temperature [167] cannot be fully explained by an aggregation signal from conspecifics. However, as observed in several studies, necrophagous larval aggregates are self-organized systems based on local communication and interaction among individuals [99]. Additionally, other factors such as thigmotaxis, exodigestion or

chemical cues are likely involved in larval aggregation and may overcome the avoidance of high temperatures [125].

To conclude, in this study the behavioral thermal regulation abilities of individual *L. sericata* necrophagous larvae were analyzed for the first time. These thermoregulation mechanisms likely operate inside larval masses in which local high temperatures can approach or exceed the lethal threshold. Indeed, many authors described in field conditions a turnover of individual inside masses, and postulate this behavior may lead to cooling of body temperatures [18], [62], [124], [126], [190], [201]. During our experiments, larvae fed at temperatures up to 38 °C. Although a retentive effect of conspecifics is demonstrated for this species [99], we did not observe clear evidence that an aggregation vector changed the thermal regulation behavior of larvae. Experiments with several larvae simultaneously would likely more closely reflect field conditions and could determine how gregarious behavior interacts with mechanisms of thermoregulation.

Chapitre 3 : Développement et stratégies évolutives

Effect of thermoregulation and aggregation on *Lucilia sericata* development and *fitness*.

Cindy Aubernon, Valéry Hédouin, Damien Charabidzé

Ces travaux sont en cours. Plusieurs répliques sont encore nécessaires pour augmenter la puissance statistique de nos résultats. Les émergences des adultes sont encore en cours pour certaines conditions et nécessitent plusieurs relevés comme la taille des individus, le sexe ratio, le taux de survie et la durée nécessaire pour voir émerger 10 % des individus. Suivant les résultats, d'autres observations seront peut-être nécessaires pour caractériser la *fitness* des individus.

Ces résultats seront soumis à la revue *Journal of Insect Physiology* dans le courant de l'année 2020.

Introduction

Les larves de Calliphoridae, comme tout ectotherme, sont fortement affectées par la température ambiante [216], notamment pour des activités telles que la prise alimentaire [134], [178], la ponte [102], le vol [78], [217] ou encore la reproduction [218]. Beaucoup d'études se sont déjà intéressées à ces effets, et notamment aux courbes de performance [132], à la tolérance [219] et aux préférences et optimums thermiques [91], [220] sur l'activité métabolique des insectes. Ces paramètres sont en effet particulièrement importants dans l'étude de l'écologie des ectothermes [219].

Les larves de Calliphoridae, premières colonisatrices des cadavres [5], sont particulièrement étudiées en entomologie médico-légale [32], [61], notamment en vue d'analyser leur durée de développement en fonction de la température ambiante [145]. Cependant, bien qu'elles soient capables de thermoréguler et qu'elles soient en recherche constante de leur température optimale dans leur environnement [221], ce comportement n'est jamais pris en compte lors des études de développement [28]. Le cadavre étant un environnement thermiquement hétérogène [125], la régulation thermique implique une modification de la température ressentie par les larves [221] et donc potentiellement de la durée du développement subséquent. Enfin, la composante sociale caractéristique de ces insectes est majoritairement, et parfois délibérément, omise de ces études [28], ce qui nous pousse à nous questionner sur la robustesse des données de développement utilisées pour les expertises entomologiques.

En conditions expérimentales, les larves cherchent à sélectionner la température la plus proche de leur température spécifique préférentielle [221]. Nous supposons que leur développement devrait en être affecté. De plus, la présence de congénères ayant un effet sur la régulation thermique, ce comportement pourrait affecter d'une façon conséquente la durée de développement des larves. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons suivi le développement de *Lucilia sericata* du stade œuf jusqu'au stade adulte en laissant la possibilité de thermoréguler et/ou de s'associer à des congénères dans un milieu thermiquement hétérogène.

Matériel et méthodes

Protocole

Les mouches utilisées pour cette étude proviennent d'une souche française *Lucilia sericata* (Verminière de l'Ouest 48.424292N, 1.487749W) élevée au laboratoire dans des cages en tulle (50 x 50 x 50 cm) contenant approximativement 250 ± 50 individus. Les œufs sont obtenus en plaçant directement à l'intérieur des cages un pilulier contenant 20 ± 1 g de foie de bœuf mixé pendant 1

heure. La présence d'œufs est relevée à 12h30 exactement nous donnant une approximation de l'heure de la ponte à la demi-heure près. Les œufs ainsi obtenus sont déposés dans une boîte en plastique (143 × 105 × 59 mm) dans un incubateur à 25 °C (Sanyo, Moriguchi City, Osaka, Japan) sur 20 ± 1 g de foie de bœuf mixé en attendant de les placer dans le dispositif expérimental.

Les expérimentations ont été réalisées au sein du Thermograde (2^e génération), un dispositif chauffant programmable, permettant de créer des profils de températures variés le long d'une gouttière de 80 cm de long contenant 500 ± 5 g de foie de bœuf mixé. Des thermomètres bouton sont placés tous les 5 cm au sein du dispositif afin de relever localement la température du substrat (DS1921G Thermochron i-button, précision : 0.5 °C ; Maxim Integrated, San Jose, CA, USA). Quelle que soit la condition testée, les larves sont toujours placées de façon homogène au sein du dispositif. Le dispositif est ensuite fermé à l'aide d'une casquette en plastique noir opaque pour une durée de 36 heures. A ce moment, les larves sont retirées du Thermograde, comptées et placées de nouveau dans une boîte d'élevage (143 × 105 × 59 mm) contenant 100 ± 5 g. Cette boîte est déposée à 25 °C, dans un bac contenant 2 cm de sable fin. Les pré-pupes, prélevées dans le sable, sont comptées toutes les 8 heures (6h30, 14h30 et 22h30) et séparées dans une boîte d'empupement (143 × 105 × 59 mm) à 25 °C, en attendant l'émergence des adultes, comptés de la même façon, toutes les 8 heures (Figure 20).

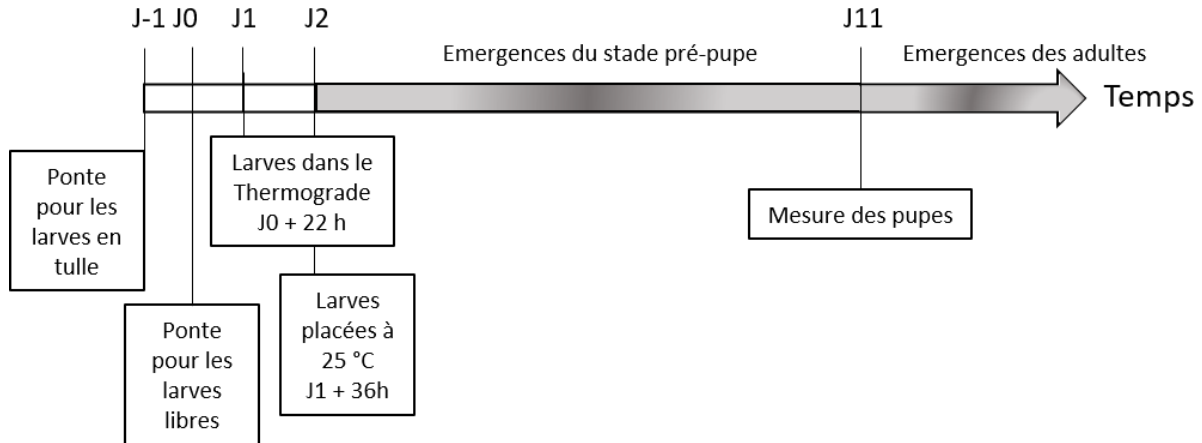


Figure 20 : Frise chronologique représentant le protocole expérimental de mise en élevage, de la ponte à l'émergence.

Cette étude étant toujours en cours, je présente ici uniquement les premiers résultats concernant les taux de survie des larves et des pré-pupes, ainsi que la durée moyenne permettant d'observer 10 % des larves au stade pré-pupe. Ce dernier paramètre est souvent utilisé dans le domaine de l'entomologie médico-légale [4], [29] et correspond au temps minimum permettant d'atteindre le stade pré-pupe.

Conditions expérimentales

Condition contrôle : Les larves sont déposées dans le Thermograde programmé à une température constante de 33 °C à 10h30 le lendemain de la ponte, soit 22 heures après. Cette température de 33 °C est la température préférentielle des stades 3 de cette espèce *Lucilia sericata*. Deux densités ont été testées, 40 et 80 larves pour 4 et 3 réplications respectivement.

Condition thermorégulation : Les larves sont déposées dans le Thermograde programmé pour former un gradient linéaire de températures allant de 22 à 47 °C (Figure 21) 22 heures après leur ponte, soit à 10h30 le lendemain. Deux densités ont été testées, 40 et 80 larves pour 6 et 2 réplications respectivement.

Condition groupe captif : Le Thermograde est programmé comme précédemment pour former un gradient thermique, mais les larves sont distinguées en deux groupes. Le premier, *captive larvae*, est formé de larves âgées de 46 heures et placées dans un sachet en tulle à l'extrémité la plus froide du dispositif. Le second, désigné comme *free larvae*, est composé de 40 larves âgées de 22 heures déposées comme précédemment dans le Thermograde. Sept réplications ont été réalisées, ainsi qu'un contrôle n'utilisant que des larves captives pour 4 réplications. Cette condition est testée pour comprendre du fait des résultats précédents (voir chapitre 2 article The maggot, the ethologist and the forensic entomologist : Sociality and thermoregulation in necrophagous larvae) la prévalence de la socialité sur la température préférentielle. Ici les larves dans le sachet de tulle sont plus âgées pour résister à cette condition non naturelle. En effet, à 22 h, les larves sont trop faibles et le taux de mortalité observé frôlait les 100%.

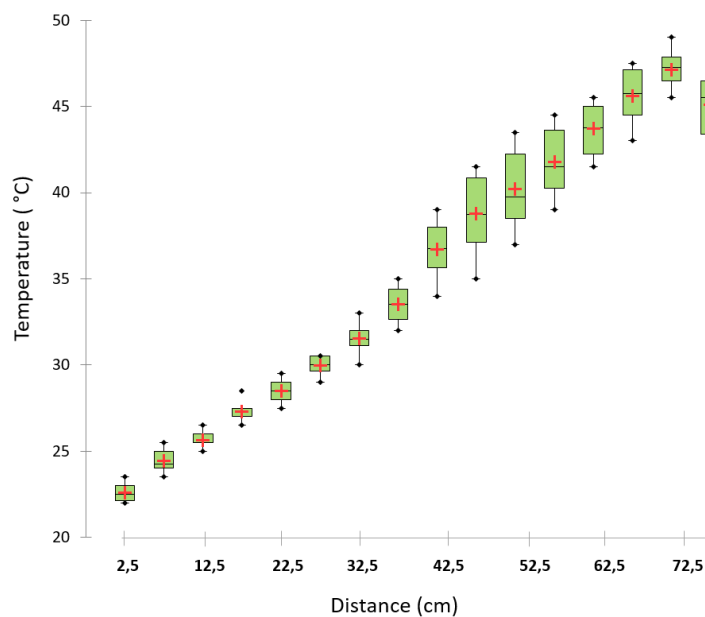


Figure 21 : Températures au sein du Thermograde. Graphique représenté sur la base des températures observées dans chaque portion pour toutes les réplications.

Analyse statistique

Les statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel R v.3.3.2 (R development Core Team). Toutes les comparaisons ont été réalisées en utilisant un test de Wilcoxon avec un seuil de significativité $\alpha = 0.05$.

Résultats

Nous observons une survie moyenne de 95.8 ± 4.94 % au stade larvaire et de 92.02 ± 6.27 % au stade pré-pupe. Ces taux sont très variables (Figure 22) mais ne diffèrent pas selon les conditions (Test de Wilcoxon : Larves : $p > 0.06$, pré-pupes : $p > 0.07$). En ce qui concerne la durée de développement, nous n'observons pas de différence entre les conditions lorsque les larves sont libres (Test de Wilcoxon : $p > 0.39$) ni entre les conditions lorsque les larves sont captives (Test de Wilcoxon : $p = 1$).

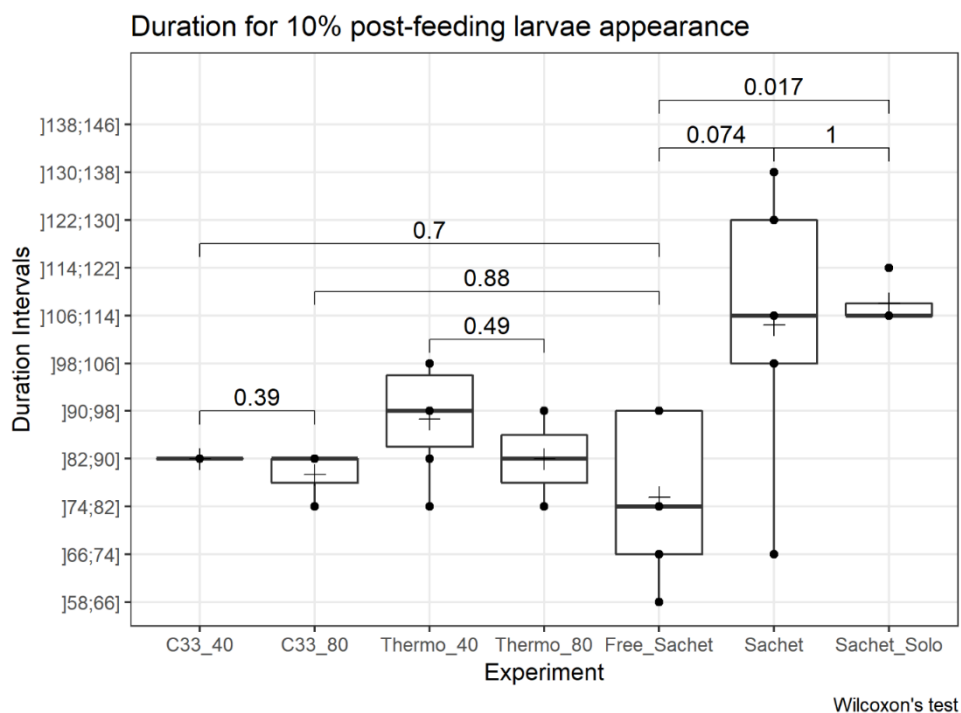


Figure 22 : Box Plots représentant la durée de développement (temps nécessaire pour observer 10% des larves en stade pré-pupe) selon les conditions expérimentales. C33_40 et C33_80 désignent les conditions où la température est constante (33 °C) et le nombre de larves est de 40 ou 80 individus. Thermo_40 et Thermo_80 désignent les conditions où 40 ou 80 larves peuvent thermoréguler (i.e. se déplacer librement) dans le Thermograde. Free_Sachet et Sachet pour la condition où 40 larves sont laissées libres dans le Thermograde (Free_Sachet) en présence de 40 larves captives à 23 °C (Sachet). Enfin, Sachet_Solo à la présence d'uniquement 40 larves captives à 23 °C. Les comparaisons ont été réalisées avec un test de Wilcoxon et les p-values sont reportées.

Les larves libres ont une durée de développement moyenne de 90.00 ± 10.52 heures. Lorsque la température est constante (condition contrôle), la durée de développement est très stable : les variations éventuelles existent uniquement entre deux observations, soit sur une marge de 8 heures. En revanche, bien que non différentes des résultats à température constante, nous observons que les larves en condition thermorégulation (i.e. libres de se déplacer dans le Thermograde) ont des durées de développement plus variables, pouvant varier de 8 heures de moins à 16 heures de plus qu'à 33 °C .

En ce qui concerne la condition où les larves sont captives, la durée moyenne de développement est de 114.88 ± 17.64 h. Dans la condition contrôle, ne présentant que des larves captives, les résultats sont très stables, ne variant que sur deux observations soit une période de 8h. En revanche, lorsque des larves captives sont présentes, nous observons une forte variabilité de la durée de développement de l'ensemble des larves (i.e. captives et libres). Pour les larves libres, le temps de développement peut se révéler être plus court de 24 heures par rapport à la condition contrôle, alors que pour les larves captives, la durée de développement peut raccourcir jusqu'à 36 heures par rapport au contrôle (i.e. uniquement des larves captives à 22 °C)

Discussion

Le but de cette étude était d'analyser le développement et la *fitness* de *Lucilia sericata* en laissant aux larves la possibilité de thermoréguler et/ou de s'associer à des congénères [221]. Nos expérimentations montrent en premier lieu que les larves se développant à température constante de 33 °C croissent aussi vite que les larves laissées libres de se déplacer sur un gradient thermique. Ce résultat démontre que les larves qui peuvent thermoréguler sont bien en constante recherche de leur température préférentielle de 33 °C [221] et que cette valeur leur permet un développement à la fois rapide et de bonne qualité. Cependant, nous observons une plus grande variabilité des durées de développement chez les larves pouvant thermoréguler, qui pourrait s'expliquer par un effet de l'âge des larves ainsi que du groupe. En effet, il a été démontré que les larves voient leurs préférences thermiques évoluer avec l'âge [137]. Nous avons d'ailleurs montré que les larves de stade 2 de *Lucilia sericata* ont des préférences thermiques plus élevées ($35.3 \pm 2.14\text{ °C}$) que les stades 3 (Annexe 2, données non publiées). Nous supposons donc qu'au cours de leur développement, les larves ajustent leur localisation dans le Thermograde et ainsi, leur température. Cependant les ectothermes n'étant pas de parfaits thermorégulateurs [91], leur sensibilité ne leur permet pas de se placer exactement à leur température préférentielle. C'est d'ailleurs ce qui est observé dans l'étude précédente (cf. Chapitre 1), où une certaine dispersion existe autour de cette température préférentielle de $33 \pm 1.5\text{ °C}$ [167]. De plus, l'action du groupe, notamment via des mécanismes de rétention, peut expliquer les

difficultés de déplacement des individus lorsqu'un agrégat existe [221]. De ce fait, contrairement aux conditions où la température est constante, les larves qui peuvent se déplacer et thermoréguler voient leur durée de développement varier légèrement mais garder une moyenne identique.

Le deuxième point mis en évidence par cette étude est qu'il existe des interactions entre les larves libres et les larves captives. Nous savons que les larves libres sont susceptibles de rejoindre les larves captives, et que l'attrait de ces larves captives dépend du nombre d'individus présents [221]. Cependant, nous n'avons observé la présence de larves libres à proximité des larves captives qu'une seule fois parmi les 5 répliques, nous laissant supposer que dans les autres cas les larves ont fait un compromis entre régulation thermique et socialité. Dans cette hypothèse, les larves ayant choisi de se relocaliser dans la zone la plus froide se seraient dans un premier temps privé des bénéfices de la thermorégulation pour rejoindre les larves captives. Ce déplacement leur aurait permis, dans certaines conditions, d'obtenir des bénéfices liés à la socialité, puis dans un second temps, de rejoindre des zones plus chaudes et plus propices à leur développement. En observant parfois des durées de développement très courtes, nous supposons que les larves libres seraient venues « aider » les larves captives, supposant une coopération au sein des larves [121]. La variabilité très importante entre les répliques pourrait être due à la stochasticité des comportements d'agrégation.

Conjointement, ces résultats démontrent des bénéfices à l'agrégation et l'existence de compromis complexes entre thermorégulation et agrégation. Ceci nous permet de mieux appréhender les stratégies des larves leur permettant d'exploiter la ressource cadavérique. La suite de cette étude nous permettra d'observer les potentiels effets de ces compromis sur d'autres traits d'histoire de vie tels que la survie des pupes et des adultes ainsi que la taille des individus.

Chapitre 4 : Groupes hétérospécifiques

Mixed-species aggregations in arthropods

Julien Boulay, Cindy Aubernon, Graeme D. Ruxton, Valéry Hédouin, Jean-Louis Deneubourg & Damien Charabidzé

Abstract

This review offers the first synthesis of the research on mixed-species groupings of arthropods and highlights the behavioural and evolutionary questions raised by such behaviour. Mixed-species groups are commonly found in mammals and birds. Such groups are also observed in a large range of arthropod taxa independent of their level of sociality. Several examples are presented to highlight the mechanisms underlying such groupings, particularly the evidence for phylogenetic proximity between members that promotes cross-species recognition. The advantages offered by such aggregates are described and discussed. These advantages can be attributed to the increase in group size and could be identical to those of non-mixed groupings, but competition-cooperation dynamics might also be involved, and such effects may differ between homo- and heterospecific groups. We discuss three extreme cases of interspecific recognition that are likely involved in mixed-species groups as vectors for cross-species aggregation: tolerance behaviour between two social species, one-way mechanism in which one species is attractive to others and two-way mechanism of mutual attraction. As shown in this review, the study of mixed-species groups offers biologists an interesting way to explore the frontiers of cooperation-competition, including the process of sympatric speciation.

Keywords: complex system, collective behaviour, cross-species recognition, self-organization, sociality.

Background

Over the last 40 years, research into collective behaviour has rapidly expanded. In a milestone book, Krause and Ruxton [222] reviewed the concepts underlying group living, and they focused their work on the mechanisms that govern the evolution and maintenance of animal groups in several species. In 2010, Sumpter reviewed how the mechanisms driving group behaviour are intertwined with its functions and concluded that simple rules may generate impressive and complex systems, such as migrating flocks of starlings, schools of fish or wildebeest herds. In this context, the study of collective behaviour has mainly focused on intraspecific phenomena [223]–[226], especially in arthropods (see the review by Jeanson *et al.* [227]). A Scopus search with ‘social’ as the keyword (literature published from 2006-2016, performed 13th June 2016) returned 5 099 research articles: 53% were on arthropods. But a large majority of the research on arthropod sociality is focused on eusocial species, especially ants and bees [222], [226], [228]. They are the topic of 78% of the scientific publications related to insects [229], likely because they form impressive societies, build complex nest structures and account for more than half of the insect biomass [230]. In comparison, the keyword ‘mixed-species’ found only 168 documents (Scopus searching from 2006-2016). Furthermore, only 8% were on arthropods while more than half (58%) were on vertebrates (see, for example, the reviews by Stensland *et al.* [231] and Terborgh [232] or researches by Farine *et al.* [233], [234]) and 34% were on other living organisms (microorganisms, fungi, echinoderms, etc.). Some of the best-known cases of mixed-species arthropods societies can be found in eusocial species [235]–[237]. A striking example involves *Harpagoxenus canadensis* (a slave-making ant) invading *Leptothorax muscorum* nests to capture brood and rear them as slave workers [238]. During this process, both species can be found working and living together in the nest, but after some time, *H. canadensis* appropriates the brood of the other species to restock its own colony. This temporary association challenges the conventional definition of an interspecific aggregation and highlights the unstable balance between different species that share the same ecological niche. Other examples of social parasitism in ants can be found in Huang and Dornhaus [239]. Nevertheless, true interspecific aggregations and cooperation are more often found in species with low levels of sociality (e.g., gregarious or communal; see the classification of sociality in Wilson [228]), and these mixed groups can result from different behaviours and more-or-less complex interactions between species. This review attempts to assemble a comprehensive inventory of mixed-species arthropod groups through the perspective of collective behaviour.

Definitions

First, it is important to draw a distinction between temporary groupings of individuals (groups that only form for mating or feeding) from gregariousness. This review focuses on mixed-species

aggregations, i.e., groups in which members of different species actively aggregate and remain together regardless of environmental heterogeneity or reproductive attraction (Figure 23). Several other terms are used in the literature for groups composed of individuals of different species including heterospecific, interspecific, mixed-species, multi-species or polyspecific, so for the sake of clarity, the term mixed-species will be used throughout this review and can refer to closely related species, species from different taxa or species from different orders [231]. Furthermore, two distinct notions can be used to characterize animal species that form groups (monospecific or mixed): social-tolerance and gregariousness. Tolerance is passive, and the underlying hypothesis is that “*a species’ social tolerance (that) has evolved to fit its optimal population density and optimal population structure*” [240].



Figure 23: Examples of mixed-species groups. (A) Large mixed-species group of necrophagous Diptera larvae (*Chrysomya albiceps* [dark maggots] and *C. marginalis* [light maggots]). Species segregation is observed due to the specific thermal preferences of the larvae (used with permission—© Cameron Richards). (B) A mixed-species group of treehoppers composed of adults and nymphs (white) of *Membracis elevate* (black adults with a white spot on their back) and *M. dorsata* (adults without a white spot) found in Ecuador (used with permission—© Robert Oelman). (C) Lady beetles (*Harmonia axyridis*) and the spotted cucumber beetle (*Diabrotica undecimpunctata*) on grass (used with permission—© Nash Turley). (D) A large mixed-species group of woodlice composed of three species (*Armadillidium vulgare* (gray circle), *Oniscus asellu* (white circle) and *Porcellio scaber* (black circle); creative commons—Dave Ingram).

This implies that individuals do not use aggregation vectors (mechanical, visual and chemical channels), so aggregates result from the attraction of individuals to the same environmental stimulus [241]. In contrast, gregariousness is defined by Vulinec [242] as “*the tendency of an animal to aggregate with others such that the animals are in contact with one another, or are nearly so, and that the distribution of the animals in the local environment is extremely patchy*”. When considering this definition, it is important to include the idea of inter-attraction, which permits animals to create and maintain groups, and such inter-attraction can be direct or indirect (stigmergy, e.g., ground marking

with chemicals). An efficient way to create mixed-species groups is to communicate with similar signals or to recognize the signals of other species. We named these signals as aggregation vectors and we will use this term throughout the text. In addition, the qualitative term “*extremely patchy*” used by Vulinec [242] also needs to be moderated; indeed, depending of the characteristics of the interactions, the spatial distribution of gregarious populations can, in some cases, be weakly patchy [243].

Types of Mixed-Species Groupings

Mixed-species aggregations have been reported in various arthropods from aphids to butterflies and woodlice to ants [108] (Figure 23), and they have been observed in terrestrial, aquatic/marine and flying arthropods (Table 2). These groups can be composed of juveniles, adults or in most cases, both stages. Several kinds of mixed-species aggregations can be found: those observed in one stage (adults or juveniles), both stages, seasonally or artificially. Mixed-species groups composed of one or both stages can be frequently or occasionally observed in the wild.

A frequently reported example of larvae-only aggregation is that which occurs in necrophagous Diptera larvae (maggots; Figure 23 A). These species are very often found in mixed-species groupings on carrion. Adult females do not exhibit intra- or inter-specific social behaviour but lay their egg-batches in aggregate on decaying tissue. This gathering may be due to the deposition of an aggregation pheromone during oviposition, as suggested in Rivers *et al.* [60]. However, Brodie *et al.* [101] recently observed that eggs clustering is promoted by attractive semiochemicals produced by carrion flies while regurgitating and feeding on carrion. Gravid and nongravid individuals can detect such attractants, which rejects the idea of aggregations being mediated by oviposition pheromones. Whatever its form (tactile, chemical or visual), the eggs aggregation promotes the initial grouping of several species at the same place. This gathering is later reinforced and maintained by the active aggregation behaviour of the larvae [98], [99]. However, as soon as larvae reach the pre-pupal stage, they leave the corpse and become strongly selfish for the rest of their lives.

Table 2: N/A: Not Available; ↑: increase; ↓: decrease; ???: unknown

Taxon	Species	Pairwise divergence time (Million Years Ago)	Life stage	Benefits	Underlying mechanisms	Non-social, one- or two-way recognition	References
Ants	<i>Manica rubida</i> , <i>Formica selysi</i>	111	Adults & Juveniles	???	???	Two-way	[235], [236], [244]
	<i>Azteca constructor</i> , <i>A. xanthacrona</i>	Same taxa	Adults & Juveniles	↑ Production of workers, better reproductive success	Pleometrotic (two queens)	Two-way	[245], [246]
Aphids	<i>Callipterinella calliptera</i> , <i>Betulaphis brevipilosa</i> , <i>Euceraphis betulae</i>	Same taxa	Adults & Juveniles	↑ Production of honeydew, protection from predators (alarm pheromone recognition?)	Aggregation pheromone?	???	[247]
Bug	<i>Macrolophus pygmaeus</i> , <i>Nesidiocoris tenuis</i>	N/A	Adults	???	???	???	[248]
Butterflies	<i>Malacosoma disstria</i> , <i>M. americanum</i> , <i>Utetheisa sp.</i>	Same taxa	Adults & Juveniles	Chemical protection, cannibalistic behaviour avoidance, <i>fitness</i> (male pheromone production)	Trail-following abilities	Two-way	[249], [250]
Carrion flies	<i>Calliphoridae spp.</i> , <i>Sarcophagidae spp.</i> , <i>Muscidae spp.</i>	55	Adults & Juveniles	Protection from predators, salivary enzymes sharing, heat generation, water loss limitation, ↑ survival rate	Shared oviposition sites, larval signal, heat, thigmotactism	Two-way	[98], [99], [251]–[254]
Chrysomelids	<i>Phratora vitellinae</i> , <i>Plagioderma versicolora</i>	Same taxa	Juveniles	Protection from predators	Chemical cues	Non-social	[255]
Cockroaches	<i>Nauphoeta cinera</i> , <i>Leucophaea maderae</i>	105	Adults	???	Chemical cues	Two-way	[256]
Collembola	<i>Orchesella cincta</i> , <i>O. villosa</i> , <i>Tomocerus minor</i>	284	Adults	???	Chemical cues	One-way	[257]
Crabs	<i>Pagurus bernhardus</i> , <i>P. prideauxi</i>	Same taxa	Adults & Juveniles	???	???	???	[258]
Crustaceans	<i>Calappa calappa</i> , <i>Pachygrapsus planifrons</i> , <i>Lysiosquillina maculata</i> , <i>L. sulcata</i> , <i>Raoulserenea sp.</i> , <i>Stenopus hispidus</i> , <i>Panulirus penicillatus</i>	356	Juveniles	Habitat selection	Chemical cues, visual cues	Two-way	[259]
	<i>Panulirus guttatus</i> , <i>P. argus</i>	Same taxa	Adults	Recognition of alarm odours, shelter sharing	Chemical cues	Non-social	[260]–[263]
	<i>Alonella</i> , <i>Ceriodaphnia</i> , <i>Chydorus</i> , <i>Megafenestra</i> , <i>Pleuroxus</i>	Same taxa	Adults	Protection against predators	Similar behaviour or pheromones emitted by <i>Scapholeberis</i> ?	???	[263]

Dermoptera	<i>Euborellia moresta</i> , <i>Forficula auricularia</i> , <i>F. decipiens</i> , <i>F. pubescens</i>	190	Adults & Juveniles	Protection from predators	Chemical cues	Two-way?	[264]
Fleas	40 species listed by (Stanko et al. 2002)	Same taxa	Adults & Juveniles	Suppression of host immune system	Reduction of the size of the resource	Non-social	[265], [266]
Fruit flies	<i>Drosophila sp.</i>	Same taxa	Adults & Juveniles	Limit fungal growth	Chemical cues, egg-batches, non-random distribution of oviposition sites	Two-way	[267]–[269]
Lady beetles	<i>Hippodamia convergens</i> , <i>H. tredecimpunctata</i> , <i>Hypera postica</i>	239	Adults	↓ Mortality during winter, protection from predators and/or parasitoids?	Presence of aphid prey, environmental stimuli (T°, wind), chemical cues	Two-way	[270]–[273]
Locusts	<i>Locusta migratoria migratorioides</i> , <i>Schistocerca gregaria</i>	81	Juveniles	Protection from predators	Chemical cues	Two-way	[274], [275]
Mites	<i>Eotetranychus sp.</i> , <i>Tetranychus urticae</i>	Same taxa	Juveniles	↑ Fertility, ↑ silk production, ↑ survival rate	Deposition of faeces, Intraguild predation, chemical cues, silk attraction (sericophily)	Non-social	[276], [277]
Nitidulid beetles	<i>Carpophilus dimidiatus</i> , <i>C. freemani</i> , <i>C. mutilatus</i> , <i>C. antiquus</i> , <i>C. marginellus</i> , <i>C. humeralis</i>	Same taxa	Adults	???	Chemical cues	One-way	[278], [279]
Scorpions	<i>Buthotus judaicus</i> , <i>Compsobuthus wernerii judaicus</i> , <i>Leiurus quinquestriatus</i>	Same taxa	Adults	???	Depends on season, specialization of scorpions for different prey, low aggressiveness	Non-social	[280]
Spiders	<i>Hypochilus thorelli</i> , <i>Achaearanea tepidariorum</i>	308	Adults & Juveniles	Web-building, web site selection	Chemical cues, vibrational cues, silk attraction (sericophily)	One-way	[281]
	<i>Serracutisoma proximum</i> , <i>S. spelaeum</i>	Same taxa	Adults & Juveniles	Protection against predators	Chemical cues?	Two-way	[282]
Stink bugs	<i>Nezara viridula</i> , <i>Chlorochroa ligata</i> , <i>C. sayi</i> , <i>Thyanta pallidovirens</i> , <i>Euschistus conspersus</i> , <i>Eurydema sp.</i>	Same taxa	Juveniles	Protection against desiccation, developmental acceleration, ↓ mortality, ↓ predation rates, better adherence to substrate	Tactile cues, chemical cues	Two-way	[283], [284]
Tenebrionid flour beetles	<i>Tribolium castaneum</i> , <i>T. confusum</i> , <i>T. freeman</i>	Same taxa	Adults	Attraction of sexual partners	Chemical cues	Two-way	[285], [286]
Termites	<i>Reticulitermes santonensis</i> , <i>R. lucifugus grassei</i>	Same taxa	Adults & Juveniles	???	Chemical cues	Two-way	[237], [287]
Ticks	<i>Haemaphysalis longicornis</i> , <i>H. megaspinosa</i>	Same taxa	Juveniles	↓ Water loss	Chemical cues	Non-social	[287], [288]

Treehoppers	<i>Aconophora nitida</i> , <i>A. mexicana</i>	Same taxa	Juveniles	Protection from predators, maternal care	Stochastic phenomenon or shared oviposition sites by females	Non-social	[289], [290]
Triatomine bugs	<i>Triatoma infestans</i> , <i>T. sordida</i> , <i>T. guasayana</i> , <i>Panstrongylus megistus</i>	36	Adults & Juveniles	Better exploitation of protected places	Chemical cues, faeces	Two-way	[291], [292]
Trilobites	<i>Ampyx</i> , <i>Asaphellus</i>	N/A	Adults	???	???	???	[293]
Whirligig beetles	<i>Gyrinidae sp.</i>	Same taxa	Adults	Predator avoidance, ↑ defensive secretion	Mechanical stimuli (water waves), chemical cues (pygidial secretion?), visual cues, orientation to neighbours	Two-way	[242], [294]
Woodlice	<i>Porcellio scaber</i> , <i>Armadillidium vulgare</i> , <i>Oniscus asellus</i>	161	Adults	Protection from desiccation, ↑ production of faeces (secondary food source)	Tactile cues, chemical cues	Two-way	[295], [296]

Gatherings can also occur due to stochastic phenomena (i.e. by chance) [260] or because one species is exceptionally present [297]. A different degree of territoriality can also promote mixed-species groups [298]. Such a case has been reported for two lobster species, *Panulirus guttatus* and *P. argus*, (Table 2). These two species occasionally share the same shelters without competition [262]; *P. guttatus* tends to climb along the walls while *P. argus* occupies the floor. Each species uses the shelter space differently, which promotes coexistence, and the aggregation allows *P. argus* to share the alarm odours of *P. guttatus*, enhancing protection against predators. Briones-Fourzán et al. [260] suggested that such rarely observed mixed-species groups could be chemically mediated, but no evidence has been found. Some mixed-species groups also appear at a specific time each year. Ladybeetles, or ladybugs, form large, mixed-species aggregations inside buildings during winter [272], [273], and by forming such groups, they limit heat loss and reduce their mortality [270].

Lastly, some artificial groups have only been observed under laboratory conditions. Some of them have been created from highly social species, such as ants or termites, while others gathered gregarious species (Tableau 2). Hodge and Storfer-Isser [281] create artificial mixed-species spider clusters by provisioning the group with sufficient food until the adult instar was reached. Such an environmental condition and sericophily enabled sociality (aggregation) that does not exist in the wild, highlighting a possible effect of habituation/collective breeding. By experimentally modifying the environmental conditions, Hodge and Storfer-Isser [281] forced a species that naturally aggregates with conspecifics to assemble with heterospecifics. Similar results were observed by Warburg [280] in scorpions.

Such artificial groups are interesting models to explore the minimum parameters needed to form mixed-species groups. These studies also highlight the crucial role of early social experience on the ontogeny of kin and nestmate recognition, and their results support the fact that mixed-species groups are often composed of phylogenetically related species (Table 2) Phylogenetic proximity likely facilitates cross-species recognition, which is a necessary mechanism to initiate and maintain mixed-species groups. Such proximity also allows the use of similar aggregation signals (visual, chemical, etc.), thus facilitating the formation of mixed-species groups.

Aggregation Vectors and Cross-Species Recognition

To aggregate, stabilize, shape, reassemble or even split a group, gregarious species need efficient aggregation vectors [299], which in arthropods are often based on the perception of chemical cues (e.g., cuticular hydrocarbons) as occurs in cockroaches [300] or ladybirds [301]. Despite being mostly unknown, interspecific chemical signals are also likely involved in mixed-species groups as vectors for cross-species aggregation. Wertheim [268] highlighted three types of interspecific chemical interactions with (1) natural enemies (predator-prey relationship), (2) microbial organisms (e.g., the relation between *Drosophila antiqua* aggregation pheromones and microbial or fungal growth), and (3) the ecological community. For this last interaction, Wertheim [268] highlights that the composition of the aggregation pheromones of some closely related species are similar, and this chemical similarity promotes mixed-species groups. A well-known example of information sharing in mixed-species groups are cockroaches. Everaerts *et al.* [256] reared two species of cockroaches together, namely, *Nauphoeta cinera* and *Leucophaea maderae*, in the same environment. Under natural conditions, the chemical profiles of these two cockroach species are highly species-specific and used for intraspecific aggregations [302], but when reared together, these two species established interspecific chemical communication. Far from expressing simple tolerance behaviour (Figure 24), the individuals aggregated together, increasing the size of the group [256]. The authors also observed a change in the chemical profile of the hydrocarbons in both species. Everaerts *et al.* [256] hypothesized that this hydrocarbon transfer occurred during the frequent physical contact among group members, and such contact typically occurs in the early life stages of individuals and persists over time. In 1994, Errard reared *Manica rubida* and *Formica selysi* [235], two ant species, in a mixed-species colony for different time periods and observed a gradual increase in the tolerance behaviour of both species. Furthermore, the individual hydrocarbon profiles of both species gradually acquired the chemical profile of the mixed colony [235]. The establishment of the social group occurred in the early adult stage and was maintained through imprinting of mixed-colony cuticular hydrocarbons. Interestingly, the individuals reared in the mixed-species colony were not attacked by allospecific individuals reared with non-mixed nestmates, suggesting that there is a minimal quantity of allospecific hydrocarbon compounds

necessary for allospecific recognition [235]. Vienne *et al.* [244] also observed a similarity between hydrocarbon profiles in two ant species. One species being more tactile (dominant species) than the other, the touching between individuals created a common cuticular hydrocarbons profile in this mixed-species. While apparently simple, this process is favoured by relative phylogenetic proximity among species and long cumulative physical contact to allow chemical transfer.

The cross-species recognition is an essential mechanism to create and maintain mixed-species aggregation. The phylogenetic proximity between species can favour such recognition and so promote the formation of mixed-species groups. Related species often share some communication abilities (chemical, tactile or visual channels) that facilitate the communication between individuals. Regarding mixed-species groups listed in the Table 1, more than a half (55%) are composed by species of the same taxa and 10% are composed by relative related species (pairwise divergence time inferior to 100 MYA (Million Years Ago) based on timetree.org). This observation supports the hypothesis that the phylogenetic proximity facilitates the formation of mixed-species. But such proximity is not a necessary condition for individuals to form mixed groups. Indeed, 30% of mixed-species groups listed are composed by species with a pairwise divergence time superior to 100 MYA (for 5% of listed examples there is no data; timetree.org). Even if the phylogenetic proximity between species favour the formation of mixed-species groups, it may also increase the competition as these species likely share close ecological niches [303]. A trade-off seems to stand out that driving the formation and the maintain of mixed-species groups. Such balance is between the sharing of communications ways (increased by the phylogenetic proximity) and the risk of competition (decreased by a relative divergence of the species).

Three extreme cases of interactions can maintain members in mixed-species groups (Figure 24). First, tolerant species can create a group that is only based on having the same preferences (e.g., shaded places), which is a non-social way to aggregate; such a case has been reported in crustaceans [262]. Cross-species recognition can also be a one-way mechanism, meaning that one species is a tolerant leader or nuclear species that forms the mixed-species group [304]. Palestirini *et al.* [305] observed such unbalanced interspecific attraction in dung beetles. However, in many cases, cross-species recognition is a two-way mechanism (see examples in Tableau 2), which requires two species to be able to recognize each other and exchange information; such a case has been suggested by Boulay *et al.* [99] to explain frequent mixed-species groups of Calliphoridae larvae. This kind of mechanism relies on equal exchange between species, meaning that both intraspecific and interspecific attraction are similar.

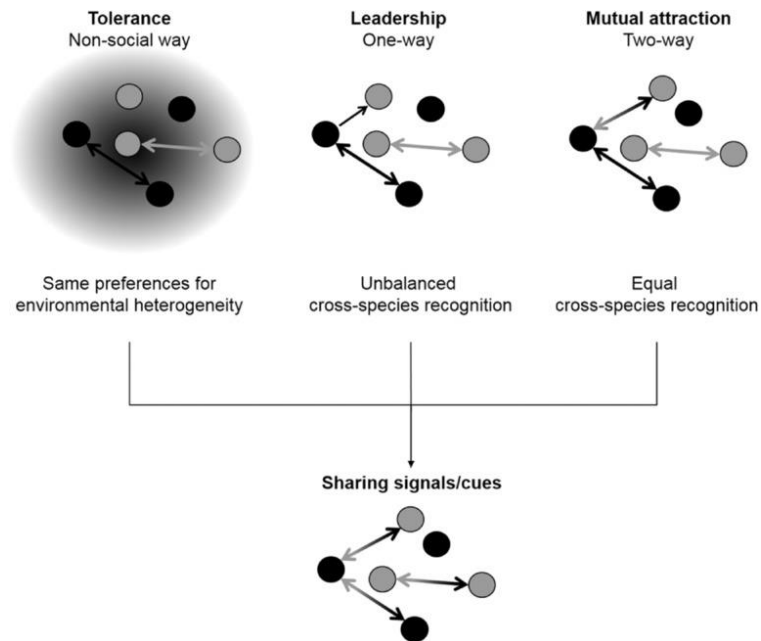


Figure 24: Three extreme cases of interactions between species conducive to the formation of mixed-species groups. The nonsocial way is described as a gathering of tolerant species with the same preferences for environmental heterogeneity. In the one-way mechanism, one species is a tolerant leader or nucleus that forms the mixed-species group. The two-way mechanism is a mutual attraction of both species that is conducive to the formation of the group. Sharing signals/cues conduct to the maintenance of the mixed-species group in time. Arrows represent the detection of aggregation signals.

However, the one-way and two-way mechanisms represent two extreme situations, and various experimental results strongly suggest that two-way recognition is not always symmetrical; more often, individuals prefer conspecifics. Accordingly, Broly *et al.* [295] suggested a stronger intraspecific attraction relative to interspecific attraction in woodlice groupings. In contrast, Meadows and Mitchell [258] observed a stronger aggregation of *Pagurus bernhardus* with crabs of another species. However, although beneficial in the context of aggregation, identical aggregation vectors can also be a constraint due to overlapping signals. These signals can hamper responders from distinguishing intraspecific members, which may explain the advantage of an asymmetric mechanism.

Arthropods can also use physical communication to form mixed-species groups. Hodge and Storfer-Isser [281] described the utilization of chemical and vibrational cues as aggregation vectors in two web-building spiders, *Hypochilus thorelli* and *Achaearanea tepidariorum*. This aggregation is supported by an interspecific attraction to silk that favours the formation and maintenance of the group in one web site. As shown by Devigne *et al.* [95] and Broly *et al.* [306] in woodlice, thigmotactism (i.e., the search for contact) can also be a strong aggregation vector. The use of simple visual cues can also lead to the formation of mixed-species groups. Mizell *et al.* [307] described evidence of visual responses to conspecific and heterospecific congeners in two leafhopper species, *Homalodisca vitripennis* and *Oncometopia nigricans*. The authors used visual baits, such as leafhopper cadavers or

coloured models, to attract individuals, and found that the presence of conspecifics or heterospecific congeners was used by the two species to estimate the quality of the host plant. The authors also observed that *H. vitripennis* responded to cadavers of the similarly sized heterospecific *O. nigricans*. Using this information, the leafhoppers chose to rejoin the heterospecific congeners on the same host plants. Similarly, Lecchini *et al.* [259] showed that postlarval crustaceans preferentially used visual cues over chemical cues to detect heterospecific individuals and thus select their habitat. Indeed, individuals rely on the presence of heterospecific crustacean congeners to determine habitat quality, which could explain mixed-species aggregations.

Benefits

The notion of gregariousness often implies cooperation and/or competition, and these two phenomena are the most fundamental principles that drive the evolution of social structures. In 1931, Allee was the first to observe and to experimentally test for a positive relationship between a *fitness* component and population size or density [122], [308]. Indeed, aggregation offers direct benefits for group members and gathers reproductive individuals together, thereby facilitating reproduction. Based on this pioneering study, Odum [309] named this relationship *the Allee principle*, which is more widely known as the 'Allee effect'. However, there are only a few empirical and theoretical studies of the consequences of the Allee effect for mixed-species animal groups [310].

First, the benefits of aggregation can simply result from the number of individuals. Known examples of such benefits include protection against predators, protection against environmental constraints or foraging advantages [157], [311], [312]. One of the most studied benefits of aggregation is protection against predators, which is commonly said to be one of the main advantages of aggregation [242], [313]. Predation risk is reduced by the presence of many individuals whose detection abilities are specific to their species (receptors increased). Cooperative defence (i.e., an increase in the number of predator detectors), also known as *the many eyes and ears theory*, is one of the few benefits that has been studied in mixed-species groups. Indeed, this mechanism could be more efficient in a mixed-species group because each species contributes its specific predator detection abilities. In insects, Pasteels and Gregoire [255] reported a defensive aggregation of two chrysomelid larvae, *Phratora vitellinae* and *Plagioderma versicolora*, on a *Salix* tree. These two species secrete a defensive substance against the female sawfly, *Tenthredo olivacea*, their common predator. According to the authors, the aggregation may be a social adaptation to efficiently repel enemies and increase the chance of survival. On the other side, the transmission of disease within aggregation is an important aspect that shouldn't be ignored [314]. But in the case of mixed-species groups, such transmission could also be decreased, as has been suggested to occur in maggots [60], [191].

The advantages of mixed-species groups can also be attributed to the direct increase in group size (just as in single-species aggregations); i.e., individuals cooperate to reach an optimal group size so that each individual will gain direct benefits. When different species gather, even more individuals can be aggregated and more benefits can be gained. A striking example is provided by terrestrial crustaceous woodlice, for which desiccation is a major concern as they are very sensitive to water loss. In response to this environmental stress, aggregation has been shown to offer protection against drying [306] (Figure 23 D). In this context, Hassall *et al.* [315] also demonstrated that two species of woodlice, *Porcellio scaber* and *Armadillidium vulgare*, can clump together (see also Caubet and Richard [316]). Consistent with the Allee effect, these authors found that at low densities, mixed-species groups promote population growth that results in positive *fitness* consequences (higher growth rates and survivorship of group members) [315]. Furthermore, *A. vulgare* is more resistant to desiccation than *P. scaber* [317], and Broly *et al.*, [318] demonstrated that body shape explains the difference in the mass-specific water loss rates. As a likely consequence, *P. scaber* aggregates more than *A. vulgare* [315], and it can be supposed that *P. scaber* joins with *A. vulgare* to form a larger group that is better able to withstand low relative humidity and/or high ambient temperatures. For monospecific groups, *the selfish herd theory* postulates that individuals placed at the centre of an aggregation reduce their risk of harm compared to conspecifics present at the vanguard [157]. Such a mechanism holds for mixed-species groups, and may even be amplified by the different characteristics of the species.

Living together may also improve access to food. Hassall *et al.* [315] hypothesized that mixed-species woodlice aggregations provide individuals with an additional food resource because these species are detritivorous and feed on each other's faeces. Another interesting example is provided by the larvae of carrion flies (Diptera Calliphoridae) [60] (Figure 23 A), whose maggot masses can gather hundreds to thousands of individuals of several species and instars. These larvae secrete digestive enzymes and antibiotics, and their movements mechanically liquefy muscles to facilitate the assimilation of food (exodigestion). This benefit is likely a consequence of a simple numerical effect; if more individuals are present in a group (regardless of the species), more salivary enzymes are produced [230]. Moreover, larvae secrete species-specific antibiotics [60] that decrease the number of pathogens on the carrion and thus increase larval survival. In this context, Ives [252] quantified the strength of larval competition in carrion flies and demonstrated a reduction in interspecific competition relative to intraspecific competition through resource partitioning.

Thus, mixed-species can offer advantages that are not available to small monospecific groups. Furthermore, the addition of two or more species can yield different benefits than those observed in monospecific groups (e.g., different sensory abilities). However, while it may seem that the benefits of

grouping are more or less equally shared when individuals belong to the same species, this assumption becomes questionable for groups composed of different species. In other words, one may ask if for the same group size, a monospecific group can be more effective than a mixed one. An initial response to this question is that the accumulation of the different abilities of the species in a mixed group can generate benefits that cannot be matched in the monospecific group. Such a phenomenon has been previously reported in mammals [231], and Roth and Willis [319] suggest that it can also be true in arthropods. Through the association of the abilities of different species (cooperation), the benefits/deleterious effects ratio can be better compared to that observed in a monospecific group. Furthermore, species that form mixed societies mostly do not have the exact same ecological niche, which decreases the competition for food. All of this raises the question of benefit symmetry among group members. In social foraging groups, *the producer-scrounger game* is one of mathematical models used to describe the individual foraging strategies of group members [320]. This model highlights the exploitation of a producer's findings (e.g., resource sites) by scroungers and predicts how foraging strategies change with food patch size. It also predicts how individuals can switch between the two strategies, scrounging or producing, until they reach an evolutionarily stable strategy [321]. Such models have been used for many bird species [226], [320] but, to our knowledge, only in non-mixed species groups. However, this model could be modified to describe the foraging strategies of mixed-species groups by adding parameters to quantify the different foraging abilities of each species. Such an upgraded model would be useful for predicting the ways in which species search and compete for resources in mixed groups.

Species Competition

The question of competition is a key point in understanding mixed-species groupings. Surprisingly, even though mixed-species groups are interesting models for exploring the balance between collective benefits, species-specific benefits and competition within species and individuals, almost no experimental data can be found in the literature (Figure 25).

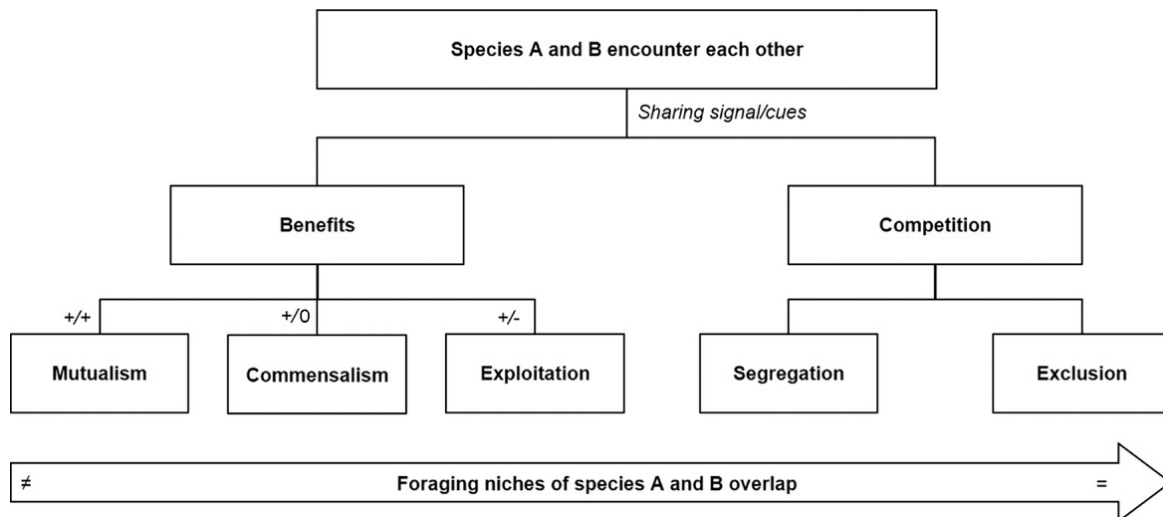


Figure 25: Schematic overview of relationship between species in mixed-species groups. The overlap of ecological niches drives the interactions among species. Mutualism: a relationship between two species in which both benefit from the association. Commensalism: a relationship between two species in which one derives some benefit, while the other is unaffected. Exploitation: a relationship between two species in which one derives some benefit while the other is negatively affected. Segregation: a competitive relationship between two species that splits the group but the species remain in contact or close to each other. Exclusion: a competitive relationship between two species leading to the exclusion of one species from the area. The effects on the species can be (+) beneficial, (-) detrimental, or (0) neutral.

The close proximity of competitors that occupy the same ecological niche decreases food availability or the accessibility of reproductive partners, so competition can emerge between members of mixed-species groups in habitats with insufficient food resources. However, Anne and Rasa [322] suggest that competition decreases in mixed-species rather than single-species groups; individuals must compete for all of their resources in monospecific groups, while competition may be for only a single resource (food) in mixed-species groups [322]. Consistent with this idea, Reis *et al.* [253] observed a higher survival rate in double-species groups composed of *Chrysomya putoria* and *Cochliomyia macellaria* when they increased the larval density of both species. However, they also showed that *C. macellaria* is an inferior competitor in the presence of *Ch. putoria*, so coexistence depends on the condition that the cadaver size is not limiting. Thus, even if aggregation offers advantages, there may also be unbalanced relationships in mixed-species groups or even social parasitism, in which some species disproportionately benefit from the competitive abilities of another species. Moreover, the mechanical exclusion of one species by another may also occur, or the trade-offs between the species may change over time. At first, individuals of one species may gain from cooperating with those of another species to form a group, but once the group is formed and stable, species can mutually separate once their optimal group size is reached. If the two species have sufficiently different ecological niches, they can segregate but remain in contact (Figures 23 A & 25). This mechanism has been observed in two larval Diptera species, *Chrysomya albiceps* and *C. marginalis*

[141]. These species grow faster at high temperatures, but each one has its own thermic preferendum. Due to their abilities to produce heat (larval-mass effect), they can aggregate together and increase local temperature. However, such aggregates split when mass-temperature start to exceed the tolerance of one species [60]. Competition for access to food was observed in necrophagous larvae, which densely aggregate on carrion. Inside these larval masses, individuals try to reach the food located under the mass and thus crawl over each other in a movement described as “scramble competition” [60]. However, Charabidze *et al.* [125], [148] highlighted that these masses are more structured than typically thought; according to the self-organization theory, a complex structure can emerge from larval foraging behaviour, allowing them to feed more efficiently. More generally speaking, while the resource is not limiting, species can occupy a similar/identical ecological niche without experiencing the effects of competition, as in leaf-feeding aphids [247]. However, many resources are restricted in quantity, time or space, which may contribute to restricting the ecological niches that are suitable for mixed-species groups.

Conclusion

Based on this review of the literature, mixed-species aggregations appear to be found in a wide range of arthropod taxa (Table 2). The phylogenetic proximity tends to favour the formation and the maintaining of such groups, likely due to similar scales (size, lifespan, displacement, etc.) and an easier communication between members. However, the degree to which the speciation process may be linked to the existence of stable mixed-species groups remains to be answered. Mixed-species groups do not seem to be restricted by the degree of sociality of the species; they have been observed in species ranging from gregarious to eusocial. Drawing on this, this review raises the question of the proximate and ultimate causes favouring such mixed-species groups, and one conclusion is the importance of the spatial distribution/specialization of the species. Obviously, natural mixed-species grouping is restricted to species of approximately the same size that at least partly share the same area during the same period of time. Species that form stable social groups are also more likely to accept individuals from another species. Furthermore, closely related species are likely to share similar aggregation cues (e.g., related chemical compounds) and detection abilities, which facilitates cross-species recognition and, probably, the formation of mixed-species groups. But theoretical models also show that the cues of both species do not need to perfectly overlap to produce mixed-species groups [323]. Furthermore, mixed-species groups can also be observed if the inter-attraction between species is less than the intraspecific attraction but greater than a critical value. The similarity of the cues of the two species modulates the inter-attraction between them [323].

Blends of chemical compounds (e.g., hydrocarbons) are the most common aggregation cues used by arthropods. Experiments on cross-species chemical recognition have been performed in only a restricted number of species, but they could provide an interesting starting point for understanding the mechanisms driving mixed-species aggregation dynamics, especially in the context of self-organization. Indeed, such aggregation dynamics result from a network of feedbacks, mainly the amplification of positive feedbacks resulting from inter-attraction, and this concept successfully explains how interactions between individuals can generate complex collective systems. Furthermore, self-organization is associated with the notion of emergence (a phenomenon is emergent when observers cannot predict its appearance based only on the knowledge of the behaviour of the components of the system). From unicellular organisms to mammals, this theory has been used to describe collective phenomena and to explain how individuals can form, amplify, regulate or divide groups; many examples of emergent phenomena are described in Camazine *et al.* [223]. In the case of mixed groups, self-organized models predict different collective behaviours without the need to change the behaviour of any individuals. Some generic parameters, such as resource availability (e.g., the carrying capacity) or the number of individuals involved, are the keys to shaping the aggregates. A simple but striking consequence is the possibility for species to segregate even in absence of agonistic behaviour [323].

From a purposive point of view, mixed-species groups likely provide similar benefits to members as intraspecific groups, a conclusion that was also drawn from mixed-species groups of mammals [231]. These benefits essentially include enhancing protection against predators and shared foraging strategies (Table 2), and as shown by the examples in this review, mixed-species groups can be stable in time and mutually beneficial, especially if the species do not have the same ecological niche or if resources are not limiting. In such cases, the competition between species should play a secondary role, and both species can benefit from the aggregation and the resulting cooperation. However, interspecific competition can quickly direct the benefits disproportionately towards one species at the expense of the other. Experimental and theoretical results show that an increase in competition can lead to new patterns and a shift towards segregation [323], [324]. Accordingly, the study of mixed-species groups offers an interesting way to investigate the frontiers between cooperation and competition.

Compared to intraspecific groups, and especially eusocial species, our understanding of mixed-species groups of arthropods is at an early stage (see the review by Jeanson *et al.* [227]), but most of the experimental designs used to study monospecific groups, such as the binary choice test, can be applying to the study of mixed-species groups [99], [324]. Several marking techniques also exist to

follow individuals, which can facilitate the monitoring of species during experiments [325], and such technical approaches provide a good working basis for further experimentation on mixed-species groups. Moreover, various theories, mathematical models and metrics have been developed in the context of aggregation and could be applied or adapted to mixed-species groups (for metrics, see Everaerts *et al.* [256], Ives [252], Sauphanor and Sureau [264] or Caubet and Richard [316]; for models, see Deneubourg *et al.* [326] or Nicolis *et al.* [323]). However, models of the cooperation-competition phenomenon still need to be established for mixed-species groups, but the required experimental data are currently lacking.

Acknowledgements

The authors would like to thank Robert Oelman (photographer), Cameron Richards (PhD) and Nash Turley (postdoctoral researcher) for permitting us to reuse their photos. Jean-Louis Deneubourg is a Senior Research Associate from the F.R.S.-FNRS.

Be lonely or feel cold: the cruel dilemma of interspecific aggregation in blowflies' larvae

Cindy Aubernon, Valéry Hédouin, Damien Charabidzé

Ces travaux sont encore en cours de rédaction pour une soumission dans l'année au journal *Behavioral Ecology*. Nous travaillons actuellement avec le Professeur Jean-Louis Deneubourg pour une modélisation des comportements observés. Une analyse plus poussée par modèle mathématique nous permettrait de mettre en évidence les effets stochastiques potentiels et si les comportements observés peuvent être reproduits *in silico* sur la base de règles comportementales simples.

Introduction

Sur le cadavre, les larves ne forment pas toujours des agrégats conspécifiques. En effet, plusieurs espèces peuvent coloniser le même corps au même moment [11], et ainsi former des agrégats hétérospécifiques [111], [112]. Cette formation donne lieu à une compétition interspécifique qui peut aboutir, lorsque les espèces n'ont pas la même compétitivité, à l'expulsion en marge de l'agrégat de l'une des espèces, formant ainsi un agrégat parfaitement scindé en deux groupes conspécifiques [111], [112]. En effet, ce phénomène observé chez deux espèces du genre *Chrysomya spp* a été décrit comment étant dû à la température produite par l'une des espèces, beaucoup trop élevée pour l'autre. L'observation de cette configuration nous pousse à croire que pour ne pas subir la température produite par la première espèce, la seconde a opté pour un compromis entre régulation thermique et socialité.

La température est un paramètre important pour la physiologie des insectes. Elle affecte leurs activités [116] comme la prise alimentaire [129], la ponte des femelles [327], le vol [78] ou la reproduction [218]. Beaucoup d'études s'intéressent donc aux effets de la température sur la physiologie des insectes et plus largement sur les ectothermes [216], [219], [220]. Chez les Calliphoridae, nous avons démontré que les larves des espèces *Lucilia sericata*, *Calliphora vomitoria* et *Calliphora vicina* ont une température préférentielle spécifique de 33.3 ± 1.5 , 29.6 ± 1.6 et 22.6 ± 1.6 °C respectivement [167] et qu'elles sont en constante recherche de cette température dans leur environnement [221].

Les interactions entre espèces de larves Calliphoridae ont été encore peu étudiées, mais il a été mis en évidence que *Lucilia sericata* et *Calliphora vomitoria* partagent un signal attractif favorisant la formation d'agrégats hétérospécifiques [99]. Cependant, les larves n'ont pas la même attractivité l'une envers l'autre. En effet, *L. sericata* est fortement attractive pour sa propre espèce mais aussi pour *C. vomitoria* [100].

Du fait de leur attractivité réciproque, et de leurs températures préférentielles différentes, nous supposons que la formation des agrégats hétérospécifiques dépend principalement de la capacité des larves à faire un compromis entre régulation thermique et socialité. Cependant, ayant des temps de première colonisation qui diffèrent, nous supposons que l'ordre d'arrivée sur le cadavre est un point important à prendre en compte. Ainsi, pour tester cette hypothèse, nous avons analysé la formation d'agrégats des larves de *Lucilia sericata* et *Calliphora vomitoria* dans un environnement thermique hétérogène en faisant varier l'ordre d'arrivée des espèces.

Matériel et méthodes

Les deux espèces utilisées dans cette étude *L. sericata* et *C. vomitoria* proviennent d'une souche Française (Verminière de l'Ouest 48.424292N, 1.487749W). Les mouches adultes (environ 250 ± 50 individus) sont élevées au laboratoire dans des cages en tulle (50 x 50 x 50 cm). Elles sont nourries avec du sucre semoule et de l'eau *ad libitum*. Les œufs sont obtenus en utilisant un pilulier contenant 20 ± 1g de foie bœuf mixé placé directement dans les cages et ce, durant 4 heures. La présence d'œufs est relevée toutes les heures nous donnant une approximation de la ponte à la demi-heure près. Les œufs ainsi obtenus sont déposés dans des boîtes en plastique (143 x 105 x 59 mm) contenant 100 ± 5 g de foie de bœuf mixé, placées dans un incubateur (Sanyo, Moriguchi City, Osaka, Japan) à 19 ± 0.1 °C dans l'attente du stade approprié. Les temps de développement de chaque espèce ont été obtenus grâce à la base de donnée ForenSeek [28], [145], [147].

Les expérimentations ont été réalisées dans le Thermograde [167], un dispositif chauffant permettant de créer un gradient thermique linéaire le long d'une gouttière de 80 cm de longueur contenant 2 cm d'épaisseur de foie de bœuf mixé. Des thermomètres boutons (DS1921G Thermochron i-button, précision : 0.5 °C ; Maxim Integrated, San Jose, CA, USA) ont été placés à distance régulière au sein du dispositif (tous les 5 cm) pour mesurer la température locale.

Avant toute expérimentation, les larves sont retirées de leur boîte d'élevage afin qu'elles jeûnent pendant 4 heures à 19 °C [148]. Les larves sont ensuite placées de façon homogène tout le long du Thermograde, puis le dispositif est fermé à l'aide d'une casquette opaque en plastique noir. Après 19 heures d'expérimentation, le dispositif est ouvert et la localisation des larves est relevée sur des quadras de 5 cm. Une première expérimentation (*one-step process*, 8 réplifications) analyse l'agrégation de 40 larves de chaque espèce placées au même moment dans le dispositif. Une seconde expérimentation (*two-step process*, 8 réplifications), analyse l'agrégation de 40 larves de chaque espèce, où la seconde est déposée dans le dispositif 4 heures après la première.

Analyse statistique

L'analyse a été réalisée en utilisant le logiciel R software v.3.3.2 (R development Core Team). Un indice d'agrégation a été calculé en utilisant le package Spatstat [328]. Cet indice mesure la moyenne des distances deux à deux entre tous les individus étudiés. Plus cet indice est grand, plus les individus sont éloignés et donc non agrégés. Nous avons établi un seuil minimal d'agrégation, d'une valeur de 5 cm (valeur maximale établie lorsque l'agrégat chevauche deux portions successives). Au-dessus de ce seuil, les larves sont considérées comme non agrégées. Toutes les comparaisons ont été réalisées à l'aide d'un test T de Student, avec un seuil de significativité α de 0.05.

Résultats

Des expérimentations de cinétique d'agrégation d'une durée de 4 heures ont été réalisées (13 répétitions au total). Les résultats sont présentés en annexe 3 de ce travail de thèse.

One-step process

Lorsque les larves des deux espèces sont placées en même temps dans le dispositif, nous observons à la fin de l'expérimentation une dispersion des insectes entre 20 et 41.5 °C (Figure 26). Les larves se réunissent, mais forment des groupes non agrégés (indice d'agrégation total = 14.22 ± 10.62 cm). L'indice d'agrégation ne diffère pas significativement entre les deux espèces (Test de Student : ddl = 14 ; $p = 0.18$), les larves étant dispersées dans le Thermograde de la même façon (Indices d'agrégation : *L. sericata* = 10.79 ± 8.60 ; *C. vomitoria* = 11.97 ± 9.42). Cependant, on observe que les larves ne sont pas réparties aléatoirement, mais plutôt qu'elles sont réparties spécifiquement avec plus de 70 % des larves de *Lucilia sericata* placées à des températures supérieures à 32 °C et plus de 60 % des larves de *C. vomitoria* placées à des températures en dessous.

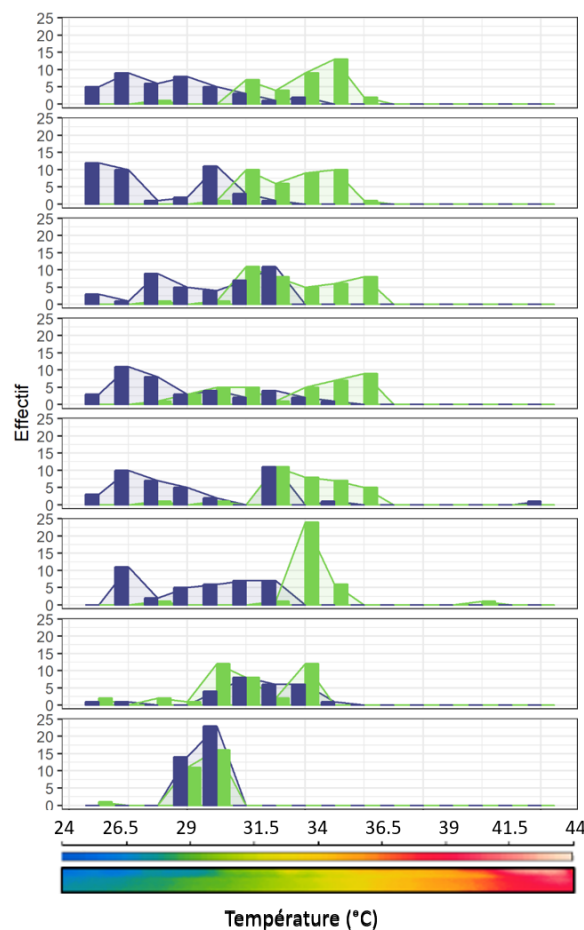


Figure 26 : Graphique représentant les 8 répétitions de la conditions *one-step process* où les deux espèces sont placées en même temps dans le Thermograde. Chaque répétition représente la distribution (effectif) des espèces en fonction de la température. En bleu, *Calliphora vomitoria*, en vert, *Lucilia sericata*.

Two-step process

Calliphora vomitoria déposée en premier

Après 19 heures, toutes les réplifications présentent la même distribution des larves, soit la formation d'un agrégat hétérosécifique localisé à 33.47 ± 1.46 °C avec un indice d'agrégation global de 3.18 ± 6.04 cm. Les deux espèces sont très agrégées avec un indice respectif non significativement différent (test T de Student : ddl = 9.83 ; p = 0.47 ; *L. sericata* = 2.49 ± 4.72 cm ; *C. vomitoria* = 3.96 ± 7.10 cm) et une distribution ne dépassant jamais deux quadras du dispositif (Figure 27).

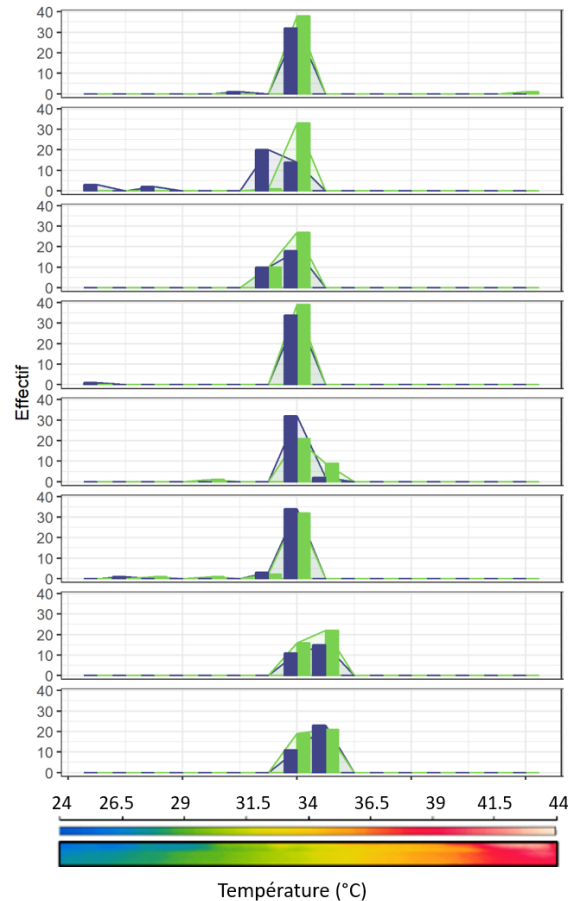


Figure 27 : Graphique représentant les 8 réplifications de la conditions *Two-step process* où *Calliphora vomitoria* est placée en premier dans le Thermograde. Chaque réplification représente la distribution (effectif) des espèces en fonction de la température. En bleu, *Calliphora vomitoria*, en vert, *Lucilia sericata*.

Lucilia sericata déposée en premier

Ces résultats présentent 4 distributions différentes (Figure 28). La première (pour 2 réplifications) montre une agrégation hétérosécifique (indice d'agrégation global = 1.84 ± 3.07 cm) localisée aux alentours de la température préférentielle de *Lucilia sericata*. La seconde (pour 3 réplifications) montre la formation d'un agrégat hétérosécifique (indice d'agrégation global = 2.49 ± 4.95) à une température proche de la température préférentielle de *C. vomitoria*. La troisième distribution présente deux formations monospécifiques bien ségréguées (indices d'agrégations : global = $10.57 \pm$

10.03; *L. sericata* = 7.86 ± 8.21 ; *C. vomitoria* = 5.08 ± 6.63) aux alentours de la température préférentielle respective des deux espèces (2 réplifications). Enfin, la quatrième conformation (pour 3 réplifications) montre la formation d'un groupe non agrégé (indice d'agrégation global = 10.44 ± 10.24), dispersé sur plus de 4 quadras du dispositif où les larves sont localisées entre 25 et 33.5 °C.

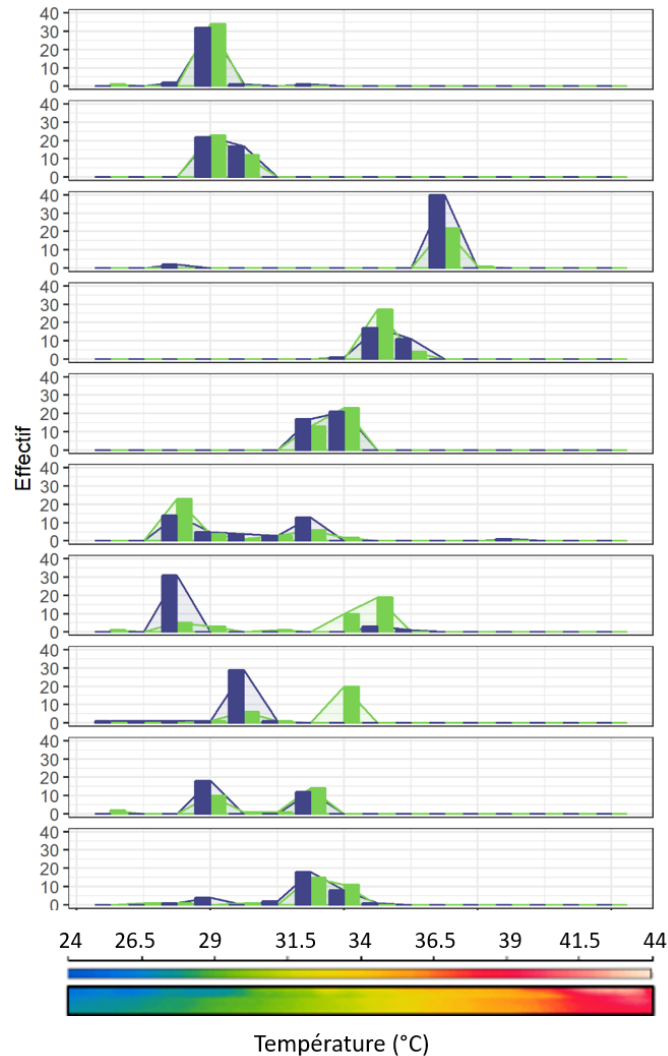


Figure 28 : Graphique représentant les 10 réplifications de la conditions *Two-step process* où *Lucilia sericata* est placée en premier dans le Thermograde. Chaque réplification représente la distribution (effectif) des espèces en fonction de la température. En bleu, *Calliphora vomitoria*, en vert, *Lucilia sericata*. Les deux premières réplifications représentent la condition où le groupe est agrégé aux alentours de la température préférentielle de *C. vomitoria*. Les 3 suivantes représentent la condition où le groupe est agrégé aux alentours de la température préférentielle de *L. sericata*. Les réplifications 6, 9 et 10 représentent la condition où le groupe n'est pas agrégé alors que les réplifications 7 et 8 représentent la condition où forment deux groupes consécifs bien ségréés.

Discussion

Cette étude repose sur l'hypothèse que la formation d'agrégation hétérosécifique des larves de Calliphoridae est basée sur des compromis entre l'agrégation et la régulation thermique. Les

résultats montrent clairement que la dynamique temporelle joue également un rôle majeur dans cette formation.

Lucilia sericata et *Calliphora vomitoria* sont deux espèces de mouche Calliphoridae dont la température préférentielle des larves de troisième stade est respectivement de 33.3 ± 1.5 et 29.6 ± 1.6 °C. Ces deux espèces sont capables de coloniser un cadavre au même moment [11], mais leur intervalle de première apparition diffère légèrement : à des températures supérieures à 18 °C, *Lucilia sericata* colonise plus rapidement les carcasses [13]. Ce sont des espèces tout de même assez proches physiologiquement et thermiquement [12], [251], [329].

Lorsque ces espèces sont placées au même moment dans notre dispositif, nous remarquons qu'il est difficile pour les larves de réellement s'agréger. En effet, nous observons la formation d'un regroupement où la majorité des larves sont rangées spécifiquement aux deux extrémités thermiques. Cette conformation suggère que les larves ont débuté leur processus d'agrégation, mais qu'un nombre non négligeable d'individus parcourt le dispositif en faisant des allers-retours réguliers entre les deux agrégats en formation. Les larves reconnaissant mutuellement leurs signaux attractifs [99], cette formation hétérospécifique non aboutie ou en cours de division démontre une forte interattraction entre les espèces. De plus, la faculté des larves à voyager entre les deux groupes en formation suggère une large tolérance thermique, que ce soit pour des températures en-dessous ou au-dessus de leur température préférentielle. Le cadavre étant un milieu hétérogène où les températures sont variables et souvent éloignées des préférences thermiques du fait de la latitude de nos régions, les larves sont probablement bien adaptées à des températures inférieures à leur température préférentielle [28], [147]. En revanche, les températures maximales tolérées étant plus ou moins proches des températures préférentielles [330], le fait que les larves puissent rejoindre des températures supérieures implique une forte tolérance au stress thermique. Cette tolérance peut fortement varier en fonction de l'état de satiété des larves, où les bornes minimales et maximales s'éloignent lorsque les larves sont nourries [219]. De telles conditions sont probablement présentes au sein des agrégats larvaires où la température peut localement dépasser les 45 °C.

Dans l'expérience où l'arrivée des insectes diffère, on observe un déséquilibre entre les signaux attractifs et le comportement de régulation thermique. En effet, dans le cas où *L. sericata* est déposée ultérieurement, nous observons un unique groupe où toutes les larves sont agrégées à la température préférentielle de *L. sericata*. On peut supposer dans ce cas que la trace laissée par les larves de *L. sericata* s'agrégeant, aurait attiré les larves de *C. vomitoria* en dehors de leur préférence thermique. La forte attractivité de *L. sericata* est connue [100], cependant, nous montrons ici pour la première fois l'étonnante prévalence de la socialité interspécifique sur la régulation thermique. En effet, Greenberg

et Tantawi (1993) ont montré que *C. vomitoria* ne pouvait terminer son développement à des températures supérieures ou égales à 29 °C [147]. Le choix contre intuitif des larves pour une température potentiellement létale nous pousse donc à croire que l'agrégation hétérospécifique est susceptible d'apporter des bénéfices à même de compenser les risques d'une température trop élevée [48].

Dans le cas où *Calliphora vomitoria* est déposée en second lieu, nous observons une forte variabilité des états finaux. En effet, il est difficile dans cette condition de comprendre la hiérarchie des résultats obtenus et notamment d'en déduire s'il s'agit d'états transitoires (i.e. nécessitant un temps supérieur à celui de nos expérimentations pour se stabiliser) ou s'il s'agit de plusieurs états stables, induits par la sensibilité des larves aux conditions initiales. Nous pensons que ces configurations pourraient être différentes étapes d'une même dynamique, plus ou moins rapide en raison de processus stochastiques. Dans ce cas, la modélisation a un intérêt certain. Connaissant les températures préférentielles spécifiques, les cinétiques d'agrégation ainsi que les sensibilités à l'attraction mutuelle, la modélisation permettrait d'étudier les conditions reproduisant ces résultats pour en comprendre les subtilités.

Dans tous les cas, ces différentes conformations démontrent que les larves de Calliphoridae sont en recherche d'un compromis entre différents signaux, notamment thermiques et sociaux. Nous montrons ainsi qu'une balance très fine existe entre ces différents éléments, suggérant qu'ils sont susceptibles d'apporter des bénéfices spécifiques. Très récemment, notre équipe est ainsi parvenue à démontrer dans une moindre mesure cette possibilité entre *Lucilia sericata* et *Calliphora vicina* [48]. Les auteurs observent pour des températures supérieures de 3 degrés au *preferendum* thermique de *C. vicina* (25 °C), une absence de coût à la formation d'agrégats hétérospécifiques. Ainsi, *L. sericata* et *Calliphora vomitoria* ayant des *preferendum* thermiques plus proches que *L. sericata* et *C. vicina*, nous supposons que la formation de ces agrégations hétérospécifiques est une stratégie développementale apportant des bénéfices tels qu'une prise alimentaire mutualisée et le partage éventuel de composés anti-microbiens [47], [100], [331].

Remerciement

Nous tenons à remercier Mr Pierre Vallet pour son aide dans l'exécution des expérimentations en vue d'obtenir la cinétique d'agrégation des larves à 4 heures. Les résultats sont présentés en annexe 3 de ce travail.

Discussion

L'intelligence, c'est la faculté d'adaptation

André Gide, 1869-1951

Les larves de Diptères nécrophages sont particulièrement étudiées dans le domaine de l'entomologie médico-légale. Etant des espèces pionnières utilisées pour la datation de l'Intervalle Post-Mortem minimum (IPMm), leur physiologie est aujourd'hui bien connue [28], [62]. Cependant, la plupart des études sur leur développement ont délibérément mis de côté la composante sociale de ces insectes. Ainsi, bien que décrit de longue date, le comportement grégaire des larves n'est que faiblement étudié [98], [99], [113].

De nombreux paramètres peuvent affecter le développement des insectes [32], [332], qu'ils soient biotiques [47] ou abiotiques [28], [76]. Il est par ailleurs connu que les larves de Diptères Calliphoridae sont capables de modifier leur micro-habitat [75], [83], et que cette action a un effet sur leur développement [47]. Il a également été démontré que les larves de différentes espèces communes pouvaient coexister [252] et même former activement des groupes hétérospécifiques [60], [108]. Cependant, ces connaissances n'avaient jusqu'à présent pas fait l'objet d'une réelle démarche intégrative considérant l'écologie des asticots comme un véritable paramètre d'intérêt, avec des conséquences directes en entomologie médico-légale [38]. Ce travail de thèse propose au contraire une vision globale intégrant le comportement des larves dans leurs processus de développement en appliquant pour la première fois une démarche issue de l'écologie adaptative [2].

Comportement des larves

Le comportement des larves des trois espèces que nous avons étudiées repose sur des bases similaires : recherche constante de nourriture [114], d'une température préférentielle [330] et de congénères pour s'agréger [100]. Il intègre donc les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement. Nos recherches postulaient initialement que les individus cherchaient à maximiser chacun de ces paramètres afin d'optimiser leur *fitness*. Cependant, la synthèse de nos travaux les plus récents indique plutôt l'existence d'une forme de stratégie collective de développement, reposant sur l'optimisation sociale de paramètres multiples.

En effet, les recherches de notre équipe ont démontré que les larves de Calliphoridae présentent un comportement d'agrégation actif, que ce soit pour la formation de groupes hétérospécifiques ou conspécifiques [98], [100], et que de tels agrégats apportent de nombreux bénéfices en terme de développement [47], [48]. L'exodigestion, une prise alimentaire mutualisée au sein des agrégats, permet un développement accéléré des larves de *L. sericata* (effet Allee) [47]. Au sein de groupes hétérospécifiques (*C. vicina* + *L. sericata*), Komo (2019) a également observé des bénéfices partagés allant de l'augmentation de la vitesse de développement à une taille plus grande et un meilleur taux de survie [48]. Il existe donc de réels bénéfices développementaux liés à

l'agrégation des larves. De plus, au sein des masses larvaires, les bénéfices sociaux ainsi que l'optimisation thermique vont généralement de pair. En effet, le dégagement de chaleur lié au métabolisme des larves (*larval-mass effect*) permet d'atteindre des températures locales élevées [124], [125]. Au sein des très grandes masses larvaires, ou la température peut dépasser les 40°C [124], [125], le turn-over (déplacement continu des individus) permet une thermorégulation efficace [113].

Dans ce contexte, j'ai démontré que les larves étaient constamment à la recherche de leur température préférentielle [167] et qu'elles étaient aptes à thermoréguler en fonction des changements climatiques [221]. Cette température étant spécifique et très différente entre les trois espèces étudiées (33 °C pour *Lucilia sericata*, 29 °C pour *Calliphora vomitoria* et 22 °C pour *Calliphora vicina*), j'ai émis l'hypothèse qu'il s'agissait d'un optimum développemental propre à la physiologie de chaque espèce [167]. Ces préférences et les tolérances thermiques associées [91], [219], [220] permettraient aux larves d'optimiser leur développement. Cependant, du fait de l'asymétrie de la courbe de performance, il est possible que *le sous-optimal soit optimal* [91]. En effet, les ectothermes n'étant pas de parfaits thermorégulateurs, il est préférable de viser le sous-optimal, au risque d'avoir une *fitness* moins élevée, que d'avoir trop chaud [17], [91], [220]. A défaut de pouvoir démontrer que les valeurs choisies par les larves maximisaient leur *fitness stricto-sensu* (i.e. leur succès reproducteur), j'ai démontré que ces valeurs étaient optimales en terme de développement. En effet, la température de 33 °C choisie par *L. sericata* permet d'apporter un développement de bonne qualité [28], en corrélation avec les études précédentes à ce sujet [73]. Lorsque l'environnement thermique est hétérogène, c'est cette température qui semble également être sélectionnée par la très grande majorité des individus. Bien que la variabilité soit plus élevée, la moyenne de change pas, apportant une vitesse de développement optimale à l'échelle de la population. Enfin, lorsque la température locale diminue, les larves tendent à se re-localiser dans la zone la plus proche de cette température préférentielle, confirmant ainsi leur choix mais également leur comportement de thermorégulation comportementale.

Cependant, les conditions naturelles imposent généralement des choix plus complexes, où il n'est pas possible de maximiser simultanément tous les paramètres. Les capacités de perception et d'intégration des larves nécrophages étant limitées, je me suis intéressée aux choix des larves entre thermorégulation et socialité, et aux conséquences de ces choix en terme de *fitness*. Lorsque nous confrontons des individus à un choix entre une température optimum (i.e. thermorégulation) et un groupe d'individus préexistant (i.e. agrégation), les répartitions observées (i.e. décisions) sont très différentes selon les répliques. D'infimes variations initiales semblent pouvoir renverser la tendance, aboutissant parfois à des choix dont la valeur adaptative semble faible [96]. Nous l'observons

particulièrement bien dans la figure 27, où 4 états finaux sont possibles alors que les conditions initiales sont les mêmes. Les effets de rétention et d'attraction des 2 signaux étant en opposition, les disparités entre les comportements individuels ainsi que leur stochasticité jouent probablement un rôle prépondérant sur ces choix finaux [221]. Du fait de la capacité de réaction des larves [221], de l'action du groupe [98], [100], [158] et de la vitesse de modification du milieu [32], [61], ces cas limites sont peut-être des artefacts ou des états transitoires uniquement visibles lors d'expérimentations de courtes durées en conditions de laboratoire [96]. Dans ce contexte, une approche par modélisation présenterait un réel intérêt, permettant d'anticiper les réponses comportementales liées aux variations environnementales [326].

Quoi qu'il en soit, nous remarquons que, dans les conditions que nous avons étudiées, le choix des larves n'affecte pas significativement leur développement. La variabilité en terme de durée de développement est certes plus grande lorsque les contraintes de choix sont multipliées, mais la durée moyenne de développement reste inchangée et proche du minimum possible (Figure 22). En d'autres termes, le comportement des larves génère une diversité de réponses (compromis collectifs) dont la conséquence semble cependant être limitée puisqu'aboutissant toujours à une durée de développement minimale. En ce sens, la valeur adaptative de ces différents choix collectifs semble relativement stable. La socialité semble ainsi compenser des déséquilibres apportés par les variabilités environnementales. Cette robustesse des comportements sociaux apparaît dès lors comme un mécanisme de résilience, une sorte de tampon à même de répondre efficacement aux évolutions rapides de l'écosystème cadavérique (Figure 28).

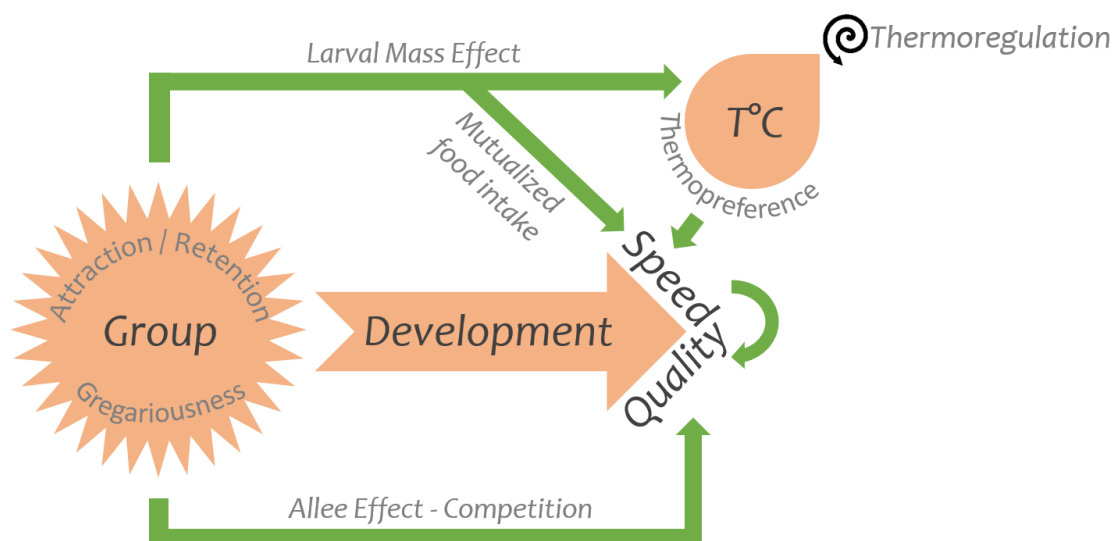


Figure 28 : Schéma récapitulatif des paramètres biotiques affectant le développement des larves de Calliphoridae.

Stratégie évolutive

S'il est admis qu'un comportement donné permet le plus souvent de maximiser la *fitness* des individus [333], cette maximisation est toujours soumise à un certain nombre de contraintes, ce qui en fait une solution adaptée uniquement dans un cadre donné [92]. De ce fait, il est rare d'observer des solutions toujours optimales, maximisant tous les bénéfices et minimisant tous les coûts, la sélection naturelle menant souvent à des solutions moins avantageuses mais en revanche beaucoup plus stables et donc efficaces sous une variété de conditions. La notion de compromis a donc un rôle crucial afin d'aboutir au meilleur agencement des bénéfices. A première vue, l'agrégation des larves de Diptères nécrophages peut sembler contre-intuitive, puisque l'on observe un véritable grouillement frénétique, caractéristique d'une perte d'énergie (*scramble competition*) [148], ainsi que tous les paramètres caractérisant le paradoxe du gréganisme dans les cas extrêmes [92], [334]. On s'aperçoit cependant que l'agrégation des larves permet, sous les contraintes propres à l'écosystème cadavérique, une optimisation de la *fitness* (ou du moins des traits d'histoire de vie) des individus [92]. Le gréganisme des larves de Diptères Calliphoridae semble donc être un compromis stable entre des bénéfices (exodigestion, *larval-mass effect*, etc.) et les contraintes émergeant de la vie en groupe [60]. L'agrégation permet en effet d'obtenir des bénéfices impossibles à atteindre individuellement et que l'optimisation thermique ne semble pas pouvoir compenser. Ce point est d'autant plus vrai en conditions hétérospécifiques où l'exodigestion sociale, mais peut-être également le contrôle local des populations bactériennes ou des seuils thermiques spécifiques, procure aux larves agrégées des bénéfices développementaux importants [100]. De plus, des paramètres de "qualité de développement" sont également favorisés. Ainsi, si la vitesse n'est pas nécessairement maximisée, les larves semblent favoriser un compromis incluant les différents paramètres physiologiques de croissance (taille, poids, durée de développement, survie, etc.).

Les espèces étudiées dans ce travail sont ubiquistes, largement répandues à travers le monde [17] et notamment en Europe en tant que colonisatrices des carcasses [335]. Ces espèces sont adaptées à l'écosystème extrême dans lequel elles évoluent, notamment grâce à une fécondité élevée, permettant de pallier la forte mortalité des stades pré-reproducteurs [104], un cycle de vie court, une croissance rapide, une maturité sexuelle précoce et une exploitation rapide de la ressource cadavérique [103]. Cette stratégie démographique, dite *de type r*, permet aux larves de s'affranchir d'une partie des contraintes propres à leur environnement. Néanmoins, bien qu'il existe de légères variations physiologiques selon les populations de ces espèces [43], [49], [73], les écosystèmes dans lesquels elles évoluent sont eux, extrêmement variables. En effet, la ressource cadavre diffère totalement en taille, poids et propriétés nutritives selon les espèces animales : se développer sur une

souris morte n'est pas identique à exploiter un cadavre d'éléphant [11], [62], [63]. De plus, les facteurs biotiques et abiotiques affectant le cadavre peuvent lourdement varier, que ce soit du fait de la zone géographique, où l'on observe un changement drastique des conditions climatiques, des populations de prédateurs [111] ou encore des parasites [331], ou du fait des variabilités interindividuelles comme les bactéries commensales [336].

Chez *Lucilia sericata*, on observe une adaptation extrême : la capacité d'ectoparasitisme. Cette espèce peut en effet se développer en tant que myiases sur les moutons d'élevage [337], notamment dans le nord de l'Europe et particulièrement au Royaume-Uni [331], probablement pour pallier certaines variabilités géographiques du climat. En effet, dans une étude en 2007, Martínez-Sánchez et collaborateurs observent que les larves de *L. sericata* sont plus compétitives dans le Nord, alors que dans le Sud, elles sont souvent prédatées par d'autres larves comme *Chrysomya albiceps* [46]. Dans une étude distincte réalisée en Afrique du Sud, Richards et ses collaborateurs décrivent *Lucilia sericata* comme étant peu adaptée au *larval-mass effect*, puisqu'elle a un seuil de température maximale aux alentours de 48 °C [111]. Les auteurs affirment donc qu'elle n'est pas assez performante par rapport aux autres espèces locales qui ont une température maximale plus élevée et postulent qu'elle aurait, pour cette raison, développé une nouvelle stratégie, l'ectoparasitisme (myiases). *Lucilia sericata* produit des myiases principalement en Angleterre et en Nouvelle-Zélande [338], [339]. Les contraintes environnementales, et notamment thermiques, ainsi que la plasticité comportementale de cette espèce permettraient d'expliquer ces deux résultats. En effet, dans le Nord de l'Europe, *Lucilia sericata* a probablement du mal à atteindre une température de 33 °C propice à son développement non seulement parce que cette température est rare d'un point de vue climatique dans ces régions, mais aussi du fait de la raréfaction des grandes carcasses permettant l'indépendance thermique via la socialité (*larval-mass effect*) [340]. Ainsi, *Lucilia sericata* aurait développé une stratégie d'ectoparasite, où les pressions climatiques ou de compétition interspécifique sont moins fortes [331]. Cependant, ces observations particulières chez *L. sericata* ne sont pas le lot des autres espèces nécrophages.

Les espèces étudiées dans nos travaux ont donc la capacité de supporter de grandes variabilités de facteurs écologiques. Sur les cadavres, leur comportement tant à favoriser un développement rapide et de bonne qualité. Ainsi, bien que ces larves soient mues par une perception locale, des capacités cognitives rudimentaires et des règles comportementales simples, leurs réponses collectives peuvent rapidement devenir complexes. Elles aboutissent cependant dans la majorité des cas à une *fitness* de qualité. Il est ainsi possible de considérer les masses larvaires comme de véritables super-organismes, où l'importance des individus s'efface devant celle du groupe. Les larves, en

constante interconnexion et communiquant localement, forment des structures autonomes permettant la survie du groupe dans un environnement hostile.

Conclusion

La connaissance des écosystèmes est un point majeur en écologie. Cependant, pour des raisons assez évidentes, l'écosystème cadavérique a été particulièrement négligé par les écologues. Bien que la présence d'une carcasse permette aux plus petits organismes, via l'action des décomposeurs, de bénéficier de cette ressource, la gestion des forêts et la limitation de la décomposition naturelle conduit à un appauvrissement des sols et une perte de biodiversité associée [56]. Cette mauvaise gestion des carcasses et le manque d'intérêt pour sa faune limite les connaissances taphonomiques et écologiques et porte atteinte aux écosystèmes. Mais lorsque surviennent des catastrophes environnementales, comme la récente augmentation de la nécromasse en Australie début 2019 (du fait de températures frôlant les 50 °C), la résilience des écosystèmes implique notamment la capacité de recyclage de ces ressources [341]. La nécessité du maintien des populations d'insectes nécrophages à même de recycler rapidement et efficacement une nécromasse abondante se rappelle alors à notre souvenir. Considérer le cadavre dans son ensemble, au sein de son écosystème mais aussi en tant qu'écosystème à part entière, nous permettra de mieux comprendre le rôle de ces travailleurs de la mort. Enfin, bien que ne permettant pas des applications directes, de telles connaissances constituent des fondements sur lesquels doivent s'appuyer les travaux en entomologie médico-légale.

Bibliographie

- [1] M. Leclercq and C. Verstraeten, "Eboueurs entomologiques bénévoles dans les écosystèmes terrestres.", *Notes fauniques de Gembloux*, vol. 25, pp. 17–23, 1992.
- [2] R. F. Chapman, *The Insects - Structure and Function*. 2013.
- [3] M. Chinery, J. Legrand, and H. Perrin, *Insectes de France et d'Europe occidentale*. Flammarion, 2012.
- [4] J. H. Byrd and J. L. Castner, *Forensic entomology : the utility of arthropods in legal investigations*. CRC Press, 2001.
- [5] J. H. Byrd and J. L. Castner, "Insects of Forensic Importance," pp. 63–150, Sep. 2009.
- [6] L. Davies, "Seasonal and spatial changes in blowfly production from small and large carcasses at Durham in lowland northeast England," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 13, no. 3, pp. 245–251, Sep. 1999.
- [7] D. Charabidze, V. Hedouin, and D. Gosset, "Que font les mouches en hiver ? Étude des variations hebdomadaires et saisonnières des populations d'insectes nécrophages," *La Rev. Médecine Légale*, vol. 3, no. 3, pp. 120–126, Sep. 2012.
- [8] C. S. Richards, I. D. Paterson, and M. H. Villet, "Estimating the age of immature *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae), correcting for temperature and geographical latitude," *Int. J. Legal Med.*, vol. 122, no. 4, pp. 271–279, Jul. 2008.
- [9] K. Moophayak *et al.*, "Species composition of carrion blow flies in Northern Thailand: altitude appraisal," *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, vol. 56, no. 2, pp. 179–182, Apr. 2014.
- [10] C. S. Richards, K. A. Williams, and M. H. Villet, "Predicting geographic distribution of seven forensically significant Blowfly species (Diptera: Calliphoridae) in South Africa," *African Entomol.*, vol. 17, no. 2, pp. 170–182, Sep. 2009.
- [11] V. Bernhardt, M. Bálint, M. A. Verhoff, and J. Amendt, "Species diversity and tissue specific dispersal of necrophagous Diptera on human bodies," *Forensic Sci. Med. Pathol.*, vol. 14, no. 1, pp. 76–84, 2018.
- [12] D. Martín-Vega, C. Martín Nieto, B. Cifrián, A. Baz, and L. M. Díaz-Aranda, "Early colonisation of urban indoor carcasses by blowflies (Diptera: Calliphoridae): An experimental study from central Spain," *Forensic Sci. Int.*, vol. 278, pp. 87–94, Sep.

- 2017.
- [13] S. Matuszewski, M. Szafałowicz, and A. Grzywacz, "Temperature-dependent appearance of forensically useful flies on carcasses," *Int. J. Legal Med.*, vol. 128, no. 6, pp. 1013–1020, Nov. 2014.
- [14] L. Davies and G. G. Ratcliffe, "Development rates of some pre-adult stages in blowflies with reference to low temperatures," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 8, no. 3, pp. 245–254, Jul. 1994.
- [15] J. Faucherre, D. Cherix, and C. Wyss, "Behavior of *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae) Under Extreme Conditions," *J. Insect Behav.*, vol. 12, no. 5, pp. 687–690, 1999.
- [16] C. J. Cederholm, M. D. Kunze, T. Murota, and A. Sibatani, "Pacific salmon carcasses: essential contributions of nutrients and energy for aquatic and terrestrial ecosystems" *Fish. Mag.*, vol. 24, no. 10, pp. 6–15, 2011.
- [17] R. Wall, "The reproductive output of the blowfly *Lucilia sericata*," *J. Insect Physiol.*, vol. 39, no. 9, pp. 743–750, Sep. 1993.
- [18] G. S. Anderson and S. L. VanLaerhoven, "Initial studies on insect succession on carrion in southwestern British Columbia," *J. Forensic Sci.*, vol. 41, no. 4, Jul. 1996.
- [19] L. E. Braack, "Visitation patterns of principal species of the insect-complex at carcasses in the Kruger National Park," *Koedoe*, vol. 24, no. 1, pp. 33–49, Jan. 1981.
- [20] J. R. Ashworth and R. Wall, "Responses of the sheep blowflies *Lucilia sericata* and *L. cuprina* to odour and the development of semiochemical baits," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 8, no. 4, pp. 303–309, Oct. 1994.
- [21] C. da S. Ribeiro and C. J. Von Zuben, "Nutritional ecology of blowflies (Diptera, Calliphoridae): estimates of critical larval weight for pupation on two different," *Rev. Bras. Entomol.*, vol. 54, no. 4, pp. 661–664, 2010.
- [22] V. Bernhardt, C. Schomerus, M. A. Verhoff, and J. Amendt, "Of pigs and men—comparing the development of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) on human and porcine tissue," *Int. J. Legal Med.*, vol. 131, no. 3, pp. 847–853, May 2017.
- [23] M. Clark, M. Worrell, and J. Pless, "Postmortem changes in soft tissues" in *Forensic taphonomy, the postmortem fate of human remains*, CRC Press, W. H. & M. Sorg, Ed. Boca Raton, FL, USA., 1997, pp. 151–160.
- [24] I.-W. Chu-Wang and R. C. Axtell, "Fine structure of the terminal organ of the house fly

- larva, *Musca domestica* L.," *Zeitschrift Zellforsch. und mikroskopische Anat.*, vol. 127, no. 3, pp. 287–305, 1972.
- [25] M. Cobb, "What and how do maggots smell?," *Biol. Rev.*, vol. 74, no. 4, pp. 425–459, 1999.
- [26] J. Dekeirsschieter *et al.*, "Cadaveric volatile organic compounds released by decaying pig carcasses (*Sus domesticus* L.) in different biotopes," *Forensic Sci. Int.*, vol. 189, no. 1–3, pp. 46–53, 2009.
- [27] C. Aubernon, J. Boulay, and D. Charabidzé, "Comportement et développement des larves nécrophages," in *Insectes cadavres et scènes de crime*, De Boeck., D. Charabidzé and M. Gosselin, Eds. 2014, p. 90.
- [28] M. Grassberger and C. Reiter, "Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram," *Forensic Sci. Int.*, vol. 120, no. 1–2, pp. 32–36, Aug. 2001.
- [29] D. Charabidze, G. Morvan, D. Dupont, D. Gosset, and B. Bourel, "ForenSeek: un programme de simulation du développement des insectes nécrophages dédié à l'entomologie médico-légale," *Ann. soc. entomol. Fr.*, vol. 44, no. 3, pp. 385–392, 2008.
- [30] M. Bergeret, "Infanticide, momification naturelle du cadavre.," *Ann. Hyg. Publique Med. Leg*, vol. 4, pp. 442–452, 1855.
- [31] M. Benecke, "A brief history of forensic entomology.," *Forensic Sci. Int.*, vol. 120, no. 1–2, pp. 2–14, Aug. 2001.
- [32] D. Charabidzé, M. Gosselin, and J.-P. Beauthier, *Insectes, cadavres et scènes de crime principes et applications de l'entomologie médico-légale*. De Boeck, 2014.
- [33] C. Frederickx, J. Dekeirsschieter, F. Verheggen, and E. Haubruge, *L'entomologie forensique, les insectes résolvent les crimes*, vol. 63, no. 4. Presses Agronomiques de Gembloux, 2011.
- [34] J.-P. Michaud, G. Moreau, and K. G. Schoenly, "Reply: on throwing out the baby with the bathwater: A reply to Wells," *J. Med. Entomol.*, vol. 51, no. 3, pp. 494–495, May 2014.
- [35] J.-P. Michaud and G. Moreau, "Effect of variable rates of daily sampling of fly Larvae on decomposition and carrion insect community assembly: Implications for forensic entomology field study protocols," *J. Med. Entomol.*, vol. 50, no. 4, pp. 890–897, Jul. 2013.

- [36] C. Aubernon, C. Devigne, V. Hedouin, D. Gosset, and D. Charabidze, "In vitro effects of household products on Calliphoridae larvae development: Implication for forensic entomology," *J. Forensic Sci.*, vol. 60, no. 1, 2015.
- [37] C. Aubernon, D. Charabidzé, C. Devigne, Y. Delannoy, and D. Gosset, "Experimental study of *Lucilia sericata* (Diptera Calliphoridae) larval development on rat cadavers: Effects of climate and chemical contamination," *Forensic Sci. Int.*, vol. 253, 2015.
- [38] M. E. Benbow, J. K. Tomberlin, and A. M. Tarone, *Carrion ecology, evolution, and their applications*. .
- [39] G. S. Anderson, "Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera)," *J. Forensic Sci.*, vol. 45, no. 4, p. 14778J, Jul. 2000.
- [40] B. Greenberg, "Flies as forensic indicators," *J. Med. Entomol.*, vol. 28, no. 5, pp. 565–577, Sep. 1991.
- [41] A. S. Kamal, "Comparative study of thirteen species of Sarcosaprophagous Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera)1 I. Bionomics," *Ann. Entomol. Soc. Am.*, vol. 51, no. 3, pp. 261–271, May 1958.
- [42] M. I. Marchenko, "Medicolegal relevance of cadaver entomofauna for the determination of the time of death," *Forensic Sci. Int.*, vol. 120, no. 1–2, pp. 89–109, 2001.
- [43] A. M. Tarone and D. R. Foran, "Components of developmental plasticity in a Michigan opulation of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae)," *J. Med. Entomol.*, vol. 43, no. 5, pp. 1023–1033, Sep. 2006.
- [44] G. C. Ulyyett, "Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 234, no. 610, pp. 77–174, Mar. 1950.
- [45] S. J. Moe, N. C. Stenseth, and R. H. Smith, "Density-dependent compensation in blowfly population give indirectly positive effects of a toxicant," *Ecology*, vol. 83, no. 6, pp. 1597–1603, Jun. 2002.
- [46] A. Martínez-Sánchez, K. E. Smith, S. Rojo, M. A. Marcos-García, and R. Wall, "Geographic origin affects larval competitive ability in European populations of the blow fly, *Lucilia sericata*," *Entomol. Exp. Appl.*, vol. 122, no. 2, pp. 93–98, Feb. 2007.
- [47] Q. Scanvion, V. Hédouin, and D. Charabidzé, "Collective exodigestion favours blow fly colonization and development on fresh carcasses," *Anim. Behav.*, vol. 141, pp. 221–232,

- Jul. 2018.
- [48] L. Komo, Q. Scavion, V. Hédouin, and D. Charabidzé, "Facing death together: heterospecific aggregations of blowfly larvae evince mutual benefits," *Behav. Ecol.*, vol. 30, no. 4, pp. 1113-1122, 2019.
- [49] M. B. Gallagher, S. Sandhu, and R. Kimsey, "Variation in developmental time for geographically distinct populations of the common green bottle fly, *Lucilia sericata* (Meigen)," *J. Forensic Sci.*, vol. 55, no. 2, pp. 438-442, Mar. 2010.
- [50] K. Verma and R. Paul, "*Lucilia sericata* (Meigen) and *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) Development rate and its implications for forensic entomology," *J. Forensic Sci. Med.*, vol. 2, no. 3, p. 146, 2016.
- [51] A. Roe and L. G. Higley, "Development modeling of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae)," *PeerJ*, vol. 3, p. e803, Mar. 2015.
- [52] W. Pruna, P. Guarderas, D. A. Donoso, and Á. Barragán, "Life cycle of *Lucilia sericata* (Meigen 1826) collected from Andean mountains," *Neotrop. Biodivers.*, vol. 5, no. 1, pp. 3-9, Jan. 2019.
- [53] S. Niederegger, J. Pastuschek, and G. Mall, "Preliminary studies of the influence of fluctuating temperatures on the development of various forensically relevant flies," *Forensic Sci. Int.*, vol. 199, no. 1-3, pp. 72-78, Jun. 2010.
- [54] L. Cervantès, L. Dourel, E. Gaudry, T. Pasquerault, and B. Vincent, "Effect of low temperature in the development cycle of *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera, Calliphoridae): implications for the minimum postmortem interval estimation," *Forensic Sci. Res.*, vol. 3, no. 1, pp. 52-59, Jan. 2018.
- [55] P. A. Magni, S. S. Dhaliwal, and I. R. Dadour, "Effect of continuous and cyclic exposure to a cold environment on the development of larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) in different sized larval masses," *J. Med. Entomol.*, vol. 53, no. 4, pp. 1-8, 2016.
- [56] P. S. Barton, "The role of carrion in ecosystems," in *Carrion ecology, evolution and their application*, 2016, pp. 273-286.
- [57] T. L. DeVault, I. L. Brisbin, Jr., and O. E. Rhodes, Jr., "Factors influencing the acquisition of rodent carrion by vertebrate scavengers and decomposers," *Can. J. Zool.*, vol. 82, no. 3, pp. 502-509, Mar. 2004.
- [58] J. C. Moore *et al.*, "Detritus, trophic dynamics and biodiversity," *Ecol. Lett.*, vol. 7, no. 7,

- pp. 584–600, Jun. 2004.
- [59] G. L. Greene, “Rearing techniques for *Creophilus maxillosus* (Coleoptera: Staphylinidae), a predator of fly larvae in cattle feedlots,” *J. Econ. Entomol.*, vol. 89, no. 4, pp. 848–851, Aug. 1996.
- [60] D. B. Rivers, C. Thompson, and R. Brogan, “Physiological trade-offs of forming maggot masses by necrophagous flies on vertebrate carrion,” *Bull. Entomol. Res.*, vol. 101, no. 5, pp. 599–611, Oct. 2011.
- [61] J. Amendt, M. L. Goff, C. P. Campobasso, and M. Grassberger, Eds., *Current concepts in forensic entomology*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010.
- [62] C. Pietro Campobasso, G. Di Vella, and F. Introna, “Factors affecting decomposition and Diptera colonization,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 120, no. 1–2, pp. 18–27, Aug. 2001.
- [63] D. O. Carter, D. Yellowlees, and M. Tibbett, “Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems,” *Naturwissenschaften*, vol. 94, no. 1, pp. 12–24, Dec. 2006.
- [64] T. L. Eberhardt and D. A. Elliot, “A preliminary investigation of insect colonisation and succession on remains in New Zealand,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 176, no. 2–3, pp. 217–223, Apr. 2008.
- [65] E. P. Meehan, Seminet-Reneau, E. E., and T. P. Quinn, “Bear predation on pacific salmon facilitates colonization of carcasses by fly maggots,” *Am. Midl. Nat.*, vol. 153, no. 1, pp. 142–151, Jan. 2005.
- [66] T. Simmons, R. E. Adlam, and C. Moffatt, “Debugging decomposition Data: comparative taphonomic studies and the influence of insects and carcass size on decomposition rate,” *J. Forensic Sci.*, vol. 55, no. 1, pp. 8–13, Jan. 2010.
- [67] J. Meyer, B. Anderson, and D. O. Carter, “Seasonal variation of carcass decomposition and gravesoil chemistry in a cold (Dfa) climate,” *J. Forensic Sci.*, vol. 58, no. 5, pp. 1175–1182, Sep. 2013.
- [68] H. Al-Mesbah, C. Moffatt, O. M. E. El-Azazy, and Q. A. H. Majeed, “The decomposition of rabbit carcasses and associated necrophagous Diptera in Kuwait,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 217, no. 1–3, pp. 27–31, Apr. 2012.
- [69] W. Lord, “The ecology of carrion communities in maritim-terrestrial habitats: an insular study of guul, seal and rodent decomposition on the isles of shoals (New Hampshire),” *Dr. Diss.*, Jan. 1982.
- [70] J. Podhorna, C. Aubernon, M. Borkovcova, J. Boulay, V. Hedouin, and D. Charabidze, “To

- eat or get heat: Behavioral trade-offs between thermoregulation and feeding in gregarious necrophagous larvae," *Insect Sci.*, vol. 25, no. 5, pp. 883–893, Jul. 2017.
- [71] F. Tuccia, E. Zurgani, S. Bortolini, and S. Vanin, "Experimental evaluation on the applicability of necrobiome analysis in forensic veterinary science," *Microbiologyopen*, p. e828, Mar. 2019.
- [72] K. Louadi, "Development of *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoid) (Diptera: Calliphoridae) under different biotic and abiotic conditions Entomobiogeography View project Hymenopteres apoidea cleptoparasites View project," *J. Entomol. Zool. Stud.*, vol. 683, no. 51, pp. 683–691, 2017.
- [73] A. M. Tarone, C. J. Picard, C. Spiegelman, and D. R. Foran, "Population and temperature effects on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) body size and minimum development time," *J. Med. Entomol.*, vol. 48, no. 5, pp. 1062–1068, Sep. 2011.
- [74] B. J. Sharanowski, E. G. Walker, and G. S. Anderson, "Insect succession and decomposition patterns on shaded and sunlit carrion in Saskatchewan in three different seasons," *Forensic Sci. Int.*, vol. 179, no. 2–3, pp. 219–240, Aug. 2008.
- [75] J. E. Joy, M. L. Herrell, and P. C. Rogers, "Larval fly activity on sunlit versus shaded raccoon carrion in southwestern West Virginia with special reference to the black blowfly (Diptera: Calliphoridae)," *J. Med. Entomol.*, vol. 39, no. 2, pp. 392–397, Mar. 2002.
- [76] M. S. Archer, "Rainfall and temperature effects on the decomposition rate of exposed neonatal remains," *Sci. Justice*, vol. 44, no. 1, pp. 35–41, Jan. 2004.
- [77] R. C. Janaway, S. L. Percival, and A. S. Wilson, "Decomposition of human remains," in *Microbiology and Aging*, Totowa, NJ: Humana Press, 2009, pp. 313–334.
- [78] M. Laparie, P. Vernon, Y. Cozic, Y. Frenot, D. Renault, and V. Debat, "Wing morphology of the active flyer *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) during its invasion of a sub-Antarctic archipelago where insect flightlessness is the rule," *Biol. J. Linn. Soc.*, vol. 119, no. 1, pp. 179–193, Sep. 2016.
- [79] B. B. Dent, S. L. Forbes, and B. H. Stuart, "Review of human decomposition processes in soil," *Environ. Geol.*, vol. 45, no. 4, pp. 576–585, Feb. 2004.
- [80] S. R. Bucheli, Z. Pan, C. L. Glennie, A. M. Lynne, D. P. Haarman, and J. M. Hill, "Terrestrial laser scanning to model sunlight irradiance on cadavers under conditions of natural decomposition," *Int. J. Legal Med.*, vol. 128, no. 4, pp. 725–732, Jul. 2014.

- [81] R. F. Denno and W. R. Cothran, "Competitive interactions and ecological strategies of Sarcophagid and Calliphorid flies inhabiting rabbit carrion," *Ann. Entomol. Soc. Am.*, vol. 69, no. 1, pp. 109–113, Jan. 1976.
- [82] J. K. Tomberlin *et al.*, "Interkingdom responses of flies to bacteria mediated by fly physiology and bacterial quorum sensing," *Anim. Behav.*, vol. 84, no. 6, pp. 1449–1456, Dec. 2012.
- [83] A. Ahmad, A. Broce, and L. Zurek, "Evaluation of significance of bacteria in larval development of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae)," *J. Med. Entomol.*, vol. 43, no. 6, pp. 1129–1133, Nov. 2006.
- [84] K. M. Barnes, D. E. Gennard, and R. A. Dixon, "An assessment of the antibacterial activity in larval excretion/secretion of four species of insects recorded in association with corpses, using *Lucilia sericata* Meigen as the marker species," *Bull. Entomol. Res.*, vol. 100, no. 06, pp. 635–640, Dec. 2010.
- [85] J. K. Tomberlin *et al.*, "A Review of bacterial interactions with blow flies (Diptera: Calliphoridae) of medical, veterinary, and forensic importance," *Ann. Entomol. Soc. Am.*, vol. 110, no. 1, pp. 19–36, Jan. 2017.
- [86] J. M. Jay and K. S. Kontou, "Fate of free amino acids and nucleotides in spoiling beef," *Appl. Microbiol.*, vol. 15, no. 4, pp. 759–64, Jul. 1967.
- [87] S.-F. Shiao and T.-C. Yeh, "Larval Competition of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae): Behavior and ecological studies of two blow fly species of forensic significance," *J. Med. Entomol.*, vol. 45, no. 4, pp. 785–799, Jul. 2008.
- [88] C. E. Abbott, "The development and general biology of *Creophilus villosus* Grav.," *Journal of the New York Entomological Society*, vol. 46. New York Entomological Society, pp. 49–53, 1938.
- [89] C. P. Campobasso, D. Marchetti, F. Introna, and M. F. Colonna, "Postmortem artifacts made by ants and the effect of ant activity on decompositional rates," *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, vol. 30, no. 1, pp. 84–87, Mar. 2009.
- [90] C. S. Richards and M. H. Villet, "Factors affecting accuracy and precision of thermal summation models of insect development used to estimate post-mortem intervals," *Int. J. Legal Med.*, vol. 122, no. 5, pp. 401–408, Sep. 2008.
- [91] T. L. Martin and R. B. Huey, "Why 'suboptima' is optimal: Jensen's inequality and

- ectotherm thermal preferences.," *Am. Nat.*, vol. 171, no. 3, pp. E102-18, Mar. 2008.
- [92] E. Danchin, L.-A. Giraldeau, and F. Cézilly, *Écologie comportementale*. Sciences Sup, 2005.
- [93] J. R. Krebs and N. B. Davies, *An introduction to behavioural ecology*. Blackwell Scientific Publications, 1993.
- [94] M. Lihoreau, "Organisation et fonctionnement des groupes sociaux chez une blatte grégaire : un autre modèle de société d'insectes," Université de Rennes, 2009.
- [95] C. Devigne, P. Broly, and J.-L. Deneubourg, "Individual preferences and social interactions determine the aggregation of woodlice," *PLoS One*, vol. 6, no. 2, p. e17389, Feb. 2011.
- [96] A. Dussutour, S. J. Simpson, E. Despland, and N. Colasurdo, "When the group denies individual nutritional wisdom," *Anim. Behav.*, vol. 74, no. 4, pp. 931–939, Oct. 2007.
- [97] S. T. Trumbo, "Reproductive benefits and the duration of paternal care in a biparental burying beetle, *Necrophorus orbicollis*," *Behaviour*, vol. 117. Brill, pp. 82–105.
- [98] J. Boulay, C. Devigne, D. Gosset, and D. Charabidze, "Evidence of active aggregation behaviour in *Lucilia sericata* larvae and possible implication of a conspecific mark," *Anim. Behav.*, vol. 85, no. 6, pp. 1191–1197, Jun. 2013.
- [99] J. Boulay, J.-L. Deneubourg, V. Hédouin, and D. Charabidzé, "Interspecific shared collective decision-making in two forensically important species," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 283(1824), no. 20152676, 2016.
- [100] Q. Fouche, V. Hedouin, and D. Charabidze, "Communication in necrophagous Diptera larvae: interspecific effect of cues left behind by maggots and implications in their aggregation," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 2844, Dec. 2018.
- [101] B. S. Brodie, W. H. L. Wong, S. VanLaerhoven, and G. Gries, "Is aggregated oviposition by the blow flies *Lucilia sericata* and *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae) really pheromone-mediated?," *Insect Sci.*, vol. 22, no. 5, pp. 651–660, Oct. 2015.
- [102] H. Ody, M. T. Bulling, and K. M. Barnes, "Effects of environmental temperature on oviposition behavior in three blow fly species of forensic importance," *Forensic Sci. Int.*, vol. 275, pp. 138–143, Jun. 2017.
- [103] E. R. Pianka, "On r- and K-Selection," *Am. Nat.*, vol. 104, no. 940, pp. 592–597, Nov. 1970.
- [104] R. H. MacArthur and E. o Wilson, *The theory of Island biogeography*, Princeton.

- New Jersey, 1967.
- [105] J. P. Grime, "Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory," *Am. Nat.*, vol. 111, no. 982, pp. 1169–1194, Nov. 1977.
- [106] F. Slansky, J. G. Rodriguez, and 1920-, *Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates*. Wiley, 1987.
- [107] G. Le Masne, "Classification et caractéristiques des principaux types de groupements sociaux réalisés chez les invertébrés," *Struct. Physiol. des Soc. Anim. 34th Coll. Int. CNRS 34 Paris*, 1952.
- [108] J. T. Costa, *The other insect societies*. Belknap Press of Harvard University Press, 2006.
- [109] A. J. Lewis and M. E. Benbow, "When entomological evidence crawls away: *Phormia regina* en masse larval dispersal," *J. Med. Entomol.*, vol. 48, no. 6, pp. 1112–1119, Nov. 2011.
- [110] J. Boulay, "Étude du comportement d'agrégation des larves nécrophages de Diptères : de l'individuel au collectif," Université de Lille, 2015.
- [111] C. S. Richards, B. W. Price, and M. H. Villet, "Thermal ecophysiology of seven carrion-feeding blowflies in Southern Africa," *Entomol. Exp. Appl.*, vol. 131, no. 1, pp. 11–19, Apr. 2009.
- [112] A. Ahmad and B. Omar, "Effect of carcass model on maggot distribution and thermal generation of two forensically important blowfly species, *Chrysomya megacephala* (Fabricius) and *Chrysomya rufifacies* (Macquart)," *Egypt. J. Forensic Sci.*, vol. 8, no. 1, p. 64, Dec. 2018.
- [113] A. P. Johnson, S. J. Wighton, and J. F. Wallman, "Tracking movement and temperature selection of larvae of two forensically important blow fly species within a 'maggot mass,'" *J. Forensic Sci.*, vol. 59, no. 6, pp. 1586–1591, Nov. 2014.
- [114] J. Boulay, C. Betremieux, V. Hédouin, and D. Charabidzé, "A first insight into the scanning behaviour of the presocial blow fly larvae," *Physiol. Entomol.*, vol. 40, no. 4, pp. 317–324, Dec. 2015.
- [115] G. Fraenkel and D. Gunn, *The orientation of animals, kineses, taxes and compass reactions*, [New ed.]. New York: Dover Publications, 1961.
- [116] D. F. Miller, "Determining the effects of change in temperature upon the locomotor movements of fly larvae," *J. Exp. Zool.*, vol. 52, no. 2, pp. 293–313, Jan. 1929.

- [117] D. Charabidze, B. Bourel, H. Leblanc, V. Hedouin, and D. Gosset, "Effect of body length and temperature on the crawling speed of larvae (Robineau-Desvoidy) (Diptera Calliphoridae)," *J. Insect Physiol.*, vol. 54, no. 3, pp. 529–533, Mar. 2008.
- [118] E. Bonabeau, G. Theraulaz, J.-L. Deneubourg, S. Aron, and S. Camazine, "Self-organization in social insects," *Trends Ecol. Evol.*, vol. 12, no. 5, pp. 188–193, May 1997.
- [119] E. O. Wilson and B. Hölldobler, "Dense heterarchies and mass communication as the basis of organization in ant colonies," *Trends Ecol. Evol.*, vol. 3, no. 3, pp. 65–68, Mar. 1988.
- [120] C. K. Cornwallis, C. A. Botero, D. R. Rubenstein, P. A. Downing, S. A. West, and A. S. Griffin, "Cooperation facilitates the colonization of harsh environments," *Nat. Ecol. Evol.*, vol. 1, no. 3, p. 0057, Feb. 2017.
- [121] M. Dombrowski *et al.*, "Cooperative behavior emerges among *Drosophila* Larvae," *Curr. Biol.*, vol. 27, no. 18, pp. 2821–2826.e2, Sep. 2017.
- [122] F. Courchamp, L. Berec, and J. Gascoigne, *Allee effects in ecology and conservation*. Oxford University Press, 2008.
- [123] L. Chambers *et al.*, "Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds," *Br. J. Dermatol.*, vol. 148, no. 1, pp. 14–23, Jan. 2003.
- [124] V. Heaton, C. Moffatt, and T. Simmons, "Quantifying the temperature of maggot masses and its relationship to decomposition," *J. Forensic Sci.*, vol. 59, no. 3, pp. 676–682, May 2014.
- [125] D. Charabidze, B. Bourel, and D. Gosset, "Larval-mass effect: Characterisation of heat emission by necrophagous blowflies (Diptera: Calliphoridae) larval aggregates," *Forensic Sci. Int.*, vol. 211, no. 1–3, pp. 61–66, Sep. 2011.
- [126] D. H. Slone and S. V. Gruner, "Thermoregulation in larval aggregations of carrion-feeding blow flies (Diptera: Calliphoridae)," *J. Med. Entomol.*, vol. 44, no. 3, pp. 516–523, May 2007.
- [127] Z. Erzinçlioğlu, *Blowflies*. Richmond Publishing Co. Ltd, 1996.
- [128] S. Chown and S. W. Nicolson, *Insect physiological ecology : mechanisms and patterns*. Oxford University Press, 2004.
- [129] D. J. Lactin and D. L. Johnson, "Temperature-dependent feeding rates of *Melanoplus sanguinipes* nymphs (Orthoptera: Acrididae) laboratory trials," *Environ. Entomol.*, vol.

- 24, no. 5, pp. 1291–1296, Oct. 1995.
- [130] J. E. Heath, J. L. Hanegan, P. J. Wilkin, and M. S. Heath, "Adaptation of the thermal responses of insects," *Am. Zool.*, vol. 11, no. 1, pp. 147–158, Feb. 1971.
- [131] K. R. Zamudio, R. B. Huey, and W. D. Crill, "Bigger isn't always better: body size, developmental and parental temperature and male territorial success in *Drosophila melanogaster*," *Anim Behav. Febr. March*, vol. 49, pp. 671–677, 1995.
- [132] N. R. Andrew, R. A. Hart, M.-P. Jung, Z. Hemmings, and J. S. Terblanche, "Can temperate insects take the heat? A case study of the physiological and behavioural responses in a common ant, *Iridomyrmex purpureus* (Formicidae), with potential climate change," *J. Insect Physiol.*, vol. 59, no. 9, pp. 870–880, Sep. 2013.
- [133] C. Pappas, D. Hyde, K. Bowler, V. Loeschcke, and J. G. Sørensen, "Post-eclosion decline in 'knock-down' thermal resistance and reduced effect of heat hardening in *Drosophila melanogaster*," *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, vol. 146, no. 3, pp. 355–359, Mar. 2007.
- [134] H. Padmanabha, B. Bolker, C. C. Lord, C. Rubio, and L. P. Lounibos, "Food availability alters the effects of larval temperature on *Aedes aegypti* growth," *J. Med. Entomol.*, vol. 48, no. 5, pp. 974–984, Sep. 2011.
- [135] M. L. May, "Insect thermoregulation," *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 24, no. 1, pp. 313–349, Jan. 1979.
- [136] J. Bligh and K. G. Johnson, "Glossary of terms for thermal physiology," *J. Appl. Physiol.*, vol. 35, no. 6, pp. 941–61, Dec. 1973.
- [137] M. E. Dillon, G. Wang, P. A. Garrity, and R. B. Huey, "Thermal preference in *Drosophila*," *J. Therm. Biol.*, vol. 34, no. 3, pp. 109–119, Apr. 2009.
- [138] H. Schmitz and L. T. Wasserthal, "Antennal thermoreceptors and wing-thermosensitivity of heliotherm butterflies: Their possible role in thermoregulatory behavior," *J. Insect Physiol.*, vol. 39, no. 12, pp. 1007–1019, Dec. 1993.
- [139] J. L. Cloudsley-Thompson, "Hot blood or cold? Thermoregulation in terrestrial poikilotherms," *Science Progress (1933-)*, vol. 56. Science Reviews 2000 Ltd., pp. 499–509, 1968.
- [140] C. Reiter, "Growth behavior of the blue blowfly *Calliphora vicina* maggots," *Z. Rechtsmed.*, vol. 91, no. 4, pp. 295–308, 1984.
- [141] M. H. Villet, C. S. Richards, and J. M. Midgley, "Contemporary precision, bias and

- accuracy of minimum Post-Mortem Intervals estimated using development of carrion-feeding insects,” in *current concepts in forensic entomology*, Dordrecht: Springer Netherlands, 2009, pp. 109–137.
- [142] D. Dent, “Quantifying insect populations : estimates and parameters,” *Methods Ecol. Agric. Entomol.*, 1999.
- [143] C. Ames and B. Turner, “Low temperature episodes in development of blowflies: implications for postmortem interval estimation,” *Med. Vet. Entomol.*, vol. 17, no. 2, pp. 178–186, Jun. 2003.
- [144] J. A. Payne, “A Summer Carrion Study of the Baby Pig *Sus Scrofa* Linnaeus,” *Ecology*, vol. 46, no. 5, pp. 592–602, Sep. 1965.
- [145] D. Charabidzé, “ForenSeek.” [Online]. Available: <https://www.forenseek.org/general-terms-and-conditions-of-use/>. [Accessed: 11-Mar-2019].
- [146] B. Greenberg, “Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and a Muscid (Diptera),” *Ann. Entomol. Soc. Am.*, vol. 83, no. 6, pp. 1210–1214, Nov. 1990.
- [147] B. Greenberg and T. I. Tantawi, “Different developmental strategies in two boreal blow flies (Diptera: Calliphoridae),” *J. Med. Entomol.*, vol. 30, no. 2, pp. 481–484, Mar. 1993.
- [148] D. Charabidze, V. Hedouin, and D. Gosset, “Discontinuous foraging behavior of necrophagous *Lucilia sericata* (Meigen 1826) (Diptera Calliphoridae) larvae,” *J. Insect Physiol.*, vol. 59, no. 3, pp. 325–331, Mar. 2013.
- [149] E. E. Bice and J. E. Beuk, “The effects of heat upon the nutritive value of protein,” *Adv. Food Res.*, vol. 4, pp. 233–279, Jan. 1953.
- [150] S. Ireland and B. Turner, “The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, *Calliphora vomitoria*,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 159, no. 2–3, pp. 175–181, Jun. 2006.
- [151] S. E. Donovan, M. J. R. Hall, B. D. Turner, and C. B. Moncrieff, “Larval growth rates of the blowfly, *Calliphora vicina*, over a range of temperatures,” *Med. Vet. Entomol.*, vol. 20, no. 1, pp. 106–114, Mar. 2006.
- [152] M. Lebouvier *et al.*, “The significance of the sub-Antarctic Kerguelen Islands for the assessment of the vulnerability of native communities to climate change, alien insect invasions and plant viruses,” *Biol. Invasions*, vol. 13, no. 5, pp. 1195–1208, May 2011.
- [153] D. S. Saunders and S. A. L. Hayward, “Geographical and diapause-related cold tolerance in the blow fly, *Calliphora vicina*,” *J. Insect Physiol.*, vol. 44, no. 7–8, pp. 541–551, Jul.

- 1998.
- [154] M. H. Sorg, W. D. Haglund, and W. D. Haglund, *Forensic Taphonomy*. CRC Press, 1996.
- [155] H. Williams and A. M. M. Richardson, "Growth energetics in relation to temperature for larvae of four species of necrophagous flies (Diptera: Calliphoridae)," *Austral Ecol.*, vol. 9, no. 2, pp. 141–152, Jun. 1984.
- [156] D. Rivers, "Heat production by necrophagous fly larvae: implications for forensic entomology," *Ann. Forensic Res. Anal.*, vol. 2, no. 1, pp. 10–13, 2015.
- [157] J. K. Parrish and L. Edelstein-Keshet, "Complexity, pattern, and evolutionary trade-offs in animal aggregation.," *Science*, vol. 284, no. 5411, pp. 99–101, Apr. 1999.
- [158] J. Boulay, C. Aubernon, G. D. Ruxton, V. Hédouin, J.-L. Deneubourg, and D. Charabidzé, "Mixed-species aggregations in arthropods," *Insect Sci.*, vol. 26, no. 1, pp. 2–19, Feb. 2019.
- [159] C. Rivault, A. Cloarec, and L. Sreng, "Cuticular extracts inducing aggregation in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.)," *J. Insect Physiol.*, vol. 44, no. 10, pp. 909–918, Oct. 1998.
- [160] D. J. T. Sumpter, "The principles of collective animal behaviour," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 361, no. 1465, pp. 5–22, Jan. 2006.
- [161] T. C. Oliveira and S. D. Vasconcelos, "Insects (Diptera) associated with cadavers at the Institute of Legal Medicine in Pernambuco, Brazil: Implications for forensic entomology," *Forensic Sci. Int.*, vol. 198, no. 1–3, pp. 97–102, May 2010.
- [162] J. Amendt, C. S. Richards, C. P. Campobasso, R. Zehner, and M. J. R. Hall, "Forensic entomology: applications and limitations," *Forensic Sci. Med. Pathol.*, vol. 7, no. 4, pp. 379–392, Dec. 2011.
- [163] A. P. Johnson and J. F. Wallman, "Effect of massing on larval growth rate," *Forensic Sci. Int.*, vol. 241, pp. 141–149, Aug. 2014.
- [164] A. P. Johnson, K. M. Mikac, and J. F. Wallman, "Thermogenesis in decomposing carcasses," *Forensic Sci. Int.*, vol. 231, no. 1–3, pp. 271–277, Sep. 2013.
- [165] C. M. Bogert, "Thermoregulation in reptiles, a factor in evolution," *Evolution (N. Y.)*, vol. 3, no. 3, pp. 195–211, Sep. 1949.
- [166] R. D. Stevenson, "The relative importance of behavioral and physiological adjustments controlling body temperature in terrestrial ectotherms," *Am. Nat.*, vol. 126, no. 3, pp. 362–386, Sep. 1985.

- [167] C. Aubernon, J. Boulay, V. Hédouin, and D. Charabidzé, "Thermoregulation in gregarious dipteran larvae: evidence of species-specific temperature selection," *Entomol. Exp. Appl.*, vol. 160, no. 2, pp. 101–108, Aug. 2016.
- [168] S. T. Trumbo, "Carcass age and reproductive costs for *Nicrophorus orbicollis* (Coleoptera: Silphidae)," *Environ. Entomol.*, vol. 45, no. 5, pp. 1178–1183, Oct. 2016.
- [169] R. Denno and B. Benrey, "Aggregation facilitates larval growth in the neotropical nymphalid butterfly *Chlosyne janais*," *Ecol. Entomol.*, vol. 22, no. 2, pp. 133–141, May 1997.
- [170] L. Davies, "Laboratory studies on the egg of the blowfly *Lucilia Sericata* (MG.)," *J. Exp. Biol.*, vol. 25, no. 1, 1948.
- [171] K. Mellanby, "Low temperature and insect activity," *Proc. R. Soc. London. Ser. B - Biol. Sci.*, vol. 127, no. 849, pp. 473–487, Oct. 1939.
- [172] S. Nylin and K. Gotthard, "Plasticity in life-history traits," *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 43, no. 1, pp. 63–83, Jan. 1998.
- [173] P. Blums, J. D. Nichols, J. E. Hines, M. S. Lindberg, and A. Mednis, "Individual quality, survival variation and patterns of phenotypic selection on body condition and timing of nesting in birds," *Oecologia*, vol. 143, no. 3, pp. 365–376, Apr. 2005.
- [174] A. J. Wilson and D. H. Nussey, "What is individual quality? An evolutionary perspective," *Trends Ecol. Evol.*, vol. 25, no. 4, pp. 207–214, Apr. 2010.
- [175] M. Rohlf and T. S. Hoffmeister, "Spatial aggregation across ephemeral resource patches in insect communities: an adaptive response to natural enemies?," *Oecologia*, vol. 140, no. 4, pp. 654–661, Aug. 2004.
- [176] J. E. Rawlins and R. C. Lederhouse, "Developmental influences of thermal behavior on monarch caterpillars (*Danaus plexippus*): an adaptation for migration (Lepidoptera: Nymphalidae: Danainae)," *Journal of the Kansas Entomological Society*, vol. 54. Kansas (Central States) Entomological Society, pp. 387–408.
- [177] C. C. Nice and J. A. Fordyce, "How caterpillars avoid overheating: behavioral and phenotypic plasticity of pipevine swallowtail larvae," *Oecologia*, vol. 146, no. 4, pp. 541–548, Jan. 2006.
- [178] A. Muntzer, C. Montagne, L. Ellse, and R. Wall, "Temperature-dependent lipid metabolism in the blow fly *Lucilia sericata*," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 29, no. 3, pp. 305–313, Sep. 2015.

- [179] N. R. Andrew *et al.*, "Assessing insect responses to climate change: What are we testing for? Where should we be heading?," *PeerJ*, vol. 1, p. e11, Feb. 2013.
- [180] T. M. (Rutgers U. N. B. N. Casey, "Effects of temperature on foraging of caterpillars." Chapman and Hall, 1993.
- [181] S. Kadochova and J. Frouz, "Seasonal change in phototropic behavior of *Formica polyctena*," poster, International Union for the Study of Social Insects, Australia, 2014.
- [182] J. C. Jones and B. P. Oldroyd, "Nest thermoregulation in social insects," *Adv. In Insect Phys.*, vol. 33, pp. 153–191, Jan. 2006.
- [183] T. J. Kurtti, M. A. Brooks, C. Wensman, and R. Lovrien, "Direct microcalorimetry of heat generation by individual insects," *J. Therm. Biol.*, vol. 4, no. 2, pp. 129–136, Apr. 1979.
- [184] E. Schmolz and O. Schulz, "Calorimetric investigations on thermoregulation and growth of wax moth larvae *Galleria mellonella*," *Thermochim. Acta*, vol. 251, pp. 241–245, Mar. 1995.
- [185] C. Ruf and K. Fiedler, "Thermal gains through collective metabolic heat production in social caterpillars of *Eriogaster lanestris*," *Naturwissenschaften*, vol. 87, no. 4, pp. 193–196, Apr. 2000.
- [186] C. Pimentel, M. Santos, C. Ferreira, and J.-Å. Nilsson, "Temperature, size, reproductive allocation, and life-history evolution in a gregarious caterpillar," *Biol. J. Linn. Soc.*, vol. 105, no. 2, pp. 340–349, Feb. 2012.
- [187] R. B. Huey and R. D. Stevenson, "Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: A discussion of approaches," *Am. Zool.*, vol. 19, no. 1, pp. 357–366, Feb. 1979.
- [188] Y. Tsubaki and Y. Shiotsu, "Group feeding as a strategy for exploiting food resources in the burnet moth *Pryeria sinica*," *Oecologia*, vol. 55, no. 1, pp. 12–20, Oct. 1982.
- [189] T. D. Fitzgerald and S. C. Peterson, "Cooperative foraging and communication in caterpillars," *Bioscience*, vol. 38, no. 1, pp. 20–25, Jan. 1988.
- [190] D. B. Rivers, T. Ciarlo, M. Spelman, and R. Brogan, "Changes in development and heat shock protein expression in two species of flies (*Sarcophaga bullata* [Diptera: Sarcophagidae] and *Protophormia terraenovae* [Diptera: Calliphoridae]) reared in different sized maggot masses.," *J. Med. Entomol.*, vol. 47, no. 4, pp. 677–89, Jul. 2010.
- [191] M. R. Wilson, Y. Nigam, W. Jung, J. Knight, and D. I. Pritchard, "The impacts of larval density and protease inhibition on feeding in medicinal larvae of the greenbottle fly

- Lucilia sericata*," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 30, no. 1, pp. 1–7, Mar. 2016.
- [192] B. Greenberg and J. C. Kunich, *Entomology and the law : flies as forensic indicators*. Cambridge University Press, 2002.
- [193] I. Hanski, "Assimilation by *Lucilia illustris* (Diptera) Larvae in constant and changing temperatures," *Oikos*, vol. 27, no. 2, p. 288, 1976.
- [194] I. Hanski, "An interpolation model of assimilation by larvae of the blowfly *Lucilia illustris* (Calliphoridae) in changing temperatures," *Oikos*, vol. 28, no. 2/3, p. 187, 1977.
- [195] C. C. Deonier, "Carcass temperatures and their relation to winter blowfly populations and activity in the southwest.," *J. Econ. Entomol.*, vol. 33, pp. 166–170, 1940.
- [196] C. Christopherson and D. L. Gibo, "Foraging by food deprived larvae of *Neobellieria bullata* (Diptera: Sarcophagidae)," *J. Forensic Sci.*, vol. 42, no. 1, p. 14069J, Jan. 1997.
- [197] L. A. Nelson, M. Downton, and J. F. Wallman, "Thermal attributes of *Chrysomya* species," *Entomol. Exp. Appl.*, vol. 133, no. 3, pp. 260–275, Dec. 2009.
- [198] B. Turner and T. Howard, "Metabolic heat generation in dipteran larval aggregations: a consideration for forensic entomology," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 6, no. 2, pp. 179–181, Apr. 1992.
- [199] I. Hanski, "Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence," *Ecol. Entomol.*, vol. 12, no. 3, pp. 257–266, Aug. 1987.
- [200] P.-M. So and D. Dudgeon, "Interspecific competition among larvae of *Hemipyrellia ligurriens* (Calliphoridae) and *Boettcherisca formosensis* (Sarcophagidae) (Diptera)," *Res. Popul. Ecol. (Kyoto).*, vol. 32, no. 2, pp. 337–348, Dec. 1990.
- [201] T. E. Huntington and L. G. Higley, "Decomposed flesh as a vitellogenic protein source for the forensically important *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae)," *J. Med. Entomol.*, vol. 47, no. 3, pp. 482–486, May 2010.
- [202] P. H. Strange, "The spectral sensitivity of Calliphora maggots," *J. Exp. Biol.*, vol. 38, no. 1, 1961.
- [203] R. Wall, K. M. Pitts, and K. E. Smith, "Pre-adult mortality in the blowfly *Lucilia sericata*," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 15, no. 3, pp. 328–334, Sep. 2001.
- [204] V. Serratore, M. Zalucki, and P. Carter, "Thermoregulation in moulting and feeding *Danaus plexippus* L. (Lepidoptera: Nymphalidae) caterpillars," *Aust. J. Entomol.*, vol. 52, pp. 8–13, 2012.
- [205] W. D. Haglund and M. H. Sorg, *Forensic taphonomy : the postmortem fate of human*

- remains*. CRC Press, 1997.
- [206] C.-P. Chen, R. Lee, and D. Denlinger, "A comparison of the responses of tropical and temperate flies (Diptera: Sarcophagidae) to cold and heat stress," *J. Comp. Physiol. B*, vol. 160, no. 5, pp. 543–547, Dec. 1990.
- [207] D. Pauli, A.-P. Arrigo, and A. Tissières, "Heat shock response in *Drosophila*," *Experientia*, vol. 48, no. 7, pp. 623–629, Jul. 1992.
- [208] D. A. Parsell and S. Lindquist, "The biology of heat shock proteins and molecular chaperones," in *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*, R. Morimoto, A. Tissiere, and C. Georgopoulos, Eds. 1994, pp. 457–494.
- [209] M. E. Feder, N. Blair, and H. Figueras, "Natural thermal stress and heat-shock protein expression in *Drosophila* larvae and pupae," *Funct. Ecol.*, vol. 11, no. 1, pp. 90–100, Feb. 1997.
- [210] G. D. Yocum, K. H. Joplin, and D. L. Denlinger, "Expression of heat shock proteins in response to high and low temperature extremes in diapausing pharate larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*," *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, vol. 18, no. 4, pp. 239–249, Jan. 1991.
- [211] G. D. Yocum *et al.*, "Alteration of the eclosion rhythm and eclosion behavior in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, by low and high temperature stress," *J. Insect Physiol.*, vol. 40, no. 1, pp. 13–21, Jan. 1994.
- [212] J. A. Yoder, J. B. Benoit, D. L. Denlinger, and D. B. Rivers, "Stress-induced accumulation of glycerol in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*: Evidence indicating anti-desiccant and cryoprotectant functions of this polyol and a role for the brain in coordinating the response," *J. Insect Physiol.*, vol. 52, no. 2, pp. 202–214, Feb. 2006.
- [213] J. F. Harrison and J. H. Fewell, "Thermal Effects on feeding behavior and net energy intake in a grasshopper experiencing large diurnal fluctuations in body temperature," *Physiol. Zool.*, vol. 68, no. 3, pp. 453–473, May 1995.
- [214] J. G. Kingsolver, "Feeding, growth, and the thermal environment of cabbage white caterpillars, *Pieris rapae* L.," *Physiol. Biochem. Zool.*, vol. 73, no. 5, pp. 621–8, Jul. 2015.
- [215] M. Gosselin, D. Charabidzé, C. Fripiat, B. Bourel, and D. Gosset, "Development time variability: adaptation of Regniere's method to the intrinsic variability of Belgian *Lucilia sericata* (Diptera, Calliphoridae) population.," *J. Forensic Res.*, vol. 1, no. 109, 2010.
- [216] K. Gotthard, "Growth strategies of ectothermic animals in temperate environments,"

- in *Environment and animal development*, BIOS Scientific Publishers, 2001, pp. 287–304.
- [217] B. Heinrich, "Insect thermoregulation," *Endeavour*, vol. 19, no. 1, pp. 28–33, Jan. 1995.
- [218] H. Thormar, "Effect of temperature on the reproduction rate of *Tetrahymena pyriformis*," *Exp. Cell Res.*, vol. 28, no. 2, pp. 269–279, Nov. 1962.
- [219] C. Nyamukondiwa and J. S. Terblanche, "Thermal tolerance in adult Mediterranean and Natal fruit flies (*Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa*): Effects of age, gender and feeding status," *J. Therm. Biol.*, vol. 34, no. 8, pp. 406–414, Dec. 2009.
- [220] L. Gvoždík, "Mismatch between ectotherm thermal preferenda and optima for swimming: A test of the evolutionary pace hypothesis," *Evol. Biol.*, vol. 42, no. 2, pp. 137–145, Jun. 2015.
- [221] C. Aubernon, V. Hedouin, and D. Charabidze, "The maggot, the ethologist and the forensic entomologist: Sociality and thermoregulation in necrophagous larvae," *J. Adv. Res.*, vol. 16, pp. 67–73, Mar. 2019.
- [222] J. Krause and G. D. Ruxton, *Living in groups*. Oxford University Press, 2002.
- [223] S. Camazine, *Self-organization in biological systems*. Princeton University Press, 2001.
- [224] S. M. Kivelä *et al.*, "The past and the present in decision-making: the use of conspecific and heterospecific cues in nest site selection," *Ecology*, vol. 95, no. 12, pp. 3428–3439, Dec. 2014.
- [225] J. A. Stamps, "Conspecific attraction and aggregation in territorial species," *Am. Nat.*, vol. 131, no. 3, pp. 329–347, Mar. 1988.
- [226] D. J. T. Sumpter, *Collective Animal Behavior*. 2010.
- [227] R. Jeanson, A. Dussutour, and V. Fourcassié, "Key factors for the emergence of collective decision in invertebrates," *Front. Neurosci.*, vol. 6, p. 121, Aug. 2012.
- [228] E. O. Wilson, "The insects societies," 1971.
- [229] J. T. Costa and T. D. Fitzgerald, "Social terminology revisited: Where are we ten years later?," *Annales Zoologici Fennici*, vol. 42., pp. 559–564, 2005.
- [230] E. O. Wilson and B. Hölldobler, "Eusociality: origin and consequences," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, pp. 13367–13371, 2005.
- [231] E. Stensland, A. Angerbjörn, and P. Berggren, "Mixed species groups in mammals," *Mamm. Rev.*, vol. 33, no. 3–4, pp. 205–223, Sep. 2003.
- [232] J. Terborgh, "Mixed flocks and polyspecific associations: Costs and benefits of mixed groups to birds and monkeys," *Am. J. Primatol.*, vol. 21, no. 2, pp. 87–100, Jan. 1990.

- [233] D. R. Farine, L. M. Aplin, C. J. Garroway, R. P. Mann, and B. C. Sheldon, "Collective decision making and social interaction rules in mixed-species flocks of songbirds," *Anim. Behav.*, vol. 95, pp. 173–182, Sep. 2014.
- [234] D. R. Farine, C. P. Downing, and P. A. Downing, "Mixed-species associations can arise without heterospecific attraction," *Behav. Ecol.*, vol. 25, no. 3, pp. 574–581, May 2014.
- [235] C. Errard, "Development of interspecific recognition behavior in the ants *Manica rubida* and *Formica selysi* (Hymenoptera: Formicidae) reared in mixed-species groups," *J. Insect Behav.*, vol. 7, no. 1, pp. 83–99, Jan. 1994.
- [236] A. M. Fielde, "Artificial mixed nests of ants," *Biol. Bull.*, vol. 5, pp. 320–325, 1903.
- [237] B. Vauchot, E. Provost, A. G. Bagnères, and J. L. Clement, "Regulation of the chemical signatures of two termite species, *Reticulitermes santonensis* and *Reticulitermes lucifugus grassei*, living in mixed experimental colonies," *J. Insect Physiol.*, vol. 42, no. 4, pp. 309–321, Apr. 1996.
- [238] R. J. Stuart and T. M. Alloway, "The slave-making ant, *Harpagoxenus canadensis* and its host-species, *Leptothorax muscorum* (Nylander): slave raiding and territoriality," *Behaviour*, vol. 85. Brill, pp. 58–90, 1983.
- [239] M. H. Huang and A. Dornhaus, "A meta-analysis of ant social parasitism: host characteristics of different parasitism types and a test of Emery's rule," *Ecol. Entomol.*, vol. 33, no. 5, pp. 589–596, Oct. 2008.
- [240] E. M. Barrows, *Animal behavior desk reference: a dictionary of animal behavior, ecology, and evolution*. 2000.
- [241] W. M. Hamner and D. Schneider, "Regularly spaced rows of medusae in the Bering Sea: Role of Langmuir circulation¹," *Limnol. Oceanogr.*, vol. 31, no. 1, pp. 171–176, Jan. 1986.
- [242] K. Vulinec and M. C. Miller, "Aggregation and predator avoidance in whirligig beetles (Coleoptera: Gyrinidae)," *Journal of the New York Entomological Society*, vol. 97. New York Entomological Society, pp. 438–447, 1989.
- [243] M. Dambach and B. Goehlen, "Aggregation density and longevity correlate with humidity in first-instar nymphs of the cockroach (*Blattella germanica* L., Dictyoptera)," *J. Insect Physiol.*, vol. 45, no. 5, pp. 423–429, May 1999.
- [244] C. Vienne, V. Soroker, and A. Hefetz, "Congruency of hydrocarbon patterns in heterospecific groups of ants: transfer and/or biosynthesis?," *Insectes Soc.*, vol. 42, no.

- 3, pp. 267–277, Sep. 1995.
- [245] J. C. Choe and B. J. Crespi, *The evolution of social behavior in insects and arachnids*. Cambridge University Press, 1997.
- [246] L. Passera, S. Aron, and Conseil national de recherches Canada., *Les fourmis : comportement, organisation sociale et évolution*. CNRC-NRC, Les Presses scientifiques du CNRC, 2005.
- [247] A. E. Hajek and D. L. Dahlsten, “Coexistence of three species of leaf-feeding aphids (Homoptera) on *Betula pendula*,” *Oecologia*, vol. 68, no. 3, pp. 380–386, 1986.
- [248] R. Moreno-Ripoll, N. Agustí, R. Berruezo, and R. Gabarra, “Conspecific and heterospecific interactions between two omnivorous predators on tomato,” *Biol. Control*, vol. 62, no. 3, pp. 189–196, Sep. 2012.
- [249] F. X. Bogner, “Interspecific advantage results in intraspecific disadvantage: Chemical protection versus cannibalism in *Utetheisa ornatrix* (Lepidoptera: Arctiidae),” *J. Chem. Ecol.*, vol. 22, no. 8, pp. 1439–1451, Aug. 1996.
- [250] T. D. Fitzgerald and J. S. Edgerly, “Specificity of trail markers of forest and eastern tent caterpillars,” *J. Chem. Ecol.*, vol. 5, no. 4, pp. 565–574, Jul. 1979.
- [251] A. Gunn and J. Bird, “The ability of the blowflies *Calliphora vomitoria* (Linnaeus), *Calliphora vicina* (Rob-Desvoidy) and *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) and the muscid flies *Muscina stabulans* (Fallén) and *Muscina prolapsa* (Harris) (Diptera: Muscidae) to colonise buried remains,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 207, no. 1–3, pp. 198–204, Apr. 2011.
- [252] A. R. Ives, “Aggregation and coexistence in a carrion fly community,” *Ecol. Monogr.*, vol. 61, no. 1, pp. 75–94, Feb. 1991.
- [253] S. F. dos Reis, C. J. von Zuben, and W. A. C. Godoy, “Larval aggregation and competition for food in experimental populations of *Chrysomya putoria* (Wied.) and *Cochliomyia macellaria* (F.) (Dipt., Calliphoridae),” *J. Appl. Entomol.*, vol. 123, no. 8, pp. 485–489, Sep. 1999.
- [254] B. A. Woodcock, A. D. Watt, and S. R. Leather, “Aggregation, habitat quality and coexistence: a case study on carrion fly communities in slug cadavers,” *J. Anim. Ecol.*, vol. 71, no. 1, pp. 131–140, Jan. 2002.
- [255] J. M. Pasteels and J.-C. Gregoire, “Selective predation on chemically defended Chrysomelid larvae,” *J. Chem. Ecol.*, vol. 10, no. 12, pp. 1693–1700, Dec. 1984.

- [256] C. Everaerts, J. P. Farine, and R. Brossut, "Changes of species specific cuticular hydrocarbon profiles in the cockroaches *Nauphoeta cinerea* and *Leucophaea maderae* reared in heterospecific groups," *Entomol. Exp. Appl.*, vol. 85, no. 2, pp. 145–150, Nov. 1997.
- [257] H. A. Verhoef, C. J. Nagelkerke, and E. N. G. Joosse, "Aggregation pheromones in Collembola," *J. Insect Physiol.*, vol. 23, no. 8, pp. 1009–1013, Jan. 1977.
- [258] P. S. Meadows and K. A. Mitchell, "An analysis of inter- and intraspecific aggregations in two sympatric species of hermit crab (Decapoda, Anomura, Paguridae)," *Mar. Behav. Physiol.*, vol. 2, no. 1–4, pp. 187–196, Aug. 1973.
- [259] D. Lecchini, S. C. Mills, C. Brié, R. Maurin, and B. Banaigs, "Ecological determinants and sensory mechanisms in habitat selection of crustacean postlarvae," *Behav. Ecol.*, vol. 21, no. 3, pp. 599–607, May 2010.
- [260] P. Briones-Fourzán, E. Ramírez-Zaldívar, and E. Lozano-Alvarez, "Influence of conspecific and heterospecific aggregation cues and alarm odors on shelter choice by syntopic spiny lobsters.," *Biol. Bull.*, vol. 215, no. 2, pp. 182–90, Oct. 2008.
- [261] E. Lozano-Álvarez and P. Briones-Fourzán, "Choice and occupation patterns of shelters by two sympatric lobster species, *Panulirus argus* and *Panulirus guttatus*, under experimental conditions," *Mar. Freshw. Res.*, vol. 52, no. 8, p. 1145, 2001.
- [262] E. Lozano-Álvarez, P. Briones-Fourzán, A. Osorio-Arciniegas, F. Negrete-Soto, and C. Barradas-Ortiz, "Coexistence of congeneric spiny lobsters on coral reefs: differential use of shelter resources and vulnerability to predators," *Coral Reefs*, vol. 26, no. 2, pp. 361–373, Jun. 2007.
- [263] A. A. Kotov, "Mixed multispecific schools of littoral Anomopoda (Crustacea: 'Cladocera')," *Hydrobiologia*, vol. 434, no. 1/3, pp. 211–212, 2000.
- [264] B. Sauphanor and F. Sureau, "Aggregation behaviour and interspecific relationships in Dermaptera," *Oecologia*, vol. 96, no. 3, pp. 360–364, Dec. 1993.
- [265] B. R. Krasnov *et al.*, "Aggregation and species coexistence in fleas parasitic on small mammals," *Ecography (Cop.)*, vol. 29, no. 2, pp. 159–168, Apr. 2006.
- [266] B. R. Krasnov, N. V. Burdelova, I. S. Khokhlova, G. I. Shenbrot, and A. Degen, "Larval interspecific competition in two flea species parasitic on the same rodent host," *Ecol. Entomol.*, vol. 30, no. 2, pp. 146–155, Apr. 2005.
- [267] J. Jaenike and A. C. James, "Aggregation and the coexistence of mycophagous

- Drosophila," *J. Anim. Ecol.*, vol. 60, no. 3, p. 913, Oct. 1991.
- [268] B. Wertheim, "Evolutionary ecology of communication signals that induce aggregative behaviour," *Oikos*, vol. 109, no. 1, pp. 117–124, Apr. 2005.
- [269] B. Wertheim, R. Allemand, L. E. M. Vet, and M. Dicke, "Effects of aggregation pheromone on individual behaviour and food web interactions: a field study on *Drosophila*," *Ecol. Entomol.*, vol. 31, no. 3, pp. 216–226, Jun. 2006.
- [270] N. H. Copp, "Temperature-dependent behaviours and cluster formation by aggregating ladybird beetles," *Anim. Behav.*, vol. 31, no. 2, pp. 424–430, May 1983.
- [271] A. Honěk, Z. Martinková, and S. Pekár, "Aggregation characteristics of three species of Coccinellidae (Coleoptera) at hibernation sites," *Eur. J. Entomol.*, vol. 104, pp. 51–56, 2007.
- [272] R. E. Lee and Jr., "Aggregation of lady beetles on the shores of lakes (Coleoptera: Coccinellidae)," *Am. Midl. Nat.*, vol. 104, no. 2, p. 295, Oct. 1980.
- [273] R. G. Simpson and C. E. Welborn, "Aggregations of alfalfa weevils, *Hypera postica*, convergent lady beetles, *Hippodamia convergens*, and other insects," *Environ. Entomol.*, vol. 4, no. 2, pp. 193–194, Apr. 1975.
- [274] A. Niassy, B. Torto, P. G. N. Njagi, A. Hassanali, D. Obeng-Ofori, and J. N. Ayertey, "Intra- and interspecific aggregation responses of *Locusta migratoria migratorioides* and *Schistocerca gregaria* and a comparison of their pheromone emissions," *J. Chem. Ecol.*, vol. 25, no. 5, pp. 1029–1042, 1999.
- [275] B. Uvarov, *Grasshoppers and locusts. A handbook of general acridology Vol. 2. Behaviour, ecology, biogeography, population dynamics*. Centre for Overseas Pest Research, 1977.
- [276] G. Le Goff, "Benefits of aggregation in *Tetranychus urticae*," Université catholique de Louvain (UCL), 2011.
- [277] D. H. Slone, "Spatial patterns of predaceous and phytophagous apple mites (Acari : Eriophyidae, phytoseiidae, Stigmaeidae, Tetranychidae): intra- and interspecific relationships." 06-Apr-1999.
- [278] R. J. Bartelt, D. K. Weaver, and R. T. Arbogast, "Aggregation pheromone of *Carpophilus dimidiatus* (F.) (Coleoptera: Nitidulidae) and responses to *Carpophilus* pheromones in South Carolina," *J. Chem. Ecol.*, vol. 21, no. 11, pp. 1763–1779, Nov. 1995.
- [279] R. J. Bartelt, K. L. Seaton, and P. F. Dowd, "Aggregation pheromone of *Carpophilus*

- antiquus* (Coleoptera: Nitidulidae) and kairomonal use of *C. lugubris* pheromone by *C. antiquus*," *J. Chem. Ecol.*, vol. 19, no. 10, pp. 2203–2216, Oct. 1993.
- [280] M. R. Warburg, "Intra- and interspecific cohabitation of scorpions in the field and the effect of density, food, and shelter on their interactions," *J. Ethol.*, vol. 18, no. 1, pp. 59–63, Jun. 2000.
- [281] M. A. Hodge and A. Storfer-Isser, "Conspecific and heterospecific attraction: A mechanism of web-site selection leading to aggregation formation by web-building spiders," *Ethology*, vol. 103, no. 10, pp. 815–826, Apr. 2010.
- [282] M.-C. Chelini, R. H. Willemart, and P. Gnaspini, "Gregarious behavior of two species of Neotropical harvestmen (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae)," *J. Arachnol.*, vol. 40, no. 2, pp. 256–258, Aug. 2012.
- [283] A. Fucarino, J. G. Millar, J. S. McElfresh, and S. Colazza, "Chemical and physical signals mediating conspecific and heterospecific aggregation behavior of first instar stink bugs," *J. Chem. Ecol.*, vol. 30, no. 6, pp. 1257–1269, Jun. 2004.
- [284] T. Ishiwatari, "Studies on the scent of stink bugs (Hemiptera : Pentatomidae) : II. Aggregation pheromone activity," *Appl. Entomol. Zool.*, vol. 11, no. 1, pp. 38–44, 1976.
- [285] L. Arnaud, G. Lognay, M. Verscheure, L. Leenaers, C. Gaspar, and E. Haubruge, "Is dimethyldecanal a common aggregation pheromone of *Tribolium* flour beetles?," *J. Chem. Ecol.*, vol. 28, no. 3, pp. 523–532, 2002.
- [286] M. F. Ryan and D. P. O'Ceallachain, "Aggregation and sex pheromones in the beetle *Tribolium confusum*," *J. Insect Physiol.*, vol. 22, no. 11, pp. 1501–1503, Jan. 1976.
- [287] T. Tsunoda, "Interspecific and intraspecific associations of two species of hard ticks, *Haemaphysalis longicornis* and *Haemaphysalis megaspinosa*, in relation to suesting site," *J. Parasitol.*, vol. 93, no. 3, pp. 531–541, Jun. 2007.
- [288] D. E. Sonenshine, "Pheromones and other semiochemicals of the Acari," *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 30, no. 1, pp. 1–28, Jan. 1985.
- [289] K. L. Olmstead and T. K. Wood, "The effect of clutch size and ant attendance on egg guarding by *Entylia bactriana* (Homoptera: Membracidae).," *Psyche A J. Entomol.*, vol. 97, no. 1–2, pp. 111–120, 1990.
- [290] T. Wood, "Sociality in the Membracidae (Homoptera).," *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.*, vol. 11, pp. 15–22, 1979.
- [291] A. N. Lorenzo Figueiras and C. R. Lazzari, "Aggregation behaviour and interspecific

- responses in three species of Triatominae," *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 93, no. 1, pp. 133–137, Jan. 1998.
- [292] T. Mota and M. G. Lorenzo, "Lack of segregation between two species of Chagas disease vectors," *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 87, no. 1, pp. 109–116, Jul. 2012.
- [293] B. Chatteron and R. Fortey, "Linear clusters of articulated trilobites from lower ordovician (arenig) strata at Bini Tinzoulin, north of Zagora, Southern Morocco," in *Advances in trilobite research : Conference, Toledo (Spain), June, 16-24, 2008*, 2008, p. 448.
- [294] B. Heinrich and F. D. Vogt, "Aggregation and foraging behavior of whirligig beetles (Gyrinidae)," *Behav. Ecol. Sociobiol.*, vol. 7, no. 3, pp. 179–186, Sep. 1980.
- [295] P. Broly, Q. Ectors, G. Decuyper, S. C. Nicolis, and J.-L. Deneubourg, "Sensitivity of density-dependent threshold to species composition in arthropod aggregates," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 32576, Dec. 2016.
- [296] E. J. Rellinger, D. M. Clifford, K. A. Reinsel, J. M. Welch, and J. A. Yoder, "Herding limits water loss in the sand fiddler crab, *Uca pugilator*," *J. Crustac. Biol.*, vol. 25, no. 1, pp. 141–145, Jan. 2005.
- [297] B. D. Ayres, M. P. Ayres, M. D. Abrahamson, and S. A. Teale, "Resource partitioning and overlap in three sympatric species of Ips bark beetles (Coleoptera: Scolytidae)," *Oecologia*, vol. 128, no. 3, pp. 443–453, Aug. 2001.
- [298] L. Grinsted, I. Agnarsson, and T. Bilde, "Subsocial behaviour and brood adoption in mixed-species colonies of two Theridiid spiders," *Naturwissenschaften*, vol. 99, no. 12, pp. 1021–1030, Dec. 2012.
- [299] M. Lachmann, G. Sella, and E. Jablonka, "On the advantages of information sharing," *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.*, vol. 267, no. 1450, pp. 1287–1293, Jul. 2000.
- [300] J.-M. Ame, C. Rivault, and J.-L. Deneubourg, "Cockroach aggregation based on strain odour recognition," *Anim. Behav.*, vol. 68, no. 4, pp. 793–801, Oct. 2004.
- [301] D. Durieux *et al.*, "Role of long-chain hydrocarbons in the aggregation behaviour of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae)," *J. Insect Physiol.*, vol. 58, no. 6, pp. 801–807, Jun. 2012.
- [302] M. Lihoreau and C. Rivault, "Kin recognition via cuticular hydrocarbons shapes cockroach social life," *Behav. Ecol.*, vol. 20, no. 1, pp. 46–53, Jan. 2009.
- [303] I. Kaplan and R. F. Denno, "Interspecific interactions in phytophagous insects revisited:

- a quantitative assessment of competition theory," *Ecol. Lett.*, vol. 10, no. 10, pp. 977–994, Oct. 2007.
- [304] U. Srinivasan, R. H. Raza, and S. Quader, "The nuclear question: rethinking species importance in multi-species animal groups," *J. Anim. Ecol.*, vol. 79, no. 5, pp. 948–954, May 2010.
- [305] C. Palestini, E. Barbero, and A. Ronaldo, "Intra- and interspecific aggregation among dung beetles (Coleoptera: Scarabaeoidea) in an Alpine pasture," *J. Zool.*, vol. 245, no. 1, pp. 101–109, 1998.
- [306] P. Broly, L. Devigne, J.-L. Deneubourg, and C. Devigne, "Effects of group size on aggregation against desiccation in woodlice (Isopoda: Oniscidea)," *Physiol. Entomol.*, vol. 39, no. 2, pp. 165–171, Jun. 2014.
- [307] R. F. Mizell, P. C. Andersen, B. V. Brodbeck, and W. B. Hunter, "Congener response reduces risks from bottom-up and top-down forces: behavioral parsimony by a xylophage," *Am. Entomol.*, vol. 58, no. 2, pp. 106–115, Apr. 2012.
- [308] P. A. Stephens and W. J. Sutherland, "Consequences of the Allee effect for behaviour, ecology and conservation," *Trends Ecol. Evol.*, vol. 14, no. 10, pp. 401–405, Oct. 1999.
- [309] E. P. Odum, *Fundamentals of ecology*. Philadelphia, 1953.
- [310] F. Courchamp, T. Clutton-Brock, and B. Grenfell, "Inverse density dependence and the Allee effect," *Trends Ecol. Evol.*, vol. 14, no. 10, pp. 405–410, Oct. 1999.
- [311] M. Riipi, R. V. Alatalo, L. Lindström, and J. Mappes, "Multiple benefits of gregariousness cover detectability costs in aposematic aggregations," *Nature*, vol. 413, no. 6855, pp. 512–514, Oct. 2001.
- [312] A. S. Weed, "Benefits of larval group feeding by *Chrysolina aurichalcea asclepiadis* on *Vincetoxicum*: improved host location or feeding facilitation?," *Entomol. Exp. Appl.*, vol. 137, no. 3, pp. 220–228, Dec. 2010.
- [313] D. L. Evans and J. O. Schmidt, *Insect defenses : adaptive mechanisms and strategies of prey and predators*. State University of New York Press, 1990.
- [314] K. Wilson, R. Knell, M. Boots, and J. Koch-Osborne, "Group living and investment in immune defence: an interspecific analysis," *J. Anim. Ecol.*, vol. 72, no. 1, pp. 133–143, Jan. 2003.
- [315] M. Hassall, J. M. Tuck, and R. James, "Effects of density and spatial heterogeneity on foraging behaviour and fitness correlates of *Armadillidium vulgare* (Isopoda

- Oniscidea),” *Ethol. Ecol. Evol.*, vol. 17, no. 3, pp. 233–247, Jul. 2005.
- [316] Y. Caubet and F.-J. Richard, “Image processing software for spatial analysis of animal grouping,” *Zookeys*, no. 515, pp. 173–89, 2015.
- [317] M. Derhé, A. Moss, D. Edwards, R. Carmenta, and M. Hassall, “Predicting the effect of climate change on aggregation behaviour in four species of terrestrial isopods,” *Behaviour*, vol. 147, no. 2, pp. 151–164, Jan. 2010.
- [318] P. Broly, C. Devigne, and J.-L. Deneubourg, “Body shape in terrestrial isopods: A morphological mechanism to resist desiccation?,” *J. Morphol.*, vol. 276, no. 11, pp. 1283–1289, Nov. 2015.
- [319] L. M. Roth and E. B. Willis, *The biotic associations of cockroaches*. 1960.
- [320] L.-A. Giraldeau and T. Caraco, *Social foraging Theory*. 2000.
- [321] L.-A. Giraldeau and G. Beauchamp, “Food exploitation: searching for the optimal joining policy,” *Trends Ecol. Evol.*, vol. 14, no. 3, pp. 102–106, Mar. 1999.
- [322] E. Rasa and O. Anne, “Interspecific defence aggregations: a Model for the evolution of sociality and kin selection,” *Netherl. J. Zool.*, vol. 40, no. 4, 1989.
- [323] S. C. Nicolis, J. Halloy, and J.-L. Deneubourg, “Transition between segregation and aggregation: the role of environmental constraints,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 32703, Dec. 2016.
- [324] I. Leoncini and C. Rivault, “Could species segregation be a consequence of aggregation processes? Example of *Periplaneta americana* (L.) and *P. fuliginosa* (Serville).,” *Ethology*, vol. 111, no. 5, pp. 527–540, May 2005.
- [325] J. R. Hagler and C. G. Jackson, “Methods for marking insects: current techniques and future prospects,” *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 46, no. 1, pp. 511–543, Jan. 2001.
- [326] J.-L. Deneubourg, S. Goss, N. Franks, A. Sendova-Franks, C. Detrain, and L. Chrétien, “The dynamics of collective sorting robot-like ants and ant-like robots,” in *the first international conference on simulation of adaptive behavior on From animals to animats*, 1990.
- [327] B. Bourel, B. Callet, V. Hédouin, and D. Gosset, “Flies eggs: a new method for the estimation of short-term post-mortem interval?,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 135, no. 1, pp. 27–34, Jul. 2003.
- [328] A. Baddeley, E. Rubak, and R. Turner, “Spatial point patterns : methodology and applications with R,” *J. Stat. softwar*, vol. 75, no. 2, 2016.

- [329] J. Stevens and R. Wall, "Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance," *Forensic Sci. Int.*, vol. 120, no. 1–2, pp. 116–123, Aug. 2001.
- [330] J. Deal, "The temperature preferendum of certain insects," *J. Anim. Ecol.*, vol. 10, no. 2, p. 323, Nov. 1941.
- [331] M. Hall and R. Wall, "Myiasis of humans and domestic animals," *Adv. Parasitol.*, vol. 35, pp. 257–334, Jan. 1995.
- [332] C. Wyss and D. Cherix, *Traité d'entomologie forensique : les insectes sur la scène de crime*. Presses polytechniques et universitaires romandes, 2013.
- [333] D. McFarland and A. Houston, *Quantitative ethology: The state space approach*, Pitman Adv. 1981.
- [334] C. Frederickx, J. Dekeirsschieter, F. J. Verheggen, and E. Haubruge, "The community of Hymenoptera parasitizing necrophagous Diptera in an urban biotope," *J. Insect Sci.*, vol. 13, no. 32, pp. 1–14, Apr. 2013.
- [335] K. E. Smith and R. Wall, "The use of carrion as breeding sites by the blowfly *Lucilia sericata* and other Calliphoridae," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 11, no. 1, pp. 38–44, Jan. 1997.
- [336] M. I. Bhat, A. Kumari, S. Kapila, and R. Kapila, "Probiotic lactobacilli mediated changes in global epigenetic signatures of human intestinal epithelial cells during *Escherichia coli* challenge," *Ann. Microbiol.*, pp. 1–10, Feb. 2019.
- [337] A. Martinez-Sanchez, S. Rojo, and M. A. Marcos-Garcia, "Annual and spatial activity of dung flies," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 14, no. 1, pp. 56–63, Mar. 2000.
- [338] J. Stevens and R. Wall, "The evolution of ectoparasitism in the genus *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae)," *Int. J. Parasitol.*, vol. 27, no. 1, pp. 51–59, Jan. 1997.
- [339] M. Daniel, H. Srámová, and E. Zálabská, "*Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) causing hospital-acquired myiasis of a traumatic wound.," *J. Hosp. Infect.*, vol. 28, no. 2, pp. 149–52, Oct. 1994.
- [340] Z. Morales-Reyes *et al.*, "Shepherds' local knowledge and scientific data on the scavenging ecosystem service: Insights for conservation," *Ambio*, vol. 48, no. 1, pp. 48–60, Jan. 2019.
- [341] C. Deluzarche, "Australie : une vague de chaleur meurtrière cause la mort de milliers d'animaux," *Futura planète*, 25-Jan-2019.
- [342] V. Hédouin and M. Gosselin, "Médecine légale et datation du décès," in *Insectes*

- cadavres et scènes de crime*, De Boeck., D. Charabidzé and M. Gosselin, Eds. 2014, p. 42.
- [343] H. M. B, "Estimation of time of death," *Forensic Sci. Int.*, vol. 165, no. 2–3, 1992.
- [344] J. Dekersschieter and E. Haubruge, "Ecologie chimique du cadavre," in *Insectes cadavres et scènes de crime*, De Boeck., D. Charabidzé and M. Gosselin, Eds. 2014, p. 56.
- [345] J. K. Tomberlin and M. E. Benbow, *Forensic entomology : International dimensions and frontiers.* .
- [346] J. Wells and J. Castner, "Estimating the postmortem interval," in *Forensic entomology, the utility of arthropods in legal investigations*, 2010, p. 388.
- [347] R. S. Anderson, "Resource partitioning in the carrion beetle (Coleoptera:Silphidae) fauna of southern Ontario: ecological and evolutionary considerations," *Can. J. Zool.*, vol. 60, no. 6, pp. 1314–1325, Jun. 1982.
- [348] Y. Z. Erzinçlioğlu, "Immature stages of British Calliphora and Cynomya , with a re-evaluation of the taxonomic characters of larval Calliphoridae (Diptera)," *J. Nat. Hist.*, vol. 19, no. 1, pp. 69–96, Feb. 1985.
- [349] J. Bartholo de Andrade *et al.*, "Larval dispersal and predation in experimental populations of *Chrysomya albiceps* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae)," 2002.
- [350] M. Lee Goff, "Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers," *Exp. Appl. Acarol.*, vol. 49, no. 1–2, pp. 21–36, Oct. 2009.
- [351] H. LeBlanc and D. Charabidzé, "Réalisation des prélèvements entomologiques," in *Insectes cadavres et scènes de crime*, De Boeck., D. Charabidzé and M. Gosselin, Eds. 2014, p. 104.
- [352] A. Domp martin-Blanchère, "Intérêt de la larvothérapie dans le traitement des plaies chroniques.," *La Rev. Francoph. gériatrie gérontologie*, vol. 14, no. 132, pp. 72–74, 2007.

Annexes

Annexe 1 : Article de vulgarisation pour Médecine/Science

Les larves de Diptères nécrophages en entomologie médico-légale : une histoire de température

Cindy Aubernon*, Valéry Hédouin et Damien Charabidzé

Résumé

L'entomologie médico-légale est l'utilisation des insectes afin de calculer l'intervalle post-mortem (temps écoulé entre la découverte d'un corps et la mort réelle de l'individu). Connaître la biologie, la physiologie et le comportement de ces insectes sur l'écosystème représenté par le cadavre est d'une importance primordiale pour améliorer les expertises entomologiques. C'est sur quoi se focalise l'unité de taphonomie médico-légale, unique équipe de recherche en France experte sur ce sujet.

Abstract

The forensic entomology is the use of insects to date the death. The forensic expert assessment is based on the development of necrophagous insects which are growing on the cadaver, to calculate their age and then estimate the Post-Mortem Interval. This development depends on a number of parameters like temperature, species or behavior. The French Forensic Taphonomy unit, the only expert team on the subject in France, works on the biology, physiology and ethology of the necrophagous insects. Their works are focused on thermoregulation behavior and thermal preferendum of maggot masses, aggregation phenomenon and social interaction or on food intake. These works are particularly of interest to understand the pre-social parameters and evolution strategies. More importantly, their aim is to better understand the development of necrophagous insects and, *in fine*, to improve the forensic expert assessment.

La découverte d'un corps humain en décomposition n'est pas chose rare. Elle va être à l'origine de la mise en place d'une procédure judiciaire qui permettra d'identifier la victime, les causes de sa mort et de dater le décès. La détermination de la date de la mort peut reposer sur différentes méthodes. Ce sont, le plus souvent, les médecins légistes qui, grâce aux rigidités cadavériques, aux lividités, et à la température corporelle, en donneront une valeur plus ou moins précise [342]. Plus la date du décès est éloignée de celle de la découverte du corps, plus la température du cadavre sera proche de la température de l'environnement dans lequel il a été découvert. Le calcul de la date du décès, se fondant sur la différence entre la température du corps et celle de son environnement [343], ne sera précis qu'au cours de la période de refroidissement du cadavre qui excède rarement 72 heures. Au-delà ou complémentirement, et si les conditions le permettent, une autre technique sera nécessaire pour déterminer cette date de mort : l'entomologie forensique ou médico-légale.

Il n'est pas rare d'observer, sur un cadavre en décomposition, la présence d'insectes nécrophages, en particulier de Diptères. Ces insectes, principalement représentés par les mouches Calliphoridae, utilisent le corps comme ressource alimentaire, comme lieu d'accouplement, de ponte et de croissance des larves que l'on appelle communément asticots. Ce corps représente ainsi un véritable écosystème : un lieu de compétition, de prédation ou encore de parasitisme [344]. Les insectes qui s'y développent pourront être prélevés à des fins d'expertise entomologique. Ainsi, l'identification des espèces présentes permettra d'estimer un intervalle *post-mortem* (IPM) et de dater le décès. L'entomologie médico-légale représente donc une expertise majeure lors de la découverte d'un corps. Cependant, connaître la biologie des insectes nécrophages, leur physiologie et leur comportement reste primordial pour que cette méthode puisse être exploitée à son maximum. Dans cette revue, nous présenterons les principes de l'expertise entomologique ainsi que les dernières recherches qui apportent une réflexion et des éléments permettant de l'affiner. Les travaux que nous relatons ont été réalisés au sein de l'unité de taphonomie médico-légale de Lille, une équipe de recherche unique en France sur cette thématique [345].

L'entomologie forensique ou médico-légale

Les mouches de la famille Calliphoridae sont poïkilothermes : leur température corporelle dépend en effet de celle de leur environnement. Leur développement, soumis à un cycle (Figure 1), est fonction de la température qu'elles rencontrent : plus la température est élevée, plus il sera rapide [2]. La durée du cycle est également dépendante de l'espèce [39]. Cette relation entre température, durée de développement et espèce est bien connue. Elle permet de déterminer un pourcentage de développement par unité de temps et de température [29]. Ainsi, pour *Lucilia sericata*, la croissance des larves, à 20 °C, est de 5,33 % par jour [28]. La datation entomologique nécessite donc d'identifier,

en premier lieu, les espèces présentes sur le cadavre. En s'appuyant sur les données météorologiques passées, il sera ensuite possible de calculer l'âge des insectes afin de déterminer la date des premières pontes. Ceci permettra de donner un IPM minimum, c'est-à-dire une date de ponte, correspondant à un instant T où la victime était déjà décédée [346]. À partir de ce temps T, il appartiendra à l'expert d'estimer la date du décès en fonction des informations concernant le lieu de découverte et l'accessibilité au cadavre [62]. Le délai de colonisation (c'est-à-dire le temps nécessaire pour obtenir les premières pontes sur le corps) dépend, en effet, du climat mais également du lieu de découverte [62] : il est plus aisé, pour une mouche, d'atteindre un corps nu dans une forêt par une journée ensoleillée de printemps, qu'un cadavre situé au 5^e étage d'un immeuble, enroulé dans des draps de lit, en plein hiver. L'estimation de ce délai de colonisation, ajoutée à l'IPM minimum, permettra de préciser la date du décès [346].

Afin d'optimiser cette datation du décès, les recherches actuelles portent sur les paramètres qui influent sur le développement des larves de Diptères nécrophages, notamment la température. Beaucoup d'études se sont en effet intéressées à la biologie [88], à l'écologie [347], à la physiologie [348] ou encore au comportement des larves des insectes nécrophages [27]. Ces études ont apporté un grand nombre de données désormais prises en considération pour les expertises médico-légales.

Comportement d'agrégation des insectes

Au stade larvaire, les mouches Calliphoridae ont un comportement d'agrégation marqué [349]. Les asticots se rassemblent et vivent en groupes pouvant contenir des dizaines de milliers d'individus. Ce phénomène social est primordial pour leur survie et leur développement : le cadavre étant un écosystème éphémère, il est en effet important pour ces larves qui composent le groupe d'acquérir des stratégies évolutives afin de se développer vite et bien [60]. Dans ce contexte, le grégarisme apporte de nombreux bénéfices comme la protection contre les prédateurs, la coopération sociale (effet Allee) [310] ou encore la génération de chaleur [125]. Ce dernier phénomène, appelé *larval-mass effect*, repose notamment sur la taille du groupe. On peut en effet observer des températures, au sein des masses larvaires, qui dépassent de 20 °C la température ambiante. Cette augmentation de la température locale permet un développement plus rapide des larves, ce qui limite leur séjour sur le cadavre. Tous ces bénéfices associés au grégarisme permettent un développement optimisé des larves en limitant la prédation, le parasitisme ou la compétition et le risque de manque de ressources [108]. Partant de ces constats, l'hypothèse qu'il existerait pour chaque espèce une température préférentielle de développement, qui serait une température optimale pour un développement efficace tout en limitant la mortalité des larves, a été émise [73]. Cette température permettrait également d'optimiser le succès reproducteur des insectes adultes [131]. De ce fait, cela suppose que

les larves devraient trouver cette température préférentielle ou une valeur s'en approchant dans leur environnement qu'est le corps en décomposition.

Préférences thermiques

Une étude [167], fondée sur l'utilisation d'un dispositif innovant nommé le Thermograde, a révélé la sélection préférentielle d'une température. Cette analyse, qui a porté sur les larves de troisième stade de trois espèces majeures d'intérêt forensique (*Lucilia sericata*, *Calliphora vomitoria* et *Calliphora vicina*), montre en effet que les insectes se regroupent à une température déterminée mais que celle-ci dépend de l'espèce, avec une sélection de $33,3 \pm 1,5$ °C pour *L. sericata*, de $29,6 \pm 1,6$ °C pour *C. vomitoria*, et de $22,4 \pm 1,5$ °C pour *C. vicina*. Bien que ces températures élevées soient rares et saisonnières dans nos régions, il est justifié de penser que les larves puissent être en continuelle recherche de cette température sur un cadavre.

En effet, un corps en décomposition, en raison de l'activité bactérienne [350], de celle des larves [125], ou encore de son exposition lumineuse [350], présente des niveaux de température hétérogènes. Il peut ainsi présenter des « microclimats » où la température est supérieure à celle de son environnement [75]. Ces zones seraient donc potentiellement attractives pour les larves se développant sur le corps, modifiant ainsi leur historique thermique par rapport à la température ambiante.

Comportement thermique

Les larves des mouches Calliphoridae sont à la recherche de leur température préférentielle sur le corps : une stratégie de régulation thermique, qui permettrait d'optimiser leur développement, semble donc exister. La question se pose donc de savoir si ce comportement de régulation thermique permet également aux larves de se prémunir des températures extrêmes. En effet, du fait de l'augmentation de chaleur due aux masses de larves, il n'est pas rare d'observer, au sein d'un agrégat, des températures très élevées pouvant dépasser le seuil létal supporté par les individus [28]. Il a longtemps été postulé que le déplacement des larves leur permettait de se refroidir, en périphérie de l'agrégat, avant qu'elles ne réintègrent le centre, point le plus chaud de la masse. La température qu'elles rencontrent au sein même de la nourriture qu'elles prélèvent a une action sur leur comportement [70]. En effet, en utilisant un logiciel de suivi vidéo, l'analyse du comportement d'une larve de *L. sericata* soumise à de la nourriture chauffée à 25 °C (expérience témoin), à 34 °C (température préférentielle de l'espèce [167]) ou à 38 °C (température létale pour l'espèce [28]) a montré que les larves pouvaient se nourrir quelle que soit la température de la nourriture fournie. Cependant, dans les conditions de températures élevées, le temps total passé dans la zone nutritive et la durée de chaque passage des larves sont diminués. Dans ces conditions, les asticots se nourrissent

donc rapidement, puis s'éloignent de la zone chaude pour se placer dans des conditions de température plus faible, limitant ainsi leur exposition aux températures extrêmes. Un comportement de régulation thermique fort semble donc exister. Ces observations confirment celles montrant un *turn-over* continu au sein des masses larvaires [148]. Elles corroborent l'hypothèse d'une stratégie permanente d'optimisation thermique chez les larves de Diptères nécrophages. Il est cependant important de garder à l'esprit que les larves forment continuellement des groupes et qu'il existe, en plus de la température, un potentiel effet des congénères sur les comportements individuels, aboutissant à l'émergence d'un choix collectif différent de la somme des décisions individuelles.

Action des congénères sur le comportement

Les congénères et le groupe peuvent avoir un effet sur le comportement individuel des larves, affectant ainsi leurs choix sur le cadavre et leur thermorégulation. Le groupe a un effet attractif sur les individus [98], orientant la larve dans son choix de localisation et donc, potentiellement, de température. Le groupe a également un effet rétentif [99]. Il limite le déplacement de la larve pouvant l'empêcher de quitter la zone dans laquelle se situe l'agrégat. Ces effets de groupe sont observables pour des interactions homo-spécifiques (entre mêmes espèces) et hétérospécifiques (entre espèces différentes). La taille du groupe semble néanmoins plus importante que la nature de l'espèce présente au sein de l'agrégat.

Ces phénomènes d'attraction, de rétention et de dégagement thermique, produits par les masses larvaires, permettent donc l'apparition de « boucles de renforcement » aboutissant à l'auto-amplification du phénomène de groupe, ce qui augmente les bénéfices du groupe et optimise le développement larvaire : plus le groupe sera important, plus il émettra de chaleur et plus il sera attractif pour les individus. Il est donc finalement difficile de connaître avec certitude l'historique thermique d'une larve. Il dépendra non seulement de son comportement, mais également d'un ensemble d'interactions complexes entre les individus et l'environnement local de l'agrégat.

Thermorégulation et application à l'expertise

L'expertise entomologique est réalisée en utilisant la température ambiante comme référence (évaluée par des thermostats en condition intérieure, ou des stations météorologiques, quand il s'agit de l'extérieur [351]). Les études qui ont permis de déterminer les durées de développement des espèces à différentes températures ont été, jusqu'à présent, réalisées dans des conditions stables, contrôlées, dans lesquelles les fluctuations de température reposaient sur la précision d'incubateurs. Ces données ne reproduisent donc pas l'effet réel de la température ambiante sur le développement larvaire. Elles ne prennent pas en compte l'émission de chaleur au sein des agrégats, le comportement de thermorégulation des larves, ni l'action des congénères sur le groupe. Connaître avec précision

l'historique thermique des larves se développant sur un corps est donc difficile avec ces paramètres pré-déterminés. L'estimation de l'IPM inclut, dans le protocole actuel de datation, une marge d'erreur qui est appropriée. Cependant, l'utilisation de la température ambiante comme référence ne semble donc pas adaptée aux conditions précises d'expertises. Bien que les larves soient en recherche, sur le cadavre, de leur température préférentielle, ou d'une zone s'en rapprochant, l'utilisation de la température ambiante comme unique paramètre pour la détermination de la date de mort reste imprécise : il est en effet nécessaire de connaître l'historique de la cartographie thermique de la victime (la chronologie des températures présentes dans toutes les zones du cadavre). Il est de plus indispensable que cette température soit toujours mesurable sur le corps en décomposition. Ce paramètre, qui dépend de nombreux phénomènes comme l'activité bactérienne ou l'ensoleillement, n'est, à ce jour, absolument pas prédictible. Elle ne permet donc pas de mettre en évidence de potentielles zones sur le cadavre qui soient attractives pour les larves.

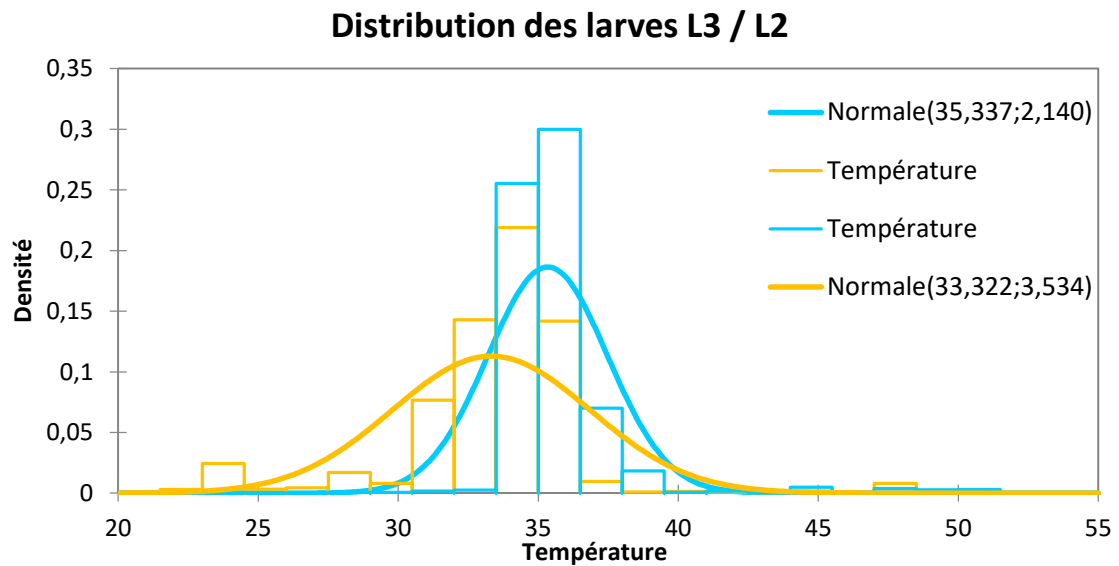
Les recherches actuelles tentent d'affiner les connaissances sur le comportement complexe de thermorégulation des larves en déterminant de nouveaux paramètres. Il est ainsi important de connaître le réel effet des congénères sur les individus et de confronter cet effet à celui qu'a la température sur ces individus. Soumettre une larve à ces deux paramètres simultanément devrait permettre de comprendre comment les larves réagissent face à un groupe ou une nouvelle zone de température optimale et ainsi, de distinguer un strict choix, d'un compromis. Il est également important de connaître avec précision le développement des larves dans des conditions qui leur permettent d'exprimer leurs comportements de thermorégulation dans toute leur complexité. Ceci permettra d'identifier des divergences pouvant exister avec les données actuelles relatives au développement des larves, qui sont, jusqu'à présent, fondées sur des expériences de privation de leur capacité de régulation thermique. Ces nouvelles données permettront d'introduire le comportement de thermorégulation dans le calcul de l'intervalle post-mortem minimum et ainsi d'augmenter la précision de la datation du décès, en réduisant la marge d'erreur tolérée pour l'expertise.

Le grégarisme étant le premier stade de socialité, ce comportement est fortement étudié chez d'autres arthropodes et insectes [125]. De fortes similitudes sont en effet retrouvées entre les espèces grégaires. Il est donc possible d'appliquer les théories proposées à d'autres modèles animaux. Parallèlement, les larves de *L. sericata* sont utilisées en asticothérapie [352]. En effet, ces larves assainissent les plaies en les désinfectant et en facilitant la cicatrisation. Apporter de nouvelles données sur le comportement des asticots permettrait donc non seulement d'améliorer le protocole actuel d'expertise, mais également d'optimiser l'utilisation de ces larves dans ce domaine médical.

Généralement considérés comme rebutants et associés à la pourriture, les asticots représentent pourtant une source pour appréhender les phénomènes sociaux et les stratégies évolutives. La compréhension de leur comportement est également importante pour des applications dans des domaines comme la justice ou la médecine. Poursuivre ces recherches devrait conduire, sur le long terme, à affiner les protocoles d'expertises et médicaux, facilitant ainsi leur utilisation au quotidien.

Annexe 2 : Température préférentielle de *Lucilia sericata* selon le stade larvaire

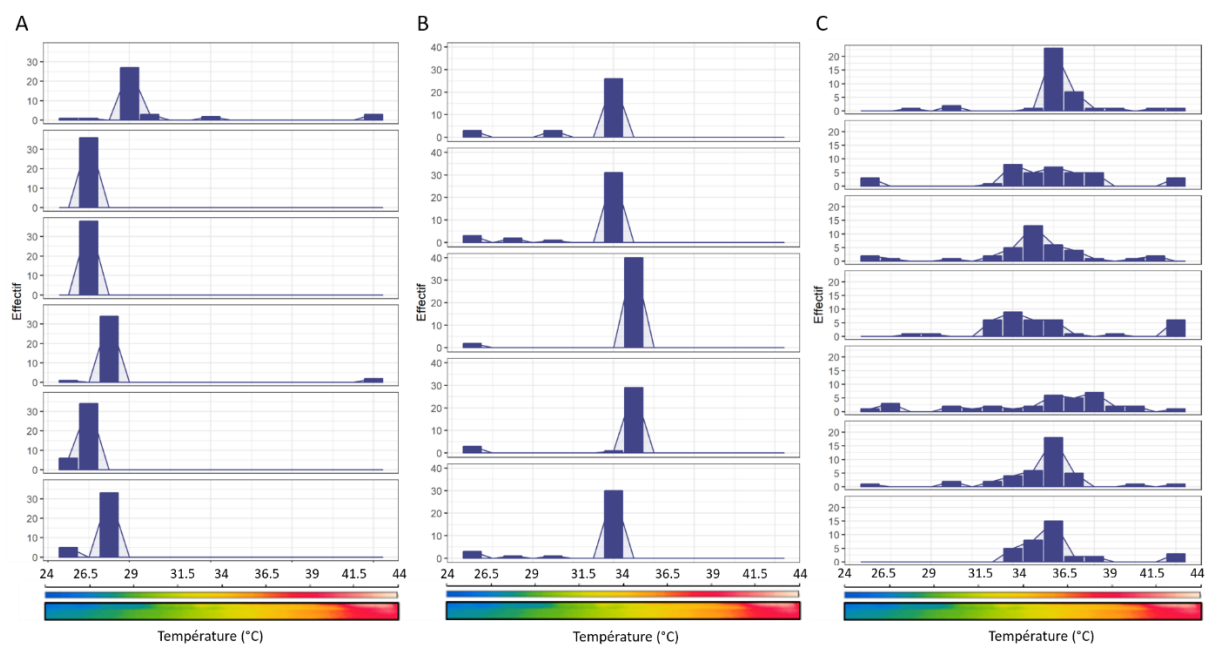
Résultats obtenus par Inès Leleu lors de son stage de recherche de Master 1 Biologie et Santé de Lille.



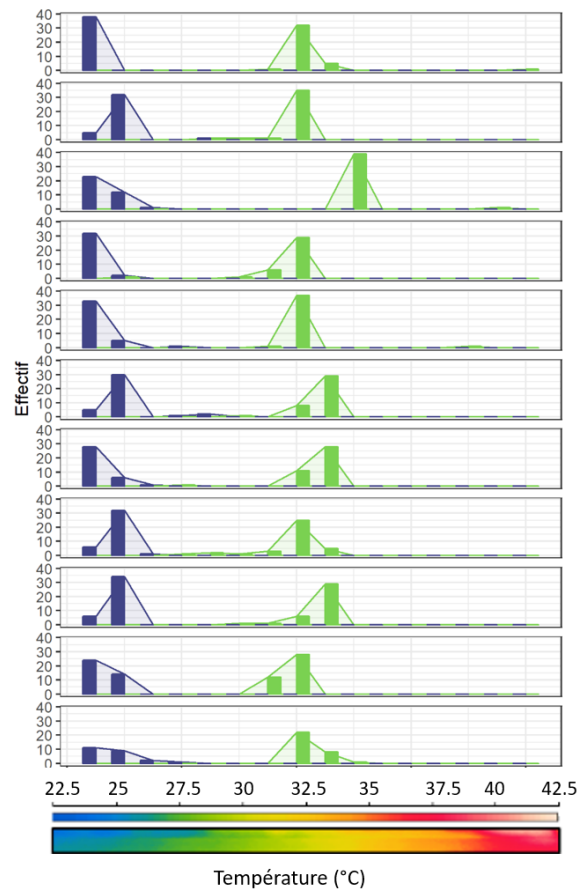
En bleu, les résultats pour les larves de stade 2 et en jaune, pour les larves de stade 3 [167]. Les histogrammes représentent la densité des larves dans le Thermograde en fonction des zones thermiques. Les courbes représentent la Gaussienne modélisant les résultats. Nous observons ici une température de 35.5 ± 2.14 °C pour les larves de stade 2, ce qui est significativement au-dessus de la température préférentielle des larves de stade 3 (33.3 ± 1.5 °C ; T-Student : $p < 0.0001$).

Annexe 3 : Groupes hétérosécifiques

Des expériences en supplément ont été réalisées, dont la première concernait la cinétique d'agrégation des différentes espèces à 4 h. Trois conditions ont été testées en conditions consécécifiques. Les deux premières consistaient à observer le positionnement de *Lucilia sericata* et *Calliphora vomitoria* après 4 heures dans le Thermograde. La dernière consistait à forcer l'agrégation de *Lucilia sericata* en plaçant à sa température préférentielle un plot. Ce plot, composé de *Patafix* (UHU), permettait d'agir sur le thigmotactisme des larves. La seconde expérimentation est l'observation de l'agrégation hétérosécécifique de *Lucilia sericata* et *Calliphora vicina* placées en même temps dans le Thermograde.



Graphiques représentant la distribution des larves (effectif) en fonction de la température après 4 heures dans le Thermograde. A : *Calliphora vomitoria* pour 6 réplifications. B : *Lucilia sericata* forcée à s'agréger pour 5 réplifications. C : *Lucilia sericata* pour 7 réplifications.



Graphique représentant les 11 réplifications où les deux espèces sont placées en même temps dans le Thermograde. Chaque réplification représente la distribution (effectif) des espèces en fonction de la température. En bleu, *Calliphora vicina*, en vert, *Lucilia sericata*.

Communication

Ecrite

C. Aubernon, V. Hédouin, D. Charabidzé. 2019. The maggot, the ethologist and the forensic entomologist: sociality and thermoregulation in necrophagous larvae. *Journal of Advanced Research* DOI : [10.1016/j.jare.2018.12.001](https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.12.001)

J. Boulay, **C. Aubernon**, V. Hédouin, D. Charabidzé. 2019. Mixed-species aggregations in arthropods. *Insects Science*. DOI : [10.1111/1744-7917.12502](https://doi.org/10.1111/1744-7917.12502)

J. Podhorna, **C. Aubernon**, M. Borkovcova, J. Boulay, D. Charabidzé. 2018. To eat or get heat: Behavioral trade-offs between thermoregulation and feeding in gregarious larvae. *Insects Science* DOI : [10.1111/1744-7917.12465](https://doi.org/10.1111/1744-7917.12465)

Y. Delannoy, T. Colard, E. Le Garff, V. Mesli, **C. Aubernon**, G. Penel, V. Hédouin, D. Gosset. 2016. Effects of the environment on bone mass: A human taphonomic study. *Journal of Legal Medicine*. 20 : 61-67

C. Aubernon, J. Boulay, V. Hédouin, D. Charabidzé. 2016. Thermoregulation in gregarious Dipteran larvae: evidence of species-specific temperature selection. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 120(2) : 101-108

C. Aubernon, J. Boulay, D. Charabidzé. 2014. Comportement et développement des larves nécrophages. *Insectes cadavres et scène de crime*. D. Charabidzé et M Gosselin. Edition DeBoeck 79-90

Orale

C. Aubernon, V. Hédouin, D. Charabidzé. 2018. Post-feeding necrophagous larvae pupation strategies: A link with molting hormones titers? HBA. Tours – France.

C. Aubernon, V. Hédouin, D. Charabidzé. 2018. The good: they are tool in forensics, the bad: their behavior is complex, the ugly: they are necrophagous maggots. Ento'18. Edge Hill University – Royaume-Uni.

C. Aubernon, D. Charabidzé, V. Hédouin. 2018. The behaviour of maggots and its consequences for development time calculation. EAFE. Munich – Allemagne.

C. Aubernon, D. Charabidzé, V. Hédouin. 2016. Thermoregulation in Calliphorids larvae. EAFE. Budapest – Hongrie.

C. Aubernon, D. Charabidzé, A. Depeme, C. Devigne, V. Hédouin. 2015. Do flies truly lay their eggs in wounds? From a criminal case to laboratory experiments. EAFE. Huddersfield - Royaume-Uni.

C. Aubernon, D. Charabidzé, D. Gosset. 2015. Thermoregulation in necrophagous larval masses. FNRS aggregation. Gembloux - Belgique.

Affichées

Y. Delannoy, T. Colard, **C. Aubernon**, J. Boulay, V. Hédouin, D. Gosset. 2015. The effects of soil environment on bone mass: a human prospective taphonomic study. AAFS. Orlando - USA.

Vulgarisation

Ecrite

C. Aubernon, V. Hédouin, D. Charabidzé. 2017. Les larves de Diptère nécrophages en entomologie médico-légale : une histoire de température : *Médecine Science*. 33(8-9) : 779-783.

L. Pernet, **C. Aubernon**, D. Charabidzé. 2015. La thermorégulation chez les insectes : de la cigale à la fourmi. *Espèces*. 17 : 44-49

Orale

Participation à plusieurs éditions de la *Fête de la Science*, organisée par le CNRS et l'Université de Lille. J'ai pu animer un stand sur la taphonomie, le recyclage de la matière organique ou encore sur le principe d'erreur en sciences.

J'ai présenté mon sujet de thèse lors du concours Ma thèse en 180 secondes

J'ai participé à plusieurs cours de vulgarisations dans des collèges dont celui de Marchiennes et d'Haubourdin.

C. Aubernon, D. Charabidzé, V. Hédouin. 2016. Thermoregulation in necrophagous dipteran larvae: Application in forensic entomology. JAV. Lille - France

Encadrements

2019 : Laëtitia Poirier, Master 2 Recherche : Stratégies d'empupement des larves de Calliphoridae. Université Rennes 1. Master Sciences, Technologie et Santé mention Biologie-Agronomie-Santé Spécialité Comportement Animal et Humain.

2018 : Pierre Vallet, Master 2 Recherche : Cinétique d'agrégation et préférence thermique chez *Calliphora vomitoria* et *Lucilia sericata*. Université Rennes 1. Master Sciences, Technologie et Santé mention Biologie-Agronomie-Santé Spécialité Comportement Animal et Humain. Co-encadrement avec Damien Charabidzé.

2016 : Nathanaël Carlier, Master 1 : Etude du comportement de fuite induit par la température chez les larves de *Lucilia sericata*. Université de Lille. Master Taphonomie.

2016 : Inès Leleu, Master 1 Recherche : Préférences thermiques chez deux stades larvaires de Diptères nécrophages. Université Lille 1. Master Biologie Santé parcours Biologie Cellulaire. Co-encadrement avec Damien Charabidzé.

2015 : Laura Pernet, Master 2 Recherche : Stratégies comportementales de régulation thermique chez les larves nécrophages (*Lucilia sericata*, Diptera : Calliphoridae). Université Rennes 1. Master Sciences, Technologie et Santé mention Biologie-Agronomie-Santé Spécialité Comportement Animal et Humain. Co-encadrement avec Damien Charabidzé.

Prix

Juin 2016 : Prix Médecine/Science. Ce prix est attribué, après évaluation par un jury académique, à la meilleure présentation, selon les critères de la revue (excellence et divulgation scientifiques), réalisée au cours des journées doctorales de l'école ED 446 - Biologie-Santé - Lille.

Mai 2016 : Prix du publique en finale régionale Haut de France du concours Ma Thèse en 180 secondes.