

Estimation de l'âge de la nymphe de *Calliphora vicina*, *C. vomitoria* et *Lucilia sericata* par l'observation de caractères morphologiques externes (Diptera, Calliphoridae)

par Thierry PASQUERAULT, Laetitia CERVANTES, Laurent DOUREL,
Benoît VINCENT, Emmanuel GAUDRY & Christophe ROCHETEAU†

Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale, Département Entomologie,
1 boulevard Théophile-Sueur, F – 93110 Rosny-sous-Bois <thierry.pasquerault@gendarmerie.interieur.gouv.fr>

Résumé. – Dans la perspective d'une utilisation en entomologie forensique, il est proposé de séquencer l'évolution de la nymphe de trois espèces de Diptères Calliphoridae : *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830, *C. vomitoria* (Linné, 1758) et *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) sur la base de caractères morphologiques externes afin d'estimer l'âge lors de leur phase de métamorphose. Ainsi, une observation simple par transparence met en évidence cinq séquences majeures identifiables dans le développement nymphal des deux espèces de *Calliphora* et quatre pour *Lucilia sericata*. Après dissection, les résultats sont plus précis. Pour les *Calliphora* étudiées, neuf séquences sont individualisées, sept pour *L. sericata*. Ce séquençage est exprimé en pourcentage de la durée totale du développement nymphal.

Abstract. – **Estimating the age of the nymph of *Calliphora vicina*, *C. vomitoria* and *Lucilia sericata* by observing external morphological characters (Diptera, Calliphoridae).** The authors propose to sequence the evolution of the nymph based upon external morphological characters observation thorough the pupation with aim to estimate the age the specimen. The study was carried out during the metamorphosis of three species of Diptera Calliphoridae of forensic importance: *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830, *C. vomitoria* (Linné, 1758) and *Lucilia sericata* (Meigen, 1826). Thus, a simple observation in transparency shows five main sequences identified in the pupal development for the two species of *Calliphora* and four sequences for *Lucilia sericata*. After dissection, the results are more accurate, with nine sequences for all the *Calliphora* studied, and seven for *L. sericata*. Results are expressed as a percentage of the total duration of pupal stage development.

Keywords. – Forensic entomology, pupal stage, external morphological characters, post-mortem interval estimation.

L'estimation du délai post-mortem minimum, fondée sur la détermination du moment de la première ponte sur le corps par les Diptères nécrophages, est l'une des applications principales de l'entomologie médico-légale. Ce délai, période comprise entre le décès de la victime et la découverte du corps, peut être estimé par la relation directe qui existe entre le temps de développement de ces Diptères et la température subie au cours de leur développement. Ces temps de développement sont connus pour la majorité des espèces en question, sous la forme de données obtenues à températures constantes (DAVIES & RATCLIFFE, 1994 ; LEFEBVRE & PASQUERAULT, 2004 ; RICHARDS & VILLET, 2008 ; HIGLEY & HASKELL, 2009). L'un des modèles mathématiques permettant d'estimer l'âge d'un individu à partir de données de températures fluctuantes est le modèle d'accumulation des degrés/jour (MARCHENKO, 2001 ; RICHARDS & VILLET, 2008). Cette méthode fiable impose l'élevage des spécimens jusqu'à la fin du stade pupal, matérialisée par l'émergence de l'adulte. En présence d'individus morts au stade pupal ou larvaire, aucun élevage n'est possible. Dans le cas d'individus morts au stade pupal, seul un large intervalle de ponte peut être estimé (début et fin de pupaison). Une méthode alternative doit être utilisée pour une meilleure précision car le stade pupal représente près de la moitié de la vie immature de l'insecte (GREENBERG & TANTAWI, 1993).

Le cycle de développement des Insectes Diptères Cyclorhaphes, auxquels appartiennent les Calliphoridae, est composé chronologiquement de quatre stades morphologiques : œuf,

larve, pupa et adulte. Le stade œuf représente une très faible part de la durée totale de ce cycle comme décrit par HIGLEY & HASKELL (2009). Le développement larvaire peut être séquencé en trois stades (ERZINÇLIOĞLU, 1985). La larve de 1^{er} stade est caractérisée par une absence de stigmates antérieurs. Les stigmates antérieurs apparaissent au 2^e stade, les stigmates postérieurs présentent 2 fentes. La 3^e fente stigmatique postérieure apparaît au 3^e stade. La prépupe se caractérise par un changement de coloration et le jabot se vide (ZDAREK & FRAENKEL, 1972). Ces caractères sont aisément identifiables. En revanche, au cours du stade pupal l'évolution de la nymphe est effectuée à l'intérieur d'un puparium. L'évolution des caractères morphologiques n'est donc pas observable directement. Aussi, en termes de datation, à l'exception d'un début de pupaison ou d'une émergence imminente, il n'est pas possible d'estimer précisément l'état de développement de la nymphe. Bien que les mécanismes histologiques soient bien connus (PEREZ, 1910 ; BAUTZ, 1971 ; JARVILLEHTO & FINELL, 1983 ; SIVASUBRAMANIAN & BIAGI, 1983), ils sont contraignants à mettre en évidence et peu aisés pour une datation. A l'occasion de l'étude des mécanismes histologiques ou d'études spécifiques, certains auteurs comme FINEL & JARVILLEHTO (1983), FRAENKEL & BHASKARAN (1973) ou PUJOL-LUZ & BARROS-CORDEIRO (2012) ont présenté des caractères morphologiques externes directement observables sur la nymphe.

Toutefois, l'étude de l'évolution des caractères morphologiques de la nymphe peut être réalisée également avec des méthodes d'imagerie virtuelle comme décrite par RICHARDS *et al.* (2012). La datation des pupes peut également être réalisée par dosage hormonal (GAUDRY *et al.*, 2006).

Dans la présente étude, le développement pupal de trois espèces de Calliphoridae d'intérêt forensique majeur, *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830, *C. vomitoria* (Linné, 1758) et *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), est séquencé par l'observation de l'évolution des caractères morphologiques de la nymphe après avoir extrait celle-ci de l'enveloppe pupale. Il est proposé une méthode rapide et pragmatique pouvant être facilement utilisée en routine afin d'estimer l'âge des spécimens morts au stade pupal.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Espèces étudiées. – Le choix des espèces étudiées s'est porté sur celles les plus fréquemment rencontrées dans les dossiers relatifs à l'estimation du délai post-mortem réalisés au sein du département entomologie de l'IRCGN (Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale) depuis 1992 comme il apparaît dans le bilan dressé par GAUDRY *et al.* (2001). Au 31 juillet 2012, 1070 examens ont été réalisés pour la France métropolitaine ainsi que pour les départements et territoires d'outre-mer français. *Calliphora vicina* est présente dans 381 cas (36%), *C. vomitoria* 341 fois (32%) et *Lucilia sericata* 229 fois (21%).

Les souches de *Calliphora vicina* et *C. vomitoria* proviennent de piégeages réalisés avec de la viande de bœuf à Rosny-sous-Bois (93) (48°52'23"N - 2°29'7"E). La souche de *Lucilia sericata* provient du commerce des vers de pêche et est produite à Béziers (34) (43°34'42"N - 3°15'79"E). Ces spécimens sont élevés en enceinte climatique et les adultes obtenus en première génération sont, dans un premier temps, identifiés à l'aide de l'ouvrage de Rognes (1991) pour s'assurer de la mono-spécificité de chacun des élevages réalisés, puis utilisés pour obtenir les pontes.

Conditions d'élevage des imagos. – L'élevage des imagos est effectué dans une cage d'élevage en plexiglas aérée de 74 cm³ placée dans une pièce climatisée dont la température varie entre 22 et 24°C. La photopériode de 16 : 8 est maintenue grâce à deux rampes de deux néons de 15 W chacune en complément de la lumière du jour.

Les imagos disposent d'eau et de sucre à volonté. Lorsque la ponte doit être provoquée, deux coupelles contenant 10 mL de sang frais de bœuf sont placées dans la cage pendant deux

jours pour stimuler l'activité ovarienne. Puis un morceau de muscle de bœuf de 30 g remplace le sang pour provoquer l'oviposition. Les morceaux de viande sont alors contrôlés visuellement toutes les heures. Lorsque la présence d'une mouche en activité de ponte est observée, l'intervalle d'observation est réduit à la demi-heure afin de prélever des pontes les plus récentes possibles. De ce fait, le moment de la ponte est connu à ± 15 min. Afin de synchroniser le début de l'expérimentation, après chaque ponte observée, la viande est retirée de la cage pour être placée en élevage sans manipulation des œufs.

Conditions d'élevage des immatures. – Les conditions générales d'élevage des stades larvaires sont réalisées selon le standard adopté et décrit dans les méthodes d'essais en cours au sein du département entomologie (accréditation Cofrac, NF EN ISO/CEI 17025, n° 8-2527, disponible sous www.cofrac.fr).

Les œufs sont pondus sur un morceau de muscle de bœuf de 30 g. Chaque amas ainsi constitué est placé sur un lit de sable de $2,0 \pm 0,5$ cm dans une boîte en plexiglas (L : 27 cm ; l : 14 cm ; H : 8 cm). Plusieurs boîtes d'élevage sont ainsi réalisées pour chacune des espèces. Les œufs ne sont pas comptés afin d'éviter leur manipulation.

Les boîtes sont placées dans une enceinte climatique de marque Sanyo, à température constante de consigne de $24,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Le suivi de la température dans l'enceinte climatique est assuré par une station d'acquisition de température de marque Jumo®. L'humidité relative est comprise entre 45 et 75 %, et la photopériode réglée sur un cycle de 16 : 8.

Deux observations quotidiennes (à 8 h 00 et à 18 h 00) sont réalisées durant la phase larvaire.

Régulièrement, de la viande de bœuf est ajoutée afin d'assurer aux larves une quantité de nourriture suffisante pour ne pas générer un phénomène de compétition alimentaire. Aucune surpopulation notable dans les boîtes n'est observée.

Une rotation des boîtes dans l'enceinte climatique est réalisée quotidiennement pour limiter l'influence des variations de température au sein de l'appareil (DOUREL *et al.*, 2011).

Protocole de prélèvement des pupes. – Afin de garantir l'homogénéité de l'échantillonnage, les pupes prélevées sont choisies parmi celles dont la coloration est brun orangé attestant d'une pupaison récente inférieure à 2 heures.

À l'apparition de la première pupa, les observations et prélèvements des pupes sont effectués quatre fois par jour (6 h 00, 12 h 00, 18 h 00 et 00 h 00).

Les pupes sont prélevées lors de ces contrôles et placées dans des boîtes de Petri contenant du sable. Elles sont nommées "J=0" et portent mention de l'heure de prélèvement (J=0 6H, J=0 12H, J=0 18H, J=0 24H).

Toutes les 24 heures, la dénomination de ces quatre boîtes de Petri est incrémentée de 1 ("J=0 6H" devenant "J=1 6H" par exemple).

Les nouvelles pupes prélevées dans les boîtes d'élevage sont alors placées, dans les mêmes conditions, sous la dénomination "J=0 6H" "J=0 12H" "J=0 18H" ou "J=0 24H" selon l'heure du prélèvement.

À partir de J=7, les boîtes de Petri et leur contenus sont transférés dans des boîtes circulaires en matière plastique (diamètre de 8 cm), grillagées afin d'éviter la fuite possible des insectes adultes susceptibles d'émerger.

Au total, 30 pupes de chaque espèce sont prélevées par chaque période de 24 h, de J=0 à J=X (X étant le nombre de jours nécessaires pour obtenir les premières émergences).

Chaque pupa est isolée dans un tube Eppendorf®, dans une solution d'éthanol à environ 70 %, avant d'être disséquée.

Des photos générales et de détails des caractères observés sont réalisées sous stéréomicroscope Leica MZ 16.

Test de contrôle. – La mortalité des pupes dans l'éthanol à environ 70 % a été testée : 50 pupes supplémentaires sont prélevées chaque jour jusqu'au début des premières émergences (J=0 à J=8 pour *L. sericata*, J=0 à J=9 pour *C. vicina* et *C. vomitoria*) et sont ensuite immergées dans un pilulier totalement rempli d'éthanol à environ 70 % à température ambiante.

Après 1, 3, 6, 12 et 24 heures d'immersion, 10 pupes sont rincées à l'eau puis replacées en élevage dans les conditions précédemment décrites.

Dissection. – La dissection s'effectue sous stéréo-microscope Leica MZ16, avec un grossissement moyen de 40×, dans de l'éthanol à environ 70 % pour faciliter le décollement des divers téguments.

Les pupes sont incisées latéralement à l'aide d'un scalpel au niveau de l'étranglement du tiers antérieur (zone naturellement fragilisée). Une incision longitudinale supplémentaire est généralement nécessaire. La nymphe est alors extraite à l'aide d'une pince fine.

En raison de l'adhérence des téguments sur la face interne des très jeunes pupariums, la dissection est délicate.

Observations. – Une étude préliminaire menée par PASQUERAULT *et al.* (2002) a défini les caractères morphologiques les plus discriminants de la nymphe. L'ensemble des caractères morphologiques étudiés et décrits ci-dessous est commun aux trois espèces étudiées.

Avant la dissection, la nymphe est observée avec une source de lumière froide à travers le puparium sans décoloration artificielle de celui-ci. Ainsi, pattes et ailes peuvent être mises en évidence. La pilosité thoracique et abdominale devient de plus en plus visible dans le temps en raison de l'intensification de la pigmentation des soies. La coloration des yeux devient réellement observable lorsque celle-ci atteint une coloration rosée soutenue. La coloration soutenue voire noire des aristas et du proboscis est également un élément intéressant.

Après la dissection, les éléments ou évolutions morphologiques suivants sont retenus dans la présente étude.

- Les crochets buccaux (fig. 2) peuvent être encore insérés dans la nymphe dans la direction opposée à leur position en phase larvaire. Dans ce cas, les téguments de la nymphe et ceux formant le puparium sont confondus. Il est donc pratiquement impossible de séparer la nymphe de son enveloppe. Les crochets buccaux peuvent aussi adhérer au puparium.

- Les ailes et les pattes sont distinguables (fig. 3). Les tarsi apparaissent et s'individualisent progressivement.

- La pigmentation des pattes (fig. 4). Les pattes sont considérées comme pigmentées lorsqu'elles ne sont plus beige clair et/ou translucides, mais brunâtres jusqu'à noires.

- Les yeux (fig. 5). La délimitation du tour de l'œil apparaît marquée très tôt par un sillon pigmenté très net. La pigmentation rouge rosé de l'œil est plus délicate à observer et pas toujours uniforme sur sa surface. Cette pigmentation peut s'atténuer dans le temps lorsque la nymphe disséquée est conditionnée dans une solution alcoolisée.

- La pilosité thoracique et abdominale (fig. 6-7). Une fois visible, elle évolue d'un aspect translucide à une coloration noire en passant par des nuances de brun-gris selon l'âge de la nymphe. Cette pigmentation n'est pas toujours uniforme et peut apparaître sur le thorax et pas encore sur l'abdomen. De la même façon, les soies post-oculaires ainsi que la pilosité des pattes peuvent apparaître à un moment différent.

- La coloration du proboscis peut être de trois types. Sans pigmentation (fig. 8), il est alors translucide avec le canal central parfois visible. Il peut être pigmenté en brun foncé (fig. 9), mais de façon non uniforme, ou être totalement noir (fig. 10).

- La coloration de la trompe et des ocelles (fig. 11) rouge rosé apparaît de façon franche.

- Le sac ptilinaire (fig. 12). La membrane du sac ptilinaire, en cours de déploiement, est visible.

RÉSULTATS

Test de la mortalité en solution d'éthanol. – Le test de contrôle de survie des pupes immergées en éthanol à 70 % montre que quelques émergences sont observées après une immersion de 1 et 3 heures. Toutefois, aucune émergence d'insecte adulte n'est obtenue après 12 heures d'immersion. Il existe une homogénéité de ces observations pour les trois espèces étudiées.

Caractères observables par transparence du puparium. – Les résultats de l'observation des caractères morphologiques avec une lumière transmise à travers le puparium sont exprimés,

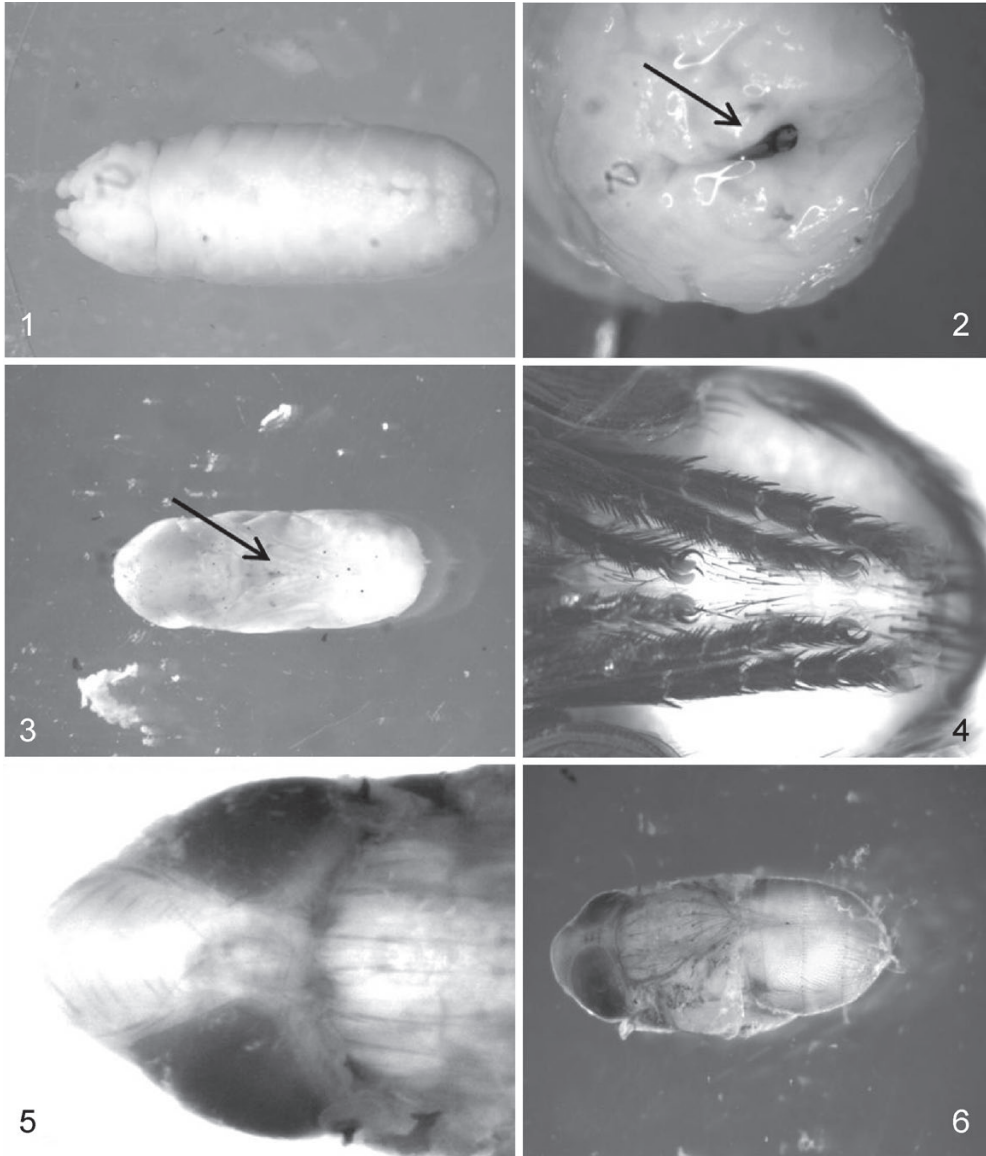


Fig. 1-6. – Caractères morphologiques observés [1-2 : *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy ; 3, 5-6 : *Lucilia sericata* (Meigen) ; 4 : *C. vomitoria* (Linné)]. – 1, Corps non segmenté. – 2, Crochets buccaux de la larve non invaginés. – 3, Pattes et ailes visibles mais non pigmentées. – 4, Tarses pigmentées. – 5, Pigmentation des yeux. – 6, Pilosité translucide.

dans les tableaux suivants, selon le pourcentage d'observation dans la population élevée à 24°C : -, caractère non visible ou visible chez moins de 15 % des spécimens ; +, visible chez 16 à 30 % des spécimens ; ++, visible chez 31 à 75 % des spécimens ; +++, visible chez 76 à 100 % des spécimens.

Pour les trois espèces étudiées, les premiers caractères morphologiques observables par transparence sont les pattes et les ailes. La morphologie générale de la nymphe apparaît vers 30 % de la durée totale de développement nymphal.

Les caractères morphologiques plus fins apparaissent plus tard aux environs de 70 % de la durée totale de développement nymphal. La pilosité est d'autant plus visible que sa pigmentation est soutenue.

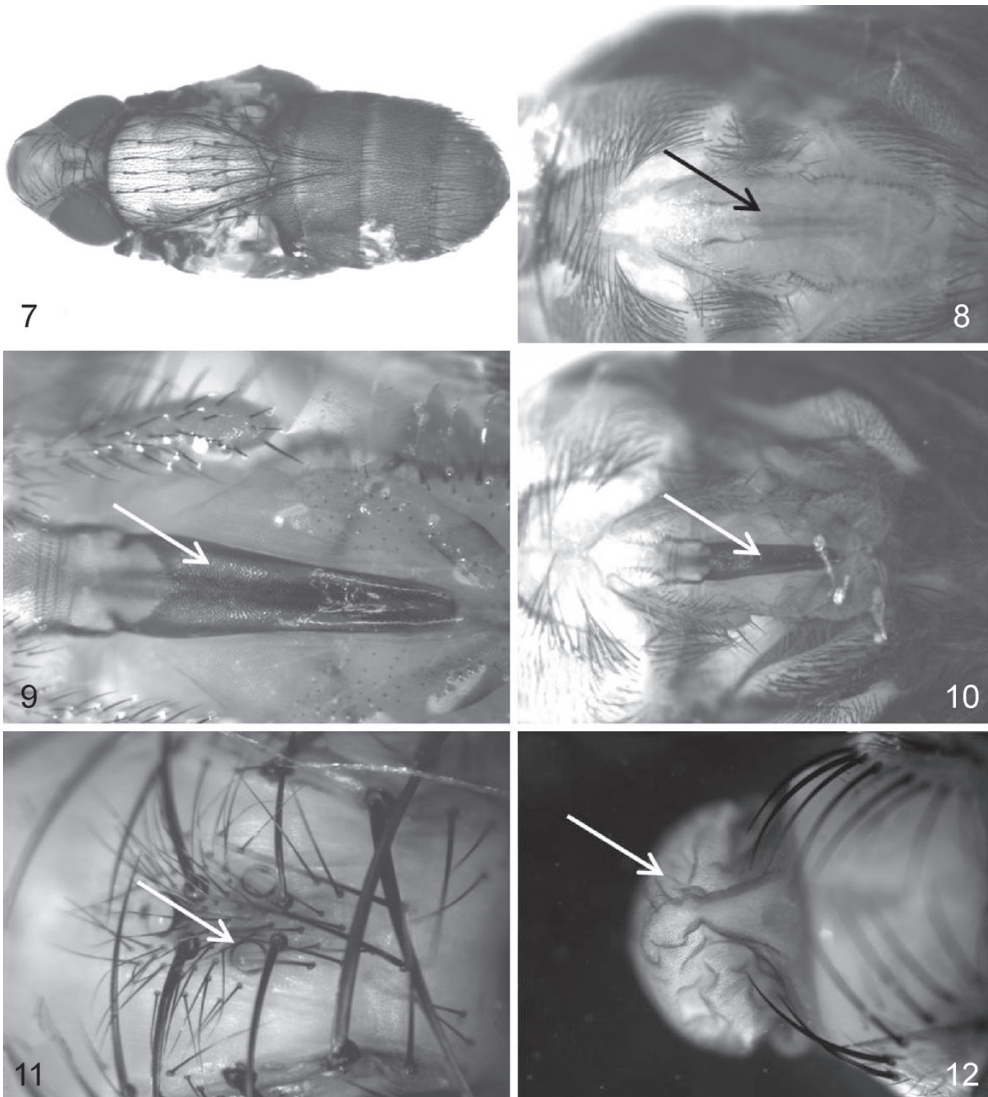


Fig. 7–12. – Caractères morphologiques observés [7, 10–12 : *Lucilia sericata* (Meigen); 8 : *Calliphora vomitoria* (Linné); 9 : *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy]. – 7, Pilosité noire. – 8, Proboscis non pigmenté. – 9, Proboscis pigmenté. – 10, Proboscis noir. – 11, Coloration des ocelles. – 12, Déploiement du sac ptilinaire.

Enfin, le proboscis devient visible principalement lorsque sa coloration est bien contrastée. Dans les derniers temps précédant l'émergence de l'insecte adulte, l'ensemble des caractères est facilement identifiable.

Les résultats sont synthétisés dans les tableaux I à III.

Caractères observables par dissection. – De la même façon, les résultats sont exprimés en % de la durée totale de développement nymphal à 24°C.

En raison de l'adhérence des téguments sur la face interne du puparium des très jeunes pupes (J=0 et J=1), le taux de réussite de la dissection est faible. A J=0 (pupe âgée de 0 et 6 heures) le taux de réussite est de 20 %. Il est de 75 % à J=1. Ce taux augmente à 100 % dès J=2.

Après dissection, les résultats suivants sont observés pour les trois espèces étudiées.

Tableau I. – Apparition des caractères dans la population étudiée (N=30) à 24°C pour *Calliphora vicina*
(- : caractère non visible ou chez moins de 15 % des spécimens ; + : visible chez 16 à 30 % ;
++, visible chez 31 à 75 % des spécimens ; +++, visible chez 76 à 100 % des spécimens).

Intervalle d'étude	J=0	J=1	J=2	J=3	J=4	J=5	J=6	J=7	J=8	J=9	J=10
% du temps total de développement	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Pattes visibles	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Ailes visibles	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Yeux rouges	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++
Pilosité thoracique et abdominale	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++
Arista visible	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++
Proboscis noir	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++

Tableau II. – Apparition des caractères dans la population étudiée (N=30) à 24°C pour *Calliphora vomitoria*
(- : caractère non visible ou chez moins de 15 % des spécimens ; + : visible chez 16 à 30 % ;
++, visible chez 31 à 75 % des spécimens ; +++, visible chez 76 à 100 % des spécimens).

Intervalle d'étude	J=0	J=1	J=2	J=3	J=4	J=5	J=6	J=7	J=8	J=9	J=10
% du temps total de développement	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Pattes visibles	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Ailes visibles	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Yeux rouges	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
Pilosité thoracique et abdominale	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
Arista visible	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
Proboscis noir	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++

Tableau III. – Apparition des caractères dans la population étudiée (N=30) à 24°C pour *Lucilia sericata*
(- : caractère non visible ou chez moins de 15 % des spécimens ; + : visible chez 16 à 30 % ;
++, visible chez 31 à 75 % des spécimens ; +++, visible chez 76 à 100 % des spécimens).

Intervalle d'étude	J=0	J=1	J=2	J=3	J=4	J=5	J=6	J=7	J=8	J=9
% du temps total de développement	0	11	22	33	44	55	66	77	88	100
Pattes visibles	-	-	-	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
Ailes visibles	-	-	-	+	+	++	+++	+++	+++	+++
Yeux rouges	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
Pilosité thoracique et abdominale	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
Arista visible	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
Proboscis noir	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++

– La présence des crochets buccaux retournés et insérés dans la nymphe indique un stade de développement très peu avancé (inférieur à 10 % de la durée totale de développement).

– Les ailes et les pattes sont visibles très tôt, vers 20 % de la durée de développement nymphal. Toutefois les tarses apparaissent plus progressivement mais sont toujours visibles à partir de 40 %.

– La pigmentation des pattes commence par l'apex (tarse 5 et les griffes) à partir de 50-60 % de la durée de développement, puis cette pigmentation devient plus régulière et franche à partir de 80 %.

– La délimitation du tour de l'œil apparaît marquée par un sillon pigmenté très net à compter de 60 % de la durée de développement nymphal. La pigmentation de l'œil est plus délicate à observer. À environ 70 %, la pigmentation rouge est très nette chez *L. sericata* et *C. vomitoria*. Pour *C. vicina*, un tiers des spécimens a des yeux pigmentés dès 50 %. Cette observation doit pouvoir se faire au cours des deux premières semaines car une dépigmentation peut apparaître ultérieurement lorsque la nymphe est conditionnée en éthanol.

– La pilosité du corps apparaît à 60-70 % de la durée totale de développement nymphal pour les trois espèces. Dans un premier temps translucide, elle se colore en brun-gris avant de devenir noire à 80 % de la durée totale de développement. Même translucide, la pilosité est visible par transparence à travers le puparium. Il faut noter que les soies post-oculaires et la pilosité des pattes apparaissent un peu plus tôt. Pour *C. vicina* et *C. vomitoria*, la pigmentation de la pilosité apparaît plus rapidement sur le thorax que sur l'abdomen.

– La coloration du proboscis devient vraiment visible et individualisée à partir de 30 % de la durée totale de développement nymphal. Elle se fait alors en trois phases distinctes. Entre 30 et 50 % de la durée totale de développement nymphal le proboscis est translucide. Le canal central est parfois visible. À 60 %, le canal est de plus en plus visible et se colore en brun foncé à noir. À partir de 80 %, mais surtout à 90 % de la durée totale de développement nymphal, l'ensemble du proboscis se colore en différentes nuances de brun. En fin de développement, l'ensemble du proboscis devient noir.

– La coloration rouge de la trompe et des ocelles apparaît très nettement et de façon franche. Elle est indicatrice de la fin de l'évolution de la nymphe. Elle apparaît lorsque le développement de la nymphe est proche de son issue (pour les trois espèces).

– Le déploiement du sac ptilinaire, ayant pour fonction d'ouvrir le puparium, apparaît lorsque l'émergence est imminente. Cette étape est très brève.

Les résultats des observations sont synthétisés dans les tableaux IV à VI.

DISCUSSION

Le test de mortalité des pupes en solution d'éthanol montre que le conditionnement choisi ne permet pas la survie des spécimens au-delà de 12 heures et est donc compatible pour une estimation de la durée de développement pupal avec pour intervalle d'étude minimal 24 heures. Le choix de cet intervalle est dicté par l'expression des résultats obtenus lors de l'estimation du délai post-mortem minimum. Ainsi, la capacité de survie des nymphes en milieu alcoolique étant inférieure à cet intervalle, elle n'induit pas de biais dans l'exploitation des résultats.

Avant dissection. – L'observation de la nymphe par transparence ne permet pas de séquencer le développement nymphal avec précision. Il convient de remarquer que la précision obtenue est différente selon les espèces. Pour *C. vicina* et *C. vomitoria*, à partir de 30 % de la durée totale de développement nymphal total, des phases sont distinguables tous les 20 % jusqu'à 80 % (10 % entre 70 et 80 %). Après 80 % il n'y a pas de caractères pouvant affiner le résultat. Pour *L. sericata*, en revanche, la précision est moindre, les premiers caractères sont observables à compter de 50 % environ de la durée totale de développement nymphal. L'apparition de plusieurs

Tableau VI. – Expression de l'évolution des caractères morphologiques externes de la nymphe de *Lucilia sericata* (N=30) en % de la durée totale du de développement pupal (- : caractère non visible ; + : caractère visible).

% de la durée totale de développement pupal	< 10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Tagmes non séparés, crochets buccaux attachés à la nymphe	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tagmes, pattes, ailes et yeux visibles	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pattes pigmentées et pilosité visible	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Pilosité grise	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Pilosité et pattes noires, nervation alaire, antennes, palpes pigmentés	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Proboscis bicolore, trompe ocre-brun	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Proboscis noir	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Trompe rouge, déploiement de la ptiline, ocelles rouges	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

50 % de la durée de développement pupal, il n'est pas observé de caractères pouvant affiner l'estimation de l'âge des nymphes. De 60 % à la fin du développement pupal, un séquençage avec un pas de 10 % est possible.

L'expression des résultats en % de la durée de développement pupal totale, et non pas seulement en jours, permet une utilisation de cette étude avec des modèles de calcul de développement en degrés/jour. Cette application est majoritairement utilisée dans les cas d'intérêt forensique réalisés en criminalistique.

CONCLUSION

L'observation des caractères morphologiques distinguables par transparence peut mettre en évidence cinq séquences majeures identifiables dans le développement pupal des *Calliphora* et quatre séquences pour la troisième espèce étudiée, *Lucilia sericata*.

Pour les caractères morphologiques observables après dissection, les résultats du séquençage sont plus précis. Les deux espèces du genre *Calliphora* se dissocient de *L. sericata* avec un séquençage plus fin (9 pour *Calliphora*, 7 pour *Lucilia*).

Ce séquençage exprimé en pourcentage de la durée de développement pupal, et non sous la forme de données temporelles brutes, permet l'application de ces résultats pour toutes les données de développement disponibles dans la bibliographie, et ce quelle que soit la température.

Des méthodes plus lourdes comme les coupes histologiques et colorations, le dosage hormonal ou autres peuvent apporter une précision accrue mais au détriment de la facilité et de la rapidité d'exécution ; leur coût est aussi plus élevé. Cette méthode simple permet de séquencer la phase pupale avec une précision compatible avec une pratique pragmatique de l'entomologie légale utilisée en routine.

REMERCIEMENTS. – Les auteurs remercient Mélanie Monges de l'Institut de Recherche Criminelle qui a participé aux nombreuses heures d'observation de jour comme de nuit nécessaires à cette expérimentation.

AUTEURS CITÉS

- BAUTZ A.-M., 1971. – Chronologie de la mise en place de l'hypoderme imaginal de l'abdomen de *Calliphora erythrocephala* Meig. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, **112** (1) : 157-181.
- DAVIES L. & RATCLIFFE G.-G., 1994. – Development rates of some pre-adult stages in blowflies with reference to low temperatures. *Medical and Veterinary Entomology*, **8** : 245-254.

- DOUREL L., GAUDRY E., VINCENT B., PASQUERAULT Th. & CERVANTES L., 2011. – *Quality assurance and temperature: how to reduce a potential bias in the Post-Mortem Interval estimation*. Communication orale. 9th Meeting of the European Association for Forensic Entomology – Torun, Pologne.
- ERZINÇLIOĞLU Y.-Z., 1985. – Immature stages of British *Calliphora* and *Cynomya*, with a re-evaluation of the taxonomic characters of larval Calliphoridae (Diptera). *Journal of Natural History*, **19** : 69-96.
- FINELL N. & JARVILLEHTO M., 1983. – Development of the compound eyes of the blow-fly *Calliphora erythrocephala*: changes in morphology and function during metamorphosis. *Annales zoologici Fennici*, **20** : 223-234.
- FRAENKEL G. & BHASKARAN G., 1973. – Pupariation and pupation in cyclorrhaphous flies (Diptera): terminology and interpretation. *Annals of the Entomological Society of America*, **66** : 418-422.
- GAUDRY E., BLAIS C., MARIA A. & DAUPHIN-VILLEMANT C., 2006. – Study of steroidogenesis in pupae of the forensically important blow fly *Protophormia terraevovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, **160** : 27-34.
- GAUDRY E., MYSKOWIAK, J.-B. CHAUVET B., PASQUERAULT Th., LEFEBVRE F. & MALGORN Y., 2001. – Activity of forensic entomology department of the French Gendarmerie. *Forensic Science International*, **120** : 68-71.
- GREENBERG B. & TANTAWI T., 1993. – Different developmental strategies in two Boreal blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, **30** (2) : 481-484.
- HIGLEY L. & HASKELL N., 2009. – Insect development and forensic entomology (p. 389-405). In : Byrd J. H. & Castner J. L. (éds), *Forensic entomology, the utility of arthropods in legal investigations*, 2^e édition., CRC LLC, Boca Raton : 705 p.
- JARVILLEHTO M. & FINELL N., 1983. – Development of the function of visual receptor cells during the pupal life of the fly. *Calliphora*. *Journal of Comparative Physiology*, **150** : 529-536.
- LEFEBVRE F. & PASQUERAULT Th., 2004. – Temperature-dependent development of *Ophyra aenescens* (Wiedemann) and *Ophyra capensis* (Wiedemann) (Diptera, Muscidae). *Forensic Science International*, **139** : 75-79.
- MARCHENKO M.-I., 2001. – Medicolegal relevance of cadaver entomofauna for the determination of the time of death. *Forensic Science International*, **120** : 89-109.
- PASQUERAULT Th., ROCHETEAU C. & GAUDRY E. 2002. – *Determination of nymph development stages by observations of morphological characters*. Poster présenté au 1^{er} European forensic entomology seminar, Rosny-sous-Bois, France.
- PÉREZ C., 1910. – Recherches histologiques sur la métamorphose des muscides : *Calliphora erythrocephala* Mg. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, (5) **4** : 1- 274.
- PUJOL-LUZ J.-R. & BARROS-CORDEIRO K.-B., 2012. – Intra-puparial development of the females of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*, **56** (3) : 269-272.
- RICHARDS C.-S., SIMONSEN T.-J., ABEL R.-L., HALL M.-J., SCHWYN D.-A. & WICKLEIN M., 2012. – Virtual forensic entomology improving estimates of minimum post mortem interval with 3D micro-computed tomography. *Forensic Science International*, **220** : 89-109.
- RICHARDS C.-S. & VILLET M.-H., 2008. – Factors affecting accuracy and precision of thermal summation models of insect development used to estimate post-mortem intervals. *International Journal of Legal Medicine*, **122** : 401-408.
- ROGNES K., 1991. – Blowflies (Diptera, Calliphoridae) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna entomologica Scandinavica*, **24** : 272 p.
- SIVASUBRAMANIAN P. & BIAGI B., 1983. – Morphology of the pupal stages of the fleshfly *Sarcophaga bullata* (Parker) (Diptera: Sarcophagidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, **12** (5-6) : 355-359.
- ZDAREK J. & FRAENKEL G., 1972. – The mechanism of puparium formation of flies. *Journal of Experimental Zoology*, **179** : 315-324.
-